

Untersuchungen zur posttranskriptionellen
Expressionskontrolle des epithelialen Natrium-Kanals ENaC
unter Aldosteron und Vasopressin

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

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

vorgelegt von
Andrea Perlewitz
aus Berlin

April 2010

Die Arbeit wurde von Januar 2006 bis April 2010 unter der Leitung von Prof. Dr. sc. nat. B. J. Thiele am Institut für Vegetative Physiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. sc. nat. B. J. Thiele, Charité-Universitätsmedizin Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. W. Schuster, Freie Universität Berlin

Die Disputation erfolgte am 31.05.2010.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	7
1.1 BEDEUTUNG DER OSMOTISCHEN- UND WASSER-HOMÖOSTASE	7
1.1.1 <i>Rolle der Natrium-Homöostase</i>	8
1.2 DER EPITHELIALE NATRIUM-KANAL ENAC.....	9
1.2.1 <i>Die physiologische Rolle des ENaC</i>	10
1.2.2 <i>Die pathophysiologische Rolle des ENaC</i>	11
1.2.3 <i>Struktur der ENaC-Untereinheiten, Zusammensetzung des ENaC-Kanals und Maus Knockout-Modelle</i>	12
1.2.4 <i>Regulation der ENaC Expression und Aktivität</i>	14
1.2.5 <i>Regulation der ENaC Expression unter Aldosteron und Vasopressin in der Niere</i>	17
1.3 POSTTRANSKRIPTIONELLE REGULATION DER GENEXPRESSION	21
1.3.1 <i>Regulationsebenen der Genexpression</i>	21
1.3.2 <i>Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation</i>	22
1.3.3 <i>RNA/ Protein Interaktionen</i>	24
1.3.4 <i>Untranslatierte Regionen (UTRs) als regulative Elemente</i>	25
1.3.5 <i>5'UTRs</i>	26
1.3.6 <i>3'UTRs</i>	27
1.4 EINGLIEDERUNG DER ARBEIT.....	30
1.5 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	31
2 MATERIAL UND METHODEN	32
2.1 ZELLKULTUR.....	32
2.1.1 <i>Kultur der mCCD_{cl1}-Zellen</i>	32
2.1.2 <i>Hormon-Stimulation</i>	32
2.1.3 <i>mRNA-Stabilitäts-Assay</i>	33
2.1.4 <i>Transfektion von Zellen für Reportergen (Luziferase)-Assays</i>	33
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE METHODEN	34
2.2.1 <i>RNA-Isolation und DNase-Verdau</i>	34
2.2.2 <i>Klonierung von PCR-Fragmenten</i>	34
2.2.3 <i>Klonierung der Luziferase-Expressionsvektoren</i>	35
2.2.4 <i>Plasmid-DNA-Präparationen</i>	35
2.2.5 <i>Quantifizierung der mRNA durch RT-PCR</i>	36
2.2.6 <i>Isolation von zytosolischen Proteinen</i>	37
2.2.7 <i>Fraktionierung von Polysomen und mRNPs durch Ultrazentrifugation</i>	37
2.2.8 <i>Polysomengradienten-Analyse</i>	38
2.2.9 <i>Western-Blot Analyse</i>	39
2.3 METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG VON RNA/PROTEIN-INTERAKTIONEN.....	40
2.3.1 <i>RNA-Affinitätschromatographie</i>	40
2.3.2 <i>Identifizierung von Proteinen durch MALDI-TOF-MS</i>	41
2.3.3 <i>Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)</i>	41
2.3.4 <i>UV-Crosslinking-Assay</i>	41
2.3.5 <i>Ko-Immunpräzipitation von RNA aus Zellextrakten (RNA-Pulldown-Assay)</i>	42
2.4 DENSIMETRISCHE ANALYSE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG	43
3 ERGEBNISSE	44
3.1 EXPRESSION DER ENAC UNTEREINHEITEN IN MCCD _{cl1} ZELLEN UNTER DEM EINFLUSS VON ALDOSTERON ODER VASOPRESSIN	44
3.2 VERTEILUNG DER ENAC mRNAs ZWISCHEN TRANSLATIONSAKTIVEN POLYSOMEN UND TRANSLATIONSINAKTIVEN mRNPs	48
3.3 EXPRESSION EINES LUZIFERASE-REPORTERGEN-KONSTRUKTS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER γ -ENAC mRNA 3'UTR UNTER ALDOSTERON UND DDAVP IN MCCD _{cl1}	49
3.4 UNTERSUCHUNG DER γ -ENAC 3'UTR AUF BEKANNTE RNA-BINDUNGS-MOTIVE	52
3.5 EINFLUSS VON ALDOSTERON ODER VASOPRESSIN AUF DIE ENAC mRNA-STABILITÄT.....	54
3.6 EINFLUSS VON ALDOSTERON UND DDAVP AUF DIE TRANSLATIONS-EFFIZIENZ DER ENAC mRNAs	57
3.7 BINDUNG VON PROTEINEN AUS ZYTOPLASMATISCHEN EXTRAKTEN VON MCCD _{cl1} ZELLEN AN DIE γ -ENAC mRNA 3'UTR IN VITRO	60

3.8	IDENTIFIZIERUNG VON RNA-BINDUNGSPROTEINEN DER γ -ENAC 3'UTR MITTELS RNA-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	61
3.9	UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION MÖGLICHER RBPs DER γ -ENAC 3'UTR IN MCCD _{CL1} ZELLEN UNTER STIMULATION MIT ALDOSTERON ODER DDAVP	63
3.10	VERÄNDERUNG DER ASSOZIATION BESTIMMTER RBPs AN POLYSOMEN UNTER DER STIMULATION DURCH ALDOSTERON ODER DDAVP	65
3.11	EINFLUSS KOTRANSFIZIERTER RBPs AUF DIE LUZIFERASE-EXPRESSION IN ABHÄNGIGKEIT DER γ -ENAC mRNA 3'UTR	67
3.12	EFFEKT EINER HUR ÜBEREXPRESSION AUF DIE γ -ENAC EXPRESSION IN MCCD-ZELLEN UND BINDUNG AN IN VITRO TRANSKRIPTTE DER γ -ENAC 3'UTR.....	70
3.13	IN VIVO INTERAKTION VON HUR MIT DER γ -ENAC mRNA UNTER DER STIMULATION MIT ALDOSTERON ODER DDAVP	73
4	DISKUSSION.....	75
4.1	EXPRESSION DER ENAC-UNTEREINHEITEN UNTER ALDOSTERON ODER DDAVP	76
4.2	POSTTRANSKRIPTIONELLE REGULATION DER ENAC-EXPRESSION UNTER ALDOSTERON ODER DDAVP	79
4.3	ROLLE RNA-BINDENDER PROTEINE DER γ -ENAC 3'UTR FÜR DIE γ -ENAC TRANSLATION UNTER ALDOSTERON ODER DDAVP	82
4.4	BEDEUTUNG DER POSTTRANSKRIPTIONELLEN EXPRESSIONSKONTROLLE FÜR DIE EXPRESSION DER ENAC-UNTEREINHEITEN UNTER ALDOSTERON ODER DDAVP	90
4.5	AUSBLICK	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
6	SUMMARY	95
7	LITERATURVERZEICHNIS	97
8	PUBLIKATIONEN	108
9	DANKSAGUNG.....	109

Abkürzungsverzeichnis

ADH	antidiuretisches Hormon
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
ANP	atriale natriuretische Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
ARE	AU-reiches Element
ARE-BP	AU-reiches Element Bindungsprotein
AS	Aminosäure
AVP	Arginin-Vasopressin
b	Base(n)
bp	Basenpaar(e)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA (engl.)
Cl ⁻	Chlorid-Ion
cpm	counts per minute (engl.)
dDAVP	1-deamino-8-D-Arginin Vasopressin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DNA	desoxyribonucleic acid (engl.)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphat gepufferter Salzlösung
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay (engl.)
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	fötale Kälberserum
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein (engl.)
g	Gramm
Gly	Glycin
H ⁺	Wasserstoff-Ion
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
His	Histidin
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
IRE	Iron Response Element (engl.)

Abkürzungen

IRES	interne Ribosomenbindungsstelle (Internal Ribosome Entry Site; engl.)
IRP	Iron Regulatory Protein (engl.)
k	kilo-
K ⁺	Kalium-Ion
kDa	kilo Dalton
l	Liter
m	milli-
M	Molar
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flights Mass Spectroscopy (engl.)
μ	mikro-
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA (engl.)
mRNP	messenger ribonucleoprotein (engl.)
N ⁺	Natrium-Ion
nt	Nukleotid(e)
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction (engl.)
RBP	RNA-Bindungsprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleintriphosphat
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
sek	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBE	Trisbase mit Borsäure und EDTA
TBS	Tris buffered saline (engl.)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	Einheit (engl. unit)
UTP	Uraciltriphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett

1 *Einleitung*

1.1 *Bedeutung der osmotischen- und Wasser-Homöostase*

Die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der osmotischen Homöostase und der Wasser-Homöostase ist die Grundvoraussetzung für Organismen zur Existenz in Lebensräumen, deren osmotische Verhältnisse nicht denen ihrer Gewebe entsprechen. Daher entwickelten sich im Laufe der Evolution dem jeweiligen Lebensraum angepasste spezielle Mechanismen und Organe zur Regulation des Ionen- und Wasserhaushalts. Bei den Säugetieren ist die Niere das zentrale Organ für die Osmoregulation. Sie ist verantwortlich für die Ausscheidung von überschüssigem Wasser und wasserlöslichen Substanzen, wie Salzen, körperfremden Stoffen (Giftstoffen, pharmazeutischen Substanzen) und Stoffwechselendprodukten, insbesondere der stickstoffhaltigen Stoffwechselendprodukte (z. B. Harnstoff, Kreatinin). Die Aufgabe der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts, sowie des Säure-Basen-Haushalts sind dabei eng mit dieser Ausscheidungsfunktion verbunden, wobei die Elektrolyt-Homöostase und die Wasserausscheidung unter einer ständigen hormonellen Kontrolle stehen, die ihrerseits über das Blutvolumen und den Blutdruck beeinflusst wird. So führt ein Blutdruck-Abfall zur Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der Nieren-Glomeruli und bewirkt somit eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems. Durch Angiotensin II wird dabei die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde und von Vasopressin (auch antidiuretisches Hormon (ADH) oder Arginin-Vasopressin (AVP)) aus dem Hypothalamus und dem Hypophysenhinterlappen induziert. Dieses führt in der Niere letztendlich zu einer verstärkten Reabsorption von Na^+ und Wasser. Einen gegensätzlichen Effekt hat das atriale natriuretische Peptid (ANP oder atrialer natriuretischer Faktor (ANF)), das bei erhöhtem Blutdruck aus dem Vorhof des Herzens freigesetzt wird und zu einer gesteigerten Na^+ -Ausscheidung und Urinbildung führt. Zusätzlich hemmt es die Freisetzung von Renin und Vasopressin sowie die Bildung von Aldosteron.

1.1.1 Rolle der Natrium-Homöostase

Na^+ ist mit einer Konzentration von ~142 mM bei einer Gesamtkonzentration von ~153 mM an Kationen (Werte bezogen auf das Blut beim Menschen) das wichtigste extrazelluläre Kation. Was sich dadurch widerspiegelt, dass NaCl für mehr als 90% des osmotischen Drucks im Extrazellularraum verantwortlich ist. Die Aufrechterhaltung der Na^+ -Homöostase ist daher entscheidend für die Elektrolyt- und Wasser-Homöostase des Körpers. Von besonderer Bedeutung hierbei ist die Regulation der Na^+ -Rückresorption aus dem Primärharn im distalen Nephron und dem Sammelrohr der Niere. Dabei werden den 180 l Primärharn unter anderem (bei einer täglichen Aufnahme von etwa 10 g NaCl) mehr als 99% des NaCl und etwa 99% des Wassers wieder entzogen. Dieses führt zu einer Reduktion des Volumens von ursprünglich 180 l Primärharn (Ultrafiltrat), mit einer enthaltenen Menge von 1800 g NaCl, auf 0,5-2,0 l an letztendlich ausgeschiedenem Endharn mit einem NaCl-Gehalt von etwa 1 g (Durchschnittswerte für einen erwachsenen Menschen). Dabei ist schon seit Jahrzehnten bekannt, dass ein enger Zusammenhang zwischen dem zum Teil auf dem Blutdruck beruhenden renalen Perfusionsdruck und der renalen Ausscheidung von Natrium und Wasser besteht (60). Nach diesem Modell der "renal body fluid pressure control" führt eine Erhöhung des Blutdruckes zu einer vermehrten Ausscheidung von Natrium und Wasser (26, 105), eine Senkung des Blutdrucks dagegen zu einer Retention von Natrium und Wasser. Weiterhin induziert eine Erhöhung des extrazellulären Natriumspiegels einen Blutdruck-Anstieg, wohingegen die Abnahme des Natriumspiegels eine Blutdruck-Senkung bewirkt. Dies beruht auf einer vermutlich sekundären Anpassung der Wasser-Ausscheidung an den veränderten Natriumbestand (26). Die exakte Regulation der renalen Natrium-Ausscheidung gilt dabei als zentrales Element der Blutdruckregulation. Auf molekularer Ebene wird sie durch eine Zahl unterschiedlicher Na^+ -Transportmechanismen entlang des Nephrons der Niere reguliert. Diese beinhalten nach den derzeitigen Kenntnissen den Transport durch folgende Transportproteine: den Na^+/H^+ -Antiporter (NHE3), den Bumetamid-sensitiven $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC2), den Thiazid-sensitiven Na^+/Cl^- -Transporter (NCC), den Amilorid-sensitiven epithelialen Natriumkanal (ENaC), die $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter und -Austauscher (NBC-1 u. a.) sowie die Na^+/K^+ -ATPase (94, 70, 75, 53).

Die Aufklärung der genauen Regulation und der Zusammenhänge zwischen der renalen Natriumresorption und einer krankhaften Erhöhung des Blutdrucks (Hypertonie) sind aufgrund der enorm hohen Prävalenz von großer Bedeutung. So liegt Deutschland mit einer Hypertonieprävalenz (definiert als Blutdruck $\geq 140/90$ und/oder antihypertensiver Therapie) von insgesamt über 55% bei der Altersgruppe der 35- bis 64-Jährigen im internationalen Vergleich mehrerer europäischer Länder, der USA und Kanada vorn (153). Als Folge von Hypertonie können Herzhyperthrophie und –insuffizienz sowie hämorrhagische Schlaganfälle auftreten. Ebenso ist Hypertonie einer der Hauptrisikofaktoren für arteriosklerotische Gefäßveränderungen, die zu Herzinfarkten, ischämischen Schlaganfällen, Niereninsuffizienzen sowie Durchblutungsstörungen der Beine führen können (153). Für eine Entwicklung von Therapien ist dabei die Aufklärung der Zusammenhänge zwischen der renalen Natrium-Reabsorption und der Regulation des Blutdrucks sowie die Kenntnis über die genaue Regulation aller daran beteiligten Komponenten und Prozesse notwendig.

1.2 Der epitheliale Natrium-Kanal ENaC

Im distalen Nephron und dem Sammelrohr der Niere ist der Na^+ -Transport über den epithelialen Natriumkanal ENaC der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Na^+ -Rückresorption. Der transzelluläre Na^+ -Transport über die polarisierten Epithelzellen beruht dabei auf zwei parallel ablaufenden Prozessen: Der Erste umfasst den passiven Transport von Na^+ aus dem Tubuluslumen in das Zytoplasma der Epithelzelle. Dieser Schritt wird durch den Amilorid-sensitiven ENaC vermittelt, wobei Na^+ -Ionen entlang eines elektrochemischen Gradienten über die apikale Membran der Epithelzelle diffundieren. Der Zweite besteht aus einem aktiven Transport von Na^+ über die basolaterale Membran der Epithelzelle in den extrazellulären Raum. Dieser Prozess wird unter Energieverbrauch durch die Na^+/K^+ -ATPase vermittelt, wobei pro verbrauchtem ATP drei Na^+ -Ionen im Austausch gegen zwei K^+ -Ionen aus der Zelle transportiert werden. Er ist somit auch für den Aufbau und die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten über die Zellmembran verantwortlich. In der Bilanz findet eine Reabsorption von Na^+ aus dem Lumen (Urin) ins Blut statt, bei einer gleichzeitigen Sekretion von K^+ über den K^+ -Kanal ROMK.

1.2.1 Die physiologische Rolle des ENaC

ENaC ist ein spannungs-unabhängiger Kationen-Kanal, der hoch selektiv für Na⁺ gegenüber K⁺ ist und dessen Kanal-Pore durch das Diuretikum Amilorid blockiert werden kann (148, 147). Er gehört zur Familie der ENaC/ Degenerin (DEG) Ionen-Kanäle, die Anfang der 1990er Jahre entdeckt wurden. Vertreter dieser Familie existieren sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten. Als erstes wurden die Degenerin-Gene *deg-1* und *mec-4* Anfang der 1990er Jahre bei *Caenorhabditis elegans* identifiziert. Die neue Klasse der Ionen-Kanäle erhielt den Namen Degenerine zunächst aufgrund des beobachteten Phänotyps funktionsloser Mutanten der Gene *deg-1* und *mec-4*, die zu einer Degeneration der Tast-Rezeptor-Neurone führte (21, 38). Bislang konnten mehr als 60 Mitglieder der ENaC/ DEG Familie identifiziert werden, die einen hohen Grad an funktioneller Heterogenität aufweisen, was sich unter anderem in ihrer Expression in den unterschiedlichsten Gewebetypen widerspiegelt (12, 72).

So wird ENaC unter anderem besonders in der apikalen Membran polarisierter Epithelzellen der Niere, und des Kolons exprimiert, wo er essenziell an der Natrium-Resorption und der damit verbundenen Regulation der Na⁺- und K⁺-Homöostase, des Blutvolumens und Blutdrucks beteiligt ist (54, 123). Die Expression des ENaC konnte jedoch in einer Vielzahl anderer Organe und Gewebe nachgewiesen werden, wobei die Funktionen teilweise noch nicht geklärt sind. Er wird unter anderem im Epithel der Lunge exprimiert, wo er maßgeblich an der Regulation des alveolären Flüssigkeitsfilms beteiligt ist (65). ENaC wird außerdem im Epithel der Cochlea exprimiert und scheint dort eine wichtige Funktion für die Regulation der Zusammensetzung der Endolymphe zu besitzen (58). Des Weiteren konnte ENaC auch in Geschmacks-Rezeptorzellen der fungiformen Papillae des vorderen Teils der Zunge nachgewiesen werden und scheint dort bei der Wahrnehmung der Geschmacksqualität „salzig“ eine Rolle zu spielen (86, 88). Außerdem wurde eine Expression von ENaC in einer Zahl anderer Organe und Gewebe nachgewiesen, hierzu zählen Speicheldrüsen, Schweißdrüsen, Pankreas, Testis, Ovarien, sowie Keratinozyten der Epidermis und Epithelzellen von Haarfollikeln. Die Funktion des ENaC ist in diesen Fällen jedoch zum großen Teil noch ungeklärt (72, 88).

1.2.2 Die pathophysiologische Rolle des ENaC

Die Bedeutung des ENaC wird durch die Korrelation zu Krankheiten, in denen es zu einer Fehlregulation des ENaC kommt noch unterstützt. In Bezug auf die Nierenfunktion des ENaC konnte nachgewiesen werden, dass das Liddle-Syndrom, eine seltene autosomal dominant vererbte Form des Bluthochdrucks, auf gain-of-function Mutationen des ENaC beruht. Die vermehrte Na⁺-Reabsorption führt dabei zu einer Volumen-Expansion der extrazellulären Flüssigkeit, Hypertonie, Hypokalämie, und ist mit einem erniedrigten Aldosteron-Level und einer metabolischen Alkalose assoziiert (131, 62, 142, 154). Der Pseudohypoaldosteronismus Typ I (PHA I) ist ein weiteres erblich bedingtes Syndrom, das jedoch auf einer Fehlfunktion des ENaC durch loss-of-function Mutationen beruht. Als Folge kommt es zu einer gesteigerten Natrium-Ausscheidung die zu einer Hyponatriämie mit einer Volumen-Depletion und einer dadurch bedingten Hypotonie, sowie einer Hyperkalämie führt und mit einem erhöhten Aldosteron- und Renin-Level assoziiert ist (22, 140, 120). In Bezug auf die Entstehung anderer Formen der Hypertonie wurde ebenfalls begonnen die Bedeutung des ENaC in verschiedenen Untergruppen von Populationen zu untersuchen. Hierbei konnte die Assoziation des Auftretens verschiedener SNPs (single nucleotide polymorphisms) und einer Amilorid-Sensitivität mit dem Auftreten einer Hypertonie bei afrikanisch-stämmigen Amerikanern nachgewiesen werden (4, 6, 125). Die höchste Korrelation konnte dabei für den SNP Threonin 663 Alanin (in der α -ENaC Untereinheit) nachgewiesen werden, der unter europäisch-stämmigen wesentlich häufiger vertreten ist und mit dem Fehlen einer Hypertonie unter afrikanisch-stämmigen Amerikanern segregiert (126). Auch in Bezug auf seine physiologische Rolle in anderen Organen konnte eine Assoziation mit Krankheiten nachgewiesen werden. So konnte in Kolon-Biopsien von Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) oder Colitis ulcerosa, bei denen es im Verlauf der Krankheit zu einer Störung der Absorption von Na⁺- und Cl⁻-Ionen infolge von Durchfällen kommt, eine verminderte Expression von ENaC nachgewiesen werden (56, 79). In Bezug auf die ENaC-Funktion in der Lunge führt der Funktionsverlust von ENaC unter anderem bei PHA I zur Ausbildung von Lungenödemem und ist mit dem Atemnot-Syndrom (respiratory distress syndrom) von Neugeborenen assoziiert (73, 91). Bei der Cystischen Fibrose konnte dagegen eine Steigerung der ENaC vermittelten Na⁺-Absorption festgestellt

werden, die maßgeblich an der Ausbildung der Symptome von CF (Verminderung des Volumens der alveolären Flüssigkeit, verstärkte Entzündung der Atemwege) beteiligt ist (35, 93).

1.2.3 Struktur der ENaC-Untereinheiten, Zusammensetzung des ENaC-Kanals und Maus Knockout-Modelle

Der funktionelle Natrium-Kanal ENaC besteht aus den drei Untereinheiten α -, β - und γ -ENaC, die erstmals aus dem distalen Kolon der Ratte isoliert wurden (17, 18, 87). Die α -ENaC Untereinheit kann dabei in einigen Geweben durch eine vierte identifizierte Untereinheit, die δ -ENaC Untereinheit ersetzt werden, die vorwiegend im Pankreas, in Testis, Ovarien oder in neuronalem Gewebe exprimiert wird, wobei ihre physiologische Rolle noch nicht geklärt ist (148). Die Generierung von Knockout-Mäusen der drei Untereinheiten α -, β - oder γ -ENaC zeigte, dass jede der drei Untereinheiten essenziell ist, da er zu einem schwer geschädigten Phänotyp und neonatalem Tod der Tiere führte (7, 65, 98). α -ENaC Knockout-Mäuse litten unter Atemnot und starben innerhalb von 40 h nach der Geburt an Erstickung, da die alveoläre Flüssigkeit nicht vom Epithel der Lunge resorbiert wurde (65). Mäuse in denen ein Knockout der β -ENaC- oder γ -ENaC-Untereinheit erfolgte starben dagegen innerhalb der ersten 48 h nach der Geburt vermutlich an einer Hyperkalämie. Sie wiesen hohe Na^+ - und geringe K^+ -Werte im Urin, sowie eine verlangsamte Resorption der alveolären Flüssigkeit der Lunge auf. Der Effekt auf die Nierenfunktion des ENaC war jedoch ausschlaggebend für die Letalität des Knockouts. Der Phänotyp entsprach dabei dem klinischen Phänotyp des PHA I bei Neugeborenen des Menschen (7, 98).

Die Sequenzen der verschiedenen Untereinheiten sind zu 30-35% identisch, wobei einige strukturell entscheidende Motive zwischen den Untereinheiten hoch konserviert sind (72, 135). Jede der Untereinheiten besitzt zwei Transmembran-Domänen (M1 und M2), einen zytoplasmatischen Amino (N)- und Carboxy (C)-Terminus, sowie eine große glykosylierte extrazelluläre Domäne (Loop). Zu den hoch konservierten Motiven zählen ein Histidin-Glycin (His-Gly, HG) -Motiv in der N-terminalen zytoplasmatischen Domäne, die beiden α -helikalen Transmembran-Domänen M1 und M2, eine post-M1 und eine prä-M2-Domäne, sowie zwei Cystein-reiche Domänen (CRD II und III), eine Anzahl putativer

Phosphorylierungsstellen im extrazellulären Loop (6 bei α -ENaC, 12 bei β -ENaC, 5 bei γ -ENaC) und eine Prolin-reiche Domäne im zytoplasmatischen Bereich des Carboxy-Terminus. Die Prolin-reiche Domäne mit der Sequenz PPPxYxxL entspricht dabei der Konsensus-Sequenz eines PY-Motivs und vermittelt die Interaktion mit der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2. Wobei M2 und die prä-M2-Domäne ausschlaggebend für die Ausbildung der Pore und die Ionen-Selektivität sind. Die Bindung von Amilorid erfolgt ebenfalls im Bereich der prä-M2- und der äußeren M2-Region. Das HG-Motiv scheint eine wichtige Funktion für das Gating des Kanals zu besitzen. Die Cystein-Reste der CRD II und III scheinen in die Ausbildung von Disulfid-Brücken und an der Ausbildung der Tertiärstruktur beteiligt zu sein (16).

Die stöchiometrische Zusammensetzung des ENaC wird nach wie vor kontrovers diskutiert. So ließen ursprünglich Rekonstitutions-Versuche in *Xenopus* Oozyten auf ein Verhältnis von α_2 , β_1 , γ_1 schließen (48, 76). Wohingegen weitere funktionelle und biochemische Daten auf eine Zusammensetzung aus 9 Untereinheiten mit einem Verhältnis von α_3 , β_3 , γ_3 hindeuten (133). Dieses wird unterstützt durch elektronenmikroskopische Aufnahmen mit der Gefrierbruch-Technik, die ebenfalls auf eine Größe und Geometrie des Kanal-Komplexes von 8 bis 9 Untereinheiten deuten (42). Die neuesten kristallographischen Daten zeigen jedoch, dass der mit ENaC eng verwandte ASIC1-Kanal eine heterotrimere Struktur besitzt (69). Es gilt daher als wahrscheinlich, dass der funktionelle ENaC ebenfalls aus einem Heterotrimer mit der Zusammensetzung α_1 , β_1 , γ_1 besteht. Eine schematische Darstellung der Domänenstruktur der ENaC-Untereinheiten, sowie ein Modell zur ENaC-Kanalstruktur erfolgt in Abb. 1.1.

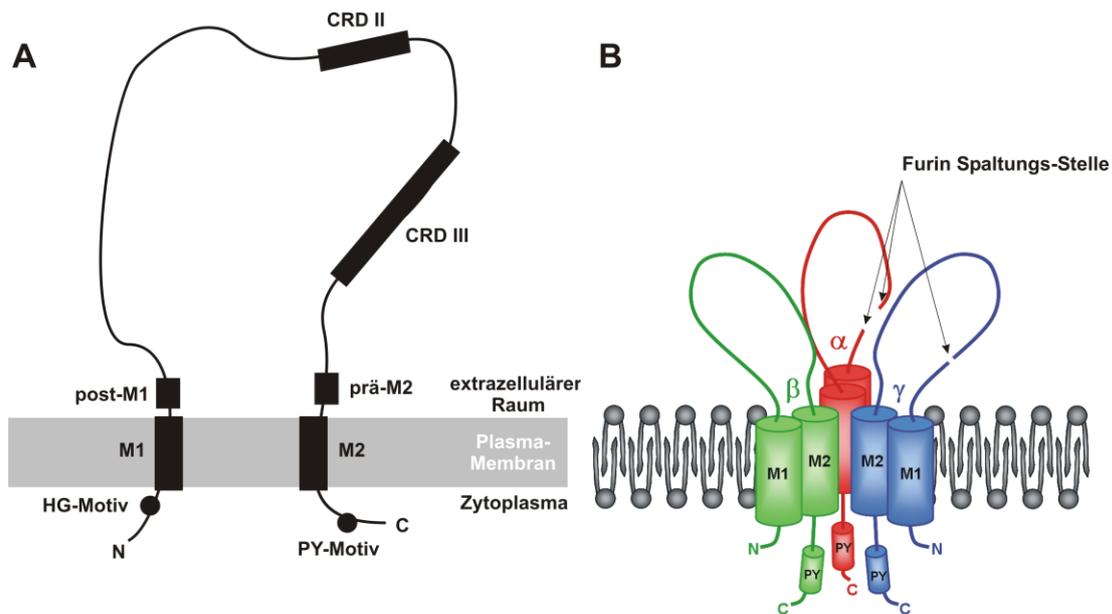


Abb. 1.1: Konservierte Domänen der ENaC-Untereinheiten und ihre topologische Organisation in der Membran sowie ein Modell der ENaC-Kanal-Struktur.

Schema der topologischen Organisation der ENaC-Untereinheiten in der Membran, mit den Transmembran-Domänen M1 und M2, dem konservierten His-Gly-Motiv (HG) im Amino (N)-terminalen und dem PY-Motiv im Carboxy (C)-terminalen Anteil der zytoplasmatischen Domänen. Im großen extrazellulären Loop befinden sich die Cystein-reichen Domänen I und II (CRD I, CRD II), sowie in unmittelbarer Nähe zur M1 und M2 Domäne die post-M1 und die prä-M2 Domäne (A). Modell der heterotrimeren Zusammensetzung des ENaC-Kanals aus den Untereinheiten α -ENaC, β -ENaC und γ -ENaC, bei dem alle drei Untereinheiten um eine zentrale Pore angeordnet sind. Das Modell basiert auf einer kristallographischen Analyse des eng verwandten ASIC1-Kanals (B).

1.2.4 Regulation der ENaC Expression und Aktivität

Alle vier ENaC-Untereinheiten α -, β -, γ - und δ -ENaC werden durch ein eigenes Gen kodiert SCNN1A, SCNN1B, SCNN1G und SCNN1D (17, 18, 87, 148, 147), wobei die Expression funktioneller ENaC-Kanäle in der Zellmembran auf einer komplexen Regulation beruht. Diese beinhaltet eine Regulation der Transkription der ENaC-Gene, Prozesse auf der posttranskriptionellen Ebene, aber auch der Assemblierung der ENaC-Untereinheiten und die Regulation des Einbaus der Kanäle in die Membran, sowie deren Internalisierung und ein anschließendes Recycling oder eine Degradation (10, 72, 74, 135).

In Bezug auf die Transkription und die Regulation der Posttranskription wurden die Mechanismen der ENaC-Expression bislang noch nicht hinreichend untersucht. Einige Studien zur Analyse der Promotorregionen von α -, β - und γ -ENaC zeigten jedoch, dass diese mehrere Ähnlichkeiten aufweisen, so fehlt allen drei Genen eine TATA-Box, dafür besitzen sie alle mehrere SP1- und PEA3-Konsensus-

Sequenzen (100, 103, 14). Für α -ENaC konnten weitere Bindungsmotive unter anderem für die Transkriptionsfaktoren AP1, AP2 und CREB sowie Response-Elemente für Retinolsäure (RARE), Metalle (MRE) und mehrere Glukokortikoid-Response-Elemente (GRE) identifiziert werden. (103). Für keine der Untereinheiten wurde jedoch bislang ein Mineralkortikoid-Response-Element in der 5'-flankierenden Region identifiziert. Vor kurzem konnte weiterhin für die α -ENaC Untereinheit gezeigt werden, dass ihre Transkription unter der Kontrolle eines Repressor-Komplexes aus Dot1a (disruptor of telomeric silencing splice variant a) und dem Transkriptionsfaktor AF9 steht, der durch Bindung zu einer Histon H3 K79 Hypermethylierung führt (122).

Zur posttranskriptionellen Seite der Kontrolle der ENaC Synthese liegen bisher nur wenige Untersuchungen in Bezug auf die Lunge vor, die sich auf die Rolle der 5'UTR der α -ENaC Untereinheit bei der Translation konzentrieren (103, 148, 3, 111, 110, 109). Die α -ENaC mRNA besitzt im Vergleich zur β - und γ -ENaC mRNA eine mit ~550/750 Nukleotiden (Ratte/ Mensch) ungewöhnlich lange und GC-reiche 5'UTR. Bei der humanen α -ENaC mRNA wurden bislang vier verschiedene Transkripte mit variierenden 5'-Enden identifiziert, die zur Expression von unterschiedlichen Spleißvarianten der α -ENaC Untereinheit mit variierenden N-Termini führen (144). In anderen Säugetierarten, so auch in Ratte und Maus konnte dagegen keine gleichzeitige Expression von α -ENaC Transkript-Varianten nachgewiesen werden, die zu einer Expression verschiedener Protein-Varianten führte (27).

In der Ratte konnte in Geschmackszellen die α -rENaCa mRNA-Variante nachgewiesen werden, die in geringen Mengen auch in der Niere und der Lunge exprimiert zu werden scheint, aber aufgrund eines eingefügten internen Stop-Kodons nicht zur Expression funktioneller α -ENaC Untereinheiten führt (84). In der Maus konnte anstelle der normalerweise 3,5 kb großen α -ENaC mRNA nur im prä- und frühen postnatalen Stadium ein 1,2 kb großes α -ENaC Transkript im Kolon detektiert werden, das wahrscheinlich nicht zur Expression funktioneller α -ENaC Untereinheiten führt. Sonst konnte in der Maus nur die 3,5 kb große α -ENaC mRNA in Niere, Kolon und Lunge nachgewiesen werden (27). Bei der β -ENaC mRNA konnten beim Menschen zwei Spleißvarianten, die auch zur Expression von zwei β -ENaC Isoformen führen, identifiziert werden, im Gegensatz

zu Maus und Ratte wo nur eine β -ENaC mRNA detektiert wurde (147, 3). Für die γ -ENaC mRNA konnte dagegen bei Maus, Ratte und Mensch nur eine γ -ENaC mRNA und Protein identifiziert werden (147, 3).

In vitro Translations-Experimente und Polysomengradienten-Analysen aus fötalen und postnatalen Ratten-Lungen zeigten, dass die β - und γ -ENaC mRNA wesentlich effizienter translatiert wird, als die α -ENaC mRNA (111). In weiteren Studien an primären Lungenzellen aus der Ratte konnte dabei gezeigt werden, dass die α -ENaC mRNA Translation während der Lungenentwicklung durch Glukokortikoide und Sauerstoff über die 5'-Cap-abhängige Initiation reguliert wird (110, 109).

Es wird allgemein angenommen, dass ENaC am endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und von dort in einer Form mit einer gewissen Grundaktivität in den Golgi-Apparat transportiert wird. Im Golgi werden α -ENaC und γ -ENaC, wahrscheinlich hauptsächlich durch Furin innerhalb ihrer extrazellulären Domäne proteolytisch gespalten, was zur vollständigen Aktivierung führt. Es ist jedoch nicht geklärt, ob diese proteolytische Spaltung reguliert wird, oder obligatorisch erfolgt. Für eine Reihe anderer Proteasen konnte gezeigt werden, dass sie ENaC in gleicher Weise durch Proteolyse aktivieren können, hierzu gehören Trypsin sowie die membranständige Serin-Protease CAP1 und Elastase (74).

In Bezug auf die Regulation des ENaC-Traffickings gibt es zahlreiche, jedoch zum Teil widersprüchliche Untersuchungen. So konnte in Zellstudien gezeigt werden, dass nur ein kleiner Anteil der ENaC-Kanäle in die Membran eingebaut wird, wobei dieses exozytotisch in Abhängigkeit von Syntaxin 1 und 3 zu erfolgen scheint (128, 129). Ein großer Teil der Kanäle scheint aber in einem subapikalen Kompartiment gespeichert zu werden, um dann z. B. infolge eines cAMP-Anstiegs schnell in die Membran eingebaut werden zu können (16). Weiterhin wurde gezeigt, dass ENaC-Kanäle anscheinend innerhalb weniger Minuten wieder aus der Zellmembran über Clathrin-überzogene Vesikel in die Zelle aufgenommen werden (149). Der Verbleib der Kanäle ist jedoch ungeklärt, so wurde sowohl ein proteasomaler, als auch ein lysosomaler Abbau und ein Recycling der Kanäle postuliert (10).

Ein wichtiger Regulator in diesem Kontext ist die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2, die einen negativen Einfluss auf die Expression der ENaC-Kanäle an der Zelloberfläche ausübt. Dieser Mechanismus ist bislang der am besten untersuchte

und basiert auf einer Interaktion von Nedd4-2 über seine WW-Domäne mit dem PY-Motiv des zytoplasmatischen Carboxy-Terminus von α -, β - und γ -ENaC. Die Interaktion mit Nedd4-2 führt dann zu einer Ubiquitinierung der ENaC-Untereinheiten, was zu einer Internalisierung und einer Degradation führt. Hierbei ist jedoch noch nicht geklärt, ob es dabei hauptsächlich zu einer Mono- oder Polyubiquitinierung und einer damit verbundenen lysosomalen oder proteasomalen Degradation kommt (151, 138, 72, 135). Die Bindung von Nedd4-2 an das PY-Motiv wird dabei über die Phosphorylierung mehrerer Serin-, Threonin-Reste in Nedd4-2 reguliert. Im phosphorylierten Zustand kann Nedd4-2 nicht an ENaC binden. Die Phosphorylierung von Nedd4-2 kann dabei durch SGK1 (serum and glucocorticoid-induced kinase 1) oder PKA (Protein Kinase A) erfolgen. Im phosphorylierten Zustand bindet und ubiquitiniert Nedd4-2 dagegen SGK1 und induziert dadurch dessen Degradation (negativer Rückkopplungsmechanismus) (134, 157). Beim Liddle-Syndrom wurden Mutationen in der Region des PY-Motivs hauptsächlich bei β - und γ -ENaC identifiziert, die dazu führen dass die Interaktion mit Nedd4-2 nicht mehr stattfinden kann und weisen daher ein gestörtes Abbau-Verhalten auf, was zu einem Anstieg der Menge an aktiven ENaC-Kanälen in der Membran führt (131, 138).

1.2.5 Regulation der ENaC Expression unter Aldosteron und Vasopressin in der Niere

Die Hormone Aldosteron und Vasopressin gelten als Hauptregulatoren zur Aufrechterhaltung der Salz- und Wasser-Homöostase, die vor allem über die Regulation der Na^+ - und Wasser-Resorption in der Niere und dem Darm wirken. Beide Hormone beeinflussen die ENaC Expression, was eine große Anzahl verschiedener Studien sowohl in Tiermodellen als auch Zellkultur-Modellen gezeigt hat.

Die Regulation durch Aldosteron und Vasopressin scheint jedoch organspezifisch und in Bezug auf die verschiedenen Untereinheiten sehr unterschiedlich zu erfolgen. So bewirkte eine Aldosteron-Behandlung in Ratten einen Anstieg der α -ENaC-, aber nicht der β - und γ -ENaC Expression in der Niere. Im Kolon führte es dagegen zu einem Anstieg der β - und γ -ENaC Expression, aber nicht der α -ENaC Expression (95, 41). Eine Behandlung mit dem Vasopressin V2-Agonisten dDAVP (1-deamino-8-D-Arginin Vasopressin) bewirkte dagegen einen Anstieg der β - und

γ -ENaC Expression in der Niere, und der Lunge, aber nicht im Kolon und führte auch nicht zu einem Anstieg der α -ENaC Expression (40, 106).

Daher erscheint eine Untersuchung der an der Hormon-Regulation beteiligten Prozesse in einem organspezifischen Kontext notwendig. Die Generierung verschiedener neuer ENaC-exprimierender Nierenzelllinien aus der Maus ermöglicht dabei eine genauere mechanistische Untersuchung der Prozesse (9, 47). Im Hinblick auf die ENaC-Regulation in der Niere wurden bislang nur einige Mechanismen bezüglich der Transkription und der posttranslationalen Kontrolle genauer untersucht. Einige Studien deuten jedoch darauf hin, dass mRNA-spezifische posttranskriptionelle Prozesse in Bezug auf die mRNA-Stabilität sowie die Translationseffizienz eine wichtige Rolle für die ENaC-Synthese spielen (95, 111). Weiterhin zeigten Untersuchungen zur Proteinstabilität der ENaC-Untereinheiten, dass die Protein-Halbwertszeit aller Untereinheiten zwischen 1-3 h liegt und sowohl die Kanäle als auch die intrazellulär gespeicherten ENaC-Untereinheiten einer ständigen Synthese bedürfen um eine ausreichende Menge an funktionellen Kanälen bereithalten zu können (124).

Aldosteron übt dabei nach dem derzeitigen Wissensstand über verschiedene Mechanismen einen positiven Effekt auf die ENaC Expression aus. Einerseits kann es an den Mineralkortikoid-, aber auch mit einer niedrigeren Affinität an den Glukokortikoid-Rezeptor binden, und dann im Nukleus über entsprechende Elemente (MRE oder GRE) in der Promotor-Region von Genen deren Transkription aktivieren oder hemmen. So kann es zum einen direkt die α -ENaC Transkription über GREs aktivieren, führt aber zum anderen auch zur vermehrten Expression von Aldosteron-induzierten Proteinen (AIPs) bzw. zur verminderten Expression von Aldosteron-reprimierten Proteinen (ARPs). Vor kurzem wurde für α -ENaC gezeigt, dass ihre Transkription unter der negativen Kontrolle des Dot1a-AF9-Komplexes steht, der normalerweise zu einer Hypermethylierung und Hemmung der Transkription führt. Unter Aldosteron wird die Repression durch diesen Komplex jedoch aufgehoben. Das beruht einerseits auf einer Verminderung der Expression von Dot1a und AF9 und andererseits auf einer Dissoziation des Komplexes von Dot1a und AF9. Die Dissoziation beruht wiederum auf einer Phosphorylierung von AF9 durch SGK1 (122). Durch Hemmung der Transkription bewirkt es zusätzlich eine Abnahme Aldosteron-unterdrückter Proteine (aldosterone-repressed-proteins; ARP). Zu den AIPs

gehören sowohl die ENaC-Gene als auch die SGK1. Die SGK1 bewirkt dabei über Phosphorylierung von Nedd4-2 eine Stabilisierung der ENaC-Kanäle in der Membran (9, 47, 92, 10, 74).

Über die Regulationsmechanismen der ENaC-Synthese unter Vasopressin weiß man, dass die Bindung von Vasopressin an den V2-Rezeptor über stimulatorische G-Proteine zur Aktivierung der Adenylatzyklase und somit zu einem intrazellulären Anstieg von cAMP führt. Dieser führt über Aktivierung der PKA zu einem schnellen Anstieg (innerhalb von 2-4 min) der ENaC-vermittelten Na⁺-Absorption (40). PKA führt in MDCK Zellen ebenfalls zu einer Aktivierung der SGK1 und konvergiert darüber mit dem Aldosteron-Effekt (9). Ebenso konnte gezeigt werden, dass es zu einer cAMP-abhängigen Insertion von ENaC-Kanälen aus einem intrazellulären Recycling-Pool in die Membran kommt (16). Außerdem führte die Stimulation mit dDAVP sowohl in der Niere, als auch in immortalisierten CCD-Zellen (cortical collecting-duct) zu einem Anstieg der β - und γ -ENaC Expression (95, 87). Ein Modell zur Regulation der ENaC Expression und Präsentation in der Membran unter Aldosteron und Vasopressin ist in Abb. 1.2 dargestellt.

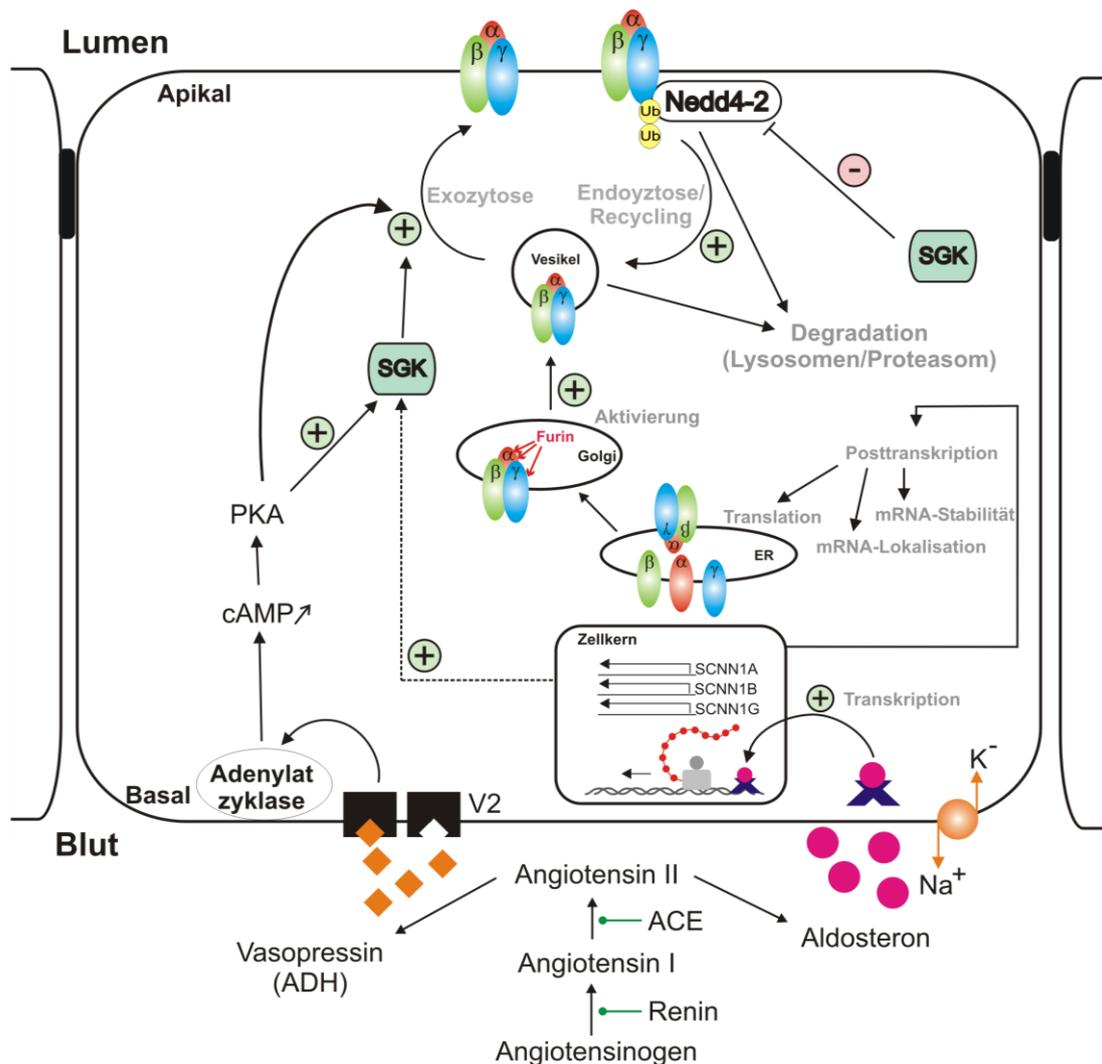


Abb. 1.2: Modell zur Regulation der ENaC Expression und seiner Präsentation an der Zelloberfläche unter Aldosteron und Vasopressin in der Niere.

Die ENaC-Expression an der Zelloberfläche wird durch die Synthese der ENaC-Untereinheiten, deren Assemblierung und Aktivierung, sowie deren Einbau in die Membran durch Exozytose und deren Ausbau aus der Membran durch Endozytose bestimmt und durch die Hormone Aldosteron und Vasopressin reguliert. Bei der Wirkung von Aldosteron ist bekannt, dass eine Aktivierung der Transkription der ENaC-Gene aber auch des Serum und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase 1 (SGK1)-Gens erfolgt. Die SGK1 hemmt die Ubiquitinierung von ENaC durch Nedd4-2 und bewirkt eine Stabilisierung der Kanäle in der Membran. Vasopressin bindet an den V2-Rezeptor und führt über Aktivierung der Adenylatzyklase zu einem Anstieg von cAMP, was zu einer Aktivierung der Protein Kinase A (PKA) führt, die SGK1 phosphorylieren und dadurch aktivieren kann und die Exozytose von ENaC-Kanälen fördert. Der Weg, über den Vasopressin die ENaC-Expression fördert ist nicht bekannt.

1.3 Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression

1.3.1 Regulationsebenen der Genexpression

Das Expressionsmuster einer eukaryotischen Zelle ist das Resultat einer komplexen Regulation der Expression aller einzelnen Gene. Verantwortlich sind hierfür Regulationsmechanismen, die sich abhängig von ihrer Wirkungsebene in transkriptionelle, posttranskriptionelle und posttranslationelle Mechanismen unterteilen lassen.

Transkriptionelle Regulationsmechanismen basieren auf der Sequenz und der Primärstruktur bestimmter DNA-Bereiche (Cis-Elemente) eines Gens, zu denen Promotoren, Enhancer, Silencer oder Lokus-Kontrollregionen zählen. Diese vermitteln über eine Interaktion mit spezifisch daran bindenden Proteinen (Transfaktoren) eine Inhibition oder Förderung der Transkription.

Die mRNA-spezifischen posttranskriptionellen Regulationsmechanismen umfassen sämtliche Mechanismen, die auf der Ebene der mRNA wirken. Auch diese Mechanismen beruhen auf einer Interaktion spezifisch bindender Transfaktoren mit Cis-Elementen der mRNA. Hierzu zählen alle Mechanismen der Prozessierung der mRNA, wie z. B. das Spleißen, das RNA-Editing und die Polyadenylierung, das Anfügen einer Cap-Struktur, aber auch der Transport der mRNA vom Nukleus ins Zytoplasma, sowie deren subzelluläre Lokalisation, die Kontrolle der Translationseffizienz und der mRNA-Stabilität. Diese Mechanismen ermöglichen sowohl eine Veränderung der Information der mRNA durch Editing oder alternatives Spleißen, als auch eine Veränderung und schnelle Anpassung der Expression dieser Information.

Posttranslationelle Regulationsmechanismen wirken auf der Proteinebene. Sie beinhalten alle Mechanismen, welche die Protein-Stabilität und -Modifikationen betreffen. Hierzu gehören alle unter dem Begriff der proteinogenen Prozessierung zusammengefaßten chemischen Modifizierungen der Proteine, wie z. B. Phosphorylierungen, Hydroxylierungen, Glykosylierungen, proteolytische Spaltungen und das Anhängen von Fettsäuren. Zu den Mechanismen zählen jedoch auch Prozesse, die durch eine Interaktion des Proteins mit bestimmten anderen Faktoren (Kofaktoren) einen Einfluss auf dessen Aktivität ausüben, wie es zum Beispiel bei Enzymen der Fall sein kann.

1.3.2 Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation

Die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression wird außer den an der Prozessierung der prä-mRNA beteiligten Mechanismen über Mechanismen vermittelt, welche die Stabilität der mRNA, ihre Lokalisation in der Zelle oder ihre Translation beeinflussen. Die meisten dieser Mechanismen beruhen auf der Interaktion spezifischer RNA-Bindeproteine (Transfaktoren) mit bestimmten Sequenzelementen (Cis-Elementen), Sekundärstrukturen der mRNA oder auf RNA-RNA-Wechselwirkungen (1, 20, 152, 116, 104, 117).

Die Cis-Elemente der mRNAs liegen dabei zumeist in den nichtkodierenden, untranslatierten Regionen (UTRs). Die Abb. 1.3 zeigt die schematische Struktur einer mRNA mit ihrer 5'- und 3'untranslatierten Region (5'UTR, 3'UTR) und mit bekannten Bindungs-Motiven für regulatorische Faktoren sowie den dadurch vermittelten Mechanismen (116, 104, 117).

Noch während der Transkription erfolgt dabei im Nukleus eine Assoziation von RNA-bindenden Proteinen (RBP) an die prä-mRNA, die eine weitere mRNA-Prozessierung durch Spleißen, RNA-Editing, Polyadenylierung sowie das Anfügen einer Cap-Struktur katalysieren. Über den Mechanismus des alternativen Spleißens können dabei unterschiedliche Transkripte eines Gens entstehen, die zur Expression verschiedener Varianten eines Proteins mit unterschiedlicher Funktion, Lokalisation oder Aktivität führen können (36, 37, 85).

In Folge des RNA-Editings kann es zu einer Modifikation, einer Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide in einer mRNA kommen. Hierbei existieren Mechanismen in Abhängigkeit einer sogenannten als Matrize verwendeten guide-RNA (gRNA), aber auch gRNA unabhängige Mechanismen (85). Das RNA-Editing kann somit sowohl zu einer Veränderung des Informationsgehalts, als auch zu einer Veränderung ihrer Expression führen und besitzt beispielsweise in Neuronen, und in Zellen des Immunsystems, vor allem aber auch bei der Expression mitochondrialer Gene eine große Bedeutung (101, 13, 114, 55).

Die Länge des Poly-A-Schwanzes einer mRNA, den sie infolge einer Polyadenylierung erhält, bestimmt bis zu einem gewissen Grad ihre Stabilität und somit ihre Halbwertszeit. Die Stabilität, sowie die Lokalisation und die Translation einer mRNA werden dabei durch die Summe aller assoziierten RBPs bestimmt und sind für jeden mRNA-RBP-, kurz als mRNP-Komplex bezeichnet,

charakteristisch (61). Durch eine Veränderung der RBP-Komposition können sie jedoch schnell an veränderte Konditionen der Zelle angepasst werden, was besonders in der Entwicklung, aber auch in der Anpassung an verschiedene Reize wie Hormone oder Schwankungen des O₂-Gehalts, notwendig ist (1, 152, 50). Posttranskriptionelle Mechanismen vervielfachen daher auf verschiedene Arten die genomische Information und ermöglichen somit eine effiziente Adaptation des Organismus.

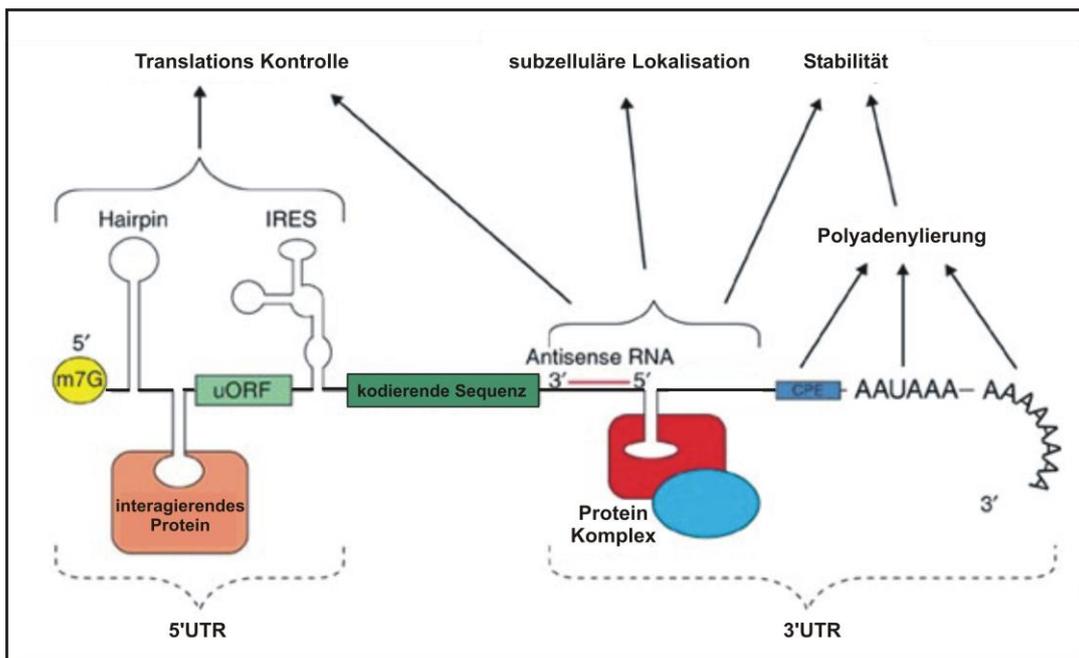


Abb. 1.3: Beispielhafte Darstellung der Struktur einer eukaryotischen mRNA mit einigen regulatorischen Elementen der posttranskriptionellen Kontrolle der Genexpression und dem damit verbundenen Mechanismus (geändert nach MIGNONE *et al.*, 2002 (104)).

In der 5'UTR vermittelten Regulation können folgende Elemente involviert sein: die 7-Methyl-Guanosin-Kappe (5'-Cap), haarnadelschleifenförmige Sekundärstrukturen, RNA-Protein Interaktionen, upstream Open Reading Frames (uORFs), Internal Ribosomal Entry Sites (IRES). In der 3'UTR vermittelten Regulation können folgende Elemente involviert sein: Interaktionen mit Antisense-RNA, RNA-Protein Interaktionen an denen auch Multiprotein-Komplexe beteiligt sein können, zytoplasmatische Polyadenylierungselemente (CPE), der poly-A-Schwanz und Variationen in dessen Länge.

1.3.3 RNA/ Protein Interaktionen

Ein Großteil der posttranskriptionellen Mechanismen beruht auf einer Interaktion von RNA-Bindungsproteinen (RBPs) mit spezifischen Motiven der mRNA. Diese können dabei entweder direkt mit bestimmten Cis-Elementen der mRNA interagieren oder ihre regulatorische Wirkung über die Interaktion mit anderen RBPs ausüben (61). Der Effekt eines RBPs auf die Expression einer spezifischen mRNA hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab, so z. B. von der Lage des damit interagierenden cis-Elements in der mRNA sowie der Interaktion des RBPs mit zusätzlichen Co-Faktoren (anderen RBPs) oder seiner Modifizierung durch z. B. Phosphorylierungen. Aufgrund dessen kann ein RBP ganz unterschiedliche Effekte bei verschiedenen mRNAs bewirken (61).

Die hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) stellt, mit mehr als 20 Vertretern, eine große Gruppe der RBPs dar. Die Klassifizierung erfolgte dabei entsprechend ihrem Molekulargewicht und ihrem elektrophoretischen Laufverhalten von hnRNP-A1 bis hnRNP-U (37) und fasst alle prä-mRNA-bindenden Proteine zusammen, die nicht fester Bestandteil anderer RNP-Komplexe wie snRNPs (small nuclear RNPs) sind (77). Die hnRNP-Proteine binden dabei bereits cotranskriptionell an die prä-mRNA (auch hnRNA, heterogeneous nuclear RNA) und vermitteln dadurch Prozesse wie den nukleären Export (20), eine Stabilisierung oder Destabilisierung oder Veränderung der Translationseffizienz (36). Dabei pendeln viele der hnRNPs zwischen Zellkern und Zytoplasma und besitzen zusätzlich auch wichtige zytosolische Funktionen (77, 36, 20, 37, 152).

Eine mRNA durchläuft im Verlauf ihrer Prozessierung von der prä-mRNA zur translatierten reifen mRNA im Zytoplasma eine Umbesetzung durch RBPs, die transkriptspezifisch variiert. Die Prozessierung der prä-mRNA im Nukleus determiniert dabei zum Teil die Zusammensetzung der RNP-Komplexe (36). Während des Spleißens der prä-mRNA werden die Intron-assoziierten hnRNPs sowie auch einige Exon-bindende Spleiß-Faktoren wieder aus dem mRNP-Komplex entfernt. Im Gegenzug binden EJC (exon-exon junction complex)-Proteine daraufhin an die gespleißte mRNA. EJC-Proteine binden in Komplexen etwa 20 nt (5'-Orientierung) vom Exon/ Exon-Übergang und sind ausschließlich mit gespleißter mRNA assoziiert. Die mRNP-Komposition zwischen gespleißter und ungespleißter RNA unterscheidet sich daher entscheidend voneinander,

ebenso wie die mRNAs transkribierter, intronloser Pseudogene. Die Bindung vieler Prozessierungsfaktoren (wie hnRNPs und EJC-Proteine) bleibt beim Transport der mRNA ins Zytoplasma bis zur Translation an die mRNA erhalten. Durch die Assoziation dieser Faktoren, insbesondere der EJC-Proteine, bis zur Translation bleiben auch Informationen aus der prä-mRNA-Struktur (Spleiß-Stellen) und den Introns erhalten und können die Expression des Gens beeinflussen (36, 85). Nach dem Export der mRNP-Komplexe ins Zytosol kommt es zu weiteren Modifizierungen durch die Interaktion mit zytosolisch lokalisierten RBPs, neuen Protein/ Protein-Wechselwirkungen oder Phosphorylierungen, die letztendlich die Lokalisation, Stabilität oder Translationseffizienz der mRNA beeinflussen können (36, 77, 20, 37, 152). RBPs kontrollieren neben diesen rein auf RBPs basierenden Mechanismen aber auch die Stabilität oder Translationseffizienz in Zusammenarbeit mit speziellen antisense oder miRNAs (micro-RNAs). Micro-RNAs sind kurze (6-8 nt) lange nicht kodierende RNAs, die in einem RISC-Komplex (RNA-Induced Silencing Complex) direkt an komplementäre Sequenzen der mRNA (oft in den 3'UTRs) binden und dadurch eine Translation verhindern oder eine Spaltung und Degradation der mRNA erleichtern (81, 19, 107). Der mRNP-Komplex erhält dabei, einerseits durch die teilweise bestehende Konstanz der assoziierten RBPs, Informationen aus der prä-mRNA-Struktur und den Introns sowie dem Expressionsprofil der Zelle, ermöglicht aber andererseits durch seine Variabilität eine Anpassung der Expression der mRNA an externe oder interne Veränderungen der Zelle. mRNPs sind somit stabile und zugleich auch dynamische Komplexe, wodurch über RBPs direkt extrazelluläre Signale mit dem mRNA-Metabolismus verknüpft werden können.

1.3.4 Untranslatierte Regionen (UTRs) als regulative Elemente

Die Information für die Regulation der Genexpression ist hauptsächlich in den nichtkodierenden Regionen des Genoms lokalisiert. Auf der mRNA-Ebene sind hierfür hauptsächlich die 5'- und 3'untranslatierten Regionen verantwortlich. Diese wichtige Funktion spiegelt sich auch in den durchschnittlichen Längen der UTRs des Menschen wieder. Die Ergebnisse der Sequenzierung des Human-Genoms durch das Internationale Human-Genom Sequenzierungs Konsortium aus dem Jahre 2001 zeigten, dass die durchschnittlichen Längen der UTRs mit 300 nt für die 5'UTR und 770 nt für die 3'UTR bei einer durchschnittlichen Länge der CDS

von 1340 nt, anteilmäßig nahezu die gleiche Größe wie der kodierende Anteil besitzen (67). Kennzeichen von regulatorischen Elementen in den UTRs sind hauptsächlich repetitive Elemente sowie konservierte Bereiche. Diese können sowohl in der 5'- als auch in der 3'UTR liegen und alle bekannten posttranskriptionellen Regulationsmechanismen vermitteln (116, 117).

Zu den bekanntesten RNA-Bindungsmotiven zählen das RRM (RNA Recognition Motiv), die RGG-Box sowie die Zink-Finger- und die KH-Domäne (hnRNP-K homology domain).

1.3.5 5'UTRs

Die 5'UTRs von Vertebraten mRNAs sind in der Regel wesentlich kürzer und GC-reicher als die 3'UTRs. Sie spielt vor allem für die Initiation der Translation eine entscheidende Rolle, wobei diese auf verschiedenen Mechanismen beruhen kann. Bei mRNAs mit einer Cap-abhängigen Translation erhält die mRNA während der Prozessierung eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe am 5'-Ende (Cap), die sie zusätzlich vor exonukleolytischem Abbau schützt. Die meisten eukaryotischen mRNAs besitzen eine Cap-Struktur. Diese dient als Ausgangspunkt der Translation, wozu eIFs (eucaryotic translation initiation factor) an die Cap-Struktur binden und durch lokale Auflösung der Sekundärstruktur eine Bindungsplattform bilden. Zusammen mit der kleinen ribosomalen Untereinheit rekrutieren sie dadurch den 43S-prä-Initiationskomplex an das 5'Ende der mRNA. Daraufhin folgt das Scanning, bei dem der Komplex in 3'-Orientierung bis zum Erreichen des ersten AUG-Triplets wandert, wo die Initiationsfaktoren von der mRNA dissoziieren und es zur Assemblierung mit der 60S ribosomalen Untereinheit kommt (57). Über eine Modulation dieses Prozesses, beispielsweise über die der Aktivität der eIF-Proteine, kann die Translationsrate einer mRNA verändert werden. So konnte zum Beispiel für die α -ENaC mRNA in der Lunge eine Sauerstoff- und Glukokortikoid-abhängige Veränderung der Translationsinitiation durch eIFs der Cap-abhängigen Translation nachgewiesen werden (109, 110, 111).

Darüber hinaus kann auch die Interaktion von eIFs der 5'UTR mit RBPs der 3'UTR zur Veränderung der Translation führen. So führt z. B. die Interaktion von eIF4G mit dem Pab1p (poly-A-binding protein 1p) zu einem Ringschluss der mRNA und einer verstärkten Rekrutierung von Ribosomen an das 5'-Ende (121). Ein zweiter

Mechanismus der Translationsinitiation ist Cap-unabhängig und beruht auf einer Y-förmigen Sekundärstruktur in der 5'UTR, die als IRES (internal ribosomal entry site) bezeichnet wird. Sie ist zumeist in 5'UTRs mit einer überdurchschnittlichen Länge, die oft komplexe Sekundärstrukturen bilden und zudem uORFs (upstream open reading frame) beinhalten können (49). Eine Computerstudie zeigte, dass von über 12000 untersuchten humanen mRNA-Sequenzen ~6,5% der mRNAs bekannte IRES-Elemente und 11% uORFs enthielten (116, 117). Weitere Mechanismen regulieren über andere Elemente der 5'UTR die Translationsinitiation. So verhindern IREs (iron-responsive elements) in der 5'UTR durch Bindung von IRPs (iron regulatory proteins) die Assoziation von eIF3 mit dem 43S-prä-Initiationskomplex und somit die Translation. IREs sind z. B. in der Ferritin-mRNA enthalten, und regulieren dessen Expression in Abhängigkeit von der zytosolischen Eisenkonzentration (113).

1.3.6 3'UTRs

Die 3'UTR der mRNA ist in der Regel wesentlich länger als die 5'UTR und wird im Allgemeinen als Hauptträger regulativer Elemente angesehen, die posttranskriptionelle Regulationsmechanismen sowohl in Bezug auf die Translationseffizienz, die mRNA-Lokalisation als auch die mRNA-Stabilität vermitteln können (36, 152, 57, 121, 5). Die 3'UTRs verschiedener mRNAs weisen dabei oftmals eine wesentlich größere Variabilität als die 5'UTRs auf, da sie nicht wie die 5'UTRs aufgrund ihrer Funktion für die Initiation der Translation bestimmten Grenzen unterliegen. Die 3'UTRs besitzen daher ein wesentlich größeres regulatorisches Potential für die Vermittlung posttranskriptioneller Mechanismen. Eine Grundeigenschaft, die sie mit der 5'UTR teilt ist, dass sie der mRNA eine gewisse Grundstabilität verleiht. Im Fall der 3'UTR beruht diese auf der Polyadenylierung der mRNA an ihrem 3'-Ende. Diese wird durch ein Polyadenylierungs-Signal der Folge AAUAAA in der 3'UTR induziert. Der Poly-A-Schwanz schützt die mRNA letztendlich durch Interaktion mit Poly-A-Bindeproteinen (PABP) vor einem exonukleolytischen Abbau wodurch eine Grundstabilität der mRNA gewährleistet wird (5, 104, 28). Die individuelle Stabilität einer mRNA, sowie ihre Lokalisation und Translation wird jedoch im Wesentlichen durch die Interaktion von RNA-Bindungsmotiven in den 3'UTRs einer mRNA bestimmt, die mit bestimmten Transfaktoren entweder eine stabilisierende oder

destabilisierende Wirkung auf die betreffende mRNA haben können (28). Oftmals basiert die Wirkung auch auf einer Kombination der verschiedenen Mechanismen, so dass es z. B. infolge einer veränderten Lokalisation auch gleichzeitig zu einem Anstieg der Translationseffizienz kommt. Unter anderem aus der Untersuchung der Regulation der Genexpression während der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* konnte man einen guten Eindruck über die Rolle UTR-vermittelter mRNA-Lokalisation und Translation gewinnen. Hierbei konnte beispielsweise ein 90 nt langes Translations-Kontroll-Element (TCE) in der 3'UTR der nos mRNA identifiziert werden, das in Abhängigkeit der Lokalisation der mRNA zu einer Repression der Translation führt und eine wichtige Funktion für die Ausbildung des anterioren-posterioren Achse besitzt (24, 25). Ein weiteres Element, das im gleichen Kontext identifiziert werden konnte ist das Nos-Responsive-Element (NRE) in der 3'UTR der Hunchback (hb) mRNA, welches bei Interaktion mit dem Nos-Protein zu einer Repression der Translation führt (59, 136).

Für eine Klasse von GU-reichen Elementen (GRE), die in vielen 3'UTRs von mRNAs mit einer kurzen Halbwertszeit identifiziert werden konnte, wurde gezeigt, dass sie mit CELF-Proteinen (CUG-binding protein and embryonically lethal abnormal vision-type RNA binding protein 3-like factors) interagieren und hierüber eine Vielzahl posttranskriptioneller Prozesse vermitteln können. Die GREs wie auch die CELF-Proteine sind dabei evolutionär konserviert, so dass CELF-Proteine verschiedener Spezies bevorzugt an GU-reiche Sequenzen binden und posttranskriptionelle Prozesse wie das mRNA-Spleißen, die Translation und die mRNA-Stabilität über die Deadenylierung und die mRNA Degradation beeinflussen (146). Im Menschen konnte die 11 nt lange Konsensus-Sequenz UGUUUGUUUGU als Bindungs-Motiv für CELF-Proteine ermittelt werden. Das am besten untersuchte Model für eine Regulation der Translation durch eine Deadenylierung stammt aus Untersuchungen an *Xenopus* Oozyten. Hierbei bewirkt eine Assoziation von EDEN-Bindungs-Proteinen (embryo deadenylation element binding protein) an GREs nach der Befruchtung der *Xenopus* Oozyte zu einer Deadenylierung und einer damit verbundenen Repression der Translation zahlreicher Transkripte darunter auch Transkripte von regulatorischen Proteinen des Zellzyklus (146).

Durch die Wirkung destabilisierender oder stabilisierender Elemente in den UTRs, kann die mRNA-Halbwertszeit von mRNAs dabei extrem variieren und von wenigen Minuten bei Early-Response-Genen bis zu mehreren Stunden z. B. bei der β -Globin mRNA betragen (83). Ein weiteres Element das die mRNA-Stabilität beeinflusst ist das Iron-Response-Element (IRE), das in der 3'UTR der Transferrin-Rezeptor mRNA vorkommt. Es bildet eine Haarnadel-förmige Struktur (Hairpin) aus und führt durch Interaktion mit Eisen-regulatorischen Proteinen (iron regulatory proteins, IRPs) zu einer Stabilisierung der mRNA (113). Eine andere wichtige Gruppe von Kontrollelementen, die zumeist in den 3'UTRs lokalisiert sind stellen die AREs (Adenylate Uridylate rich elements) dar. Entsprechend ihrer Sequenz und der Verteilung unterscheidet man drei Klassen von AREs. Wobei die AREs der Klasse I und II auf einer Variation der Konsensus-Sequenz der Motive AUUUA oder UUAUUUAUU beruhen. AREs der Klasse III besitzen keine definierten Motive des Typs AUUUA, sondern bestehen vielmehr aus AU-reichen oder U-reichen Regionen, wie es bei der c-jun mRNA der Fall ist (8, 115). AREs wurden dabei zunächst als Destabilisierungselemente der mRNA beschrieben, die an Deadenylierungsprozessen und der Auflösung der funktionellen Cap-Struktur (decapping) beteiligt sind. Es konnte jedoch an einer Vielzahl von Beispielen gezeigt werden, dass sie in Abhängigkeit der RBPs auch eine Stabilisierung, wie bei der Cyclin A und -B1 mRNA (150), oder veränderte Translationseffizienz, wie bei der TNF- α oder Cox-2 mRNA (118, 31) vermitteln können. Als RBPs welche diese Mechanismen vermitteln, sind bislang etwa 17 ARE-Bindungsproteine (ARE-BPs), wie AUF1, HuR, TTP, hnRNP-A1 oder Nukleolin, bekannt (2, 8, 23, 63).

Eine weitere wichtige Gruppe sind CU-reiche Elemente vom Typ DICE (differentiation control element), wie sie in mRNAs für Lipoxygenasen (31), Renin (108) oder den Kollagenen (132) zu finden sind. Bei der mRNA der 15-Lipoxygenase (15-LOX) führt dabei eine Interaktion der hnRNP-K und hnRNP-E1 Proteine mit einem DICE zur entwicklungsabhängigen Inhibition der Translation in Erythrozyten. CU-reiche Elemente sind jedoch auch als Mediatoren der Stabilität bekannt, wie es für die mRNA des humanen Präprorenins in Abhängigkeit von cAMP beobachtet werden konnte (132).

1.4 *Eingliederung der Arbeit*

Der in der Niere exprimierte epitheliale Natriumkanal ENaC ist essentiell für die Regulation der Natrium-Homöostase und der Regulation des Wasserhaushalts sowie der damit verbundenen Regulation des Blutvolumens und Blutdrucks. Die Bedeutung des ENaC wird durch die Korrelation zu Krankheiten wie dem Liddle-Syndrom (131, 138) oder dem Pseudohypoaldosteronismus Typ I (22, 140, 120), die auf einer Fehlregulation des ENaC beruhen noch unterstützt. Die Regulation der ENaC Expression und Aktivität wird hauptsächlich über zwei hormonelle Wege angesteuert. Eine Verminderung des Blutvolumens, Blutdrucks sowie relativer Natriummangel oder Hyperkalämie führen über Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems zur Ausschüttung von Aldosteron und Vasopressin. Die ENaC-Expression wird dabei organspezifisch sehr unterschiedlich reguliert, wie viele Untersuchungen zeigen. Die Expression der einzelnen Untereinheiten, sowie deren Assemblierung und der Einbau der aktiven ENaC-Kanäle in die Membran, werden auf komplexe Weise reguliert. Dabei sind sowohl transkriptionelle, als auch posttranskriptionelle und posttranslationelle Mechanismen beteiligt. Bislang wurde die Wirkung der Hormone Aldosteron und Vasopressin in Bezug auf die ENaC-vermittelte Na^+ -Reabsorption hauptsächlich auf der Ebene der Posttranslation untersucht. Diese Mechanismen scheinen besonders für eine unmittelbare Wirkung der Hormone auf die Erhöhung des Na^+ -Transports durch ENaC wichtig zu sein, da durch sie innerhalb weniger Minuten die Aktivität, sowie die Anzahl aktiver Kanäle in der Membran erhöht werden kann. Für eine intakte Kurzzeit- wie Langzeitregulation ist jedoch die kontinuierliche Verfügbarkeit funktioneller ENaC-Kanäle entscheidend, die nur durch eine ständige Neusynthese der einzelnen Untereinheiten gewährleistet ist, da die Proteinhalbwertszeit nur etwa 3 h beträgt (124). Die Regulation auf der transkriptionellen und posttranskriptionellen Ebene sind in Bezug auf die Wirkung von Aldosteron und Vasopressin in der Niere nicht hinreichend, bzw. mechanistisch noch nicht untersucht. Für eine Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen unter einer hormonellen Langzeitstimulation lieferten verschiedene Arbeiten in Ratten-Modellen Hinweise (42, 43, 15). So zeigte sich beispielsweise in einer Langzeitstimulation in Ratten mit Vasopressin ein Anstieg der γ -ENaC Protein-Menge auf das 5-fache bei gleichbleibender mRNA-Menge und gleichzeitig ein Anstieg der β -ENaC mRNA auf das 5-fache bei einer Erhöhung der

Protein-Menge auf das 1,5-fache (15). Solche Dissoziationen zwischen der Erhöhung auf mRNA- und Protein-Ebene sind ein recht gutes Indiz für eine Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen. In Bezug auf eine posttranskriptionelle Regulation der ENaC-Expression konnte von Otulakowski und Kollegen für die ENaC-Expression in der Lunge ein Einfluss von Sauerstoff und Glukokortikoiden auf die Translationsinitiation der ENaC mRNA nachgewiesen werden (109, 110, 111). Hiermit konnte gezeigt werden, dass prinzipiell auch bei der ENaC-Expression posttranskriptionelle Mechanismen an der Regulation der Expression beteiligt sind.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Im Hinblick auf die Regulation der ENaC Expression unter Aldosteron und Vasopressin gibt es mehrere Hinweise auf die Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen, wie verschiedene Arbeiten in Ratten-Modellen zeigen, jedoch bislang noch keine direkten Untersuchungen zu molekularen Mechanismen. In dieser Arbeit sollte daher die Expression des ENaC im Hinblick auf eine nierenspezifische Wirkung der Hormone Aldosteron und Vasopressin auf eine Beteiligung posttranskriptioneller Kontrollsysteme untersucht werden. Hierbei sollte der Schwerpunkt insbesondere auf die Rolle von RNA-bindenden Proteinen gelegt werden. Die vorliegende Arbeit wurde dabei im Rahmen des Teilprojekts „ENaC-Synthese“ in der Forschergruppe 667 der Deutschen Forschungsgemeinschaft „Epitheliale Mechanismen der renalen Volumenregulation“ angefertigt.

2 *Material und Methoden*

2.1 *Zellkultur*

2.1.1 *Kultur der mCCD_{cl1}-Zellen*

Alle Versuche wurden mit der Mauszelllinie mCCD_{cl1} (mouse cortical collecting duct Klon 1) durchgeführt, die uns freundlicherweise von B. C. Rossier (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fakultät für Biologie und Medizin der Universität Lausanne, Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurde (51). Es handelt sich hierbei um eine hoch differenzierte Zelllinie, die aus spontan immortalisierten primären Zellen des kortikalen Sammelrohrs von Mäusenieren entstammt (51). Die Kultur der mCCD-Zellen erfolgte in 60 cm² Zellkulturschalen (TPP) bei 37°C, 5%CO₂. Als Wachstums-Medium wurde eine 1:1 Mischung von Dulbecco's modified Eagle's Medium und Ham's F12 Medium (DMEM/ Ham's F-12, Biochrom AG) verwendet, das 2% Fötale Kälberserum (FCS, Biochrom AG), 50 units/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG), 1 mM HEPES-Puffer (Biochrom AG), 2 mg/ml Glukose Monohydrat (Sigma), 1 x Insulin-Transferrin-Selenium-G Supplement (Invitrogen-Gibco), 10 ng/ml Epidermal Growth Factor (Sigma), 50 nM Dexamethason (Sigma), and 1 nM 3,3',5-triiodo-L-thyronin (Sigma) enthielt. Die Zellen wurden normalerweise bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert und dann gesplittet.

2.1.2 *Hormon-Stimulation*

Für die Stimations-Experimente wurden die Zellen auf 60 cm² Zellkultur-Schalen und mit Wachstums-Medium kultiviert bis die Zellen zu einer konfluenten Monolayer gewachsen waren und begannen Dome zu bilden. Dann wurden die Zellen für 24 h mit Stimations-Medium inkubiert, das aus DMEM/ Ham's F12 Medium (Biochrom KG) bestand, dass mit 2 mg/ml Glukose Monohydrat (Sigma) und 1 mM HEPES-Puffer (Biochrom AG) versetzt war. Zur Stimulation wurde das Medium gegen Stimations-Medium ausgetauscht, dass zusätzlich 0,1% Ethanol (Carl Roth) bei den Kontrollen oder 300 nM Aldosteron (Sigma) oder 10 nM dDAVP (Sigma) enthielt. Die Zellen wurden zur Stimulation für 24 h weiter bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert.

2.1.3 mRNA-Stabilitäts-Assay

Für die Bestimmung der mRNA-Stabilität wurden die Zellen, wie unter 2.1.2 beschrieben, für 24 h stimuliert und dann die Transkription durch Zugabe von Actinomycin D (10 µg/ml Endkonzentration; MoBiTech) inhibiert. Nach 0, 3, 6, 9 und 24 h wurden die Zellen zwei Mal mit 4°C kaltem 1 x Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) gewaschen und direkt unter Zugabe von 1 ml RNA-Bee™ (BIOZOL Diagnostica Vertriebs GmbH) pro 60 cm²-Platte für die Präparation der RNA geerntet. Die Präparation der RNA erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Bestimmung der relativen mRNA-Konzentration erfolgte mittels RT-PCR wie unter 2.2.5 beschrieben.

2.1.4 Transfektion von Zellen für Reportergeräten (Luziferase)-Assays

mCCD_{cl1} Zellen wurden auf 96-well Platten (µClear Platte 96K, Greiner BIO-ONE GmbH) bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert und dann mit dem Firefly Luziferase Vektor pGL3-promotor (Promega) oder den gentechnisch veränderten Varianten mit den γ-ENaC mRNA UTRs bzw. den Deletions Varianten sowie dem Renilla Luziferase Vektor phRL-TK (Promega) transfiziert. Für die Transfektion wurde ein Verhältnis von 1:3 (DNA: Transfektions Reagenz) und TransFectin™ Lipid Reagent (Bio-Rad) als Transfektions Reagenz entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Für die Wirkung von RBPs auf die γ-ENaC UTRs wurden die Zellen gleichzeitig mit folgenden Leervektoren oder Expressions-Vektoren für die RBPs kotransfiziert: pCMV-SPORT6 (Leervektor, Invitrogen), pCMV-SPORT6-HuR, pCMV-SPORT6-AUF1, pCMV-SPORT6-TTP, pSG5 (Leervektor, Stratagene), pSG5-hnRNP-A1, pEGFP-C1 (GFP-Vektor, BD Biosciences Clontech), pEGFP-FMRP. Als Kontrolle bei den Kotransfektions-Experimenten wurden mCCD_{cl1} Zellen mit dem leeren pGL3-promoter Vektor und den entsprechenden Leervektoren oder den Expressions-Vektoren der RBPs kotransfiziert. Der Renilla Luziferase Vektor phRL-TK wurde immer kotransfiziert und diente zur Normalisierung der Transfektionseffizienz.

Für die Luziferase-Assays unter der Wirkung von Aldosteron oder dDAVP wurden die Zellen auf 96-well Platten ausgesät, 24 h danach auf Stimulations-Medium gesetzt und 30 h nach dem Aussäen transfiziert. 18 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von Stimulations-Medium mit 0,1% Ethanol (Carl

Roth) bei den Kontrollen oder 300 nM Aldosteron (Sigma) bzw. 10 nM dDAVP (Sigma) stimuliert und für 24 h weiter bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert.

Die Detektion der Luziferase-Aktivität erfolgte in einem Luminometer (Labsystems Luminoscan RS) mit einer institutseigenen Software (Luminoscan RII, Dr. Ralf Mrowka) unter Verwendung des Dual-Glo™ Luciferase Assay Systems (Promega) 24 h nach der Transfektion.

2.2 Molekularbiologische und biochemische Methoden

Alle molekularbiologischen und biochemischen Standardmethoden wurden entsprechend den Protokollen aus „Molecular Cloning, a laboratory manual“ von Sambrook *et al.* durchgeführt (B1).

2.2.1 RNA-Isolation und DNase-Verdau

Die Isolation der RNA aus Zellen oder aus Zytosol erfolgte unter Verwendung von RNA-Bee™ (BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Heidelberg, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers. Für die Isolation aus Zellen wurden diese zuvor zwei Mal mit 4°C kaltem 1 x DPBS gewaschen und direkt unter Zugabe von 1 ml RNA-Bee™ pro 60 cm²-Platte von der Platte geerntet.

Um mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA zu eliminieren wurde nach der RNA-Präparation für 30 min ein DNase-Verdau mit DNaseI (Fermentas) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch eine zweite darauf folgende RNA-Isolation unter Verwendung von RNA-Bee™ wurden alle DNase-Spuren eliminiert.

2.2.2 Klonierung von PCR-Fragmenten

Für die Klonierung und Transformation von PCR-Fragmenten wurde das TOPO TA Cloning® Dual Promoter Kit (Invitrogen) verwendet. Hierfür wurden die Abschnitte der Ratten γ -ENaC mRNA (GenBank Accession no. NM017046.1) welche die γ -ENaC 5'UTR (98 nt) und die 3'UTR (933 nt) representieren über PCR amplifiziert und in den pCR®II-TOPO-Vektor kloniert. Die PCR-Produkte wurden vor der Ligation entweder direkt über das QIAquick PCR Purification Kit, (QIAGEN) gereinigt und verwendet, oder zuvor über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und Produkte der richtigen Größe über das QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) isoliert und gereinigt. Die Ligation und

Transformation in TOP10F' *Escherichia coli* Zellen erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte über die Ampicillin-Resistenz. Positive Klone wurden über PCR unter der Verwendung spezifischer Primer und der T7-Primer auf die Insert-Größe und Orientierung kontrolliert und T7-sense orientierte Klone für eine weitere Kontrolle über Sequenzierung durch die MWG Biotech AG verwendet.

2.2.3 Klonierung der Luziferase-Expressionsvektoren

Der Ausgangsvektor für die Erstellung der Luziferase-Expressionsvektoren mit den Ratten γ -ENaC mRNA UTRs ist der pGL3-Promotor Vektor (Promega). Hierfür wurden die 5'UTR und die 3'UTR der Luziferase-mRNA gegen die UTRs der Ratten γ -ENaC mRNA (GenBank Accession no. NM017046.1) oder deren Deletionsvarianten ausgetauscht. Hierfür wurden die γ -ENaC UTRs über PCR amplifiziert und über das QIAquick PCR Purification Kit, (QIAGEN) gereinigt. Für die Klonierung der 5'UTR (98 nt) wurden dabei Primer mit angefügten Restriktionsschnittstellen für HindIII bzw. NcoI verwendet. Das PCR-Produkt wurde dann zunächst in den pCR[®]II-TOPO-Vektor kloniert und dann über Restriktion in den geschnittenen und gereinigten pGL3-Promotor Vektor umklont. Die Ligation erfolgte dabei unter Verwendung des LigaFast[™] Rapid DNA Ligation Systems (Promega) entsprechend den Vorgaben des Herstellers. Die Klonierung der 3'UTR (933 nt) erfolgte in der gleichen Weise über die Restriktionsschnittstellen von XbaI und Sall. Das Konstrukt pGL3p- γ ENaC3'UTRdelAU wurde über Deletion eines Psil-Fragments der γ -ENaC 3'UTR (nt 2869-2958) durch Psil-Restriktion und Religation der Fragmente erstellt. Das Konstrukt pGL3p-AU-element, welches den zentralen Anteil des AU-reichen Elements (nt 2865-2916) enthält wurde dagegen über PCR amplifiziert, in den pCR[®]II-TOPO-Vektor kloniert und dann über Restriktion in den geschnittenen und gereinigten pGL3-Promotor Vektor umklont. Alle Vektoren wurden durch Sequenzierung (MWG Biotech AG) überprüft.

2.2.4 Plasmid-DNA-Präparationen

Die Plasmid Präparationen wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) oder dem QIAprep Spin Midiprep Kit entsprechend den Angaben des Herstellers

durchgeführt. DNA für Transfektionen und Restriktionen wurde mit nukleasefreiem Wasser von der Matrix eluiert, ansonst wurde der im Kit enthaltene Elutions-Puffer verwendet. Die Bestimmung der Plasmidkonzentration erfolgte durch photometrische Messung.

2.2.5 Quantifizierung der mRNA durch RT-PCR

Für die Reverse Transkription der RNA in cDNA wurde die SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei wurden 3 µg Gesamt-RNA je Ansatz unter Verwendung der Oligo-dT-Primer in cDNA umgeschrieben. Die Quantifizierung der mRNA erfolgt über RT-PCR, wobei eine Normierung auf die 18 S/ 28 S rRNA-Banden bei den Stimulations-Experimenten unter Aldosteron oder dDAVP erfolgte. Hierfür wurden je 800 ng Gesamt-RNA der Probe über ein Agarose-Gel mit Ethidiumbromid aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Die Verlässlichkeit dieser Methode wurde durch eine gleichzeitige Analyse derselben Proben über Northern-Blot-Analyse überprüft. Diese Methode der Normierung auf die gefärbten 18 S/ 28 S rRNA-Banden wurde gewählt, da die normalerweise verwendeten Haushaltsgene β -Aktin und GAPDH unter Aldosteron Stimulation eine Induktion zeigten, und daher nicht zur Normierung verwendet werden konnten. Es erfolgte immer eine Kontrolle auf Kontamination durch genomische DNA über einen PCR-Ansatz mit RNA aus einer RT-Reaktion ohne reverse Transkriptase (-RT Kontrolle). In keinem Fall konnte dabei eine Kontamination nachgewiesen werden, die zu einem detektierbaren PCR-Produkt führte, daher ist die -RT-Kontrolle nur in **Abb. 3.14** gezeigt worden. Die Amplifikation erfolgte unter der Verwendung von 2,5 mM MgCl₂ mit folgendem Programm: 5 min bei 95°C, gefolgt von Zyklen mit 1 min bei 95°C, 30 sek Annealing, 1 min bei 72°C, und einer Endelongation für 10 min bei 72°C. Die Anzahl der Zyklen zur semiquantitativen Konzentrationsbestimmung wurde für jedes Zielgen in Abhängigkeit vom durchgeführten Experiment durch Plateau-Versuche ausgetestet. Alle PCR-Primer wurden vom TIB MOLBIOL Syntheselabor bezogen.

Die verwendeten Primer und Annealing-Temperaturen (in Klammern) sind wie folgt:

α -ENaC-forward 5'-GAGAGGAGAGTGCTCCTCTC, (60°C)

α -ENaC-reverse 5'-GATGGAACAAGCATTATTGAG; (60°C)

β -ENaC-forward 5'-TAGATCCCCACCCCCACC, (60°C)

β -ENaC-reverse 5'-CCAGTGTTTTCTCTCTTTATTTTC; (60°C)

γ -ENaC-forward 5'-CTCGTCTTCTCTTTCZACAC, (58°C)

γ -ENaC-reverse 5'-GCAGAATAGCTCATGTTG; (58°C)

β -actin-forward 5'-CCGCCCTAGGCACCAGGGTG, (60°C)

β -actin-reverse 5'-GGCTGGGGTGTGAAGGTCTCAA. (60°C)

Nach der PCR wurden gleiche Mengen in 1,5% Agarose-Gelen mit Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt und für die Auswertung unter UV-Licht fotografiert.

2.2.6 Isolation von zytosolischen Proteinen

Für die Isolation von zytosolischen Proteinen wurden die Zellen durch Trypsinieren von den Platten geerntet und im doppelten Volumen Lysispuffer (10 mM Tris, pH 7.5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 25% Glycerol; 0.1% SDS; 0.5% Nonidet P-40, 1 mM DTT; 1x Complete Protease Inhibitor Mix (Roche Diagnostics)) resuspendiert und mit dem Polytron-PT300 Blender (Kinematica AG) homogenisiert, gefolgt von einer 20 minütigen Inkubation auf Eis zur Lyse der Zellen. Das Homogenat wurde zentrifugiert (10 min, 4°C, 10.000 x g), und der Überstand (S10) in neue Reaktionsgefäße überführt. Für eine Lagerung der S10-Extrakte wurden diese aliquotiert, in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte durch photometrische Messung.

2.2.7 Fraktionierung von Polysomen und mRNPs durch Ultrazentrifugation

Für die Isolation Fraktionierung von Polysomen und mRNPs durch Ultrazentrifugation wurden zytoplasmatische S10 Extrakte (siehe 2.2.6) verwendet. Polysomen (S100-Pellet) wurden durch Zentrifugation der S10 Extrakte für 2 h bei 100.000 x g und 4°C (Beckman SW-41 Rotor) gewonnen. Der S100 Überstand wurde in neue Zentrifugenröhrchen überführt und die mRNPs

durch Zentrifugation für 3 h bei 300.000 x g und 4°C sedimentiert. Die Pellets der Polysomen und der mRNPs wurden in TKM-buffer (50 mM Tris; 25 mM KCl; 5 mM MgCl₂) resuspendiert. Die RNA Isolation aus den Polysomen und den mRNPs wurde durch eine Standard Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt.

2.2.8 Polysomengradienten-Analyse

Das Prinzip der Polysomengradienten-Analyse beruht auf der Auftrennung von mRNP-Komplexen und Polysomen entsprechend ihrer Masse über einen kontinuierlichen Sucrose-Gradienten. Je höher dabei der Besetzungsgrad einer mRNA mit Ribosomen ist, desto höher ist ihre Translationseffizienz und desto schneller sedimentiert die mRNA im Gradienten. Diese Methode ermöglicht somit eine Aussage über den Besetzungsgrad von mRNAs mit Ribosomen und über deren Translationseffizienz.

Für die Polysomengradienten-Analyse wurden zytosolische Lysate (S10), die wie unter 2.2.6 beschrieben isoliert wurden, auf einen kontinuierlichen Sucrose-Gradienten (17- 51% Sucrose) geladen. Die Gradienten (11 ml) wurden dafür zuvor unter Verwendung einer 17%-igen und einer 51%-igen Sucroslösung in Gradientenpuffer (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) mit Hilfe eines automatischen Mischsystems in Polyallomer-Röhrchen aufgebaut. Die Auftrennung der Polysomen erfolgte durch Ultrazentrifugation für 2 h bei 36.000 rpm (Beckmann L70 Ultrazentrifuge, SW-41 Rotor). Anschließend wurde der Gradient mit Hilfe einer Kanüle und einer peristaltischen Pumpe vom Boden des Zentrifugenröhrchens ausgehend in 12 Fraktionen unterteilt. Während der Fraktionierung wurde gleichzeitig kontinuierlich die Absorption 254 nm mit Hilfe eines Photometers (2138 UVICORD-S UV monitor; LKB Bromma) gemessen und dokumentiert. Die Fraktionierung erfolgte in 12 Fraktionen mit dem gleichen Volumen vom Boden (Fraktion 1) bis zum oberen Ende des Gradienten (Fraktion 12). Die einzelnen Fraktionen wurden in zwei gleiche Teile unterteilt, von denen einer für die Protein-Präparation, der andere für die Präparation der RNA verwendet wurde. Die Proteine wurden durch TCA-Fällung (Endkonzentration 10% TCA) präzipitiert, 3x mit Aceton gewaschen und in 100 µl Puffer (25 mM Tris, 1% SDS) gelöst. Die Isolation der RNA erfolgt unter Verwendung des E.Z.N.A. RNA Total Kits (VWR International) entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.2.9 Western-Blot Analyse

20-40 µg zytosolische Protein-Extrakte, bzw. 5 µl der einzelnen Fraktionen aus der Polysomengradienten-Analyse, wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und in Bio-Rad Mini Trans-Blot-Transfer Kammern (Bio-Rad) durch Nass-Blotting auf Roti®-PVDF Membranen transferriert (Roth). Die Membran wurde für 1 h bei RT in 1x TBS-T (20 mM Tris base, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) mit 5% Milchpulver (Carl Roth) blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 1 % Milch (1x TBS, 0,1% Tween-20). Nach dem Waschen der Membran für 3x 10 min mit 1x TBST (1x TBS, 0.1% Tween-20) erfolgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper für 1 h bei RT in 1 % Milch in 1x TBST. Vor der Detektion wurde die Membran 3x für 10 min mit 1x TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte unter Verwendung des ECL plus Western Blotting Detection Systems (Amersham Pharmacia Biotech) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Chemolumineszenz wurde durch Exposition eines Hyperfilms ECL (Amersham) dokumentiert. Vor einer weiteren Antikörperinkubation wurden die zuvor verwendeten Antikörper durch waschen mit 0,2 M NaOH für 5-10 min entfernt. Darauf wurde die Membran wie oben beschrieben blockiert und dann für eine erneute Antikörper-Detektion eingesetzt. Es wurden folgende Primärantikörper und Verdünnungen verwendet: anti-α ENaC (E4652, Sigma) 1:3000, anti-β ENaC (sc21013, Santa Cruz) 1:1000, anti-γ ENaC (sc22245 santa cruz) 1:500, anti-nucleolin (ab22758, Abcam) 1:2000, anti-HuR (# 07-468, upstate) 1:1000, anti-AUF1 (# 07-260, upstate) 1:3000, anti hnRNP-A2/B1 (BM4520, Acris) 1:500, anti-hnRNP-E1 (BioGenes GmbH) 1:12000, anti-Annexin (ab41803, Abcam) 1:1000, anti-ZFP36 (TTP) (ARP34385_P050, AVIA) 1:1000, anti-FMRP (sc28739, Santa Cruz) 1:1000, anti-hnRNP-A1 (sc10032, Santa Cruz) 1:200, anti-β-Actin (MAB1501R, Chemicon) 1:4000, anti-GAPDH (BM429, Acris) 1:6000. Als Sekundärantikörper wurden folgende HRP-konjugierte Antikörper und Verdünnungen verwendet: goat anti-rabbit (sc2030) 1:30.000, goat anti-mouse (sc2031) 1:100.000, donkey anti-rabbit (sc2317) 1:10.000, donkey anti-goat (sc2033) 1:10.000) and anti-chicken IgY (G135A, Promega) 1: 30.000, bovine anti-goat (sc2350) 1:30.000. Alle Sekundärantikörper außer dem anti-chicken IgY wurden von Santa Cruz bezogen.

Nach der Detektion wurden die Membranen mit Coomassie-Blau gefärbt und die gefärbten Proteinbanden zur Normierung der Western-Blot Signale verwendet.

Diese Art der Normierung wurde gewählt, da die Haushaltsgene β -Aktin und GAPDH, die normalerweise als Referenz verwendet werden, beide eine verstärkte Expression unter Aldosteron und dDAVP zeigten und daher nicht als Referenz verwendet werden konnten. Diese Art der Normierung wurde für alle Western-Blots mit zytosolischen Extrakten aus Hormon-behandelten Zellen verwendet.

2.3 Methoden zur Untersuchung von RNA/Protein-Interaktionen

2.3.1 RNA-Affinitätschromatographie

Für die Isolation von mRNA-Bindungsproteinen der γ -ENaC 3'UTR wurden *in vitro* Transkripte der γ -ENaC 3'UTR unter Verwendung von Biotin-CTP (Invitrogen) im Verhältnis 1:1 (markiertes CTP: unmarkiertes CTP) hergestellt. Die Komplexbildung der mRNA/Protein-Komplexe erfolgte unter Inkubation von 40 mg zytoplasmatischen Extrakten aus mCCD_{cl1}-Zellen mit 2,5 μ g *in vitro* Transkript und 200 u RNase-Inhibitor (Fermentas) für 45 min bei RT. Die Ribonukleoprotein-Komplexe (RNP-Komplexe) wurden mit Streptavidin-Agarose (Sigma-Aldrich) isoliert. Hierfür wurden zuvor je Ansatz 300 μ l Streptavidin-Agarose einmal mit 1 ml Elutionspuffer (20 mM Tris, pH 7,4; 1 M KCl; 3 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT) und dann 4x mit je 1 ml Waschpuffer (20 mM Tris, pH 7,4; 150 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT) gewaschen und die *in vitro* Transkripte durch Inkubation für 1,5 h bei 4°C an die Agarose gekoppelt. Als Negativkontrolle diente Proben ohne Zugabe eines *in vitro* Transkripts. Die beads wurden für 2 min bei 5000 x g sedimentiert, der Überstand abgenommen und die beads 5 x mit je 1 ml Waschpuffer für je 5 min gewaschen. Die letzten beiden Waschschrte wurden als Kontrollen verwendet. Die RNP-Komplexe wurden eluiert durch Inkubation der beads für 2 x 10 min bei RT mit Hochsalzpuffer 1 (20 mM Tris, pH 7,4; 1 M KCl; 3 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT) und 2 x 10 min bei RT mit Hochsalzpuffer 2 (5 mM Tris, pH 7,4, 3 M KCl, 0,75 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT). Die Fraktionen wurden vereinigt und mit TCA (10% Endkonzentration) bei RT gefällt. Die Pellets wurden mit kaltem Aceton gewaschen, getrocknet und dann in 30 μ l 1x Roti-Load (Carl Roth) gelöst. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt. Gefärbte Protein-Banden wurden ausgeschnitten und für die Identifizierung der Proteine durch MALDI-TOF-MS verwendet.

2.3.2 Identifizierung von Proteinen durch MALDI-TOF-MS

Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch MALDI-TOF-MS am Institut für Humangenetik, Charité Berlin, CVK, AG Prof. J. Klose.

Die Proteine wurden unter dafür unter der Verwendung von ZipPlates (Millipore) tryptisch verdaut. Die tryptischen Fragmente wurden mit einem Reflex IV MALDI-TOF Massenspektrometer (Bruker-Daltonics) analysiert und die Massenspektren mit Hilfe der Mascot Software 2.0 und einer automatischen Suche in der NCBI Datenbank ausgewertet.

2.3.3 Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)

Mit Hilfe des EMSA kann eine Assoziation von Proteinen an Nukleinsäuren (DNA oder RNA) nachgewiesen werden. Dieses wird sichtbar durch einen Shift des Nukleinsäure-Signals, der auf einem höheren Molekulargewicht und veränderten Laufeigenschaften durch das gebundene Protein in einer nativen PAGE oder Agarose-Gelelektrophorese beruht. In dieser Arbeit wurde der EMSA zum Nachweis einer Interaktion von zytosolischen Proteinen an die γ -ENaC mRNA 3'UTR verwendet.

Hierfür wurden radioaktiv markierte in vitro Transkripte der Ratten γ -ENaC 3'UTR unter Verwendung von $\alpha^{32}\text{P}$ -Uridin-5'-Triphosphat (800 Ci/mmol, MP Biomedicals GmbH) hergestellt. Für die Bildung des Shift-Komplexes wurden 3,5 μl zytosolisches Extrakt (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) mit 5,5 μl Puffer (10 mM HEPES, pH 7,2; 3 mM MgCl_2 ; 5% Glycerin; 1 mM DTT; 150 mM KCl; 2 μl RNaseOUT (Invitrogen); 50 ng/ μl Kaninchen rRNA) und 1 μl in vitro Transkript (10.000 cpm) für 30 min bei RT inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 1%-igen Agarose-Gelen in 0,5x TBE-Puffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele getrocknet und die Signale über das Phospho-Imager-System (Fujifilm FLA-3000) sowie durch Exposition von Filmen (Kodak Biomax MR-1) dokumentiert.

2.3.4 UV-Crosslinking-Assay

Mit Hilfe des UV-Crosslinkings kann ebenfalls eine Bindung von Proteinen an RNA nachgewiesen werden. Bei dieser Methode erfolgt jedoch ein Label-Transfer vom radioaktiv markierten Transkript auf die RNA-Bindungsproteine, so dass letztendlich nur Proteine detektiert werden, die direkt mit der RNA interagieren.

Die Herstellung der *in vitro* Transkripte sowie die Komplexbildung mit zytosolischen Extrakten aus mCCD_{cl1} Zellen in denen HuR überexprimiert wurde, erfolgt wie unter 2.3.3 beschrieben. Alternativ wurden für die Markierung der *in vitro* Transkripte $\alpha^{32}\text{P}$ -C/A/GTP verwendet. Für die UV-Crosslinking-Assays wurden 1–2 ng *in vitro* Transcript (300,000 cpm) eingesetzt. Die RNA/Protein-Komplexe wurden mit UV-Licht (255 nm, 1.6 Joule, UV-Stratalinker) auf Eis bestrahlt. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit RNase-A (30 µg/ml Endkonzentration) und RNase-T1 (750 u/ml Endkonzentration) für 1 h bei 37 °C. Die Ansätze wurden mit Ladepuffer (Roti[®]-Load 1, Roth) versetzt und über eine 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 30 min in Fixierungs-Lösung (10% Essigsäure, 10% Methanol) fixiert und anschließend getrocknet. Die Signale wurden über das Phospho-Imager-System (Fujifilm FLA-3000) sowie durch Exposition von Filmen (Kodak Biomax MR-1) dokumentiert.

2.3.5 Ko-Immunpräzipitation von RNA aus Zellextrakten (RNA-Pulldown-Assay)

Die Ko-Immunpräzipitation von HuR/mRNA-Komplexen wurde nach einem Protokoll von Doller et. al. (32) unter geringen Veränderungen durchgeführt. Die zytosolischen Extrakte für diese Methode wurden dabei unter Verwendung eines Lysepuffers mit 10 mM HEPES, pH 7.9; 1.5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0.5 mM DTT; 0.1% Nonidet P-40, 50 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄, 10 mM Natrium Pyrophosphat; 50 mM di-Natrium-Glycerol-Phosphate; und 100 u/ml RNase-Inhibitor hergestellt. Für die Immunpräzipitation (IP) aus zytosolischen Extrakten wurden je Ansatz 2 µg eines monoklonalen HuR-Antikörpers (Santa Cruz) bzw. die gleiche Menge Maus IgG mit dem zytosolischen Extrakt über Nacht bei 4°C inkubiert. Die HuR/mRNA-Komplexe wurden durch Inkubation für weitere 2 h mit Protein G-Sepharose CL-4B Beads (Amersham-Biosciences) an diese gebunden. Die Beads wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 × g sedimentiert und dann zweimal mit Niedrigsalz Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.2% Triton X-100; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0.1% SDS) und zweimal mit Hochsalz Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 500 mM NaCl; 0.2% Triton X-100; 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 0.1% SDS) gewaschen. Die Isolation der RNA aus den HuR/mRNA-Komplexen erfolgte durch direkte Zugabe von RNA-Bee (Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH) auf die Beads und nachfolgende Präparation der

RNA entsprechend den Angaben des Herstellers. Für eine Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge wurde jeweils aus der gleichen Menge, welche für die IP eingesetzt wurde, die Gesamt-RNA extrahiert und parallel zur RT-PCR der IP-Proben die Ziel-mRNAs detektiert.

2.4 Densitometrische Analyse und statistische Auswertung

Autoradiographien von Western-Blots und Fotografien von Agarose-Gelen wurden densitometrisch unter Verwendung des Programms Scion Image software (Scion Corp.) quantifiziert. Die Ergebnisse wurden als arithmetischen Mittelwerte (MW) und ihrer Standardabweichung (\pm STABW) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde über den zweiseitigen Student'schen T-Test ermittelt, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0.05$ als statistisch signifikant betrachtet wurde.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte die Expression des ENaC im Hinblick auf eine nierenspezifische Wirkung der Hormone Aldosteron und Vasopressin auf eine Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen untersucht werden. Hierfür wurde als Untersuchungsmodell die kortikale Sammelrohr-Zelllinie mCCD_{cl1} (*mouse cortical collecting duct clone 1*) verwendet. Die Zelllinie stammt aus dem Labor von B.C. Rossier und entstand durch spontane Immortalisierung von Primärzellen, die durch Mikrodissektion aus dem kortikalen Sammelrohr von Mäuse-Nieren gewonnen wurden (51). Sie besitzen einen gut ausdifferenzierten Phänotyp epithelialer Zellen des kortikalen Sammelrohrs. Zu den Merkmalen zählen die Ausbildung polarisierter Monolayer aus konfluent gewachsenen Zellen, die durch Zellkontakte wie Tight Junctions und Desmosomen verbunden sind, sowie die Ausbildung von Zell-Domen. Beruhend darauf besitzen die Zellen, wenn sie auf Filtern gezüchtet werden, einen von den Kulturbedingungen abhängig hohen transepithelialen Widerstand (zwischen 2000 und 5000 Ω/cm^2) und zeigen in Messungen der Ionenströme einen durch Aldosteron und Vasopressin stimulierbaren Amilorid-sensitiven Na^+ -Strom, der durch ENaC vermittelt wird (51). Die Expression von ENaC, sowie des Glucokorticoide-Rezeptors und des Mineralcorticoide-Rezeptors in mCCD_{cl1}-Zellen wurde zuvor ebenfalls über RT-PCR nachgewiesen (51).

3.1 Expression der ENaC Untereinheiten in mCCD_{cl1} Zellen unter dem Einfluss von Aldosteron oder Vasopressin

Als Grundlage für die Untersuchung der ENaC Expression auf die Beteiligung posttranskriptioneller Regulationsmechanismen wurde als erstes der Effekt von Aldosteron und Vasopressin auf die ENaC mRNAs und die Proteine in mCCD_{cl1} Zellen überprüft. Für die Vasopressin-Stimulation wurde dabei der reine V2-Rezeptor Agonist dDAVP (Deamino-8-Arginin-Vasopressin) verwendet. Hierfür wurden die mCCD-Zellen auf 60 cm^2 Zellkultur-Platten ausgesät und kultiviert bis sie eine konfluente Monolayer kubusförmiger Zellen bildeten und begannen Dome zu bilden. Die Dombildung gilt dabei als typisches morphologisches Merkmal der Differenzierung von Ionen-transportierenden Epithelzellen (9, 112). Darauf wurden

die Zellen für 24 Stunden mit Aldosteron [300 nM] oder dDAVP [10 nM] stimuliert und anschließend für die weitere Analyse geerntet. Die **Abb. 3.1** zeigt typische lichtmikroskopische Aufnahmen von $mCCD_{cl1}$ -Zellen, die unter Kontrollbedingungen (0,1 % Ethanol) oder mit Aldosteron oder dDAVP inkubiert wurden. Die Dombildung ist deutlich sichtbar und ist unter Aldosteron- und dDAVP-Stimulation verstärkt zu sehen. Ebenso scheinen die Dome unter dDAVP kleiner, das heißt aus weniger Zellen zu bestehen als unter Kontrollbedingungen. Die Morphologie der Zellen wurde in allen durchgeführten Versuchen unter dem Durchlicht-Mikroskop kontrolliert.

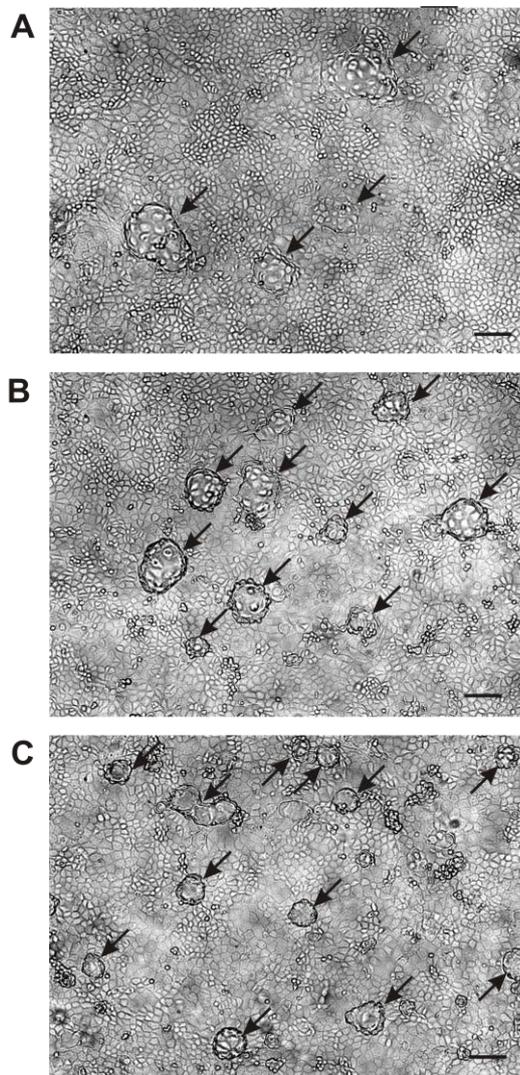


Abb. 3.1: Morphologie der $mCCD_{cl1}$ -Zellen.

$mCCD_{cl1}$ -Zellen wurden in Zellkultur-Schalen kultiviert, bis sie eine konfluente Monolayer und Dome (gekennzeichnet durch Pfeile) bildeten. Die Zellen wurden dann für 24 h mit 0,1 % Ethanol als Kontrolle (A) oder mit Aldosteron [300 nM] (B), bzw. mit dDAVP [10 nM] (C) inkubiert. Die Fotos zeigen repräsentative Aufnahmen. Der Scale Bar entspricht 10 μ M.

Für die Bestimmung der α -, β - und γ -ENaC mRNA-Menge wurde die gesamt-RNA präpariert und mittels RT-PCR bestimmt (**Abb. 3.2A**) Zur Quantifizierung der ENaC Protein-Menge wurden Ganzzell-Extrakte gewonnen und die α -, β - und γ -ENaC Protein-Menge durch Western-Blotting bestimmt (**Abb. 3.2B**). Die Expression von α -ENaC war im Vergleich zur Kontrolle nach 24 Stunden Stimulation mit Aldosteron sowohl auf mRNA- (2.4-fach) als auch auf Protein-Ebene (3,4-fach) signifikant erhöht. Die Stimulation mit dDAVP führte dagegen bei α -ENaC nicht zu einer erhöhten Expression (1,2-fach auf mRNA-Ebene, 1,1-fach auf Protein-Ebene). Die Expression von β -ENaC zeigte weder unter Aldosteron (1,1-fache mRNA-Menge, 1,1-fache Protein-Menge) noch unter dDAVP (1,2-fache mRNA-Menge, 1,2-fache Protein-Menge) eine Veränderung. Bei der γ -Untereinheit führte die Stimulation mit Aldosteron dagegen zu einer erhöhten Expression sowohl auf mRNA- (1,6-fach) als auch auf Protein-Ebene (1,9-fach). Ebenso konnte unter dDAVP eine signifikante Erhöhung der Expression der γ -ENaC mRNA auf das 1,9-fache und des Proteins auf das 2,9-fache der Kontrolle gemessen werden. Es konnte also unter Aldosteron für α - und γ -ENaC, sowie unter dDAVP für γ -ENaC eine stärkere Induktion der Expression des Proteins als der mRNA beobachtet werden, was ein Hinweis auf die Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen ist.

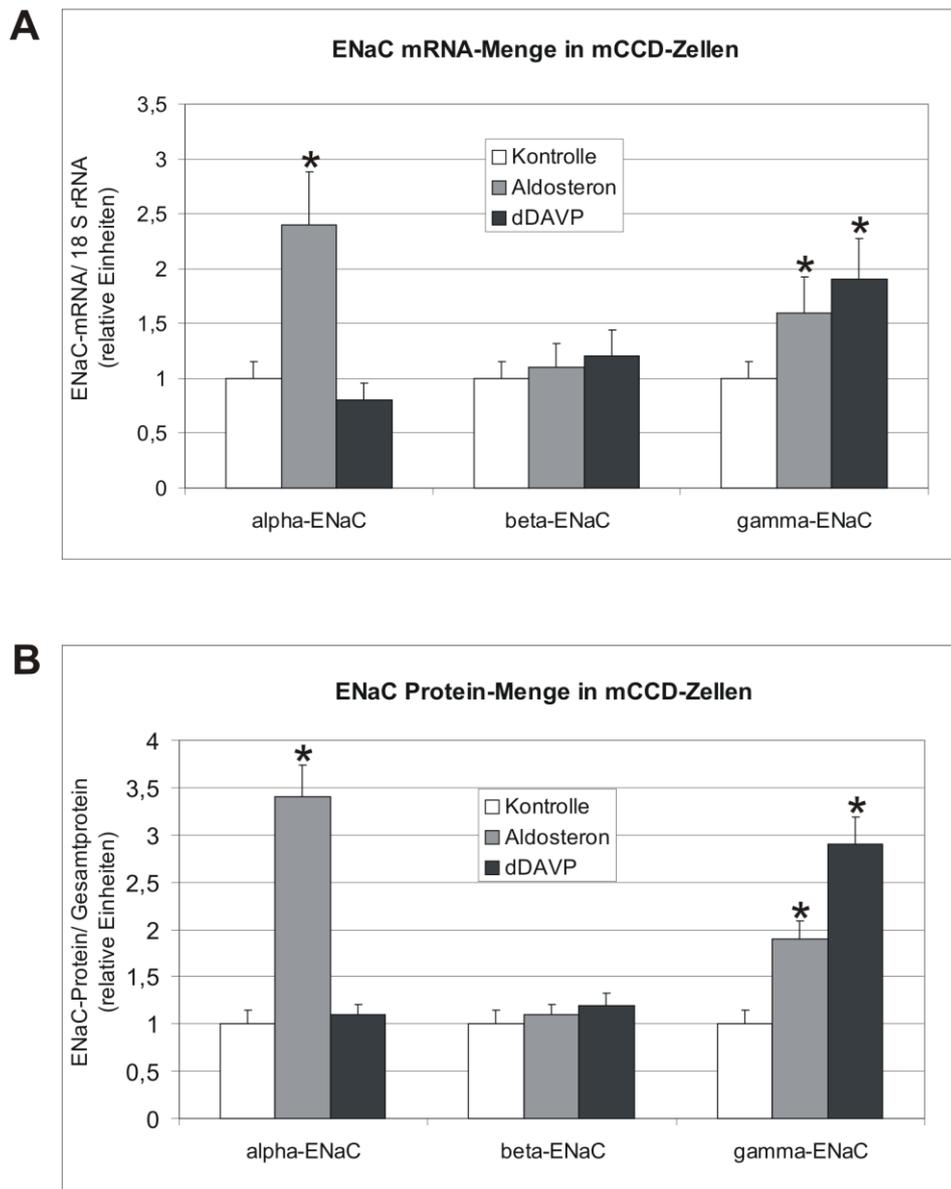


Abb. 3.2: Einfluss von Aldosteron und dDAVP auf die ENaC Expression in mCCD-Zellen.

mCCD-Zellen wurden mit Aldosteron [300 nM] oder dDAVP [10 nM] für 24 h kultiviert. Die RNA wurde extrahiert und die relative α -, β - und γ -ENaC mRNA-Menge über RT-PCR bestimmt. Der Abgleich erfolgte über die 18 S rRNA wie in Material und Methoden beschrieben. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm STABW (n= 5). Die Kontrollen wurden auf 1.0 gesetzt. * für $P \leq 0.05$ bezogen auf die Kontrolle. **(A)**. Zytosolische Extrakte (S10) wurden für Western-Blot-Analysen eingesetzt, um die Menge an α -, β - und γ -ENaC Protein zu bestimmen. Die Normalisierung erfolgte auf Coomassie-Blau gefärbte Gesamtproteinmenge der zytosolischen Extrakte, wie in Material und Methoden beschrieben **(B)**. Die Quantifizierung erfolgte über densitometrische Auswertung der Gele und Autoradiographien mit Scion-Image. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte \pm STABW (n= 3). Die Kontrollen wurden auf 1.0 gesetzt. * für $P \leq 0.05$ bezogen auf die Kontrolle.

3.2 Verteilung der ENaC mRNAs zwischen translationsaktiven

Polysomen und translationsinaktiven mRNPs

Die mRNAs im Zytoplasma von Zellen befinden sich hauptsächlich in zwei funktionellen Kompartimenten, den translationsaktiven Polysomen und den überwiegend translationsinaktiven mRNPs (messenger ribonucleoproteins). Diese beiden Fraktionen lassen sich durch Ultrazentrifugation voneinander trennen, was eine Analyse der in den Fraktionen enthaltenen mRNAs und eine Aussage über deren Translationsstatus ermöglicht.

Da die Analyse der mRNA und Proteinmenge von α - und γ -ENaC nach Stimulation mit Aldosteron oder dDAVP auf eine Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen deuten wurde zunächst diese Art der Fraktionierung durch Ultrazentrifugation durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode sollte ein Eindruck über die Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen bezüglich der Lokalisation der ENaC mRNAs in der Zelle gewonnen werden. Hierfür wurden zytoplasmatische Extrakte (10.000 x g Überstand der lysierten Zellen) aus mit Aldosteron oder dDAVP stimulierten mCCD_{Cl1} Zellen eingesetzt. Durch Ultrazentrifugation wurden hieraus die Polysomen (100.000 x g Pellet des S10) und die mRNPs (300.000 x g Pellet des S100) gewonnen. Die Quantifizierung der ENaC mRNAs und von β -Aktin als Referenz erfolgte mittels RT-PCR. Die mRNAs der α -, β -, und γ -ENaC Untereinheit zeigten hierbei ein sehr unterschiedliches Verhalten (**Abb. 3.3**).

Die mRNAs von α - und β -ENaC waren sowohl in den Kontrollzellen als auch in den mit Aldosteron oder dDAVP stimulierten Zellen fast ausschließlich mit Ribosomen assoziiert und in den Polysomen zu finden. Nur ganz geringe Spuren von α - und β -ENaC mRNA konnten in den freien Polysomen nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu waren unter Kontrollbedingungen nur etwa 60% der γ -ENaC mRNA mit Polysomen assoziiert, die restlichen 40% dagegen in der Fraktion der translationell inaktiven mRNPs. Dieses Verhältnis änderte sich drastisch in Extrakten aus Zellen, die zuvor mit Aldosteron oder dDAVP stimuliert worden waren. Unter Aldosteron-Stimulation verlagerte sich der größte Anteil der γ -ENaC mRNA aus den translationsinaktiven mRNPs in die Fraktion der Polysomen, so dass in den mRNPs nur eine geringe Menge an γ -ENaC mRNA verblieb. Die Stimulation mit dDAVP führte ebenso zu einer Verlagerung der γ -ENaC mRNA in die Polysomen, wie es unter Aldosteron zu beobachten war. Hier

verblieb jedoch mit etwa 10% ein etwas größerer Anteil der γ -ENaC mRNA in der Fraktion der freien mRNPs.

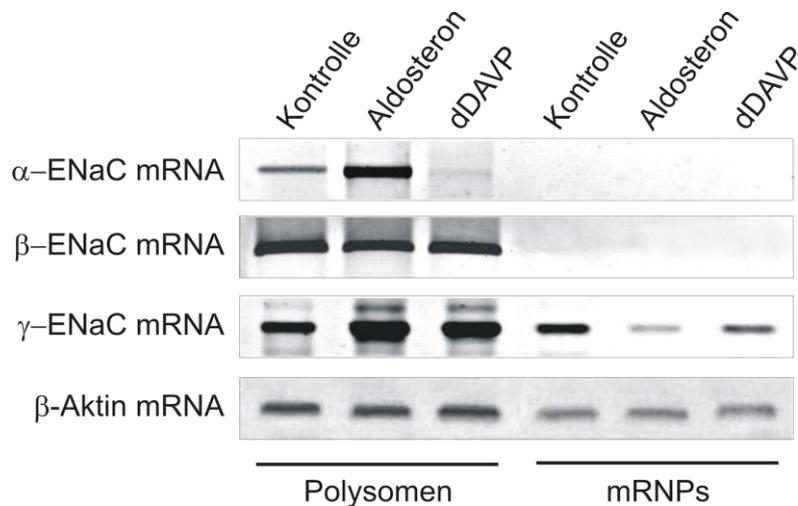


Abb. 3.3: Verteilung der ENaC mRNAs zwischen Polysomen und mRNPs.

Für die Fraktionierung wurden zytosolische Extrakte (S10) aus mCCD-Zellen, die unter Kontrollbedingungen (0,1% Ethanol) oder mit Aldosteron [300 nM] oder dDAVP [10 nM] kultiviert wurden verwendet. Die Polysomen (100.000 x g Pellet des S10) und die postpolysomalen mRNPs (300.000 x g Pellet des S100) wurden durch Ultrazentrifugation gewonnen. Die RNA der Fraktionen wurde extrahiert und die α -, β - und γ -ENaC mRNA-Menge über RT-PCR bestimmt. Zur Kontrolle wurde β -Aktin mRNA detektiert. Die -RT-Kontrollen ergaben keine Signale (Daten nicht gezeigt). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bild aus drei Experimenten.

3.3 Expression eines Luziferase-Reportergen-Konstrukts in

Abhängigkeit von der γ -ENaC mRNA 3'UTR unter Aldosteron und dDAVP in mCCD_{cl1}

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Lokalisation der ENaC mRNAs unter Aldosteron und dDAVP aus **Abb. 3.3** zeigten nur für die γ -ENaC mRNA eine deutliche Verlagerung aus der Fraktion der translationsinaktiven mRNPs in die Fraktion der Polysomen. Hiermit verbunden ist auch eine Änderung des funktionellen Zustands der verlagerten γ -ENaC mRNA in den Pool der aktiv translatierten mRNAs, die zum Beispiel auf einer Aktivierung der Translation bedingt durch die hormonelle Stimulation beruhen kann. Der Fokus der weiteren Untersuchungen wurde aufgrund dieser Ergebnisse auf die Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen für der Expression der γ -ENaC Untereinheit gelegt. Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen beruhen meist auf der Interaktion RNA-bindender Faktoren an definierte Motive der mRNA. Lokalisiert

sind diese Motive hauptsächlich in den nichtkodierenden Bereichen der untranslatierten Regionen (UTRs) der mRNAs. Die Modulation der Expression durch spezifische UTRs lässt sich mit Hilfe von Luziferase-Reportergen-Konstrukten untersuchen. Mit Hilfe dieser Methode sollte zunächst untersucht werden, welche Rolle die UTRs der γ -ENaC mRNA für die veränderte Expression unter Hormon-Stimulation spielen. Hierfür wurde als Ausgangsvektor ein Reportergen-Plasmid verwendet, welches das Gen für die Firefly Luziferase unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven SV40-Promotors enthält. Man geht somit bei der Analyse der Daten von einer konstitutiven und nicht modulierten Transkription des Luziferase-Gens aus. Weiterhin ist die exprimierte Luziferase aktiv und bedarf keiner posttranslationalen Modifikation. Die Messung der Luziferase-Menge erfolgt dabei indirekt über die Bestimmung ihrer Aktivität über Messung der Lumineszenz, die auf der Umsetzung eines Substrats beruht. Für die verwendeten Konstrukte wurden die UTRs der Firefly Luziferase durch die UTRs der γ -ENaC mRNA ersetzt. Hierbei wurden drei Konstrukte generiert: Eines enthielt nur die 5'UTR, das Zweite nur die 3'UTR und das Dritte enthielt die 5'- und die 3'UTR der γ -ENaC mRNA. Um die Wirkung der UTRs auf die Luziferase-Expression zu untersuchen wurden mCCD_{cl1} Zellen mit den Konstrukten transfiziert und mit Aldosteron oder dDAVP stimuliert. Die Messung der Luziferase Aktivität erfolgte 24 h nach Stimulationsbeginn. Die Ergebnisse zeigen, dass die γ -ENaC 5'UTR im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Einfluss auf die Luziferase-Aktivität hat, die γ -ENaC 3'UTR jedoch sowohl unter Aldosteron (2-fach erhöht), als auch unter dDAVP (2,3-fach erhöht) zu einem Anstieg der Luziferase-Aktivität führt. Den größten Effekt zeigt jedoch die Kombination der γ -ENaC 5'- und 3'UTR, bei der die Stimulation mit Aldosteron zu einer 2,2-fachen und die Stimulation mit dDAVP zu einer 2,9-fachen Erhöhung der Luziferase-Aktivität führt. Diese Ergebnisse zeigen, dass nur die γ -ENaC 3'UTR und nicht die 5'UTR in der Lage ist eine Steigerung der Expression durch Aldosteron oder dDAVP zu vermitteln.

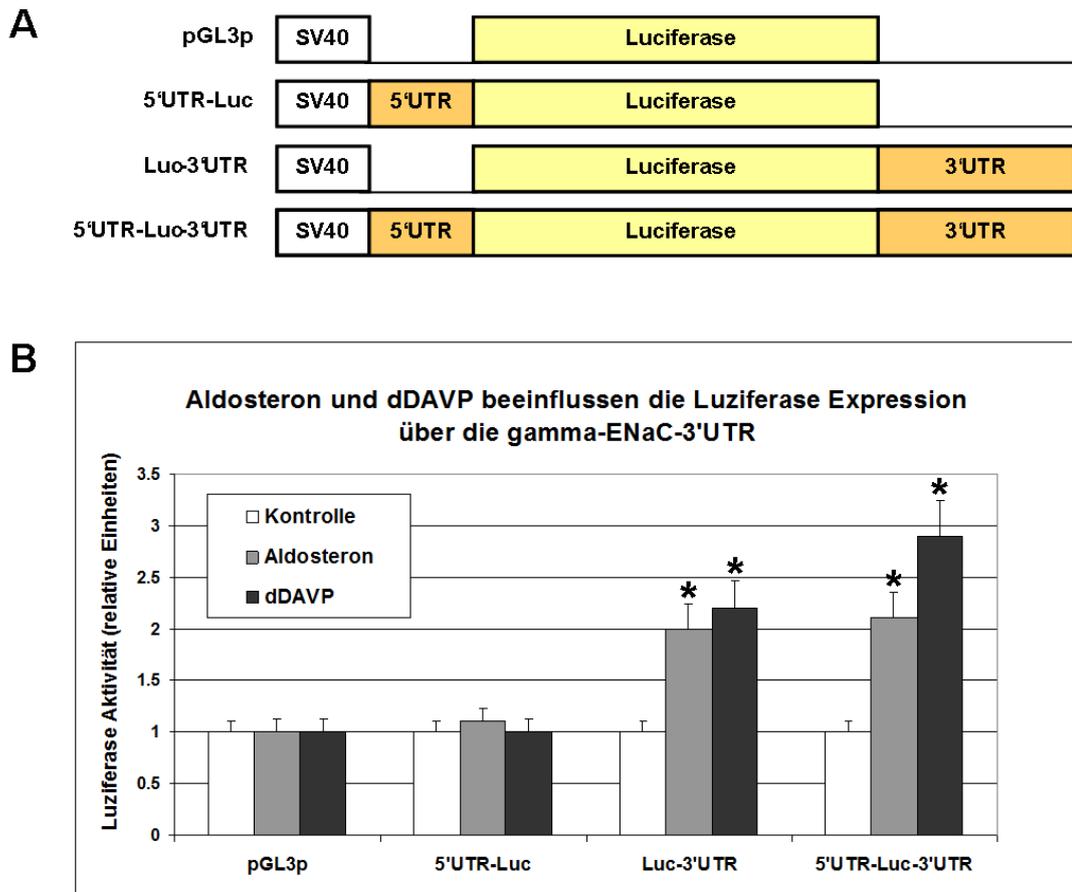


Abb. 3.4: Einfluss von Aldosteron und dDAVP auf die γ -ENaC UTR-abhängige Luziferase Expression in mCCD Zellen.

Schematische Darstellung der *Firefly* Luziferase-Reporter-Gen-Konstrukte, die für die Transfektion von mCCD-Zellen verwendet wurden. Der Ursprungsvektor pGL3-Promotor (pGL3p) mit einem SV40-Promotor und den Luziferase-UTRs (durchgezogene Linie), wurde durch Austausch der Luziferase-UTRs durch die Ratten γ -ENaC UTRs (5'UTR und/ oder 3'UTR) modifiziert (A). mCCD-Zellen wurden mit den in (A) angegebenen Luziferase-Konstrukten transfiziert. 18 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h unter Kontroll- (0,1% Ethanol) oder Stimulationsbedingungen (300 nM Aldosteron oder 10 nM dDAVP) kultiviert. Nach 24 h Stimulation erfolgte die Messung der UTR-abhängigen Luziferase-Aktivität. Zur Normalisierung der Transfektions Effizienz wurde die Luziferase-Aktivität der Renilla Luziferase (Vektor phRL-TK) verwendet, die immer cotransfiziert wurde. Die relativen Werte der Firefly-Luziferase wurden auf die Werte des pGL3p und die Kontrolle (0,1% Ethanol) bezogen. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte \pm STABW (n= 6). Die Kontrollen wurden auf 1.0 gesetzt. * für $P \leq 0.05$ bezogen auf die Kontrolle.

3.4 Untersuchung der γ -ENaC 3'UTR auf bekannte RNA-Bindungs-Motive

Die Ergebnisse der Fraktionierung (**Abb. 3.3**) zeigen, dass die Stimulation von mCCD-Zellen mit Aldosteron oder dDAVP zu einer veränderten intrazellulären Lokalisation (Shift aus den postpolysomalen RNPs in die polysomale Fraktion) der γ -ENaC mRNA führt. Aus den Luziferase-Assays (**Abb. 3.4**) wird ersichtlich, dass nur die γ -ENaC mRNA 3'UTR an der Steigerung der γ -ENaC Expression unter Aldosteron- und dDAVP-Stimulation beteiligt ist. Die 3'UTR der γ -ENaC mRNA wurde deshalb auf bekannte RNA-Bindungsmotive für RNA-Bindungsproteine untersucht. Hierdurch konnte ein AU-reiches Motiv des Typs III in der 3'-terminalen Region der γ -ENaC mRNA 3'UTR Sequenz identifiziert werden (**Abb. 3.5B**), welches bei Säugetieren hoch konserviert ist. AREs des Typ III besitzen keine klar definierten Motive, wie AUUUA-Abfolgen wie sie für AREs der Klasse I und II charakteristisch sind (8). Sie sind bislang wenig untersucht und zeichnen sich vielmehr durch einen hohen U-Reichtum in ihrer Sequenz aus, wie es beispielsweise für die 3'UTR der c-jun mRNA beschrieben wurde (115). Das γ -ENaC ARE ist mit einem prozentualen Anteil von 90% an A (42%) und U (48%) besonders AU-reich. Ein Sequenzvergleich der AREs der γ -ENaC 3'UTR aus Ratte und Maus ist in **Abb. 3.5C** dargestellt. AU-reiche Motive sind bekannt als Elemente, die in Interaktion mit ARE-BPs Mechanismen zur Stabilisierung/ Destabilisierung (8, 150, 139, 80, 119, 132) von mRNAs sowie Mechanismen zur Translationskontrolle (8, 97, 71) vermitteln.

3.5 Einfluss von Aldosteron oder Vasopressin auf die ENaC mRNA-Stabilität

Ein grundlegender posttranskriptioneller Mechanismus zur Modulation der Gen-Expression ist die Regulation der mRNA-Stabilität. Diese ist für jede mRNA spezifisch. Sie kann sich jedoch aufgrund eines Stimulus verändern. Eine Veränderung der mRNA-Stabilität, kann somit ebenso wie eine Veränderung der Transkriptionsrate zur Zunahme oder Abnahme des Levels einer spezifischen mRNA in einer Zelle führen. AU-reiche Elemente, wie das in der γ -ENaC 3'UTR identifizierte ARE (**Abb. 3.5**) sind bekannte Motive, die durch Interaktion mit ARE-BPs eine Stabilisierung von mRNAs vermitteln können. So zeigte die Untersuchung der 3'UTR-abhängigen Luziferase-Aktivität einen Anstieg unter Aldosteron und dDAVP (**Abb. 3.4**), der auf einer Stabilisierung und einem damit verbundenen Anstieg der translatierbaren mRNA-Menge beruhen kann. Da außerdem die Stimulation von mCCD_{cl1} Zellen mit Aldosteron oder dDAVP zu einer Erhöhung der α - und γ -ENaC mRNA-Menge führte (**Abb. 3.2**), sollte geklärt werden, inwiefern eine Zunahme der mRNA-Stabilität für die beobachteten Effekte verantwortlich oder daran beteiligt ist.

Um die mRNA-Stabilität zu bestimmen bedient man sich der Hilfe von Transkriptions-Inhibitoren wie Actinomycin D oder α -Amanitin. Actinomycin D interkaliert zwischen GC-Paare doppelsträngiger DNA und hemmt dadurch die Transkription aller drei eukaryotischen Polymerasen I, II und III. Durch die Hemmung der mRNA-Neusynthese kann man die Abnahme der mRNA-Menge über die Zeit bestimmen und somit auch untersuchen ob ein Stimulus einen Einfluss auf die mRNA Stabilität einer spezifischen mRNA hat.

Zur Bestimmung der mRNA-Stabilität der ENaC mRNAs in mCCD_{cl1} Zellen wurden die Zellen zunächst für 24 h mit Aldosteron oder dDAVP stimuliert und dann durch Zugabe von Actinomycin D [10 μ M] die Transkription gehemmt. Nach 0, 3, 6, 9 und 24 h wurden Zellen geerntet und die RNA präpariert. Die Bestimmung der ENaC mRNA-Menge erfolgte dann über RT-PCR, wobei β -Aktin als Vergleich diente. Die Ergebnisse in **Abb. 3.6** zeigen, dass weder die Stimulation mit Aldosteron, noch die mit dDAVP zu einer generellen Stabilisierung der untersuchten mRNAs führte. Im Gegenteil, Aldosteron und dDAVP besaßen bei allen drei (α -, β - und γ -ENaC) untersuchten Transkripten einen leicht destabilisierenden Effekt. Somit kann ausgeschlossen werden, dass eine

Stabilisierung für den Anstieg der α - und γ -ENaC mRNA nach Stimulation mit Aldosteron oder dDAVP verantwortlich ist. Die Ursache für diesen Anstieg der α - und γ -ENaC mRNA-Menge muss daher ausschließlich auf einer erhöhten Transkriptionsrate beruhen.

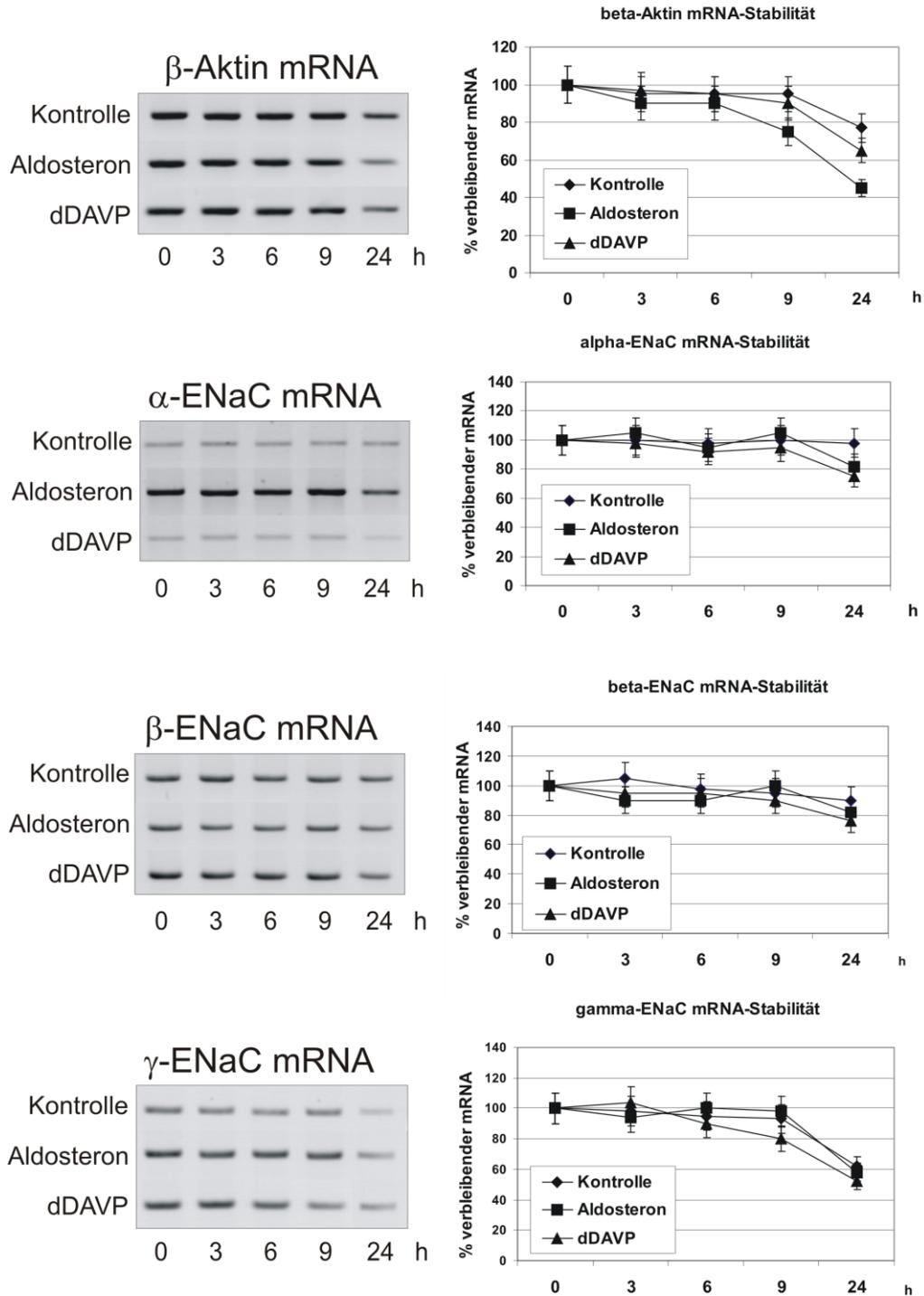


Abb. 3.6: Stabilität der ENaC mRNAs in Aldosteron- oder dDAVP-behandelten mCCD-Zellen.

mCCD Zellen wurden für 24 h mit Aldosteron [300 nM] oder dDAVP [10 nM] stimuliert. Die Transkription wurde durch Zugabe von Actinomycin D [Endkonzentration 10 µM] gestoppt. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen geerntet. Die gesamte RNA wurde präpariert und das gleiche Volumen für die RT-Reaktion eingesetzt. Die Bestimmung der α -, β - und γ -ENaC sowie der β -Aktin (Kontrolle) mRNA-Menge erfolgte durch RT-PCR. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Die Diagramme zeigen die prozentuale Menge an verbleibender mRNA in Bezug auf die jeweilige mRNA Menge zum Zeitpunkt 0 h (=100 %).

3.6 Einfluss von Aldosteron und dDAVP auf die Translations-effizienz der ENaC mRNAs

Ein weiterer fundamentaler Mechanismus der posttranskriptionellen Expressionskontrolle betrifft die Modulation der Translationseffizienz einer mRNA. Diese wirkt hauptsächlich über die Translationsinitiation, also über eine verstärkte oder verminderte Rekrutierung von Ribosomen an die mRNA, was entsprechend zu einer erhöhten oder verminderten Translation führt. Der Besetzungsgrad einer mRNA mit Ribosomen spiegelt dabei die Translationseffizienz für diese mRNA wieder. Er lässt sich mit Hilfe der Polysomengradienten-Analyse bestimmen wodurch diese Methode auch eine Aussage über die Translationseffizienz der untersuchten mRNAs zulässt. Das Prinzip der Polysomengradienten-Analyse beruht dabei auf der Auftrennung der mRNP-Komplexe und Polysomen über einen kontinuierlichen Sucrose-Gradienten. Entsprechend ihrer Masse, die mit zunehmendem Besetzungsgrad an Ribosomen steigt, sedimentieren die RNPs im Sucrose-Gradienten schneller oder langsamer. Somit erhält man bei einer Fraktionierung des Gradienten vom Boden des Zentrifugen-Röhrchens (51% Sucrose) nach oben (17% Sucrose) und unter gleichzeitiger Messung der Absorption bei 254 nm das charakteristische Profil eines Polysomengradienten. Aufgrund des UV-Profiles kann man die Verteilung der RNA den Polysomen, Monosomen (80 S- Komplexe), der schweren (60 S) und der leichten (40 S) ribosomalen Untereinheit, sowie den mRNP-Komplexen ohne assoziierte Ribosomen und den freien Proteinen zuordnen (**Abb. 3.7A**). Die Polysomen teilt man mit ansteigendem Besetzungsgrad an Ribosomen, welcher gleichbedeutend ist mit einer ansteigenden Translationseffizienz, in leichte, mittelschwere und schwere Polysomen ein.

Für die Analyse wurden zytosolische Lysate (S10) von Kontrollzellen und Hormon-behandelten Zellen (Aldosteron oder dDAVP) auf einen kontinuierlichen Sucrose-Gradienten (17- 51% Sucrose) geladen. Die Auftrennung der Polysomen erfolgte durch Ultrazentrifugation bei 160.000 x g für 2 h. Anschließend wurde der Gradient in 12 Fraktionen unterteilt unter gleichzeitiger Kontrolle des UV-Profiles (254 nm) der RNA. Die UV-Absorptions-Profile der Polysomengradienten unter Hormonstimulation mit Aldosteron oder dDAVP und den Kontrollzellen unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde deshalb exemplarisch nur ein Polysomengradienten-Profil

von Material aus Aldosteron-stimulierten mCCD_{c11}-Zellen in **Abb. 3.7A** dargestellt. Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen auf α -, β - and γ -ENaC mRNA erfolgte durch RT-PCR (**Abb. 3.7B**). Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen, dass die α -ENaC mRNA sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter dDAVP-Stimulation gleichermaßen in leichten und mittelschweren Polysomen vorkommt. Die Stimulation mit Aldosteron führt dagegen zu einer verstärkten Translationseffizienz der α -ENaC mRNA was sich durch einen Shift der α -ENaC mRNA in schwerere Polysomenfraktionen zeigt. Die Translation der β -ENaC mRNA wird weder unter der Stimulation mit Aldosteron noch unter dDAVP verändert, da die β -ENaC mRNA unter allen Bedingungen in leichten und mittelschweren Polysomen vorhanden ist. Im Gegensatz hierzu führen sowohl Aldosteron, als auch dDAVP zu einer verstärkten Rekrutierung von Ribosomen an die γ -ENaC mRNA, was zu einem Shift der γ -ENaC mRNA um zwei Fraktionen in schwerere Polysomen führt. Für die Überprüfung der Integrität der Polysomen wurden parallel Gradienten gefahren, die mit EDTA behandelt wurden. Diese Behandlung führte zu einer vollständigen Dissoziation der Polysomen-Komplexe, was im UV-Profil des Polysomengradienten zu einem Verschwinden des Polysomen-Signals und einem einzigen großen Peak in den leichten Fraktionen 9-10 (Ribosomenuntereinheiten, mRNPs und freie Proteine) führt (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend kann man sagen, dass Aldosteron zu einer verstärkten Translation der α - und γ -ENaC mRNA, die Stimulation des V₂-Rezeptors durch dDAVP jedoch nur zu einer verstärkten Translation der γ -ENaC mRNA führen.

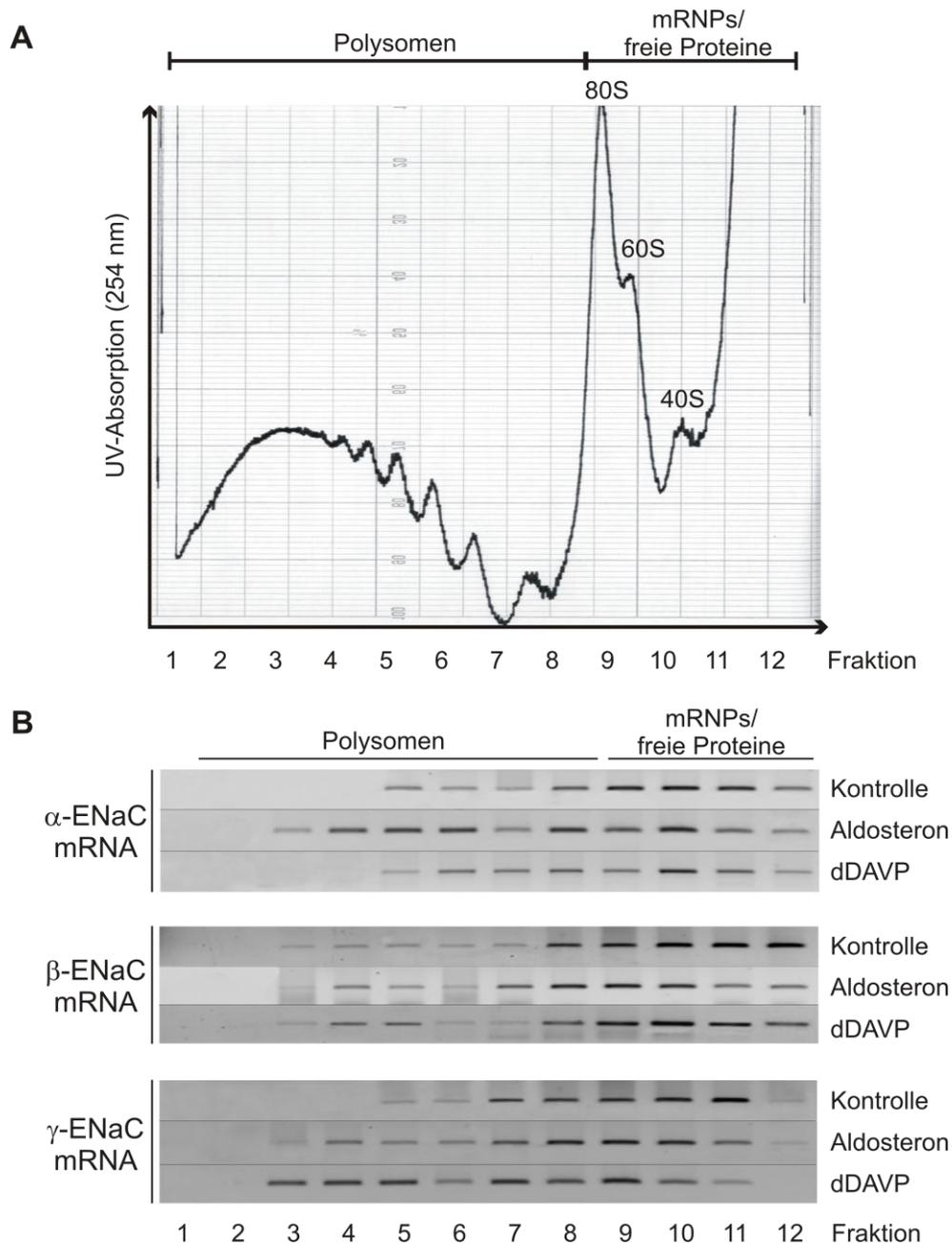


Abb. 3.7: Anstieg der Translationseffizienz der α - und γ -ENaC mRNA unter Aldosteron und dDAVP in mCCD-Zellen (Polysomengradienten-Analyse).

Zytosolische Extrakte (S10) aus Aldosteron- oder dDAVP-stimulierten mCCD-Zellen wurden durch Ultrazentrifugation (160.000 x g, 2 h) über einen kontinuierlichen Sucrose-Gradienten (17-51 % Sucrose) aufgetrennt und von unten (51% Sucrose) nach oben (17% Sucrose) in 12 Fraktionen unterteilt. Die Absorption bei 254 nm wurde während der Fraktionierung kontinuierlich gemessen (repräsentative Darstellung eines Profils) (A). Die gesamt-RNA der einzelnen Fraktionen wurde präpariert und die relative Menge an α -, β - und γ -ENaC mRNA durch RT-PCR quantifiziert. Die Polysomen-gebundenen mRNAs sind in den Fraktionen 2-8 enthalten, die freien mRNPs und freie Proteine dagegen in den Fraktionen 9-12. Die Abbildung zeigt die repräsentativen Ergebnisse eines von drei Experimenten (B).

3.7 Bindung von Proteinen aus zytoplasmatischen Extrakten von *mCCD_{cl1}* Zellen an die γ -ENaC mRNA 3'UTR *in vitro*

Die Interaktion von RBPs mit spezifischen Bindungs-Motiven in mRNAs ist die Voraussetzung für viele posttranskriptionelle Mechanismen, wie Prozesse die die Translationseffizienz modulieren. Eine Methode für den Nachweis solcher Interaktionen stellt der Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA) dar. Mit Hilfe dieser Methode sollte zunächst überprüft werden, ob eine Bindung von zytoplasmatischen Proteinen aus *mCCD*-Zellen an die γ -ENaC 3'UTR erfolgt. Hierfür wurden α -UTP₃₂ –markierte *in vitro* Transkripte der γ -ENaC 3'UTR mit zytoplasmatischen Extrakten aus *mCCD_{cl1}*-Zellen inkubiert und anschließend in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. In **Abb. 3.8** ist die Autoradiographie eines EMSAs dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass die Inkubation des *in vitro* Transkripts mit zytosolischen Proteinen zu einem Shift des Transkripts führt. Dieser wird durch an die γ -ENaC 3'UTR gebundene zytosolische Proteine verursacht, die zu einem langsameren Laufverhalten in der Gelelektrophorese führen. Der EMSA zeigt also, dass Proteine aus zytosolischen Extrakten von *mCCD*-Zellen die Fähigkeit besitzen an die γ -ENaC 3'UTR zu binden. Die Grundvoraussetzung der Interaktion von zytosolischen Proteinen mit der γ -ENaC 3'UTR ist somit gegeben.

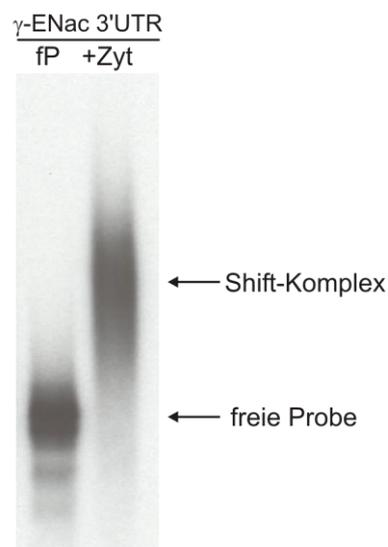


Abb. 3.8: Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA) der γ -ENaC 3'UTR.

$[\alpha^{32}\text{P}]$ -markiertes *in vitro* Transkript der Ratten γ -ENaC 3'UTR wurde mit H₂O (freie Probe, fP) oder zytosolischen Proteinen (S10, +Zyt) von *mCCD*-Zellen inkubiert und über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Gezeigt ist das repräsentative Bild einer Autoradiographie aus drei unabhängigen Versuchen.

3.8 Identifizierung von RNA-Bindungsproteinen der γ -ENaC 3'UTR mittels RNA-Affinitätschromatographie

Mit Hilfe der UTR-abhängigen Luziferase-Assays konnte gezeigt werden, dass nur die γ -ENaC 3'UTR das Potenzial zur Steigerung der Expression unter den untersuchten Stimulationsbedingungen besitzt (**Abb. 3.4**). Diese weist außerdem in Ihrer Sequenz AU-reiche Elemente auf, die als Bindungssequenzen für RNA-Bindungsproteine dienen können (**Abb. 3.5**). Posttranskriptionelle Prozesse, wie die in diesem Fall beobachtete Veränderung der Translationseffizienz (**Abb. 3.7**), beruhen auf der Interaktion von spezifischen RNA-Bindungsproteinen mit definierten Motiven in der mRNA-Sequenz. Mit Hilfe der RNA-Affinitätschromatographie sollten zunächst mögliche RNA-Bindungsproteine der γ -ENaC 3'UTR identifiziert werden. Bei dieser Methode wurden als Affinitäts-Matrix Biotin-markierte *in vitro* Transkripte der γ -ENaC 3'UTR verwendet, die an Streptavidin-Agarose gekoppelt wurden. Als Quelle für die RBPs dienten zytoplasmatische Extrakte von mCCD_{cl1} Zellen. Die affinitätsgereinigten Proteine wurden anschließend elektrophoretisch über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Danach war in der Regel ein für die γ -ENaC 3'UTR typisches Muster aus 20-40 gut erkennbaren Proteinbanden sichtbar. In **Abb. 3.9** ist das Bild eines Coomassie-gefärbten Gels einer Affinitätschromatographie dargestellt. In diesem Fall wurden 27 prominente Banden ausgeschnitten und für eine massenspektrometrische Identifizierung der Proteine durch MALDI-TOF MS verwendet. Alle identifizierten Proteine, bis auf zwei Faktoren (DNA-Helikase und γ -Aktin), gehören zur Gruppe bereits beschriebener RBPs. Unter den identifizierten RBPs befinden sich zudem mehrere Kandidaten, die bereits als ARE-BPs oder im Allgemeinen als RBPs die an U-reiche Motive binden, beschrieben wurden, wie Annexin II (45, 64), Nukleolin (45, 46, 155), FMRP (43, 30), AUF1 (96, 130), HuR (89, 82), Tristetraprolin (139), hnRNP-A2/B1 (44) sowie hnRNP-A1 (156). Diese Faktoren schienen besonders interessant aufgrund des zuvor identifizierten ARE in der γ -ENaC 3'UTR.

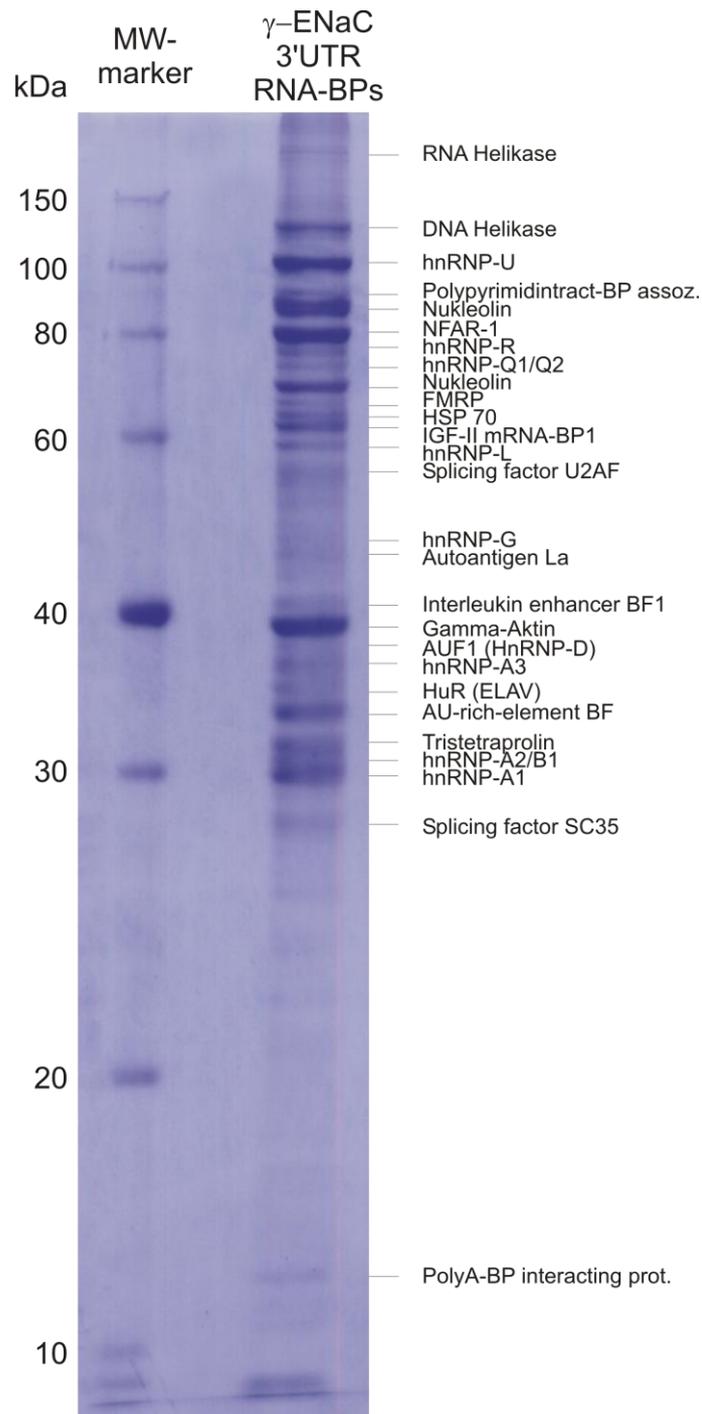


Abb. 3.9: Identifizierung von Bindungsproteinen der γ -ENaC 3'UTR mit Hilfe von RNA-Affinitätschromatographie und MALDI-TOF-MS.

RNA-Bindungsproteine der γ -ENaC 3'UTR wurden über die Aufreinigung durch RNA-Affinitätschromatographie unter Verwendung von biotinylierten *in vitro* Transkripten der Ratten γ -ENaC 3'UTR aus zytosolischen Extrakten (S10) von mCCD-Zellen gewonnen. Die affinitätsgereinigten Proteine wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt, Coomassie-Blau gefärbte Banden ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF-MS identifiziert. Die Abbildung zeigt die repräsentative Darstellung eines von drei unabhängigen Experimenten.

3.9 Untersuchung der Expression möglicher RBPs der γ -ENaC 3'UTR in mCCD_{cl1} Zellen unter Stimulation mit Aldosteron oder dDAVP

Die RNA-Affinitätschromatographie lieferte eine erhebliche Zahl möglicher regulatorischer RBPs für die γ -ENaC mRNA (**Abb. 3.9**), die für die Steigerung der Translationseffizienz unter der Stimulation mit Aldosteron oder dDAVP verantwortlich sein könnten. In diesem Zusammenhang könnte eine veränderte Expression der RBPs unter Aldosteron und dDAVP zu beobachten sein.

Aufgrund des vorhandenen AU-reichen Elements in der γ -ENaC 3'UTR sollten insbesondere Poly-U-Trakt RBPs auf eine Veränderung ihrer Expression unter der Stimulation von mCCD_{cl1}-Zellen mit Aldosteron oder dDAVP untersucht werden. Bei der Expressionsanalyse wurden neben den als mögliche Bindungspartner identifizierten ARE-BPs zusätzlich hnRNP E1, sowie die nicht-RNA-Bindungsproteine GAPDH und β -Aktin als Kontrollen im Western-Blot untersucht (**Abb. 3.10**). Hierfür wurden zytoplasmatische-Extrakte aus Kontroll- oder Hormon-stimulierten Zellen für die Western-Blot Analyse verwendet. Der Abgleich erfolgte durch Messung der $A_{280\text{ nm}}$ und durch Färbung der Western-Blot-Membranen mit Coomassie-Blau nach dem Antikörper-Nachweis. Diese Art der Normierung wurde gewählt, da die üblicherweise verwendeten Haushaltsgene GAPDH und β -Aktin unter Aldosteron induziert wurden. Wie in der **Abb. 3.10** dargestellt führte die Stimulation mit Aldosteron oder dDAVP bei einigen der untersuchten Proteine zu signifikanten Veränderungen in ihrer Expression. Die Stimulation mit Aldosteron führte zu einer Induktion von AUF1 (um 30 % erhöht), FMRP (um 70 % erhöht) und hnRNP A2/B1 (um 70 % erhöht) und nur bei HuR zu einer Repression um 40 %. Auch die Haushalts-Gene GAPDH und β -Actin wurden durch Aldosteron um 40 %, beziehungsweise 30 % induziert. Unter der Stimulation mit dDAVP konnte man dagegen nur eine Induktion der beiden Faktoren hnRNP A2/B1 (um 20 % erhöht) und HuR (um 50 % erhöht) beobachten. Bei den RBPs AUF1, FMRP und hnRNP E1 kam es dagegen zu einer leichten Repression um 20-30 %. Der verwendete Antikörper gegen AUF1 detektierte vier beschriebenen Isoformen mit Molekulargewichten zwischen 37 und 45 kDa (66). In den Untersuchungen konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen des Verhältnisses der unterschiedlichen Isoformen zueinander beobachtet werden. Unter beiden Stimulationsbedingungen konnten keine signifikanten Veränderungen der Protein-

Expression für Annexin II, hnRNP-A1, hnRNP-E1, Nukleolin und TTP festgestellt werden.

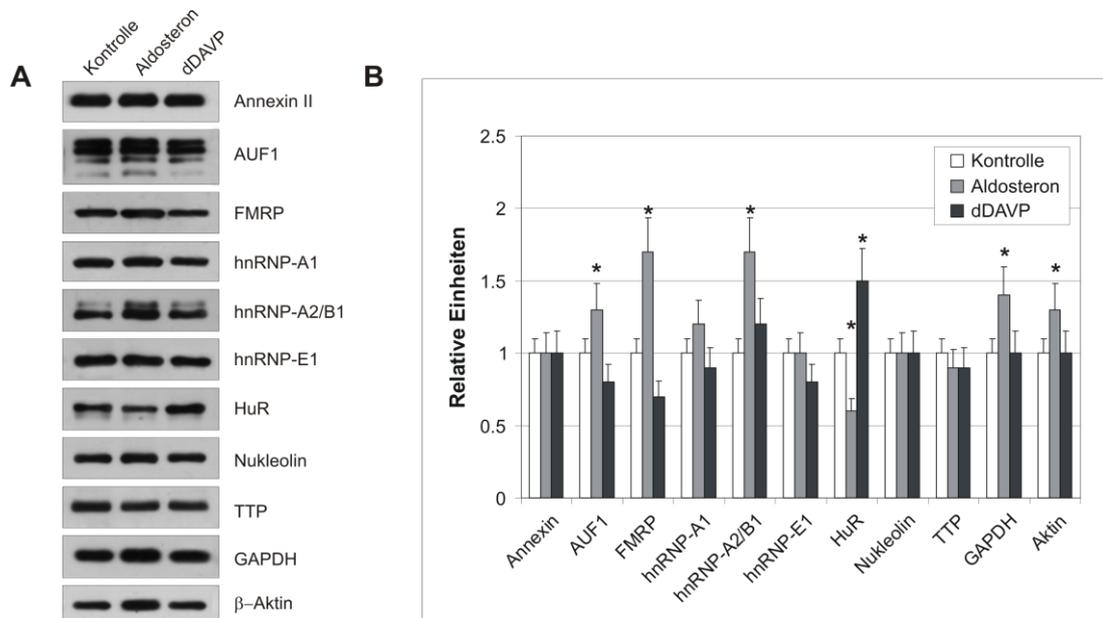


Abb. 3.10: Untersuchung der Expression von RNA-Bindungsproteinen in mCCD-Zellen unter der Stimulation mit Aldosteron oder dDAVP.

mCCD-Zellen wurden für 24 h unter Kontroll- (0,1% Ethanol) oder Stimulationsbedingungen (300 nM Aldosteron oder 10 nM dDAVP) kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und zytosolische Extrakte (S10) gewonnen. 30 µg der Extrakte wurden über Western Blot Analysen auf die Expression der RBPs Annexin II, AUF1, FMRP, hnRNP-A1, hnRNP-A2/B1, hnRNP-E1, HuR, Nucleolin, TTP sowie der Haushaltsgene β-Aktin and GAPDH untersucht. Gezeigt sind representative Western Blots der neun RBPs und der zwei Kontrollen aus fünf unabhängigen Experimenten (A). Die Autoradiographien der Western Blots wurden eingescannt und densitometrisch ausgewertet. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte ± STABW (n= 5). Die Kontrollen wurden auf 1.0 gesetzt. * für P ≤ 0.05 bezogen auf die Kontrolle.

3.10 Veränderung der Assoziation bestimmter RBPs an Polysomen unter der Stimulation durch Aldosteron oder dDAVP

Unter dem hormonellen Einfluss von Aldosteron und dDAVP konnte gezeigt werden, dass die γ -ENaC mRNA aus translationsinaktiven RNPs in Polysomen rekrutiert wurde (**Abb. 3.3**). Diese Rekrutierung in die funktionellen Kompartimente der translationsaktiven Polysomen und eine verstärkte Assoziation mit schwereren, translationsaktiveren Polysomen konnte durch die Polysomengradienten-Analyse bestätigt werden (**Abb. 3.7**). Mit Hilfe derselben Methode sollte weiterhin geklärt werden, ob die möglichen regulativen RBPs der γ -ENaC mRNA eine veränderte Lokalisation unter Hormon-Stimulation innerhalb des Polysomengradienten zeigen, die mit dem Shift der γ -ENaC mRNA einhergeht. Für diese Untersuchung wurde das gleiche Material aus den Polysomengradienten verwendet, wie aus den Versuchen unter **Abb. 3.7**. Mittels Western-Blot-Analyse wurden die gleichen RBPs wie unter **Abb. 3.10** auf ihre Assoziation mit den einzelnen Polysomen-Fraktionen (Fraktion 1-12) untersucht. Entsprechend der Polysomengradienten aus **Abb. 3.10** kann man auch hier die Fraktionen den beiden Bereichen der Polysomen (Fraktion 1-8) und der zytoplasmatischen Proteine sowie der freien mRNPs (Fraktion 8-12) zuordnen. Einige der untersuchten RBPs konnten nur in den freien mRNPs (Fraktionen 9-12) und nicht in den Polysomen nachgewiesen werden, ebenso wie die Kontrollen der nicht-RBPs GAPDH und β -Aktin, hierzu zählten hnRNP A2/B1, hnRNP-E1 sowie Nukleolin. Im Gegensatz dazu waren die RBPs Annexin II, AUF1, FMRP, hnRNP-A1, HuR und TTP mehr oder weniger stark an Polysomen (Fraktion 2-8) assoziiert. Im Zusammenhang mit der Hormonstimulation änderte sich jedoch interessanterweise die Assoziation einiger ARE-BPs an die Polysomen. Die prägnantesten Veränderungen konnten hierbei unter der Stimulation mit Aldosteron beobachtet werden. So konnte AUF1 unter Kontrollbedingungen, wie auch unter dDAVP nicht in den Polysomen-Fraktionen nachgewiesen werden. Unter Aldosteron war es dagegen in den Polysomen vertreten, was sich jedoch nur auf die beiden schwereren (42 und 45 kDa) der vier Isoformen beschränkte. Ebenso waren FMRP und TTP in Fraktionen mit schwereren Polysomen höherer Translationseffizienz vertreten. Die Stimulation mit dDAVP führte nur bei HuR und TTP zu einem Shift in Polysomenfraktionen höherer Translationseffizienz. In Bezug auf die γ -ENaC mRNA zeigen diese

beiden Proteine ein relativ gutes Komigrationsverhalten in der Polysomengradienten-Analyse.

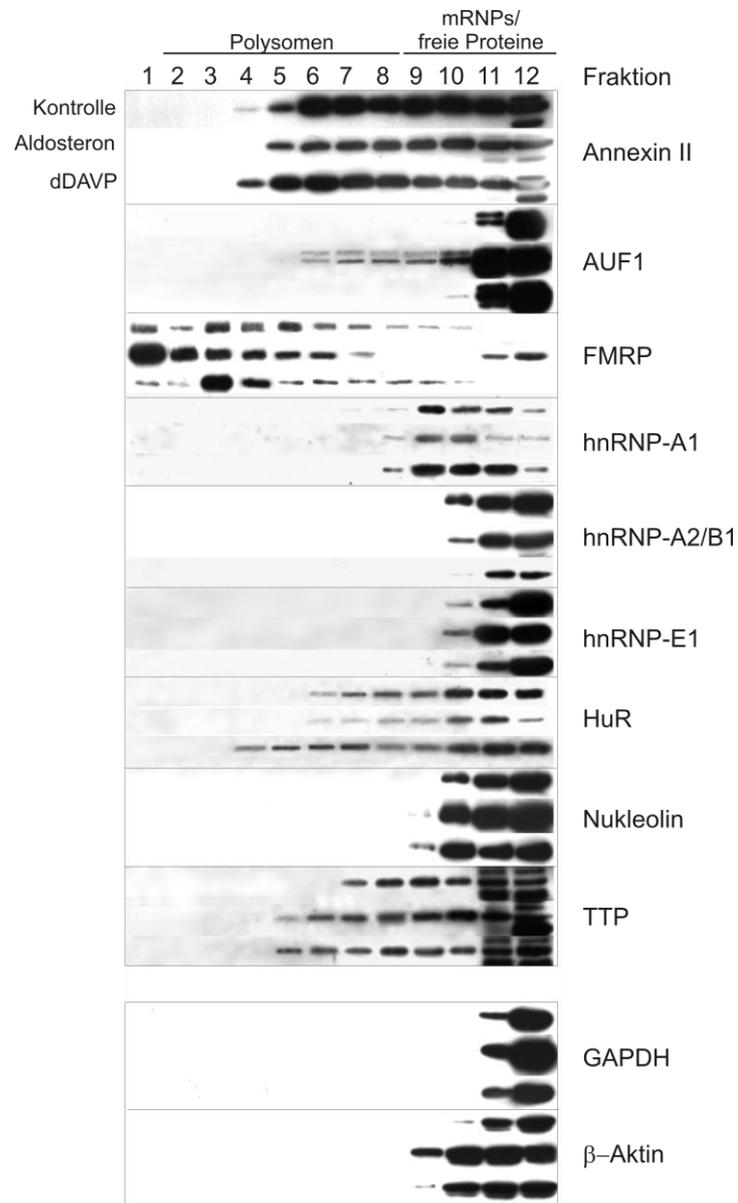


Abb. 3.11: Veränderung der Bindung bestimmter RBPs an Polysomen unter der Stimulation mit Aldosteron oder dDAVP.

Zytosolische Extrakte (S10) aus Aldosteron- oder dDAVP-stimulierten mCCD-Zellen wurden durch Ultrazentrifugation (160.000 x g, 2 h) über einen kontinuierlichen Sucrose-Gradienten (17-51 % Sucrose) aufgetrennt und von unten (51% Sucrose) nach oben (17% Sucrose) in 12 Fraktionen unterteilt. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden mit Hilfe von TCA gefällt und in einem Volumen von 100 μ l resuspendiert. 5 μ l je Fraktion wurden durch Western Blot Analyse auf die Verteilung der RBPs Annexin II, AUF1, FMRP, hnRNP-A1, hnRNP-A2/B1, hnRNP-E1, HuR, Nucleolin, TTP sowie der zytosolischen Proteine GAPDH and β -Aktin untersucht. Die Polysomen-gebundenen Proteine sind in den Fraktionen 2-8 enthalten, die mRNP gebundenen und freien Proteine dagegen in den Fraktionen 9-12. Die Abbildung zeigt die repräsentativen Ergebnisse eines von drei Experimenten

3.11 Einfluss kotransfizierter RBPs auf die Luziferase-Expression in Abhängigkeit der γ -ENaC mRNA 3'UTR

Durch die Untersuchung der Expression bekannter ARE-BPs unter Aldosteron und dDAVP (**Abb. 3.10**) und deren Kolo-kalisation in γ -ENaC mRNA enthaltenden Polysomen (**Abb. 3.11**) konnte ein Eindruck über ihre mögliche Beteiligung an der Regulation der γ -ENaC Translation gewonnen werden. Um einen Einblick über ihre Funktion für die posttranskriptionelle Kontrolle der γ -ENaC Expression in Abhängigkeit der ENaC UTRs zu bekommen wurden Luziferase-Assays mit Luziferase-Konstrukten der γ -ENaC UTRs unter der Koexpression der RBPs in mCCD-Zellen durchgeführt. Die verwendeten Luziferase-Reporter-genkonstrukte sind in **Abb. 3.12A** schematisch dargestellt. Hierbei wurden auch zwei Deletionsvarianten der γ -ENaC 3'UTR verwendet. In dem Konstrukt Luc-3'UTRdelAU wurde die AU-reiche Region (Base 2869-2958) deletiert. Das Konstrukt Luc-AU-Element enthält dagegen anstelle der kompletten 3'UTR nur das AU-reiche Element (Base 2865-2916). Für die Koexpression der RBPs Annexin II, AUF1, FMRP, hnRNP-A1, hnRNP-A2/B1, hnRNP-E1, HuR, Nukleolin, TTP wurden Expressionsvektoren kotransfiziert, wobei die Kotransfektion mit dem leeren Expressionsvektor als Normierungsgrundlage diente. Die Ergebnisse der Luziferase-Assays sind in **Abb. 3.12** dargestellt. Die Überexpression der RBPs hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression des unmodifizierten pGL3p-Vektors (Änderungen von 0,8-1,2-fach gegenüber dem Leervektor, Daten nicht gezeigt). Unter der Kotransfektion der RBP Expressionsvektoren mit dem Luziferase-Konstrukt der γ -ENaC 3'UTR konnten nur signifikante Veränderungen der Luziferase-Aktivität gegenüber der Kontrolle bei den ARE-BPs FMRP (2,7-fach), HuR (1,9-fach) und TTP (2,2-fach erhöht) beobachtet werden. Die Koexpression von AUF1 hatte dagegen nur einen leichten, nicht signifikanten Effekt (1,2-fache Erhöhung). In Kotransfektions-Versuchen mit dem Luziferase Konstrukt Luc-3'UTRdelAU, in dem das ARE deletiert war, verschwand der stimulatorische Effekt. Die Versuche mit dem Luziferase-Konstrukt, das die γ -ENaC 5'- und 3'UTR enthielt führte zu sehr ähnlichen Ergebnissen. Die Koexpression von FMRP (2,5-fach), HuR (1,8-fach) und TTP (1,9-fach erhöht) führte zu einer signifikanten, die Koexpression von AUF1 (1,3-fach) zu einer leichten nicht signifikanten Erhöhung der Luziferase-Aktivität. Die Kotransfektion

der RBPs hnRNP-A1, hnRNP-A2/B1, hnRNP-E1 und Annexin II bewirkte keine Veränderung der Luziferase-Aktivität (gezeigt sind nur die hnRNP-A1 Daten). Um zu überprüfen, ob der stimulatorische Effekt der RBPs auf der Interaktion mit dem ARE der γ -ENaC 3'UTR beruht wurden die Versuche mit dem Luziferase-Konstrukt Luc-AU-Element durchgeführt, das anstelle der 3'UTR nur das zentrale 52 Basen große ARE besitzt. Die Ergebnisse der **Abb. 3.12** zeigen, dass der Effekt auf die Luziferase-Expression der ARE-BPs AUF1 (2.2-fach), FMRP (3.4-fach), HuR (2.3-fach) und TTP (3.7-fach), den sie über das isolierte ARE ausüben noch stärker ist, als der Effekt der über die gesamte γ -ENaC 3'UTR vermittelt wird.

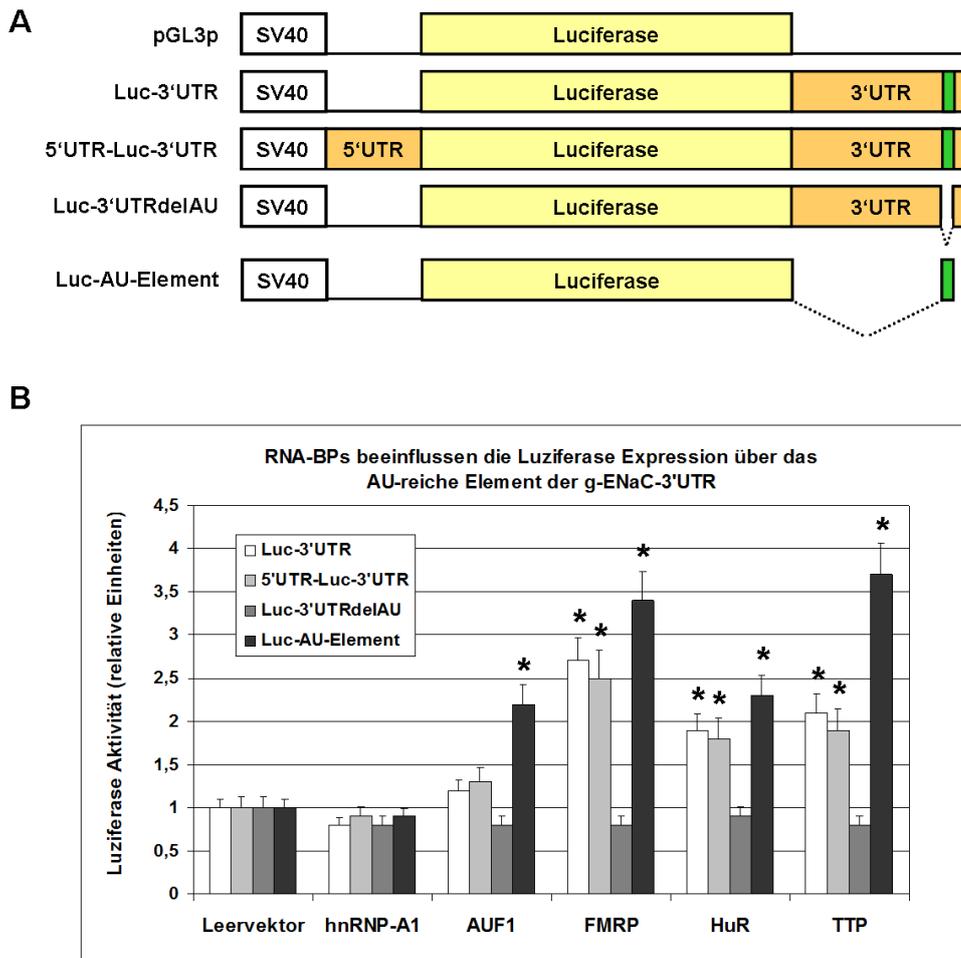


Abb. 3.12: Einfluss der Überexpression von ARE-BPs auf die γ -ENaC UTR-abhängige Luziferase-Aktivität in mCCD-Zellen.

Schematische Darstellung der Firefly Luziferase-Reportergen-Konstrukte, die für die Transfektion von mCCD-Zellen verwendet wurden. Der Ursprungsvektor pGL3-Promotor (pGL3p) mit einem SV40-Promotor und den Luciferase-UTRs (durchgezogene Linie), wurde durch Austausch der Luciferase-UTRs durch die Ratten γ -ENaC UTRs (5'UTR und/ oder 3'UTR) oder Deletionsvarianten der γ -ENaC 3'UTR modifiziert. Im Konstrukt Luc-3'UTRdelAU wurde die Region des ARE (Base 2869-2958) deletiert. Das Konstrukt Luc-AU-Element enthält anstelle der kompletten 3'UTR nur das ARE (Base 2865-2916). Deletierte Bereiche sind durch gepunktete Linien dargestellt (A). mCCD-Zellen wurden mit den in (A) angegebenen Luziferase-Konstrukten und dem Leervektor, bzw. den Expressionsvektoren für die RBPs hnRNP-A1, AUF1, FMRP, Hur oder TTP transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Messung der UTR-abhängigen Luziferase-Aktivität. Zur Normalisierung der Transfektions Effizienz wurde die Luziferase-Aktivität der Renilla Luziferase (Vektor phRL-TK) verwendet, die immer kotransfiziert wurde. Die relativen Werte der Firefly-Luziferase unter Kotransfektion der RBPs wurden auf die Werte der Kontrolle (Leervektor) bezogen. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte \pm STABW (n= 6). Die Kontrollen (Leervektor) wurden auf 1.0 gesetzt. * für P \leq 0.05 bezogen auf die Kontrolle.

3.12 Effekt einer HuR Überexpression auf die γ -ENaC Expression in mCCD-Zellen und Bindung an *in vitro* Transkripte der γ -ENaC 3'UTR

Die Ergebnisse der Polysomengradienten-Analyse (**Abb. 3.7**) zeigen, dass die Stimulation mit Aldosteron oder dDAVP zu einer Aktivierung der γ -ENaC mRNA Translation in mCCD-Zellen führt. Dieses korreliert mit der Kolo-kalisation einiger bekannter ARE-BPs (FMRP, HuR, AUF1, TTP) und einer Veränderung ihrer Assoziation an Polysomen unter Hormonstimulation (**Abb. 3.11**). Funktionell führt die Überexpression von FMRP, HuR oder TTP in Luziferase-Reporter-gen-Assays mit Konstrukten der γ -ENaC 3'UTR zu einem ARE-vermittelten Anstieg der Luziferase-Expression (**Abb. 3.12**). Dieses ist jedoch noch kein Beweis für eine direkte Interaktion der RBPs mit der γ -ENaC mRNA, bzw. eine direkte Rolle der RBPs bei der beobachteten Translationsaktivierung der γ -ENaC mRNA. In den weiteren Untersuchungen wurde auf die Rolle von HuR fokussiert, da es in der Polysomengradienten-Analyse besonders unter dDAVP eine gute Kolo-kalisation mit der γ -ENaC mRNA zeigte und auch verstärkt exprimiert wurde, was wiederum gut mit den Ergebnissen der Luziferase-Assays unter Überexpression von HuR korrelierte. Als erstes sollte überprüft werden, ob die im Luziferase-Assay beobachtete Steigerung der Expression unter HuR-Überexpression auch endogen an γ -ENaC beobachtet werden kann. Anschließend sollte über UV-Crosslinking die Interaktion von HuR mit der γ -ENaC 3'UTR überprüft werden.

Hierfür wurden mCCD-Zellen mit 5 μ g Leervektor (Kontrolle) oder 2,5 μ g, bzw. 5 μ g HuR-Expressionsvektor transfiziert und nach 24 h geerntet. Es wurden zytosolische Extrakte (S10) hergestellt und durch Western Blot Analyse die Überexpression von HuR und der Effekt auf die endogene γ -ENaC Expression untersucht. Die Überexpression von HuR betrug etwa das 2- bis 5-fache der endogenen Menge an HuR. Dieses führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg (2,5- bis 4-fach) der endogenen Menge an γ -ENaC Protein (**Abb. 3.13A**). Dieses Ergebnis zeigt, dass alleine die Überexpression von HuR ausreichend ist für eine Induktion der γ -ENaC Synthese. Um den Beweis zu führen, dass diese Induktion der γ -ENaC Synthese auf einer vermehrten Assoziation von HuR mit der γ -ENaC 3'UTR beruht, wurden UV-Crosslinking Versuche mit denselben Extrakten aus der Überexpression durchgeführt. Um zusätzlich einen Eindruck über die

Natur des Motivs zu erhalten, über das HuR mit der γ -ENaC 3'UTR interagiert wurden vier unterschiedliche *in vitro* Transkripte hergestellt, in denen entweder radioaktiv markiertes ^{32}P -ATP, -UTP, -GTP oder -CTP verwendet wurde. Die radioaktiv markierten *in vitro* Transkripte der γ -ENaC mRNA 3'UTR wurden dann entweder mit H_2O (freie Probe) oder den unter **Abb. 3.13A** verwendeten zytosolischen Extrakten aus der HuR-Überexpression inkubiert und die Bindungsfaktoren mittels UV-Crosslinking Technik dargestellt. In der Autoradiographie ist dabei ein Signal zu sehen, das der Größe von HuR (36 kDa) entspricht und welches unter Überexpression von HuR um das 3-4 fache an Intensität zunimmt. Außerdem konnte dieses Signal nur mit dem ^{32}P -UTP markierten Transkript beobachtet werden, jedoch nicht mit den ^{32}P -ATP, -GTP oder -CTP markierten Transkripten, was dafür spricht, dass die direkte Interaktion nur über ein U-reiches Motiv stattfindet, was charakteristisch für ein ARE ist.

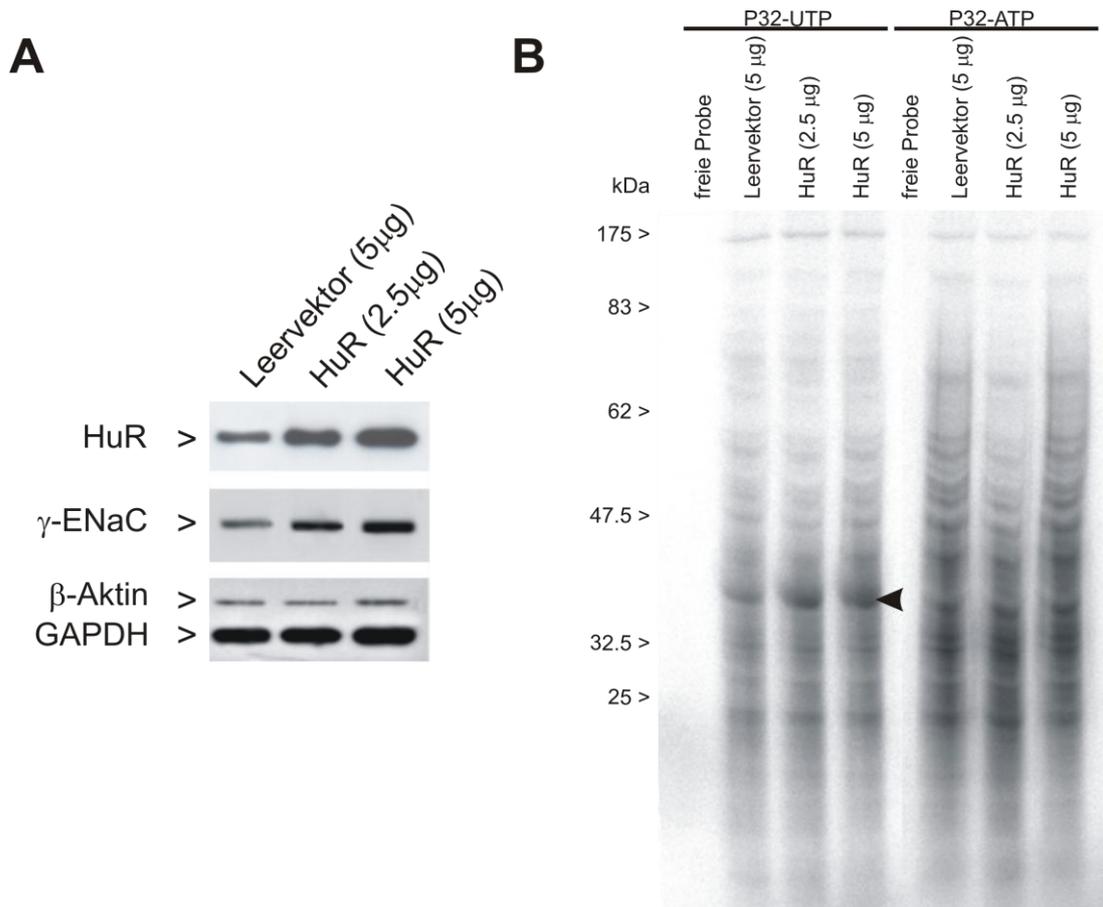


Abb. 3.13: Effekt einer HuR Überexpression auf die γ -ENaC Expression in mCCD-Zellen und Bindung an *in vitro* Transkripte der γ ENaC 3'UTR

mCCD-Zellen wurden mit 5 µg Leervektor oder 2,5 µg oder 5 µg HuR Expressionsvektor transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und zytosolische Extrakte (S10) gewonnen. 20 µg der Extrakte wurden durch Western Blot Analyse auf die HuR Expression und den Effekt auf die endogene γ -ENaC Protein Expression untersucht. Die Detektion von β -Aktin und GAPDH dienten als Ladekontrollen (A). ^{32}P -UTP- oder ^{32}P -ATP-markierte *in vitro* Transkripte der γ -ENaC mRNA 3'UTR wurden mit H_2O (freie Probe) oder den unter (A) verwendeten zytosolischen Extrakten inkubiert und die Bindungsfaktoren mittels UV-Crosslinking Technik dargestellt. Zur Einschätzung des RNA-Bindungsmotifs wurden die Transkripte separat mit ^{32}P -UTP und ^{32}P -ATP markiert. Der Pfeil kennzeichnet ein 36 kDa großes Protein (HuR), dass ein ansteigendes Bindungsverhalten zeigt (B). Gezeigt sind repräsentative Autoradiographien aus drei unabhängigen Experimenten.

3.13 *In vivo* Interaktion von HuR mit der γ -ENaC mRNA unter der Stimulation mit Aldosteron oder dDAVP

In vitro konnte die Interaktion von HuR mit *in vitro* Transkripten der γ -ENaC 3'UTR nachgewiesen werden (**Abb. 3.13**), was jedoch noch kein Beweis für die Existenz von mRNP-Komplexen der γ -ENaC mRNA mit HuR *in vivo* ist. Ebenso fehlte der Beweis für die funktionelle Rolle durch eine verstärkte Interaktion von HuR mit der γ -ENaC mRNA unter Hormonstimulation, als Ursache für die beobachtete Aktivierung der Translation. Für den Beweis der Existenz von γ -ENaC mRNA/HuR Komplexen wurden RNA-Pulldown Assays durchgeführt. Bei dieser Methode wurden HuR/mRNA Komplexe mit einem HuR Antikörper aus zytosolischen Extrakten von mCCD-Zellen koimmunpräzipitiert. Die Komplexe wurden dann an Protein-G-Sepharose gebunden und unspezifisch gebundene Proteine durch waschen mit unterschiedlich stringenten Puffern eliminiert. Aus den Antikörper-gebundenen HuR-Komplexen wurde die koimmunpräzipitierte RNA extrahiert und durch RT-PCR auf das Vorhandensein von γ -ENaC mRNA sowie GAPDH (negativ-Kontrolle) untersucht. Als Kontrolle für die Immunpräzipitation (IP) diente IgG, das im Gegensatz zum HuR-Antikörper keine IP von HuR im Kontroll-Western Blot zeigte (Daten nicht gezeigt). Die Mengen an zytosolischem Extrakt, die für die IP eingesetzt wurden, wurden zuvor auf die gleiche Konzentration eingestellt und gleiche Mengen für die IP eingesetzt. Dieses wurde anhand der Auftrennung eines Teils der Proben über SDS-PAGE und anschließende Färbung der Proteine mit Coomassie-Blau überprüft. Ebenso wurde zur Kontrolle die gleiche Menge Extrakt, die für die IP eingesetzt wurde, für eine RNA-Extraktion verwendet und über RT-PCR γ -ENaC mRNA und GAPDH mRNA nachgewiesen (Input). Eine –RT-Kontrolle wurde ebenfalls mitgeführt, bei der für die RT-Reaktion keine Reverse Transkriptase eingesetzt wurde. Dies diente der Kontrolle für eine DNA-Kontamination. In den –RT-Kontrollen war jedoch nie eine PCR-Signal detektierbar, das zu einer sichtbaren Bande führte.

Die in **Abb. 3.14** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mit dem HuR-Antikörper spezifisch γ -ENaC-mRNA/HuR, aber keine GAPDH-mRNA/HuR Komplexe immunpräzipitiert werden konnten. Um den Effekt der Hormonstimulation auf die Bildung der γ -ENaC-mRNA/HuR-Komplexe zu untersuchen, wurden die RNA-Pulldown Assays in gleicher Weise mit zytosolischen Extrakten aus Aldosteron-

oder dDAVP-behandelten Zellen wiederholt. Unter der Wirkung von Aldosteron und dDAVP konnte dabei eine Zunahme der Assoziation von HuR an die γ -ENaC mRNA beobachtet werden, welche den Anstieg der γ -ENaC Expression unter der Hormonstimulation widerspiegelt. Unter Aldosteron war etwa das 2,5-fache und unter dDAVP etwa das 3-fache an γ -ENaC mRNA mit HuR in mRNP-Komplexen assoziiert im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Die Ergebnisse der RNA-Pulldown- und der UV-Crosslinking Assays zeigen somit wie wichtig die Interaktion von HuR mit der γ -ENaC mRNA 3'UTR für die Expressionskontrolle unter den beiden Hormonen Aldosteron und Vasopressin ist.

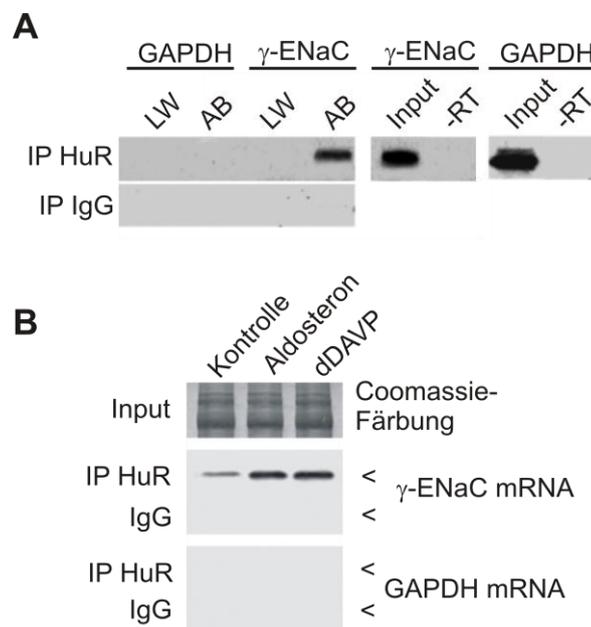


Abb. 3.14: *In vivo* Interaktion von HuR mit der γ -ENaC mRNA.

HuR-mRNA-Komplexe wurden mit einem HuR-spezifischen Antikörper, oder IgG als negativ-Kontrolle aus zytosolischen Extrakten von mCCD Zellen immunpräzipitiert und über Protein-G-Sepharose aufgereinigt. Aus der letzten Waschfraktion (LW) und der Antikörper-beladenen Protein-G-Sepharose (AB) wurde die RNA extrahiert und die γ -ENaC mRNA, sowie GAPDH als negativ-Kontrolle über RT-PCR quantifiziert. Zur Kontrolle wurden gleiche Mengen Extrakt für eine RNA-Extraktion (Input) und anschließende Detektion durch RT-PCR eingesetzt, sowie für eine -RT-Kontrolle (A). Die Immunpräzipitation wurde mit Extrakten aus Stimulationsversuchen (siehe **Abb. 3.2**) durchgeführt um die Bindung von HuR an die γ -ENaC mRNA unter Hormon-Einfluss zu untersuchen. Für den Abgleich der Extraktmengen wurde dabei die gleiche Menge an Protein durch SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung der Proteinbanden überprüft. Zur Kontrolle der Spezifität der IP-Reaktion wurden IgG-Kontrollen durchgeführt und die Koimmunpräzipitation auf GAPDH mRNA überprüft (Negativ-Kontrolle). Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

Die Aufrechterhaltung der Na^+ -Homöostase spielt eine essentielle Rolle für die Regulation der Elektrolyt- und Wasser-Homöostase des Körpers. Hierbei spielt besonders die Regulation der Na^+ -Rückresorption aus dem Primärharn im distalen Nephron und dem Sammelrohr der Niere eine wichtige Rolle, die durch den epithelialen Natriumkanal ENaC vermittelt wird. Die Regulation des Blutdrucks ist dabei eng an die Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts, für den bei Säugetieren hauptsächlich die Niere verantwortlich ist, gekoppelt (26, 60, 105). Somit können Störungen der Salz- und Wasser-Homöostase, die z. B. auf Fehlregulationen der Na^+ -Rückresorption beruhen, die Ursache für eine Hypertonie sein (125, 4, 6, 126). Einige bekannte Beispiele für erblich bedingte Störungen der ENaC-vermittelten Na^+ -Rückresorption untermauern die Rolle der Na^+ -Rückresorption für die Entstehung von Hypertonien und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, da gezeigt wurde, dass es als Folge zu Veränderungen des Blutdrucks kommt. Ein Beispiel hierfür ist das Liddle-Syndrom, eine seltene autosomal dominant vererbte Form des Bluthochdrucks, das auf gain-of-function Mutationen des ENaC beruht. Als Folge kommt es zu einer erhöhten Na^+ -Resorption, einer Volumen-Expansion, Hypertonie und Hypokaliämie, wobei dieses mit einem erniedrigten Aldosteron-Level und einer metabolischen Alkalose assoziiert ist (131, 62, 142, 154). In Bezug auf die Entstehung anderer Formen der Hypertonie konnten verschiedene SNPs (single-nucleotide polymorphisms) mit dem Auftreten einer Amilorid-Sensitivität bei einer Hypertonie in afrikanisch-stämmigen Amerikanern nachgewiesen werden (4, 6, 125). Die höchste Korrelation konnte dabei für den SNP Threonin 663 Alanin (in der α -ENaC Untereinheit) nachgewiesen werden, der unter europäisch-stämmigen wesentlich häufiger vertreten ist und mit dem Fehlen einer Hypertonie unter afrikanisch-stämmigen Amerikanern segregiert (126).

In Bezug auf die Regulation der Elektrolyt- und Wasser-Homöostase des Körpers ist besonders die Aufrechterhaltung der Na^+ -Homöostase entscheidend.

Die sich gegenseitig beeinflussenden Systeme zur Aufrechterhaltung der Elektrolyt- und Wasser-Homöostase sowie zur Regulation des Blutdrucks stehen dabei unter einer ständigen hormonellen Kontrolle. Wobei ein Blutdruck-Abfall zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems führt und die Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde und von Vasopressin aus dem Hypothalamus und dem

Hypophysenhinterlappen bewirkt. Dieses führt in der Niere letztendlich zu einer verstärkten Reabsorption von Na^+ und Wasser.

4.1 Expression der ENaC-Untereinheiten unter Aldosteron oder dDAVP

Aldosteron und Vasopressin gelten als Hauptregulatoren der ENaC-vermittelten Na^+ -Reabsorption im distalen Nephron und dem Sammelrohr der Niere, wobei beide über verschiedene Wege die ENaC-Expression und Aktivität zu beeinflussen scheinen. Sowohl bei der Aldosteron-, als auch bei der Vasopressin-Wirkung kann man dabei in Bezug auf die induzierten Mechanismen eine frühe Antwort-Phase, die einer Kurzzeit-Regulation entspricht und eine späte Antwort-Phase, die für eine Langzeitwirkung der Hormone entscheidend ist, unterscheiden. Innerhalb dieser verschiedenen Phasen spielen sowohl Mechanismen der Transkription, der Posttranskription als auch der Posttranslation für die Kontrolle der ENaC-Expression eine Rolle. Die frühe Antwort-Phase der Kurzzeit-Regulation umfasst dabei alle Prozesse, bis zu einem Zeitraum von etwa 3 h nach Einsetzen der Stimulation. In diesem Zeitraum spielen für den unmittelbar beobachteten Anstieg der Amilorid-sensitiven Na^+ -Ströme wahrscheinlich hauptsächlich die weitere Aktivierung von membranständigen ENaC-Kanäle (134, 9, 15, 127) sowie eine verstärkte Insertion weiterer ENaC-Kanäle in die Membran aus einem zytoplasmatischen Pool (16) eine Rolle. Parallel erfolgt jedoch auch eine gesteigerte Expression durch einen Anstieg der Transkription der ENaC-Gene und anderer Aldosteron-induzierter-Protein (AIP)-Gene, die z. B. wie die SGK1 wiederum die Expression des ENaC positiv beeinflussen (100, 51). Die späte Antwort-Phase scheint dagegen eine Langzeitregulation im Sinne einer Feinregulation der Na^+ -Resorption im physiologischen Kontext am besten widerzuspiegeln und beginnt nach etwa 3 h und hält in Zellkultur-Modellen länger als 24 h an. In Tier-Versuchen wurden Untersuchungen unter salzarmen Diäten oder einer Wasser-Restriktion, zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems, sowie Versuche unter einer direkten Langzeitinfusion von dDAVP (V2-Rezeptor Agonist) oder Aldosteron durchgeführt (106, 40, 41, 75, 94). Hierbei zeigte sich, dass die in Zellkultur beobachtete Langzeit-Regulation etwa der Antwort im Zeitraum von etwa drei bis 10 Tagen im Tiermodell entspricht (106, 127, 15), da die Antworten in Bezug auf das Expressionsmuster vergleichbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurden mit einer Stimulationsdauer von 24 h Langzeit-Stimulations-Modelle für die Untersuchungen zur nierenspezifischen

Wirkung der Hormone Aldosteron und Vasopressin in Bezug auf die Induktion posttranskriptioneller Mechanismen verwendet. Hierfür wurde von mir für alle Untersuchungen die mCCD_{cl1} Mauszelllinie aus dem kortikalen Sammelrohr der Niere verwendet, die aus spontan immortalisierten primären Zellen des kortikalen Sammelrohrs von Mäusenieren entstammt. Sie wurde ausgewählt, da bei Ihnen der gut ausdifferenzierte Phänotyp typischer epithelialer Zellen des Sammelrohrs erhalten geblieben ist, so dass sie in Bezug auf die Effekte unter Hormon-Stimulation ein relativ guten physiologischen Eindruck vermitteln (51, 9). Dieses ist für eine große Anzahl anderer Nieren Zellkultur-Modelle nicht der Fall, wie beispielsweise der M-1 Mauszellen die keine Aldosteron-Antwort mehr zeigen, da sie durch induzierte Immortalisierung gewonnen wurden und als Folge verschiedene Aspekte der natürlichen Regulation verloren gingen (9). Die in dieser Arbeit dokumentierte Induktion der ENaC-Untereinheiten auf mRNA und Protein-Ebene entspricht dabei im Wesentlichen den Beobachtungen aus Tierversuchen, wobei die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen in Tiermodellen teils widersprüchlich sind (106, 40, 41, 75, 94). Unter der Stimulation mit Aldosteron konnte dabei ein deutlicher Anstieg der α -ENaC mRNA (2,4-fach) und des Proteins (3,4-fach) gemessen werden, was auch in den Aldosteron Langzeitinfusions-Versuchen, sowie unter einer salzarmen Diät in Ratten beobachtet wurde (94, 95). Diese konnten jedoch keinen signifikanten Anstieg der γ -ENaC mRNA und des Proteins feststellen, wie er in diesen Versuchen mit den mCCD_{cl1}-Zellen beobachtet wurde. Ebenso wurde in einer Studie unter einer Langzeitinfusion von dDAVP sowie unter einer Wasser-Restriktion in Ratten-Nieren kein Anstieg der α -ENaC mRNA, aber ein Anstieg der β -ENaC mRNA um 85% und der γ -ENaC mRNA um 100% beobachtet (106), wohingegen eine andere Expressionsanalyse aus einer dDAVP Langzeitstimulation in Ratten einen Anstieg der α -ENaC (mRNA und Protein je 1,8-fach) sowie der β -ENaC (mRNA 5-fach/ Protein 1,5-fach) und γ -ENaC Expression (mRNA 0,9-fach/ Protein 5-fach) dokumentierte (15). In dem in dieser Arbeit verwendeten Stimulations-Modell konnte auch ein Anstieg der γ -ENaC Expression beobachtet werden, der ebenso einen stärkeren Anstieg auf der Proteinebene (2,9-fach) als auf der mRNA-Ebene (1,4-fach) zeigte. Eine Stimulation der α -ENaC, wie der β -ENaC Expression konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse zur Expression der ENaC-Untereinheiten sind in **Abb. 4.1** schematisch dargestellt.

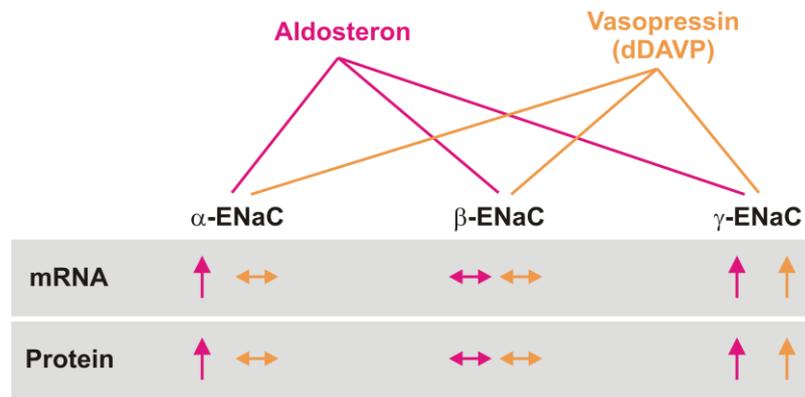


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Ergebnisse zur Untersuchung der ENaC-Expression unter Aldosteron oder dDAVP.

Schematische Darstellung der Ergebnisse zur Quantifizierung der α -, β - und γ -ENaC mRNA sowie der Protein-Mengen in $mCCD_{cl1}$ -Zellen unter der Stimulation mit 300 nM Aldosteron oder 10 nM dDAVP für 24 h. Ein Anstieg wird durch einen Pfeil nach oben bezeichnet, der waagerechte Doppelpfeil bedeutet, dass keine Veränderung in Bezug auf die Kontrolle beobachtet wurde.

Durch zahlreiche Studien wurde belegt, dass die Regulation der Expression der drei ENaC-Untereinheiten in Bezug auf Aldosteron und dDAVP Organ-spezifisch und Zelltyp-spezifisch erfolgt. Innerhalb der Niere wird der ENaC in unterschiedlichen Abschnitten des Nephrons exprimiert, die sich aufgrund ihrer Funktion z. B. stark durch die Expression von Ionen-Kanälen, Transportern und Aquaporinen unterscheiden (47). Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass diese verschiedenen Zelltypen auch in Bezug auf die ENaC-Regulation gewisse Regulationsunterschiede aufweisen. Da bei den Ganztiersversuchen die Isolation und Quantifizierung der mRNA- und Protein-Mengen immer aus dissektierten Anteilen der Niere erfolgte, hängt das Gesamt-Ergebnis immer stark vom Anteil der isolierten Bereiche ab. Mit der verwendeten $mCCD_{cl1}$ -Zelllinie kann aber zumindest eine Aussage über die Regulation im kortikalen Sammelrohr getroffen werden. Eine Veränderung bestimmter Teilaspekte der Regulation unter den Hormonen durch die spontane Immortalisierung der Zellen kann dabei letztendlich nicht ausgeschlossen werden. Ein weiterer Grund der unterschiedlichen Ergebnisse aus den Ganztiersversuchen und den Zellstudien, kann auch auf einer zusätzlichen Induktion und Freisetzung anderer Faktoren aus anderen Organen oder Zelltypen im Ganztier beruhen, die in isolierten Zellmodellen nicht beobachtet werden können. Die Ergebnisse zeigen jedoch in Bezug auf die allgemein angenommenen Effekte eine Induktion der α -ENaC Expression unter Aldosteron, sowie eine Induktion der γ -ENaC Expression unter Vasopressin (dDAVP) (75, 95, 15, 40, 106).

4.2 Posttranskriptionelle Regulation der ENaC-Expression unter Aldosteron oder dDAVP

Bei den Untersuchungen zur Langzeitwirkung der Hormone Aldosteron und Vasopressin an der mCCD_{cl1}-Zelllinie aus dem kortikalen Sammelrohr der Niere konnte mit Hilfe verschiedener Methoden gezeigt werden, dass posttranskriptionelle Mechanismen an der Regulation der ENaC Expression unter dem hormonellen Einfluss von Aldosteron und dDAVP beteiligt sind. Dieses konnte insbesondere für die α - und die γ -ENaC Untereinheit gezeigt werden. So zeigen die Ergebnisse aus den Aldosteron und dDAVP-Stimulationsversuchen, dass der Anstieg der Proteinmenge von α - und γ -ENaC zum Teil auf einer gesteigerten Transkription aber auch auf einem mRNA-spezifischen Anstieg der Translationseffizienz beruht (**Abb. 3.2**, **Abb. 3.7**). Eine Stabilisierung der mRNA konnte dabei als Ursache für den Anstieg der mRNA-Konzentration ausgeschlossen werden (**Abb. 3.6**). Sowohl unter Aldosteron als auch unter dDAVP wurde im Gegenteil eine leichte, nichtsignifikante Destabilisierung der ENaC mRNAs, aber auch der β -Aktin mRNA beobachtet. Diese Beobachtung würde sich durch ein Phänomen erklären lassen, das von Spindler et al. unter der Wirkung durch Aldosteron beschrieben wurde (137). Sie konnten hierbei eine Destabilisierung der mRNAs der Proto-Onkogene c-Myc, c-Jun und c-Fos beobachten, die durch Hemmung der Translation vermindert wurde. Sie postulierten daher, dass der Effekt auf der gesteigerten Expression und Aktivierung einer RNase beruht, der möglicherweise über einen Heat Shock Protein Komplex vermittelt wird (137). Aldosteron scheint durch diese Suppression auf jeden Fall das Expressionsmuster der Zelle in Richtung einer Differenzierung zu beeinflussen, da die Transkriptionsfaktoren c-Myc und AP-1, welches aus c-Jun und c-Fos besteht, eher in stark proliferierenden Zellen die Transkription bestimmen. Zusätzlich führte Aldosteron auch zu einer Induktion des Fos-related Antigens 2 (Fra2), das als Transkriptionsfaktor anstelle von Jun mit Fos assoziiert die Transkription in Richtung einer Differenzierung steuert (141). AP1-Bindungsstellen wurden unter anderem auch für die ENaC-Promotor-Regionen beschrieben, eine Erhöhung der Translation könnte somit auch eine Verminderung der Transkription unter diesem veränderten Kontext kompensieren. Der Anstieg der Translationsrate der α - und γ -ENaC mRNA beruht dabei auch auf einer Zunahme der Translationseffizienz und nicht nur auf dem Anstieg der Translationsrate aufgrund einer erhöhten mRNA-Konzentration, was mit Hilfe der Polysomengradienten-Analyse gezeigt werden konnte (**Abb. 3.7**). So wird

der signifikante Anstieg der mRNA-Konzentration der α -ENaC Untereinheit unter Aldosteron (**Abb. 3.2**) durch eine verstärkte Rekrutierung von Ribosomen an die α -ENaC mRNA begleitet, was durch eine Verschiebung der mRNA in Polysomenfraktionen mit einem höheren ribosomalen Besetzungsgrad sichtbar wird (**Abb. 3.7**). Für die γ -ENaC Untereinheit konnte der gleiche Effekt unter Aldosteron-, aber auch unter dDAVP-Stimulation beobachtet werden (**Abb. 3.7**). Die Mechanismen dieser Aktivierung der Translationseffizienz scheinen sich jedoch bei α -ENaC und γ -ENaC zu unterscheiden. Die Analyse der ENaC mRNA-Lokalisation zwischen den funktionellen Kompartimenten der translationsinaktiven postpolysomalen mRNPs und den translationsaktiven Polysomen zeigte, dass sowohl die α -ENaC, als auch die β -ENaC mRNA unter Kontroll- wie auch Stimulationsbedingungen nahezu ausschließlich in den Polysomen vorkommen. Die Aktivierung der Translation in Bezug auf die α -ENaC mRNA unter Aldosteron betraf also im Gegensatz zur γ -ENaC mRNA nur die Steigerung der Translationseffizienz aktiv translatierter mRNAs. Die γ -ENaC mRNA war jedoch unter Kontrollbedingungen mit einem Anteil von etwa 40% in den translationsinaktiven mRNP-Komplexen lokalisiert worauf es unter Stimulation mit Aldosteron oder dDAVP zu einer Aktivierung dieser zuvor inaktiven Komplexe und deren Verlagerung in die Fraktion der translatierten Polysomen erfolgte (**Abb. 3.3**). Bei der γ -ENaC mRNA kam es also sowohl zu einer mit einer Veränderung der Lokalisation assoziierten Aktivierung zuvor inaktiver mRNPs als auch zu einer Steigerung der Translationseffizienz der mRNA, die sich ebenfalls durch einen Shift der γ -ENaC mRNA in Polysomenfraktionen mit einem höheren Besetzungsgrad an Ribosomen beobachten ließ. In **Abb. 4.2** ist eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse schematisch dargestellt.

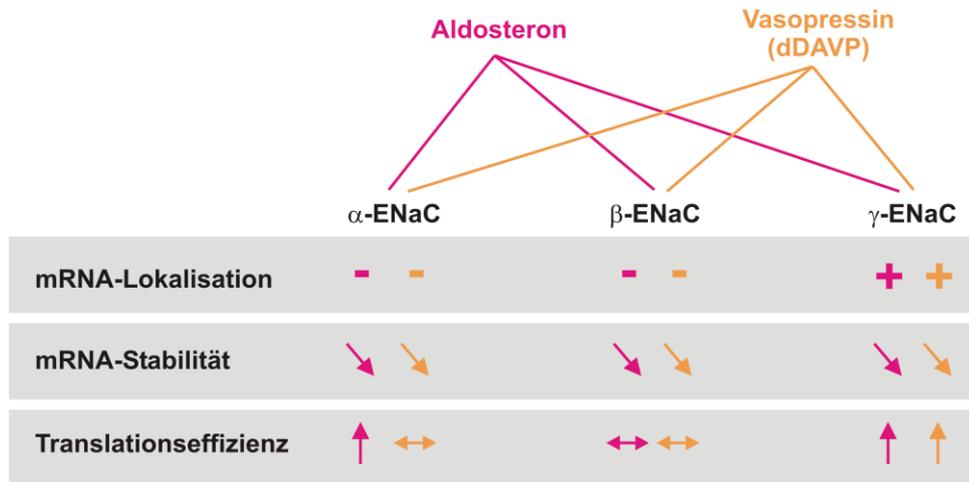


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Ergebnisse zur Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen der ENaC-Expression unter Aldosteron oder dDAVP.

Schematische Darstellung der Ergebnisse zur Veränderung der α -, β - und γ -ENaC mRNA-Lokalisation, -Stabilität sowie einer Veränderung der Translationseffizienz in $mCCD_{cl1}$ -Zellen unter der Stimulation mit 300 nM Aldosteron oder 10 nM dDAVP für 24 h. Die Abbildung fasst schematisch vereinfacht die Ergebnisse der Fraktionierung durch Ultrazentrifugation, der Bestimmung der mRNA-Stabilität, sowie der Polysomengradienten-Analyse zusammen. In Bezug auf die mRNA-Lokalisation bedeutet ein -, dass keine Veränderung, ein +, dass eine Veränderung der Lokalisation beobachtet wurde. Eine leichte Abnahme wird durch einen Pfeil nach schräg unten, ein Anstieg durch einen Pfeil nach oben dargestellt, der waagerechte Doppelpfeil bedeutet, dass keine Veränderung in Bezug auf die Kontrolle beobachtet wurde.

Die Steigerung der Translationseffizienz könnte dabei auf einer verstärkten Initiation der Translation beruhen. So konnten Otulakowski und Kollegen für die α -ENaC Translation in der Lunge zeigen, dass es in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt zu einer Aktivierung der Initiation der Translation kommt. Diese war abhängig vom mTOR-Signalling und führte zu einer verstärkten Assoziation des 5'Cap-Bindungskomplexes eIF4F an die α -ENaC mRNA (109, 110, 111).

Die Ergebnisse zur Lokalisation der ENaC mRNAs in den mRNPs aus der Fraktionierung durch Ultrazentrifugation (**Abb. 3.3**) und der Polysomengradienten-Analyse (**Abb. 3.7**) weisen jedoch eine gewisse Diskrepanz auf, die sehr wahrscheinlich auf technischen Gründen beruht. So konnte in der Polysomengradienten-Analyse ENaC-mRNA in den mRNP-Fractionen nachgewiesen werden, was in der 300.000 x g mRNP-Fraktion nach Fraktionierung durch Ultrazentrifugation für α - und β -ENaC nicht möglich war. Während die Fraktionierung durch Ultrazentrifugation in konzentrierten Lösungen unter Verwendung von RNase-Inhibitoren durchgeführt wurde, erfolgte die Auftrennung der RNA über Sucrose-Gradienten ohne Schutz vor RNasen, wobei die RNA zusätzlich infolge der

Auftrennung sehr viel stärker verdünnt wurde. Es ist daher wahrscheinlich, dass bei der Polysomengradienten-Analyse eine teilweise Degradation der mRNA durch RNasen erfolgte, was zu einer Verlagerung der mRNA-Fragmente in leichtere mRNP-Fractionen führte. Dieses Problem wäre wahrscheinlich auch durch den Einsatz von RNase-Inhibitoren nicht zu eliminieren, da diese durch die Zentrifugation im Gradienten von den Polysomen-Komplexen getrennt werden und sich oben auf dem Gradienten sammeln würden.

4.3 Rolle RNA-bindender Proteine der γ -ENaC 3'UTR für die γ -ENaC Translation unter Aldosteron oder dDAVP

Zu den wichtigsten Mediatoren posttranskriptioneller Mechanismen gehören die RBPs, die über definierte Motive in den UTRs der mRNAs ihre Wirkung entfalten. Für weitere Untersuchungen sowie die Identifizierung von RBPs als Interaktionspartnern wurde die γ -ENaC mRNA 3'UTR ausgewählt, da die γ -ENaC mRNA das interessanteste Verhalten unter der Hormon-Stimulation durch eine Veränderung ihrer intrazellulären Lokalisation (**Abb. 3.3**) und einer damit verbundenen Aktivierung ihrer Translation (**Abb. 3.7**) zeigte. Die γ -ENaC mRNA besitzt mit 69 nt bei der Maus, oder 98 nt bei der Ratte eine relativ kurze 5'UTR. Die 3'UTR ist mit 931 nt bei der Maus und 938 nt bei der Ratte wesentlich länger und erschien als vielversprechendes Objekt für eine posttranskriptionelle Regulation. Die Untersuchung der Rolle der γ -ENaC UTRs für die Expression der Luziferase im Reporter-gen-Assay zeigte, dass nur unter dem Einfluss der 3'UTR oder in Kombination der 5'UTR mit der 3'UTR ein Anstieg der Luziferase-Expression unter Stimulation mit Aldosteron oder dDAVP in mCCD-Zellen zu beobachten war (**Abb. 3.4**). Eine Analyse der γ -ENaC mRNA Sequenz zeigte, dass diese eine hoch konservierte AU-reiche Region im 3'-terminalen Teil der 3'UTR aufweist. Dieses Region, die bei der Maus 58 nt und bei der Ratte 52 nt umfasst besitzt dabei mit 90% einen außerordentlich hohen Anteil an Adenosin und Uracil (**Abb. 3.5**). Sie erfüllt damit die Kriterien eines AU-reichen Elements der Klasse III, da es einen hohen AU-Reichtum, aber keine für die AREs der Klassen I und II typischen AUUUA- oder UUAUUUAUU-Abfolgen aufweist. AREs der Klasse III wurden beispielsweise bei der mRNA von p53 (97, 8), c-jun (115, 8) oder GLUT1 (68, 130, 8) als Motive für eine Interaktion mit RBPs identifiziert. Bei diesen Fällen konnte auch gezeigt werden, dass diese Interaktion zu einer Stabilisierung der mRNA (GLUT1) und einem Anstieg

der Translationseffizienz (GLUT1, p53), aber auch zu einer Destabilisierung (c-jun) führte (8, 68). Daher wurde die γ -ENaC 3'UTR für eine weitere Untersuchung von RBPs ausgewählt. Mit Hilfe der RNA-Affinitäts-Chromatographie wurden mögliche Bindungspartner identifiziert. Diese Methode wurde gewählt, da sie die Möglichkeit bietet über eine anschließende Analyse der Proben durch MALDI-TOF-MS Proteine direkt zu identifizieren. Über diese Art der Isolierung von RBPs der γ -ENaC 3'UTR wurden in der Regel 20-40 Proteine isoliert, wobei es sich dabei auch um Proteine handeln kann, die mit einer geringen Affinität oder indirekt über Protein-Protein Wechselwirkungen an die 3'UTR gebunden waren. Die RNA-Affinitäts-Chromatographie wird oftmals nicht als sehr spezifische Methode angesehen, die Ergebnisse in Bezug auf die γ -ENaC 3'UTR zeigten jedoch, dass unter den 27 identifizierten Proteinen nur zwei Proteine vertreten waren, nämlich DNA-Helikase und gamma-Aktin, die nicht direkt zur Gruppe der RBPs gehören, aber trotzdem eine gewisse RNA-Bindungs-Affinität besitzen, bzw. an RBPs binden. Unter den identifizierten RBPs war interessanterweise eine Anzahl bekannter ARE-BPs. Hierzu zählen AUF1, HuR, Tristetraprolin (TTP), Nukleolin sowie hnRNP-A1 und hnRNP-A2/B1. Als nächstes sollte geklärt werden, inwiefern diese ARE-BPs in die Regulation der γ -ENaC Translation unter Hormon-Einfluss involviert sind. Bei den Untersuchungen wurden noch zwei weitere ARE-BPs nämlich FMRP und Annexin II untersucht, die auch bekannterweise an AU- oder U-reiche Regionen binden können. Hierbei sollten zwei Linien verfolgt werden.

Im Fall der Beteiligung bestimmter AREs an der positiven Modulation der γ -ENaC Translation sollten diese integrale Bestandteile aktiv translatierter γ -ENaC mRNA Polysomen-Komplexe sein und in Abhängigkeit von der Hormon-Stimulation eine dem entsprechende Veränderung in ihrem Assoziationsmuster zeigen. Die Ergebnisse der Western-Blots aus den Polysomengradienten zeigte, dass von den untersuchten Proteinen nur AUF1, HuR, FMRP und TTP mit Polysomen assoziiert waren und in Abhängigkeit von der Hormon-Stimulation eine Verschiebung in Fraktionen mit stärker translatierten Polysomen zeigten (**Abb. 3.11**). Die Proteine zeigten jedoch ein unterschiedliches Verhalten. Während AUF1 und FMRP eine verstärkte Assoziation an effektiver translatierte Polysomen unter Aldosteron besaß, war dieses Verhalten unter dDAVP nur für HuR und unter beiden Bedingungen nur bei TTP zu beobachten.

Für den Fall einer Beteiligung der RBPs an der Steigerung der Translationseffizienz der γ -ENaC mRNA sollte sich dieses funktionell nachweisen lassen. Dieses wurde anhand von Luziferase-Assays unter einer Koexpression der RBPs überprüft. Wie in **Abb. 3.12** dargestellt führte nur die Überexpression der RBPs HuR, TTP oder FMRP zu einem γ -ENaC 3'UTR-abhängigen Anstieg der Luziferase-Expression (1,9- bis 2,7-fache Erhöhung in Bezug auf die Kontrolle), der durch Deletion des AREs der 3'UTR verschwand. Dabei zeigten die Ergebnisse, dass der Effekt ausschließlich von der 3'UTR vermittelt wurde, da die Verwendung des Luziferase-Konstrukts mit der γ -ENaC 5'UTR und der 3'UTR im Vergleich zum Konstrukt, das nur die 3'UTR enthielt zu keiner signifikanten Veränderung der Luziferase führte. Die einfachste mechanistische Erklärung für den Einfluss von Aldosteron und dDAVP auf die RBP-abhängige Translation wäre eine Induktion oder Hemmung der γ -ENaC Translation durch RBPs, die auf einer Veränderung der zytoplasmatischen RBP-Menge beruhen würde. Die Stimulation durch Aldosteron oder dDAVP sollte in diesem Fall zu einer Veränderung der RBP-Konzentration im Zytoplasma führen, was mittels Western-Blot-Analyse detektierbar wäre. Diese These wurde überprüft, wobei die zytoplasmatische Konzentration neun verschiedener RBPs, darunter auch die der ARE-BPs AUF1, HuR, TTP und FMRP, in Aldosteron- oder dDAVP-stimulierten mCCD-Zellen untersucht wurde (**Abb. 3.10**). Besonders bei den untersuchten ARE-BPs gab es eine gute Korrelation zwischen der zytoplasmatischen Proteinkonzentration und ihrem Einfluss auf die Translationseffizienz, der sich durch die Assoziation an Polysomen zeigte. Bei AUF1 und FMRP führte die Stimulation mit Aldosteron zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Proteinkonzentration um 30, bzw. um 70% wobei auch in der Polysomengradienten-Analyse unter Aldosteron eine verstärkte Assoziation an schwerere Polysomen-Komplexe beobachtet werden konnte (**Abb. 3.11**). Ein entsprechender Effekt konnte für HuR unter dDAVP beobachtet werden, dass um etwa 50% erhöht war. Das Verhalten von TTP, sowie das von HuR unter Aldosteron fügen sich dagegen nicht einfach in das Schema des konzentrationsabhängig vermittelten Effekts im Zytoplasma. So wurde unter Aldosteron eine Abnahme der zytoplasmatischen HuR-Menge um etwa 40% beobachtet, die nicht zu einer verminderten Assoziation an Polysomen führte. Ebenso konnten für TTP keine Veränderungen der zytoplasmatischen Proteinkonzentration unter der Hormon-Stimulation beobachtet werden, jedoch sowohl unter Aldosteron als auch unter dDAVP eine verstärkte Assoziation von TTP an

Polysomen mit einer höheren Translationseffizienz. Die Ergebnisse der ARE-BP Überexpression bei γ -ENaC 3'UTR abhängigen Luziferase-Reporter-Gen-Assays (**Abb. 3.12**) zeigen dabei zumindest in Bezug auf die ARE-BPs HuR, FMRP und TTP ein vergleichbares Bild wie die Analyse der Assoziation der RBPs in der Polysomengradienten-Analyse (**Abb. 3.11**). Bei diesen drei Faktoren konnte sowohl eine verstärkte Assoziation an effizienter translatierte Polysomen unter Hormon-Stimulation und eine Kolo-kalisation mit der γ -ENaC mRNA in den Polysomenfraktionen, als auch ein positiver Effekt auf die Expression im Luziferase-Reporter-Gen-Assay, beobachtet werden. Bei AUF1, das bislang fast ausschließlich als Faktor beschrieben wurde, der eine Stabilisierung oder Destabilisierung bzw. Inhibition der Translation der mRNA bewirkt, konnte dagegen ein Anstieg der zytoplasmatischen Protein-Konzentration unter Aldosteron festgestellt werden, der auch mit einer verstärkten Assoziation an effizienter translatierte Polysomen korrelierte. In Bezug auf die γ -ENaC mRNA konnte jedoch im UTR-abhängigen Luziferase-Assay keine Induktion durch AUF1 für die gesamte γ -ENaC 3'UTR, sondern nur für das isolierte ARE der 3'UTR nachgewiesen werden.

Der Grund dafür, dass bei TTP keine Veränderung der zytoplasmatischen Protein-Menge, aber sowohl eine verstärkte Assoziation an effizienter translatierte Polysomen, als auch eine Induktion der γ -3'UTR-abhängigen Luziferase-Expression im Reporter-Gen-Assay beobachtet wurde, könnte sein, dass die Bindung von TTP an die γ -ENaC 3'UTR nicht über die Protein-Menge, sondern hauptsächlich über eine Änderung seiner Bindungs-Affinität reguliert wird. Dieses ist wahrscheinlich, da für TTP bereits gezeigt werden konnte, dass sich seine RNA-Bindungsaffinität in Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungszustand ändert, wobei eine Regulation der Phosphorylierung durch den Signalweg der p38-MAPK/ MK2-Kinase nachgewiesen werden konnte (139). Welche Kinasen unter der Stimulation mit Aldosteron oder dDAVP eventuell in eine Phosphorylierung von TTP involviert sein könnten, müsste weiter untersucht werden. Der erste Schritt für eine weitere Untersuchung der Rolle von TTP wäre, den Phosphorylierungs-Status von TTP unter der Hormon-Stimulation durch die Verwendung Phospho-spezifischer Antikörper zu bestimmen.

Bei der Identifizierung von RBPs der γ -ENaC 3'UTR wurde ein weiteres ARE-BP isoliert und identifiziert (**Abb. 3.9**). Der AU-rich-element binding factor (gi 14043072)

wurde jedoch aufgrund eines fehlender Antikörpers und Expressionsplasmids nicht weiter untersucht.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ergebnisse der RNA-Affinitätschromatographie, sowie der Polysomengradienten-Analysen und der Untersuchung der zytoplasmatischen Expression der RBPs zusammen mit den Koexpressions-Studien im UTR-abhängigen Reporter-gen-Assay eine Beteiligung der RBPs HuR, FMRP und TTP an der γ -ENaC 3'UTR vermittelten Induktion der Expression nahelegen und diese auf einer Steigerung der Translationseffizienz beruht. Eine schematische Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in **Abb. 4.3** dargestellt.

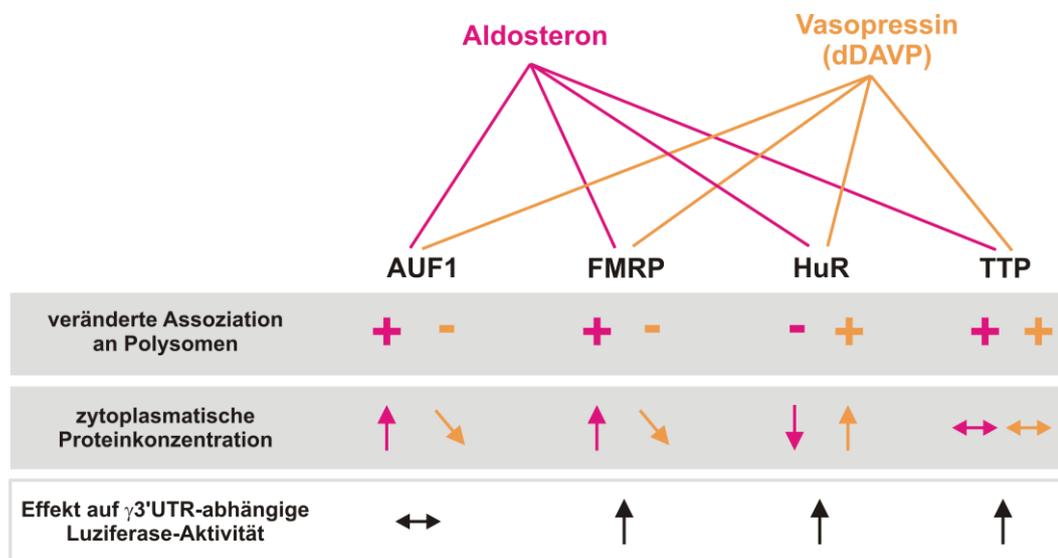


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Ergebnisse zur Untersuchung des Verhaltens der RBPs AUF1, FMRP, HuR und TTP unter Aldosteron und dDAVP, sowie deren Effekt auf die γ -ENaC 3'UTR.

Schematische Darstellung der Ergebnisse zur Veränderung der Assoziation der RBPs AUF1, FMRP, HuR und TTP an Polysomen in der Polysomengradienten-Analyse, sowie der zytoplasmatischen Expression unter Aldosteron oder dDAVP und der Effekt der RBPs unter Kotransfektion im Luciferase-Assay auf die Expression der Luciferase in Abhängigkeit der γ -ENaC 3'UTR. In Bezug auf die Assoziation an Polysomen bedeutet ein -, dass keine Veränderung, ein +, dass eine Veränderung der Assoziation beobachtet wurde. Eine Abnahme wird durch einen Pfeil nach unten, eine leichte Abnahme durch einen Pfeil nach schräg unten und ein Anstieg durch einen Pfeil nach oben dargestellt. Der waagerechte Doppelpfeil bedeutet, dass keine Veränderung in Bezug auf die Kontrolle beobachtet wurde.

Trotzdem die Polysomengradienten-Analysen zweifelsfrei gezeigt hat, dass posttranskriptionelle Mechanismen an der hormonellen Kontrolle der γ -ENaC Expression beteiligt sind und Versuche unter der Koexpression bestimmter RBPs (γ -ENaC UTR-abhängige Luciferase-Assays) eine Beteiligung einiger ARE-BPs durch

direkte Interaktion sehr wahrscheinlich macht, wurde dadurch dennoch kein Beweis für eine direkte Interaktion *in vivo* erbracht. Dieses würde nur eine Immunpräzipitation von mRNP-Komplexen beweisen können. Anhand von HuR erfolgte daher eine nähere Untersuchung der Interaktion mit der γ -ENaC mRNA, wobei auf verschiedenen Wegen gezeigt werden konnte, dass es *in vivo* eine wichtige Rolle bei der hormonellen Stimulation der γ -ENaC Expression spielt. Erstens konnte gezeigt werden, dass die HuR Überexpression in mCCD-Zellen auch zu einem Anstieg der γ -EnaC Expression führt (**Abb. 3.13**). Zweitens konnte gezeigt werden, dass überexprimiertes HuR im UV-Crosslinking-Assay konzentrationsabhängig an die γ -ENaC-3'UTR bindet und diese Assoziation nur unter Verwendung von U-markierten *in vitro* Transkripten, also an ein U-reiches Element, stattfand (**Abb. 3.12**). Drittens konnte eine direkte Interaktion durch Immunpräzipitation von γ -ENaC-mRNA/HuR-Komplexen unter Verwendung eines HuR-Antikörpers nachgewiesen werden (**Abb. 3.14**) und viertens konnte durch RNA-Pulldown-Assays außerdem gezeigt werden, dass Aldosteron und dDAVP zu einer vermehrten Bildung dieser γ -ENaC-mRNA/HuR-Komplexe führen (**Abb. 3.14**). Eine mögliche mechanistische Erklärung für die verbesserte Assoziation von HuR an die γ -ENaC mRNA unter der Hormon-Stimulation wäre wiederum ein Anstieg der zytoplasmatischen HuR-Proteinkonzentration. Der Mechanismus für die Steigerung der γ -ENaC Translation scheint sich jedoch trotz des letztendlich gleichen Effekts bei den beiden Hormonen zu unterscheiden. Wie die Ergebnisse aus **Abb. 3.10** und **Abb. 3.11** zeigen, führte die Stimulation mit dDAVP in der Tat zu einem Anstieg der zytoplasmatischen HuR-Konzentration und zu einer verstärkten Assoziation an effizienter translatierte Polysomen-Komplexe. Unter der Stimulation mit Aldosteron wurde dagegen eine leichte Abnahme der HuR Protein-Konzentration beobachtet und auch keine verstärkte Assoziation an effizienter translatierte Polysomen-Komplexe im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Interpretation dieses Ergebnisses muss man jedoch berücksichtigen dass bei der Analyse der HuR-Menge in den einzelnen Fraktionen aus der Polysomengradienten-Analysen die Assoziation von HuR an die Polysomen-Komplexe im Allgemeinen widerspiegelt und nicht nur die Assoziation an die γ -ENaC mRNA-Polysomen. So könnte auch bei einem gleichbleibenden Anteil der Assoziation von HuR an Polysomen entgegen einem Trend der Anteil an γ -ENaC-mRNA/HuR-Polysomen unter Aldosteron gestiegen sein, was auch die Ergebnisse der RNA-pulldown-Assays mit Material aus Hormon-stimulierten Zellen

zeigen (**Abb. 3.14**), sowie die Verlagerung der γ -ENaC mRNA in effizienter translatierte Polysomenfraktionen unter beiden Hormon-Stimulationen beweist (**Abb. 3.7**). Eine schematische Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in **Abb. 4.4** dargestellt.

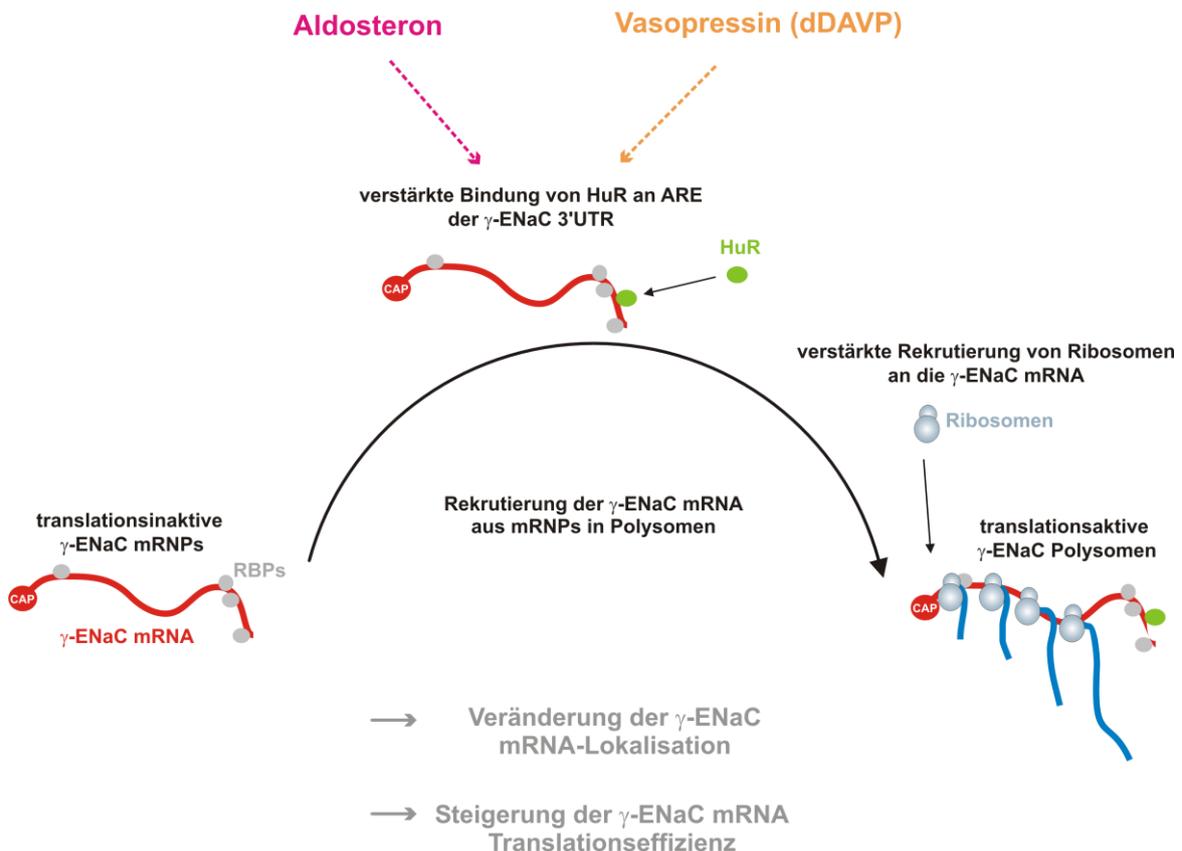


Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Ergebnisse zur Steigerung der Translationseffizienz der γ -ENaC mRNA durch HuR unter Aldosteron und dDAVP.

Schematische Darstellung der Ergebnisse zur Veränderung der Assoziation von HuR unter Aldosteron oder dDAVP und des vermittelten Effekts. Aldosteron und Vasopressin (dDAVP) führen dabei zu einer verstärkten Assoziation von HuR an das ARE der γ -ENaC mRNA 3'UTR. Dieses führt zu einer verstärkten Rekrutierung der γ -ENaC mRNA aus mRNPs in Polysomen unter einer verstärkten Rekrutierung von Ribosomen, was zu einem Anstieg der Translationseffizienz der γ -ENaC mRNA führt.

Das RNA-Bindungsmotiv von HuR wurde vor einiger Zeit systematisch neu bewertet, dabei zeigte sich, dass ein etwa 17-20 nt langes Uracil-reiches Motiv in allen mRNAs enthalten war, die bislang als HuR Interaktionspartner beschrieben waren und war meistens in der 3'UTR lokalisiert. Dieses Motiv musste demnach auch nicht notwendigerweise AUUUA- Pentamere aufweisen und war immer äußerst GC-arm, womit es dem Typ der ARE III-Motive entspricht (89). Diese Untersuchungen

stimmen sehr gut mit den Charakteristika der γ -ENaC 3'UTR überein (**Abb. 3.5**) und bestätigen andere Untersuchungen, die zeigten, dass HuR sowohl an mRNAs mit AREs der Klasse I, II als auch III bindet (97, 8).

An einer großen Anzahl von Beispielen wurde bereits gezeigt, dass HuR die Translation bestimmter mRNAs über eine Bindung an dessen 3'UTR modulieren kann. Beispiele für HuR-Ziel-mRNAs sind die mRNAs vom Tumor Suppressor p53 (97), Prothymosin- α (82), Cytochrom c (71), CAT-1 (cationic amino acid transporter) (11), Cyclooxygenase-2 (34), Hypoxia Inducible Factor (HIF α) (52) und MKP-1 (mitogen-activated protein kinase phosphatase-1) (80). Der genaue Mechanismus der HuR/3'UTR-vermittelten Translationskontrolle ist jedoch bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte dabei in allen untersuchten Fällen eine, wie im Fall der γ -ENaC mRNA, Rekrutierung der mRNAs an Polysomen durch HuR beobachtet werden. Im Fall der Prothymosin- α mRNA führte UV-Stress zu einer HuR-vermittelten Translokation der mRNA in das Zytoplasma und zu einer Aktivierung der Translation, was sich durch eine Verschiebung in schwerere Polysomenfraktionen bemerkbar machte (82). In Bezug auf die posttranskriptionelle Kontrolle der CAT-1 mRNA führte die Interaktion mit HuR infolge verschiedener Stress-Stimuli zur Freisetzung der CAT-1 mRNA aus zytoplasmatischen Processing Bodies, in denen die CAT-1-mRNA unter Inhibition der Translation durch miRNAs gespeichert wurde. Dieses war mit einer Aktivierung der Translation und einer Rekrutierung an Polysomen verbunden (11). Bei der MPK-1 mRNA konnte sowohl eine Stabilisierung der mRNA als auch eine Aktivierung der Translation unter oxidativem Stress beobachtet werden, der zumindest zum Teil auf der Interaktion der 3'UTR mit HuR beruht (80). Im Fall der mRNA des IGF-IR (insulin like growth factor receptor) führte eine Interaktion von HuR mit der 5'UTR jedoch zu einer CAP- und IRES-abhängigen Inhibition der Translation (102). Auch im Fall der p27 mRNA (CKI, cyclin-dependent kinase inhibitor) inhibiert HuR durch Interaktion mit einem IRES-Element in der 5'UTR die Translation (78).

Die Aktivität von HuR im Zytoplasma und seine Translokation vom Kern ins Zytoplasma (Shuttling) wird dabei durch seinen Phosphorylierungs-Status reguliert (34, 80, 33). Die posttranskriptionelle Kontrolle basiert demnach einerseits auf der Regulation des Shuttlings von HuR und andererseits auf Veränderungen seiner RNA-Bindungs-Affinität gegenüber der Ziel-mRNA, in diesem Fall der γ -ENaC mRNA. Trotz der letztendlich sehr unterschiedlichen Wirkung scheint ein wichtiger Faktor,

der bei allen HuR-vermittelten Mechanismen eine Rolle zu spielen scheint die Phosphorylierung von HuR zu sein, die durch einige bekannte Signalkaskaden angesteuert wird. So wird HuR unter anderem durch MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinases), AMP-Kinase (AMP activated kinase) und Mitglieder der Proteinkinase C (PKC) Familie phosphoryliert (39). Die Ergebnisse zur HuR-vermittelten Kontrolle der γ -ENaC Expression lassen jedoch keine Aussagen darüber zu, ob die beobachteten Veränderungen der zytoplasmatischen HuR-Konzentration unter Aldosteron- oder dDAVP-Einfluss auf einer Neusynthese, einer Veränderung der Protein-Stabilität oder einem veränderten Shuttling von HuR beruhen. Vielleicht sind mehrere dieser Faktoren für die Veränderung der HuR-Menge im Zytoplasma verantwortlich, vielleicht sogar alle drei Faktoren. Expressions Studien aus Ratten-Nieren oder mit IMCD (inner medullary collecting duct) Zellen haben gezeigt, dass die Stimulation durch Aldosteron und Vasopressin auch zum Anstieg der Expression von Faktoren in Signal-Kaskaden, wie der ERK Kaskade (33, 29, 90) und der c-Jun NH₂-terminalen Kinase 3 (JNK3) Kaskade (99), führt, welche die Lokalisation und die RNA-Bindungseigenschaften verschiedener RBPs darunter auch von ARE-BPs wie HuR, AUF1 und TTP regulieren können (119). Hiervon könnten auch Kinasen oder Phosphatasen betroffen sein, die für eine Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von HuR verantwortlich sind. Zwei bekannte Ziele des Signallings unter Aldosteron und dDAVP, die in Bezug auf ENaC eine entscheidende Rolle spielen, sind die SGK1-Kinase und die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 (134, 92, 10). Inwiefern diese beiden Proteine oder andere Faktoren eine Rolle für die Regulation der γ -ENaC mRNA Translation durch HuR oder der anderen RBPS wie FMRP und TTP eine Rolle spielen gilt noch zu untersuchen.

4.4 Bedeutung der posttranskriptionellen Expressionskontrolle für die Expression der ENaC-Untereinheiten unter Aldosteron oder dDAVP

Die Wirkung der Hormone Aldosteron und Vasopressin in Bezug auf die ENaC-vermittelte Na⁺-Reabsorption wurde bislang hauptsächlich auf der Ebene der Posttranslation und der Transkription untersucht. Durch diese Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass posttranskriptionelle Regulationsmechanismen eine Rolle bei der Regulation der ENaC Expression unter Aldosteron und Vasopressin spielen. Hierbei konnte durch Bestimmung der mRNA-Stabilität gezeigt werden, dass der beobachtete Anstieg der mRNA-Konzentration von α - und γ -ENaC nicht auf einer

Stabilisierung der mRNA sondern ausschließlich auf einer Aktivierung der Transkription beruhen muss. Die beiden Hormone bewirkten sogar im Gegenteil eine leichte Destabilisierung der drei ENaC-mRNAs, aber auch der unabhängigen Kontrolle der β -Aktin mRNA. Der Langzeit-Effekt einer mRNA-Destabilisierung in der Niere unter Aldosteron wurde zuvor schon von Spindler *et al.* für verschiedene mRNAs von Transkriptionsfaktoren u. a. von c-Myb und c-Jun beschrieben (137, 145). Sie konnten zeigen, dass dieser Effekt durch Hemmung der Translation vermindert wurde und postulierten daher, dass der Effekt auf der gesteigerten Expression und Aktivierung einer RNase beruht (137, 145). Dieses Modell würde somit auch die Destabilisierung der ENaC-mRNAs und der β -Aktin mRNA erklären. Gleichzeitig konnte in dieser Arbeit jedoch gezeigt werden, dass es zu einem simultanen Anstieg der Translationseffizienz bei der α -ENaC mRNA und der γ -ENaC mRNA-Translation unter Aldosteron und dDAVP kommt. Diese Steigerung der Translationseffizienz könnte dabei als Mechanismus dienen das Defizit an ENaC mRNAs aufgrund der generellen Destabilisierung von mRNAs auszugleichen und so eine gleichbleibende Neusynthese der ENaC-Untereinheiten zu gewährleisten. Da die Proteinhalbwertszeit der ENaC-Proteine nur etwa 3 h beträgt (124) ist für eine intakte Kurzzeit- wie Langzeitregulation der ENaC-vermittelten Na^+ -Rückresorption eine kontinuierliche Neusynthese für eine ständige Verfügbarkeit funktioneller ENaC-Kanäle nötig. Unter physiologischen Bedingungen im Organismus wäre diese Kompensation der mRNA-Destabilisierung durch eine Steigerung der Translationseffizienz unter Aldosteron oder Vasopressin somit wichtig, um die Na^+ -Reabsorption und somit die Na^+ -Homöostase aufrecht erhalten zu können und bietet zusätzlich eine Möglichkeit der Feinregulation der ENaC-Expression.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Expression der ENaC-Untereinheiten unter der Stimulation durch Aldosteron oder dDAVP in der kortikalen Sammelrohr-Zelllinie mCCD_{c1} der Maus zeigen, dass posttranskriptionelle Mechanismen besonders in Bezug auf die Lokalisation und Translation der γ -ENaC mRNA beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass diese auf der Interaktion der γ -ENaC 3'UTR mit HuR beruht, es scheinen jedoch auch andere ARE-BPs einen Einfluss auf die Translationseffizienz auszuüben. Außerdem konnte auch in Bezug auf die α -ENaC mRNA ein Anstieg der Translationseffizienz unter Aldosteron nachgewiesen werden.

Insgesamt scheint die Expression der drei ENaC-Untereinheiten also auf komplexe Weise durch posttranskriptionelle Mechanismen unter Aldosteron und Vasopressin (dDAVP) reguliert zu werden. Für eine vollständige Aufklärung der ENaC-Expression unter Aldosteron und Vasopressin, sowie aller beteiligten Prozesse gilt es daher in der Zukunft noch verschiedene Fragen zu beantworten. Im Kontext dieser Arbeit der posttranskriptionellen Regulation γ -ENaC Expression sollten folgende Aspekte noch geklärt werden:

- Außer HuR wurden weitere RBPs für die γ -ENaC 3'UTR als Bindungspartner identifiziert, von denen FMRP und TTP unter einer Kotransfektion auch einen positiven Effekt auf die γ -3'UTR-abhängige Expression der Luziferase im Reporter-gen-Assay zeigten. Für diese Faktoren müsste ebenfalls eine Untersuchung der Interaktion mit der γ 3'UTR durch UV-Crosslinking sowie ein Nachweis von *in vivo* γ -ENaC mRNA/ARE-BP-Komplexen durch RNA-Pulldown-Assays erfolgen.
- Ein weiterer wichtiger Punkt wäre die genauere Kartierung der RNA-Bindungsmotive der einzelnen RBPs innerhalb des AU-reichen Elements der γ 3'UTR.
- Eine weitere entscheidende Frage ist, wie und über welche Mechanismen die Assoziation der RBPs an die γ 3'UTR reguliert wird. Hierfür gilt es aufzuklären inwieweit posttranslationale Modifikationen der RBPs, wie z. B. Phosphorylierungen dafür notwendig sind um eine Bindung der RBPs an die γ 3'UTR zu bewirken.
- In diesem Kontext müsste auch geklärt werden über welche Signalkaskaden Aldosteron oder Vasopressin diese Modifizierungen und somit die Assoziation der RBPs an die γ 3'UTR ansteuern und welche Faktoren an dieser Regulation beteiligt sind.

5 Zusammenfassung

Der epitheliale Natriumkanal ENaC ist essentiell für die Feinregulation der Na⁺-Reabsorption im distalen Tubulus und dem Sammelrohr der Niere. Er ist dadurch entscheidend an der Aufrechterhaltung der Natrium- und der Wasser-Homöostase sowie der damit verbundenen Regulation des Blutvolumens und Blutdrucks beteiligt. Die Regulation der Na⁺- und der Wasser-Reabsorption wird dabei hauptsächlich über die Hormone Aldosteron und Vasopressin angesteuert. Diese sind maßgeblich an der Regulation der Expression der drei Untereinheiten des Kanals, α -, β - und γ -ENaC, sowie deren Assemblierung, Aktivierung und Einbau in die Zellmembran beteiligt. In dieser Arbeit sollte daher die Expression des ENaC im Hinblick auf eine nierenspezifische Wirkung der Hormone Aldosteron und Vasopressin, anhand der kortikalen Sammelrohr Zelllinie mCCD_{cl1} aus der Maus, auf eine Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen untersucht werden. Hierbei sollte der Schwerpunkt insbesondere auf die Rolle von RNA-bindenden Proteinen gelegt werden.

Die Untersuchung der Expression der drei ENaC-Untereinheiten zeigte, dass sowohl transkriptionelle als auch posttranskriptionelle Mechanismen an der Regulation der ENaC Expression unter dem hormonellen Einfluss von Aldosteron und dDAVP beteiligt sind. Die Erhöhung der α -, und γ -ENaC mRNA-Menge unter Aldosteron, sowie die Erhöhung der γ -ENaC mRNA-Menge unter Aldosteron und dDAVP beruhte dabei auf einem Anstieg der Transkription, da es sogar zu einer leichten Destabilisierung der ENaC-mRNAs unter beiden Hormonen kam. In Bezug auf die α - und γ -ENaC mRNA führten Aldosteron (α - und γ -ENaC) und dDAVP (γ -ENaC) zu einem Anstieg der Translationseffizienz, was durch Polysomengradienten-Analysen nachgewiesen werden konnte. Diese beruhte bei der γ -ENaC mRNA auf einer Verlagerung der mRNA aus translationsinaktiven mRNP-Komplexen in die Fraktion der translatierten Polysomen. Die RNA-Bindungs-Proteine (RBPs) und die Bindungsmotive der γ -ENaC mRNA wurden daraufhin näher untersucht. Durch eine Sequenz-Analyse konnte ein AU-reiches Element (ARE) in der γ -ENaC 3'UTR identifiziert werden, wobei durch RNA-Affinitätschromatographie verschiedene AU-reiche Element Bindungs-Proteine (ARE-BPs) wie HuR, AUF1 und TTP als RBPs der γ -ENaC 3'UTR isoliert werden konnten. Für einige RBPs, darunter HuR, TTP, AUF1 und FMRP konnte eine Kolokalisation in Polysomenfraktionen mit der γ -ENaC

mRNA, sowie eine Hormon-abhängige Veränderung der Assoziation an Polysomen gezeigt werden. Die Koexpression von HuR, TTP und FMRP und Luziferase-Konstrukten mit der γ -ENaC 3'UTR führten zu einer 3'UTR-abhängigen Induktion der Luziferase-Expression. Die Überexpression einzelner RBPs bewirkte damit einen vergleichbaren Effekt, wie er mit dem Luziferase- γ -ENaC 3'UTR-Konstrukt unter Stimulation mit Aldosteron oder dDAVP beobachtet werden konnte. UV-Crosslinking-Assays der γ -ENaC 3'UTR unter der Verwendung von überexprimiertem HuR und RNA-Pulldown-Assays zeigen, dass HuR konzentrationsabhängig mit der γ -ENaC 3'UTR interagiert und eine vermehrte Komplexbildung von γ -ENaC mRNA und HuR mit dem Anstieg der Translationseffizienz unter Hormonstimulation einhergeht. Außerdem konnte demonstriert werden, dass eine Überexpression von HuR in mCCD_{cl1}-Zellen ausreichte um die Expression von endogenem γ -ENaC zu induzieren.

6 Summary

The epithelial sodium channel ENaC is essential for the fine-regulation of the Na⁺-reabsorption in the distal tubule and the collecting duct of the kidney. ENaC, therefore, plays a major role for the maintenance of sodium- and water-homoeostasis and the associated regulation of blood-volume and pressure. These processes are mainly regulated by the hormones aldosterone and vasopressin (dDAVP). These hormones also regulate the expression, assembly of the three ENaC subunits α -, β - and γ -ENaC as well as the activation and exposition of functional ENaC channels at the cell membrane. This study aims to investigate the effects of aldosterone and vasopressin on posttranscriptional mechanisms during ENaC expression using the cortical collecting duct mouse cell line mCCD_{cl1}. Within this process I focussed on the role of RNA-binding proteins.

The investigation of ENaC subunit expression under the influence of aldosterone and dDAVP showed a participation of both, transcriptional and posttranscriptional mechanisms for the regulation of ENaC expression. It was demonstrated that the increase of α - and γ -ENaC mRNA under the influence of aldosterone, and the increase of the γ -ENaC mRNA during application of aldosterone and dDAVP are both based on an upregulation of transcription, since ENaC-mRNAs even show a destabilization under the presence of both hormones. Polysome gradient analysis showed an increase in translational efficiency of ENaC subunits under the influence of aldosterone (α - and γ -ENaC) and dDAVP (γ -ENaC). In case of γ -ENaC mRNA this increase was based on a translocation of the mRNA from translational inactive mRNP-complexes into the fraction of actively translated polysomes. RNA-binding-proteins (RBPs) and binding motifs of the γ -ENaC mRNA were then investigated in more detail. By analysis of γ -ENaC mRNA sequence an AU-rich element (ARE) in the γ -ENaC 3'UTR was identified. Moreover, different AU-rich element binding proteins (ARE-BPs) such as HuR, AUF1 and TTP could be identified as RBPs of γ -ENaC 3'UTR by RNA-affinity-chromatography and MALDI-TOF-MS. Some of the RBPs, such as HuR, TTP, AUF1 and FMRP, colocalized with γ -ENaC mRNA in polysome fractions and showed a hormone-dependent change of their association to polysomes. The coexpression of HuR, TTP, FMRP and luciferase-conjugated γ -ENaC 3'UTR constructs showed a 3'UTR dependent induction of luciferase expression. Overexpression of single RBPs therefore showed a similar effect as

observed for the luciferase-conjugated γ -ENaC 3'UTR under stimulation with aldosterone or dDAVP. UV-crosslinking-assays of the γ -ENaC 3'UTR with overexpressed HuR and RNA-pulldown-assays documented a concentration dependence of the interaction between HuR and the γ -ENaC 3'UTR and that an increase of the interaction between γ -ENaC mRNA and HuR is correlated with an increase in translational efficiency during hormone stimulation. Moreover an overexpression of HuR in mCCD_{c1} cells was sufficient to induce endogenous γ -ENaC expression.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Abdelmohsen K, Kuwano Y, Kim HH, Gorospe M. Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence. *Biol Chem*. 2008 Mar;389(3):243-55. Review.
- 2 Abdelmohsen K, Lal A, Kim HH, Gorospe M. Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell Cycle*. 2007 Jun 1;6(11):1288-92.
- 3 Ahn YJ, Brooker DR, Kosari F, Harte BJ, Li J, Mackler SA, Kleyman TR. Cloning and functional expression of the mouse epithelial sodium channel. *Am J Physiol*. 1999 Jul;277(1 Pt 2):F121-9.
- 4 Ambrosius WT, Bloem LJ, Zhou L, Rebhun JF, Snyder PM, Wagner MA, Guo C, Pratt JH: Genetic variants in the epithelial sodium channel in relation to aldosterone and potassium excretion and risk for hypertension. *Hypertension* 34 : 631 –637, 1999
- 5 Andreassi C, Riccio A. To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends Cell Biol*. 2009 Sep;19(9):465-74. Review.
- 6 Baker EH, Dong YB, Sagnella GA, Rothwell M, Onipinla AK, Markandu ND, Cappuccio FP, Cook DG, Persu A, Corvol P, Jeunemaitre X, Carter ND, MacGregor GA: Association of hypertension with T594M mutation in beta subunit of epithelial sodium channels in black people resident in London. *Lancet* 351 : 1388 –1392, 1998
- 7 Barker PM, Nguyen MS, Gatzky JT, Grubb B, Norman H, Hummler E, Rossier B, Boucher RC, Koller B. Role of gammaENaC subunit in lung liquid clearance and electrolyte balance in newborn mice. Insights into perinatal adaptation and pseudohypoaldosteronism. *J Clin Invest* 102: 1634–1640, 1998
- 8 Barreau C, Paillard L, Osborne HB. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 3;33(22):7138-50. Print 2005. Review.
- 9 Bens M, Chassin C, Vandewalle A. Regulation of NaCl transport in the renal collecting duct: lessons from cultured cells. *Pflugers Arch*. 2006 Nov;453(2):133-46. Epub 2006 Aug 26. Review.
- 10 Bhalla V, Hallows KR. Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Oct;19(10):1845-54. Review.
- 11 Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., Filipowicz, W. (2006) Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*. 2006 Jun 16;125(6):1111-24.
- 12 Bianchi L, Driscoll M. Protons at the gate: DEG/ENaC ion channels help us feel and remember. *Neuron*. 2002 Apr 25;34(3):337-40. Review.
- 13 Blanc V, Davidson NO. C-to-U RNA editing: mechanisms leading to genetic diversity. *J Biol Chem*. 2003 Jan 17;278(3):1395-8. Review.
- 14 Bremner HR, Freywald T, O'Brodovich HM, Otulakowski G. Promoter analysis of the gene encoding the beta-subunit of the rat amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Jan;282(1):L124-34.

- 15 Brooks HL, Ageloff S, Kwon TH, Brandt W, Terris JM, Seth A, Michea L, Nielsen S, Fenton R, Knepper MA. cDNA array identification of genes regulated in rat renal medulla in response to vasopressin infusion. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Jan;284(1):F218-28.
- 16 Butterworth MB, Edinger RS, Johnson JP, Frizzell RA. Acute ENaC stimulation by cAMP in a kidney cell line is mediated by exocytic insertion from a recycling channel pool. *J Gen Physiol*. 2005 Jan;125(1):81-101.
- 17 Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC. Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration; *Nature*. 1993 Feb 4; 361(6411):467-70.
- 18 Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*. 1994 Feb 3;367(6462):463-7.
- 19 Cannell IG, Kong YW, Bushell M. How do microRNAs regulate gene expression? *Biochem Soc Trans*. 2008 Dec;36(Pt 6):1224-31.
- 20 Carmody SR, Wenthe SR. mRNA nuclear export at a glance. *J Cell Sci*. 2009 Jun 15;122(Pt 12):1933-7. Review.
- 21 Chalfie M, Wolinsky E. The identification and suppression of inherited neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1990 May 31;345(6274):410-6.
- 22 Chang SS, Grunder S, Hanukoglu A, Rosler A, Mathew PM, Hanukoglu I, Schild L, Lu Y, Shimkets RA, Nelson-Williams C, Rossier BC, Lifton RP: Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat Genet* 12 : 248 –253, 1996
- 23 Cherry J, Karschner V, Jones H, Pekala PH. HuR, an RNA-binding protein, involved in the control of cellular differentiation. *In vivo*. 2006 Jan-Feb;20(1):17-23. Review.
- 24 Clark IE, Dobi KC, Duchow HK, Vlasak AN, Gavis ER. A common translational control mechanism functions in axial patterning and neuroendocrine signaling in *Drosophila*. *Development*. 2002 Jul;129(14):3325-34.
- 25 Clark IE, Wyckoff D, Gavis ER. Synthesis of the posterior determinant Nanos is spatially restricted by a novel cotranslational regulatory mechanism. *Curr Biol*. 2000 Oct 19;10(20):1311-4.
- 26 Cowley AW, Jr.: Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev* 72: 231-300,1992
- 27 Dagenais, A., R. Kothary, and Y. Berthiaume. The subunit of the epithelial sodium channel in the mouse: developmental regulation of its expression. *Pediatr. Res*. 42: 327-334, 1997
- 28 Day DA, Tuite MF. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol*. 1998 Jun;157(3):361-71.
- 29 DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Déry O, Bunnett NW. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 26;97(20):11086-91.

- 30 Denman RB. Déjà vu all over again: FMRP binds U-rich target mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 10;310(1):1-7.
- 31 Dixon DA, Balch GC, Kedersha N, Anderson P, Zimmerman GA, Beauchamp RD, Prescott SM. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1. *J Exp Med.* 2003 Aug 4;198(3):475-81.
- 32 Doller A, Akool el-S, Huwiler A, Müller R, Radeke HH, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase Cdelta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA. *Mol Cell Biol.* 2008 Apr;28(8):2608-25.
- 33 Doller A, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cell Signal.* 2008 Dec;20(12):2165-73. Review.
- 34 Doller, A., Huwiler, A., Müller, R., Radeke H.H., Pfeilschifter, J. and Eberhardt, W. (2007) Protein kinase C α -dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: Implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. *Mol. Biol. Cell*, 18, 2137-2148.
- 35 Donaldson SH, Boucher RC: Sodium channels and cystic fibrosis. *Chest* 132 : 1631 – 1636, 2007
- 36 Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Mar;3(3):195-205. Review.
- 37 Dreyfuss G, Matunis MJ, Piñol-Roma S, Burd CG. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:289-321. Review.
- 38 Driscoll M, Chalfie M. The *mec-4* gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature.* 1991 Feb 14;349(6310):588-93.
- 39 Eberhardt, W., Doller, A., Akool, el-S. and Pfeilschifter, J. (2007) Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol. Ther.* 114, 56-73.
- 40 Ecelbarger, C., Kim, G.H., Terris, J., Masilamani, S., Mitchell, C., Reyes, I., Verbalis, J.G. and Knepper, M.A. (2000) Vasopressin-mediated regulation of epithelial sodium channel abundance in rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 279, F46-F53.
- 41 Escoubet, B., Coureau, C., Bonvalet, J.P. and Farman, N. (1997) Non-coordinated regulation of epithelial Na channel and Na pump subunit mRNAs in kidney and colon by aldosterone. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 272, C1482-C-1491.
- 42 Eskandari S, Snyder PM, Kreman M, Zampighi GA, Welsh MJ, Wright EM 1999 Number of subunits comprising the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 274:27281–27286
- 43 Fähling M, Mrowka R, Steege A, Kirschner KM, Benko E, Förstera B, Persson PB, Thiele BJ, Meier JC, Scholz H. Translational regulation of the human achaete-scute homologue-1 by fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem.* 2009 Feb 13;284(7):4255-66.

-
- 44 Föhling M, Mrowka R, Steege A, Martinka P, Persson PB, Thiele BJ. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 modulate collagen prolyl 4-hydroxylase, alpha (I) mRNA stability. *J Biol Chem.* 2006 Apr 7;281(14):9279-86.
- 45 Föhling M, Mrowka R, Steege A, Nebrich G, Perlewitz A, Persson PB, Thiele BJ. Translational control of collagen prolyl 4-hydroxylase-alpha(I) gene expression under hypoxia. *J Biol Chem.* 2006 Sep 8;281(36):26089-101.
- 46 Föhling M, Steege A, Perlewitz A, Nafz B, Mrowka R, Persson PB, Thiele BJ. Role of nucleolin in posttranscriptional control of MMP-9 expression. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Oct 15;1731(1):32-40.
- 47 Fenton RA, Knepper MA. Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiol Rev.* 2007 Oct;87(4):1083-112. Review.
- 48 Firsov D, Gautschi I, Merillat AM, Rossier BC, Schild L 1998 The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J* 17:344–352
- 49 Fitzgerald KD, Semler BL. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Sep-Oct;1789(9-10):518-28. Review.
- 50 Fred RG, Welsh N. The importance of RNA binding proteins in preproinsulin mRNA stability. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Jan 15;297(1-2):28-33. Review.
- 51 Gaeggeler HP, Gonzalez-Rodriguez E, Jaeger NF, Loffing-Cueni D, Norregaard R, Loffing J, Horisberger JD, Rossier BC (2005). Mineralocorticoid versus glucocorticoid receptor occupancy mediating aldosterone-stimulated sodium transport in a novel renal cell line. *J Am Soc Nephrol.* 16(4):878-91
- 52 Galbán, S., Kuwano, Y., Pullmann, R. Jr, Martindale, J.L., Kim, H.H., Lal, A., Abdelmohsen, K., Yang, X., Dang, Y., Liu, J.O., Lewis, S.M., Holcik, M, Gorospe, M. (2007) RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol. Cell. Biol.* 2008 28, 93-107.
- 53 Gamba G: Alternative splicing and diversity of renal transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F781-F794, 2001
- 54 Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev.* 1997 Apr;77(2):359-96. Review.
- 55 Gray MW. Diversity and evolution of mitochondrial RNA editing systems. *IUBMB Life.* 2003 Apr-May;55(4-5):227-33. Review.
- 56 Greig ER, Boot-Handford RP, Mani V, Sandle GI: Decreased expression of apical Na⁺ channels and basolateral Na⁺, K⁺-ATPase in ulcerative colitis. *J Pathol* 204 : 84 –92, 2004
- 57 Groppo R, Richter JD. Translational control from head to tail. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Jun;21(3):444-51. Review.
- 58 Gründer S, Müller A, and Ruppertsberg JP. Developmental and cellular expression pattern of epithelial sodium channel , and subunits in the inner ear of the rat. *Eur J Neurosci* 13: 641-648, 2001

-
- 59 Gupta YK, Lee TH, Edwards TA, Escalante CR, Kadyrova LY, Wharton RP, Aggarwal AK. Co-occupancy of two Pumilio molecules on a single hunchback NRE. *RNA*. 2009 Jun;15(6):1029-35.
- 60 Guyton AC: Blood pressure control -special role of the kidneys and body fluids. *Science* 252: 1813-1816, 1991
- 61 Hall KB. RNA-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol*. 2002 Jun;12(3):283-8. Review.
- 62 Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, Canessa C, Iwasaki T, Rossier B, Lifton RP: Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: Genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat Genet* 11 : 76–82, 1995
- 63 Hinman MN, Lou H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Oct;65(20):3168-81. Review.
- 64 Hollås H, Aukrust I, Grimmer S, Strand E, Flatmark T, Vedeler A. Annexin A2 recognises a specific region in the 3'-UTR of its cognate messenger RNA. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Nov;1763(11):1325-34.
- 65 Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, Boucher R, Rossier BC 1996 Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in -ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 12:325–328
- 66 Inoue A, Arao Y, Omori A, Ichinose S, Nishio K, Yamamoto N, Kinoshita Y, Mita S. Identification of S1 proteins B2, C1 and D1 as AUF1 isoforms and their major role as heterogeneous nuclear ribonucleoprotein proteins. *Biochem J*. 2003 Jun 15;372(Pt 3):775-85.
- 67 International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.
- 68 Jain RG, Andrews LG, McGowan KM, Pekala PH, Keene JD. Ectopic expression of Hel-N1, an RNA-binding protein, increases glucose transporter (GLUT1) expression in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol*. 1997 Feb;17 (2):954-62.
- 69 Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E: Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 449 : 316 –323, 2007
- 70 Kaplan MR, Mount DB, Delpire E: Molecular mechanisms of NaCl cotransport. *Ann Rev Physiol* 58: 649-668, 1996
- 71 Kawai, T., Lal, A., Yang, X., Galban, S., Mazan-Mamczarz, K., Gorospe, M. (2006) Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR. *Mol Cell Biol*. 26, 3295-307.
- 72 Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev*. 2002 Jul;82(3):735-67. Review.
- 73 Keszler M, Sivasubramanian KN: Pseudohypoaldosteronism. *Am J Dis Child* 137 : 738 –740, 1983
- 74 Kleyman TR, Carattino MD, Hughey RP. ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases. *J Biol Chem*. 2009 Jul 31; 284 (31):20447-51. Review.

- 75 Knepper MA, Kim GH, Masilamani S: Renal tubule sodium transporter abundance profiling in rat kidney. Response to aldosterone and variations in NaCl intake. *Ann N Y Acad Sci* 986: 562-569, 2003
- 76 Kosari F, Sheng S, Li J, Mak DO, Foskett JK, Kleyman TR 1998 Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 273:13469–13474
- 77 Krecic AM, Swanson MS. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol.* 1999 Jun;11(3):363-71.
- 78 Kullmann M., Göpfert, U., Siewe, B and Hengst, L. (2002) ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Gen. Dev.* 16, 3087-3099.
- 79 Kunzelmann K, Mall M: Electrolyte transport in the mammalian colon: Mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 82 : 245 –289, 2002
- 80 Kuwano, Y., Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Martindale, J.L., Yang, X. and Gorospe, M. (2008) MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4562-4575.
- 81 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001 Oct 26;294(5543):853-8.
- 82 Lal, A., Kawai, T., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K., Gorospe, M. (2005) Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin alpha. *EMBO J.* 24, 1852-62.
- 83 Laroia G, Cuesta R, Brewer G, Schneider RJ. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science.* 1999 Apr 16; 284 (5413):499-502.
- 84 Li, X. J., R. H. Xu, W. B. Guggino, and S. H. Snyder. Alternatively spliced forms of the alpha subunit of the epithelial sodium channel: distinct sites for amiloride binding and channel pore. *Mol. Pharmacol.* 47: 1133-1140, 1995
- 85 Licatalosi DD, Darnell RB. RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan; 11 (1):75-87. Review.
- 86 Lin W, Finger TE, Rossier BC, and Kinnamon SC. Epithelial Na⁺ channel subunits in rat taste cells: localization and regulation by aldosterone. *J Comp Neurol* 405: 406-420, 1999
- 87 Lingueglia E, Voilley N, Waldmann R, Lazdunski M, Barbry P. Expression cloning of an epithelial amiloride-sensitive Na⁺ channel. A new channel type with homologies to *Caenorhabditis elegans* degenerins. *FEBS Lett.* 1993 Feb 22;318(1):95-9.
- 88 Lingueglia E. Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem.* 2007 Jun 15;282(24):17325-9. Review.
- 89 Lopez de Silanes, I, Zhan, M., Lal, A., Yang, X. and Gorospe, M. (2004) Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2987-2992.
- 90 Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, and Lefkowitz RJ. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2449–2454, 2001.

-
- 91 Malagon-Rogers M: A patient with pseudohypoaldosteronism type 1 and respiratory distress syndrome. *Pediatr Nephrol* 13 : 484 –486, 1999
- 92 Malik B, Price SR, Mitch WE, Yue Q, Eaton DC. Regulation of epithelial sodium channels by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Jun; 290 (6):F1285-94.
- 93 Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC: Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* 10 : 487 – 493, 2004
- 94 Masilamani S, Wang X, Kim GH, Brooks H, Nielsen J, Nakamura K, Stokes JB and Knepper MA: Time course of renal Na-K-ATPase, NHE3, NKCC2 and ENaC abundance changes with dietary NaCl restriction. *Am J Renal Physiol* 283: F648-657, 2002
- 95 Masilamani, S., Kim, G.H., Mitchell, C., Wade, J.B. and Knepper, M.A. (1999) Aldosterone-mediated regulation of ENaC α , β , and γ subunit proteins in rat kidney. *J. Clin. Invest.*, 104, R19-R23.
- 96 Mazan-Mamczarz K, Kuwano Y, Zhan M, White EJ, Martindale JL, Lal A, Gorospe M. Identification of a signature motif in target mRNAs of RNA-binding protein AUF1. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan;37(1):204-14.
- 97 Mazan-Mamczarz, K., Galban, S., Lopez de Silanes, I., Martingale, J.L. Atasoy U., Keene J.D. and Gorospe, M. (2003) RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8354-8359.
- 98 McDonald FJ, Yang B, Hrstka RF, Drummond HA, Tarr DE, McCray PB Jr, Stokes JB, Welsh MJ, Williamson RA. Disruption of the beta subunit of the epithelial Na⁺ channel in mice: hyperkalemia and neonatal death associated with a pseudohypoaldosteronism phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1727–1731, 1999
- 99 McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, Davis RJ, and Lefkowitz RJ. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290: 1574–1577, 2000.
- 100 McTavish N, Getty J, Burchell A, Wilson SM. Glucocorticoids can activate the alpha-ENaC gene promoter independently of SGK1. *Biochem J*. 2009 Sep 25;423(2):189-97. (100)
- 101 Mehler MF, Mattick JS. Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. *Physiol Rev*. 2007 Jul;87(3):799-823. Review.
- 102 Meng, Z., King, P.H., Nabors, L.B., Jackson, N.L., Chen, C.Y., Emanuel, P.D., Blume, S.W. (2005) The ELAV RNA-stability factor HuR binds the 5'-untranslated region of the human IGF-IR transcript and differentially represses cap-dependent and IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res*. 33, 2962-79. (102)
- 103 Mick VE, Itani OA, Loftus RW, Husted RF, Schmidt TJ, Thomas CP. 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*. 2001 Apr;15(4):575-88.

- 104 Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 2002;3(3):REVIEWS0004. Review.
- 105 Mizelle HL, Montani JP, Hester RL, Didlake RH, Hall JE: Role of pressure natriuresis in long-term control of renal electrolyte excretion. *Hypertension* 22: 102-111, 1993
- 106 Nicco, C., Wittner, M., DiStefano, A., Jounier, S., Bankir, L and Bouby, N. (2001) Chronic exposure to vasopressin upregulated ENaC and sodium transport in the rat renal collecting duct and lung. *Hypertension*, 38, 1143-1149.
- 107 Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol.* 2010 Mar;222(3):540-5.
- 108 Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Wilm M, Thiele BJ, Mann M, Hentze MW: mRNA Silencing During Erythroid Differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 Regulate Lipoxygenase Translation from the 3'End. *Cell* 89: 597-606, 1997
- 109 Otulakowski G, Duan W, Gandhi S, O'brodovich H. Steroid and oxygen effects on eIF4F complex, mTOR, and ENaC translation in fetal lung epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007 Oct;37(4):457-66.
- 110 Otulakowski G, Rafii B, Harris M, O'Brodovich H. Oxygen and glucocorticoids modulate alphaENaC mRNA translation in fetal distal lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 Feb;34(2):204-12.
- 111 Otulakowski, G., Rafii, B. and O'Brodovich, H. (2004) Differential translational efficiency of ENaC subunits during lung development. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 30, 862-870.
- 112 Ouar Z, Solé E, Bens M, Rafestin-Oblin ME, Meseguer A, Vandewalle A. Pleiotropic effects of dihydrotestosterone in immortalized mouse proximal tubule cells. Technical note. *Kidney Int.* 1998 Jan;53(1):59-66.
- 113 Pantopoulos K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Mar;1012:1-13. Review.
- 114 Papavasiliou FN, Schatz DG. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S35-44. Review.
- 115 Peng SS, Chen CY, Shyu AB. Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;16(4):1490-9.
- 116 Pesole G, Grillo G, Larizza A, Liuni S. The untranslated regions of eukaryotic mRNAs: structure, function, evolution and bioinformatic tools for their analysis. *Brief Bioinform.* 2000 Sep;1(3):236-49. Review.
- 117 Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S. Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene.* 2001 Oct 3;276(1-2):73-81.
- 118 Piecyk M, Wax S, Beck AR, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Kruys V, Streuli M, Anderson P. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J.* 2000 Aug 1;19(15):4154-63.
- 119 Pisitkun, T., Bieniek, J., Tchapyjnikov, D., Wang, G., Wu, W.W., Shen, R.F. and Knepper, M.A. (2006) High-throughput identification of IMCD proteins using LC-MS/MS. *Physiol. Genomics*, 25, 263-276.

- 120 Pradervand S, Barker PM, Wang Q, Ernst SA, Beermann F, Grubb BR, Burnier M, Schmidt A, Bindels RJ, Gatzky JT, Rossier BC, Hummler E: Salt restriction induces pseudohypoaldosteronism type 1 in mice expressing low levels of the beta-subunit of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 : 1732 – 1737, 1999
- 121 Preiss T, Hentze MW. From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev.* 1999 Oct;9(5):515-21.
- 122 Reisenauer MR, Anderson M, Huang L, Zhang Z, Zhou Q, Kone BC, Morris AP, Lesage GD, Dryer SE, Zhang W. AF17 competes with AF9 for binding to Dot1a to up-regulate transcription of epithelial Na⁺ channel alpha. *J Biol Chem.* 2009 Dec 18;284(51):35659-69.
- 123 Rossier BC, Pradervand S, Schild L, Hummler E. Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annu Rev Physiol.* 2002; 64: 877-97. Review.
- 124 Rotin, D., Kanelis, V. and Schild, L. (2001) Trafficking and cell surface stability of ENaC. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 281, F391-F399.
- 125 Sagnella GA, Swift PA: The renal epithelial sodium channel: Genetic heterogeneity and implications for the treatment of high blood pressure. *Curr Pharm Des* 12 : 2221 –2234, 2006
- 126 Samaha FF, Rubenstein RC, Yan W, Ramkumar M, Levy DI, Ahn YJ, Sheng S, Kleyman TR: Functional polymorphism in the carboxyl terminus of the alpha-subunit of the human epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 279 : 23900 –23907, 2004
- 127 Sauter D, Fernandes S, Goncalves-Mendes N, Boulkroun S, Bankir L, Loffing J, Bouby N. Long-term effects of vasopressin on the subcellular localization of ENaC in the renal collecting system. *Kidney Int.* 2006 Mar;69(6):1024-32.
- 128 Saxena SK, George CM, Pinskiy V, McConnell B. Epithelial sodium channel is regulated by SNAP-23/syntaxin 1A interplay. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 May 19;343(4):1279-85.
- 129 Saxena SK, Singh M, Kaur S, George C. Distinct domain-dependent effect of syntaxin1A on amiloride-sensitive sodium channel (ENaC) currents in HT-29 colonic epithelial cells. *Int J Biol Sci.* 2006 Nov 6;3(1):47-56.
- 130 Schroeder JM, Ibrahim H, Taylor L, Curthoys NP. Role of deadenylation and AUF1 binding in the pH-responsive stabilization of glutaminase mRNA. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 Mar;290(3):F733-40.
- 131 Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr, Ulick S, Milora RV, Findling JW, et al. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell.* 1994 Nov 4;79(3):407-14.
- 132 Skalweit A, Doller A, Huth A, Kähne T, Persson PB, Thiele BJ: Posttranscriptional control of renin synthesis: Identification of proteins interacting with renin mRNA 3'-untranslated region. *Circ Res* 92: 419-427, 2003

- 133 Snyder PM, Cheng C, Prince LS, Rogers JC, Welsh MJ 1998 Electrophysiological and biochemical evidence that DEG/ENaC cation channels are composed of nine subunits. *J Biol Chem* 273:681–684.
- 134 Snyder PM, Olson DR, Kabra R, Zhou R, Steines JC. cAMP and serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) regulate the epithelial Na(+) channel through convergent phosphorylation of Nedd4-2. *J Biol Chem*. 2004 Oct 29;279(44):45753-8. Epub 2004 Aug 24.
- 135 Snyder PM. The epithelial Na⁺ channel: cell surface insertion and retrieval in Na⁺ homeostasis and hypertension. *Endocr Rev*. 2002 Apr;23(2):258-75. Review.
- 136 Sonoda J, Wharton RP. Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio. *Genes Dev*. 1999 Oct 15;13(20):2704-12.
- 137 Spindler B, Verrey F. Aldosterone action: induction of p21(ras) and fra-2 and transcription-independent decrease in myc, jun, and fos. *Am J Physiol*. 1999 May;276(5 Pt 1):C1154-61.
- 138 Staub O, Dho S, Henry P, Correa J, Ishikawa T, McGlade J, Rotin D. WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO J*. 1996 May 15;15(10):2371-80.
- 139 Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W.F.C., Blackwell, T.K. and Anderson, P. (2004) MK2-induced tristetraprolin: 14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J.*, 23, 1313-1324.
- 140 Strautnieks SS, Thompson RJ, Gardiner RM, Chung E: 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 –250, 1996
- 141 Suzuki T, Okuno H, Yoshida T, Endo T, Nishina H, Iba H. Difference in transcriptional regulatory function between c-Fos and Fra-2. *Nucleic Acids Res*. 1991 Oct 25;19(20):5537-42.
- 142 Tamura H, Schild L, Enomoto N, Matsui N, Marumo F, Rossier BC: Liddle disease caused by a missense mutation of beta subunit of the epithelial sodium channel gene. *J Clin Invest* 97 : 1780 –1784, 1996
- 143 Thiele BJ, Doller A, Kähne T, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V: RNA binding proteins hnRNP A1, E1 and K are involved in posttranscriptional control of collagen I and III synthesis. *Circ Res* 95: 1058-1066, 2004
- 144 Thomas CP, Auerbach S, Stokes JB, Volk KA. 5' heterogeneity in epithelial sodium channel alpha-subunit mRNA leads to distinct NH2-terminal variant proteins. *Am J Physiol*. 1998 May;274(5 Pt 1):C1312-23.
- 145 Verrey F, Pearce D, Pfeiffer R, Spindler B, Mastroberardino L, Summa V, Zecevic M. Pleiotropic action of aldosterone in epithelia mediated by transcription and post-transcription mechanisms. *Kidney Int*. 2000 Apr;57(4):1277-82. Review.
- 146 Vlasova IA, Bohjanen PR. Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins. *RNA Biol*. 2008 Oct-Dec;5(4):201-7. Epub 2008 Oct 23.
- 147 Voilley N, Bassilana F, Mignon C, Merscher S, Mattéi MG, Carle GF, Lazdunski M, Barbry P. Cloning, chromosomal localization, and physical linkage of the beta and

- gamma subunits (SCNN1B and SCNN1G) of the human epithelial amiloride-sensitive sodium channel. *Genomics*. 1995 Aug 10;28(3):560-5.
- 148 Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Voilley N, and Lazdunski M. Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na⁺ channel. *J Biol Chem* 270: 27411-27414, 1995
- 149 Wang H, Traub LM, Weixel KM, Hawryluk MJ, Shah N, Edinger RS, Perry CJ, Kester L, Butterworth MB, Peters KW, Kleyman TR, Frizzell RA, Johnson JP. Clathrin-mediated endocytosis of the epithelial sodium channel. Role of epsin. *J Biol Chem*. 2006 May 19;281(20):14129-35.
- 150 Wang W, Caldwell MC, Lin S, Furneaux H, Gorospe M. HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *EMBO J*. 2000 May 15;19(10):2340-50.
- 151 Wiemuth D, Ke Y, Rohlf M, McDonald FJ. Epithelial sodium channel (ENaC) is multi-ubiquitinated at the cell surface. *Biochem J*. 2007 Jul 1;405(1):147-55.
- 152 Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci*. 2003 Apr;28(4):182-8. Review.
- 153 Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR et al. (2003) Hypertension Prevalence and Blood Pressure Levels in 6 European Countries, Canada, and the United States. *JAMA* 289(18): 2.363 bis 2.369
- 154 Yamashita Y, Koga M, Takeda Y, Enomoto N, Uchida S, Hashimoto K, Yamano S, Dohi K, Marumo F, Sasaki S: Two sporadic cases of Liddle's syndrome caused by de novo ENaC mutations. *Am J Kidney Dis* 37 : 499 –504, 2001
- 155 Zhang J, Tsapralis G, Bowden GT. Nucleolin stabilizes Bcl-X L messenger RNA in response to UVA irradiation. *Cancer Res*. 2008 Feb 15;68(4):1046-54.
- 156 Zhao TT, Graber TE, Jordan LE, Cloutier M, Lewis SM, Goulet I, Côté J, Holcik M. hnRNP A1 regulates UV-induced NF-kappaB signalling through destabilization of cIAP1 mRNA. *Cell Death Differ*. 2009 Feb;16(2):244-52.
- 157 Zhou R, Snyder PM. Nedd4-2 phosphorylation induces serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) ubiquitination and degradation. *J Biol Chem*. 2005 Feb

Bücher:

- B1 Sambrook J., Fritsch E.F., & Maniatis T.: *Molecular Cloning, a laboratory manual*. (ed.) New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)

8 *Publikationen*

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter dem Titel „*Aldosterone and vasopressin affect α - and γ -ENaC mRNA translation*“ bei der Zeitschrift *Nucleic Acid Research* (Oxford Journals) zur Publikation eingereicht und am 31.03.2010 akzeptiert.

9 *Danksagung*

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. B.-J. Thiele für die gute Betreuung und Unterstützung bedanken und auch vor allem für die Möglichkeit, die Dissertation in diesem interessanten und wichtigen Forschungsfeld im Rahmen dieses Projektes anfertigen zu können. Lieber Bernd, ich danke Dir ganz herzlich für alle Hilfe, konstruktiven Gespräche und Diskussionen der Ergebnisse sowie für Deine Unterstützung bei der Publikation der Daten und der Fertigstellung der Dissertation!

Herr Prof. Dr. W. Schuster gilt mein ganz besonderer Dank, da er die unliebsame Aufgabe der Betreuung einer externen Dissertation auf sich genommen hat. Vielen Dank dafür, dass Sie die Aufgabe des zweiten Gutachters und der Leitung des Promotionsverfahrens übernommen haben!

Ein besonderer Dank geht auch an alle Mitarbeiter des Instituts für Vegetative Physiologie (Charité Universitätsmedizin Berlin), vor allem an Frau Dr. A. Skalweit, Herrn Dr. B. Nafz und Herrn Dr. M. Fähling sowie Frau U. Neumann, Frau R. Stöbe und Frau J. Werner für Ihre Unterstützung, Diskussionen und gute Ratschläge sowie für aufmunternde Worte und die ein oder andere Tasse Tee, selbstgebackene Kuchen und Schokolade. In diesem Rahmen gilt mein ganz besonderer Dank Frau U. Neumann, Frau R. Stöbe und Frau J. Werner für Ihre Hilfe bei allen Dingen, die der Laboralltag so mit sich bringt. Vielen Dank, Regine, Jeannette und Ulrike für Eure Hilfe bei allen technischen- und Motivations Problemen während der ganzen Zeit und vor allem auch vielen Dank für all' die „kleinen Aufgaben“, die Ihr immer so gut und zuverlässig erledigt, ohne dass Sie jemand registriert, all' das Spülen, Sterilisieren, Spitzen stecken.... und die tausend anderen Aufgaben, die Ihr immer so nebenbei erledigt, ohne die ein vernünftiges Arbeiten als Wissenschaftler aber nicht möglich wäre!

Meinem Freund Jörn möchte ich für so unendlich viele große und kleine Dinge danken. Mein lieber Jörn, danke dafür, dass Du es einfach immer schaffst mich zum Lachen zu bringen und die Sonne für mich scheinen lässt! Ich danke Dir für Deine Liebe, Dein Verständnis und Deine Hilfe während der ganzen langen Zeit, die für uns Beide nicht immer ganz einfach war, und für all' die lieben und verrückten kleinen Überraschungen, die ich mit Dir erleben darf und die das Leben so liebenswert machen!

Einen ganz lieben und besonderen Dank möchte ich hiermit an meine Eltern richten, die mich während der ganzen Zeit in Allem unterstützt haben und ohne die ich es nie so weit gebracht hätte. Liebe Mama, lieber Papa, ich danke Euch Beiden von ganzem Herzen dafür, dass Ihr mich während der ganzen langen Zeit des Studiums und der Doktorarbeit immer unterstützt habt und mir zur Seite gestanden seid. Danke dafür, dass Ihr einfach immer für mich da seid und mir Mut gemacht habt, auch in schwierigen Zeiten durchzuhalten, dafür, dass Ihr mich liebt und immer an mich glaubt!