

**Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin**

aus dem Institut für Klinische Physiologie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Fromm

**Regulation des Epithelialen Natriumkanals (ENaC)  
im Kolon der Ratte durch MAP-Kinasen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
medizinischen Doktorwürde  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von

**Jan Kunkel**

aus Kiel

## **Gutachter**

1.: Prof. Dr. med. M. Fromm

2.: Prof. Dr. med. W. M. Kübler

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 19.09.2008

## **Meinen Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

TListe der verwendeten Abkürzungen und Symbole .....	5
Verzeichnis der Abbildungen .....	6
1 Einleitung.....	7
2 Material und Methoden .....	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Geräte.....	12
2.1.2 Chemikalien.....	12
2.1.3 Materialien .....	13
2.1.4 Tierisches Material zur Gewebegewinnung .....	14
2.1.5 Lösungen.....	14
2.2 Methoden.....	15
2.2.1 Prinzip der Versuche .....	15
2.2.2 Tiere und Darmpräparation.....	15
2.2.3 Ussing-Versuch .....	17
2.2.3.1 Prinzip.....	17
2.2.3.2 Aufbau des Ussing-Versuchsstands .....	17
2.2.3.3 Elektrische Messanordnung .....	19
2.2.3.4 Einspannen des Epithels .....	20
2.2.3.5 Korrektur von Badwiderstand und Elektrodenasymmetrie .....	20
2.2.3.6 Messung des Kurzschlussstroms .....	20
2.2.3.7 Bestimmung des elektrogenen Natriumtransports .....	21
2.2.3.8 Zugabe der Substanzen .....	22
2.2.4 Biochemische Versuche .....	22
2.2.4.1 RNA-Extraktion und -Isolation .....	22
2.2.4.2 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese .....	23
2.2.4.3 Northern Blot .....	24
2.2.5 Statistik.....	26
3 Ergebnisse.....	27
3.1 Heterogenität der Darmabschnitte.....	27
3.2 Wirkung des ERK/MAPK-Inhibitors PD98059.....	29
3.3 Wirkung des ERK-Inhibitors U0126 .....	32
3.4 Wirkung des p38-Inhibitors SB202190 .....	33
3.5 Wirkung des Proteinkinase-C-Aktivators TPA .....	34
4 Diskussion .....	36
4.1 Diskussion und Abgrenzung der Methode .....	36
4.2 Diskussion der Ergebnisse .....	37
4.2.1 Heterogenität der Darmabschnitte.....	37
4.2.2 Diskussion des Zeitverlaufs .....	37
4.2.3 Wirkung der ERK/MAPK-Inhibitoren PD98059 und U0126.....	38
4.2.4 Wirkung des p38-Inhibitors SB202190 .....	42
4.2.5 Wirkung des Proteinkinase-C-Aktivators TPA .....	42
4.2.6 Andere Signaltransduktionswege .....	43
5 Zusammenfassung .....	44
6 Literatur .....	45
Lebenslauf.....	48
Danksagung .....	49
Förderung .....	49
Veröffentlichung.....	49
Erklärung .....	50

## Liste der verwendeten Abkürzungen und Symbole

A	Fläche
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	early distal colon
EGF	epidermal growth factor
ENaC	epithelialer Natriumkanal
ER	Östradiolrezeptor
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
GRE	glucocorticoid response element
$G^t$	elektrische Leitfähigkeit des Gewebes pro $\text{cm}^2$ Epithelfläche ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
I	Stromstärke
$I_{\text{SC}}$	Kurzschlussstrom pro $\text{cm}^2$ Epithelfläche ( $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
$IC_{50}$	Inhibitionskonzentration, entspricht der Konzentration des Inhibitors, bei der die Aktivität des Kanals um 50% gehemmt wird
$J_{\text{Na}}$	Transportrate von Natrium pro $\text{cm}^2$ Epithelfläche ( $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
kb	kilo-Basenpaare
kD	kilo-Dalton
LDC	late distal colon
M	Menge an Teilchen in mol (Konzentration in mol/l)
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MR	Mineralokortikoidrezeptor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
$R^t$	elektrischer Widerstand des Gewebes eines $\text{cm}^2$ Epithelfläche ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ ), Kehrwert von $G^t$
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Stichprobenmittelwerts)
t	Zeit
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
$V_{\text{ms}}$	Potentialdifferenz zwischen mucosaler und serosaler Seite des Gewebes (mV)

## Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Aufbau des ENaC aus verschiedenen Untereinheiten.....	8
Abbildung 2: Wirkmechanismus von Aldosteron.....	9
Abbildung 3: Einteilung des distalen Kolons der Ratte .....	16
Abbildung 4: Strippen der Darmwand.....	16
Abbildung 5: Messkammer und Aufsatz .....	18
Abbildung 6: Messanordnung .....	19
Abbildung 7: Elektrophysiologie der Darmabschnitte .....	27
Abbildung 8: Kurzschlussströme bei Gabe von Aldosteron und PD98059.....	29
Abbildung 9: Northern Blot der $\alpha$ -Untereinheit des ENaC mit PD98059.....	30
Abbildung 10: Northern Blot der $\beta$ -Untereinheit des ENaC mit PD98059.....	30
Abbildung 11: Northern Blot der $\gamma$ -Untereinheit des ENaC mit PD98059.....	31
Abbildung 12: Kurzschlussströme bei Gabe von Aldosteron und UO126.....	32
Abbildung 13: Kurzschlussströme bei Gabe von Aldosteron und SB202190.....	33
Abbildung 14: Kurzschlussströme bei Gabe von Aldosteron und TPA.....	34
Abbildung 15: Zeitverlauf bei Gabe von Aldosteron und TPA.....	35