

1 Einleitung

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC, Gensymbol SCNN1) ist das Schlüsselprotein für die Regulation der Natriumausscheidung bei Wirbeltieren. Er ist typischerweise in der apikalen Membran von Epithelien distaler röhrenförmiger Organsegmente lokalisiert, wie Sammelrohr der Niere, distalem Kolon, Schweißdrüsengängen, Lunge und Speicheldrüsengängen. Die besondere Rolle des ENaC ergibt sich dadurch, dass er in diesen Epithelien – wie z.B. für das distale Kolon gezeigt werden konnte (Garty & Palmer, 1997) – den limitierenden und somit regulierenden Faktor für den transepithelialen Natriumtransport darstellt.

Durch Aldosteron nimmt am spätdistalen Kolon die Dichte der apikalen Natriumkanäle zu, so dass Natrium, angetrieben durch einen elektrochemischen Gradienten, vermehrt passiv von der apikalen Seite in die Epithelzelle einströmen kann. Der elektrochemische Gradient besteht aus zwei Komponenten, einem Konzentrationsgradienten für Natrium, der durch die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase hergestellt wird, und der apikalen Membranspannung, die hauptsächlich durch apikale Kaliumkanäle erzeugt wird. Insgesamt kommt es zu einem transepithelialen Natriumtransport, der unter Verschiebung von Nettoladungen und somit elektrogen verläuft.

Der ENaC wurde vor einigen Jahren aus dem Darm der Ratte kloniert. Er setzt sich aus drei verschiedenen, untereinander homologen Untereinheiten (α, β, γ) zusammen (Canessa et al., 1993, Canessa et al., 1994, Lingueglia et al., 1994), deren Größen $\alpha = 90$ kD, $\beta = 92$ kD, $\gamma = 85$ kD sind. Obwohl unterschiedliche Meinungen über die Anzahl der Untereinheiten bestehen, die eine Kanalpore bilden, wird eine Stöchiometrie von 2:1:1 angenommen (Kosari et al., 1998), (Firsov et al., 1998), (Eskandari et al., 1999). Die Anordnung der Untereinheiten wird durch Abb. 1 verdeutlicht.

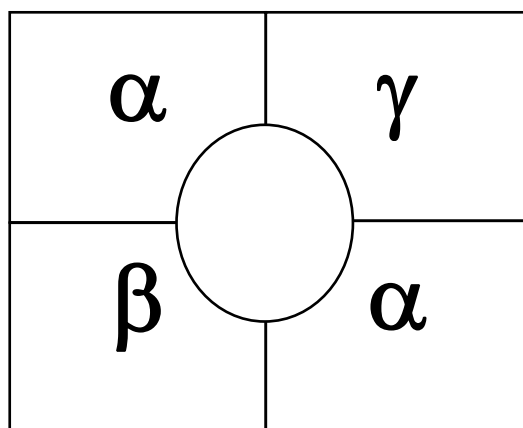


Abbildung 1: Aufbau des ENaC aus verschiedenen Untereinheiten; verändert nach Firsov et al. (1998).

Die Regulation des Kanals im distalen Kolon der Ratte erfolgt durch nanomolare Konzentrationen von Aldosteron und andere Kortikosteroide unter anderem über den Mineralokortikoidrezeptor (Fromm et al., 1993), (Barbry & Hofman, 1997), (Garty & Palmer, 1997, Grotjohann et al., 1999). Die Bedeutung einer intakten ENaC-Regulation wird durch Krankheiten mit einer Über- oder Unterfunktion des ENaC durch Genmutationen (Liddle-Syndrom oder Pseudohypoaldosteronismus Typ I) unterstrichen (Hummler & Horisberger, 1999).

Das Mineralokortikoid Aldosteron wird in der Nebennierenrinde synthetisiert und bindet an Mineralokortikoidrezeptoren (MR), die sich im Zytosol der epithelialen Zielzellen befinden. Der entstehende MR-Mineralokortikoid-Komplex dimerisiert und transloziert dann in den Zellkern, wo er die Genexpression von Aldosteron-induzierten Proteinen moduliert, die für Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt wichtig sind (siehe Abb. 2). Außer ENaC sind dies z.B. Channel-inducing factor (CHIF) und serum- and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) (Rogerson et al., 2004). Abgesehen von diesem klassischen Aldosteron-Wirkmechanismus sind auch nichtepitheliale und schnelle nichtgenomische Effekte von Aldosteron beschrieben worden. Außerdem gibt es Hinweise, dass Aldosteron auch in anderen Geweben außer der Nebennierenrinde synthetisiert werden kann (Connell & Davies, 2005).

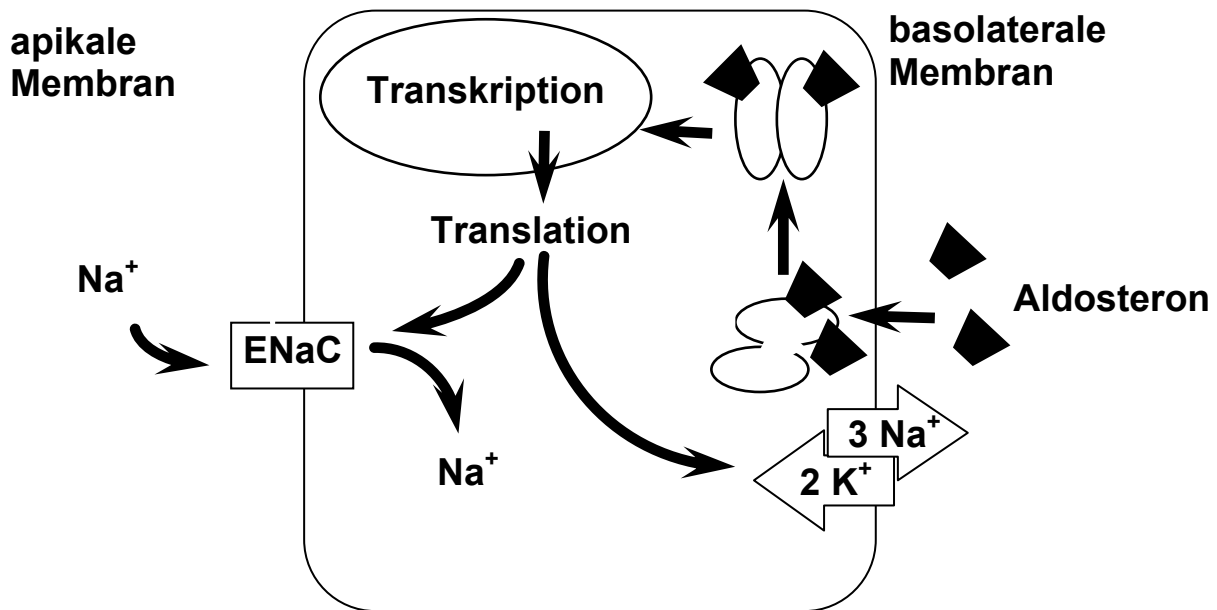


Abbildung 2: Schema der Aldosteronwirkung auf ENaC

Über den Mechanismus der ENaC-Regulation durch Aldosteron gab es zunächst kontroverse Diskussionen. Nachdem in zwei unabhängigen Studien gefunden wurde, dass endogene Aldosteron-Stimulation zu einer Induktion der mRNA von β - und γ -Untereinheiten im distalen Kolon der Ratte führten (Lingueglia et al., 1994) (Renard et al., 1995), konnte eine transkriptionelle Regulation über diese beiden Untereinheiten vermutet werden (Fromm et al., 1993), (Grotjohann et al., 1999), (Epple et al., 2000). Auch eine andere Arbeitsgruppe fand eine Zunahme von β - und γ -Untereinheiten im distalen Kolon der Ratte, die durch Aldosteron und Dexamethason hervorgerufen wurde (Fuller et al., 2000).

Diese Hypothese wurde jedoch angezweifelt (Barbry & Hofman, 1997), da in einem Vergleich von Zeitverläufen der mRNA-Expression von ENaC-Untereinheiten mit aus der Literatur entnommenen Zeitverläufen des Natriumtransportes der durch Aldosteron induzierte Natriumtransport früher einsetzte als die Expression der Untereinheiten (Asher et al., 1996). Von unserem Labor konnten jedoch an identischen Geweben Daten erhoben werden, die belegen, dass der Anstieg des Natriumtransportes mehr als eine Stunde nach dem Anstieg der β - und γ -Untereinheiten-mRNA auftritt, so dass der akute Effekt von Aldosteron durch direkte transkriptionelle Regulation der ENaC-Expression erklärt werden kann (Epple et al., 2000).

Zentner et al. konnten 1998 einen Einfluss des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges auf die Regulation der Expression der ENaC- α -Untereinheit in Speicheldrüsenzellen nachweisen (Zentner et al., 1998). MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) sind eine Gruppe von Proteinkinasen, die durch eine Reihe von extrazellulären Stimuli aktiviert werden, und Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum Zellkern durch Phosphorylierungsschritte vermitteln. Sie kontrollieren sowohl komplexe Programme wie Embryogenese, Zelldifferenzierung oder Zelltod, als auch kurzfristige Änderungen, wie sie zur Homöostase und bei Hormonwirkungen auftreten (Lewis et al., 1998). Drei wesentliche Signaltransduktionswege können dabei unterschieden werden, die jeweils nach ihren Effektorproteinen benannt sind: ERK 1/2 (extrazellulär regulierte Kinase), JNK/SAPK (c-Jun Kinase/Stress aktivierte Protein Kinase) und p38 (Su & Karin, 1996). Zentner et al. zeigten, dass durch eine Aktivierung von ERK 1/2 durch Transfektion eines Raf-1-Kinase-Proteins die Menge der gebildeten mRNA der ENaC- α -Untereinheit abnahm. Diese Abnahme war bei Zugabe des spezifischen ERK 1/2-Inhibitors PD98059 z.T. reversibel, so dass eine Beteiligung dieses Signaltransduktionswegs bewiesen war. Außerdem nahm die mRNA-Menge auch bei Stimulation mit dem Proteinkinase-C-Aktivator 12-O-Tetradecanoyl-1-phorbol-13-acetat (TPA) ab, was für eine Abhängigkeit der Regulation auch von der Proteinkinase C sprach. In einem weiteren Ansatz konnte dieselbe Arbeitsgruppe zeigen, dass das Glukokortikoid Dexamethason eine Induktion der mRNA der ENaC- α -Untereinheit bewirkt und über ein Glukokortikoid Response Element (GRE) als Gegenspieler des oben beschriebenen Raf/ERK-Signaltransduktionswegs fungiert (Lin et al., 1999).

Eine andere Arbeitsgruppe erbrachte weitere Hinweise auf ein Zusammenspiel eines Steroidhormons mit dem ERK 1/2-Signaltransduktionsweg: Chen et al. konnten zeigen, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ über den ERK 1/2-Signaltransduktionsweg zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors AP1 führt und zur Zelldifferenzierung von Caco-2-Zellen führt (Chen et al., 1999).

Eine klinische Bedeutung am Darm erhält der ENaC durch seine Rolle bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie der Colitis ulcerosa. Jüngst konnte an humanem Gewebe gezeigt werden, dass die Expression der β - und γ -Untereinheiten des ENaC bei dieser Erkrankung vermindert ist, was zu einer Hemmung der Natriumresorption im distalen Kolon führt und zur Diarrhoe beiträgt (Amasheh et al., 2004)

(Greig et al., 2004). Außerdem konnte am Lungengewebe der Ratte und an menschlichen Alveolarzellen Typ 2 gezeigt werden, dass der Entzündungsmediator Interleukin 1 β zur verminderten Natriumresorption über eine Herabregulation der α -Untereinheit des ENaC führt (Roux et al., 2005). Dies erfolgte nachweislich über eine Aktivierung der p38 MAPK und unterstreicht die Wirkung von inflammatorischen Zytokinen über MAPK auf den Natriumtransport an verschiedenen Organen.

Es lag also nahe, die Interaktionen zwischen dem Mineralokortikoid Aldosteron und den MAP-Kinase-Signaltransduktionswegen in unserem Modell zu erforschen. Diese Arbeit hatte zum Ziel, den Einfluss von Inhibitoren und Aktivatoren der MAP-Kinase-Signaltransduktionswege *in vitro* am Kolonepithel der Ratte zu untersuchen.