



**Molekulare Charakterisierung des epithelialen  
Na<sup>+</sup>-Kanals (ENaC) aus Nasengewebe  
von Patienten mit und ohne Mukoviszidose**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
**Nadine Bangel**  
geb. in Werne

August 2006

Dekan: Prof. Dr. Norbert Sachser  
Erster Gutachter: Prof. Dr. Wolf-Michael Weber  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hans Oberleithner

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2006  
Tag der Promotion: 20.10.2006

## ***Inhaltsverzeichnis***

<b><i>Inhaltsverzeichnis</i></b> .....	<b>1</b>
<b><i>Abbildungsverzeichnis</i></b> .....	<b>4</b>
<b><i>Tabellenverzeichnis</i></b> .....	<b>5</b>
<b><i>Abkürzungsverzeichnis</i></b> .....	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Ionen-transport über Epithelien .....	10
1.2 Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF) .....	12
1.3 Der Amilorid-sensitive epitheliale Natrium Kanal (ENaC) .....	14
1.3.1 Struktur des ENaC .....	15
1.3.2 Regulation von ENaC .....	21
1.4 Der ENaC im respiratorischen Epithel .....	25
1.5 Die Rolle von ENaC bei CF .....	26
1.6 Ziele der Arbeit .....	29
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>31</b>
2.1 Gewebeproben: Menschliche Nasenpolypen .....	31
2.2 Mikrobiologische Methoden .....	33
2.2.1 Bakterienstamm .....	33
2.2.2 Plasmidvektor .....	33
2.2.3 Nährmedien und Agarplatten .....	34
2.2.4 Blau-Weiß-Selektion .....	34
2.2.5 Glycerinkultur .....	35
2.2.6 Flüssigkulturen .....	35
2.2.7 Herstellung kompetenter Bakterien .....	36
2.2.8 Transformation kompetenter Bakterien .....	37
2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	38
2.3.1 Präzipitation von Nukleinsäuren .....	38
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	38
2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA .....	39
2.3.4 Restriktionsverdau .....	39
2.3.5 DNA-Gelelektrophorese .....	40
2.3.6 Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese .....	41
2.3.7 RNA-Gelelektrophorese .....	42
2.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	44
2.3.9 Präparation von Gesamt-RNA aus Nasenpolypen .....	44

2.4	<i>PCR Techniken</i> .....	45
2.4.1	<i>Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)</i> .....	45
2.5	<i>PCR Techniken mit RNA</i> .....	47
2.5.1	<i>Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)</i> .....	47
2.5.2	<i>5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)</i> .....	48
2.5.3	<i>3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)</i> .....	50
2.5.4	<i>Semi-quantitative RT-PCR</i> .....	52
2.5.5	<i>Semi-quantitative Analyse der RT-PCR</i> .....	54
2.5.6	<i>Real-time PCR mit Sybr Green I</i> .....	55
2.5.7	<i>Real-time PCR Datenanalyse</i> .....	58
2.5.8	<i>Klonierung von PCR-Fragmenten</i> .....	59
2.5.9	<i>Das TOPO TA System</i> .....	59
2.5.10	<i>DNA-Sequenzierung und Sequenzdatenanalyse</i> .....	61
2.6	<i>Allgemeine proteinbiochemische Methoden</i> .....	62
2.6.1	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i> .....	62
2.6.2	<i>Bradford Lösung</i> .....	62
2.6.3	<i>Eichgerade zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen</i> .....	62
2.6.4	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)</i> .....	63
2.6.5	<i>Probenvorbereitung</i> .....	63
2.6.6	<i>Gelzusammensetzung (SDS-PAGE)</i> .....	65
2.6.7	<i>Semidry Western Blot</i> .....	66
2.6.8	<i>Lösungen Semidry Western Blot</i> .....	68
2.6.9	<i>Densitometrische Auswertung der Western Blots</i> .....	69
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b> .....	<b>70</b>
3.1	<i>Molekulare Charakterisierung der <math>\alpha</math>-, <math>\beta</math>- und <math>\gamma</math>-hnENaC Untereinheiten aus CF und nicht-CF Nasenepithel</i> .....	70
3.1.1	<i>Überprüfung der Qualität von Gesamt-RNA</i> .....	71
3.1.2	<i>Molekulare Charakterisierung der <math>\alpha</math>-hnENaC Untereinheit aus CF und nicht-CF Nasenepithel</i> .....	72
3.1.3	<i>Molekulare Charakterisierung der <math>\beta</math>-hnENaC Untereinheit aus CF und nicht-CF Nasenepithel</i> .....	75
3.1.4	<i>Molekulare Charakterisierung der <math>\gamma</math>-hnENaC Untereinheit aus CF und nicht-CF Nasenepithel</i> .....	78
3.2	<i>Expression der <math>\alpha</math>-, <math>\beta</math>- und <math>\gamma</math>-hnENaC Untereinheiten aus CF und nicht-CF Nasenepithel</i> .....	83
3.2.1	<i>Semi-quantitative RT-PCR</i> .....	83
3.2.2	<i>real-time PCR</i> .....	85
3.3	<i>Biochemische Charakterisierung der <math>\alpha</math>-, <math>\beta</math>- und <math>\gamma</math>-hnENaC Untereinheiten aus CF und nicht-CF Nasenepithel</i> .....	88
3.3.1	<i>Nachweis des hnENaC in CF und nicht-CF Nasenepithel im Western Blot</i> ...	89
3.3.2	<i>Densitrometrische Quantifizierung der hnENaC Untereinheiten aus CF und nicht-CF Nasenepithel</i> .....	91

---

<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>93</b>
4.1	<i>Molekulare Klonierung von hnENaC aus CF und nicht-CF Nasenepithel</i> .....	95
4.2	<i>Vergleich der hnENaC mRNA Expression in CF und nicht-CF Nasenepithel</i> ....	98
4.3	<i>Vergleich der hnENaC Protein Expression in CF und nicht-CF Nasenepithel</i>	104
<b>5</b>	<b><i>Ausblick</i></b> .....	<b>108</b>
<b>6</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b> .....	<b>111</b>
<b>7</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>113</b>
<b>8</b>	<b><i>Anhang</i></b> .....	<b>124</b>
8.1	<i>Verwendete Chemikalien</i> .....	124
8.2	<i>Verwendete Geräte</i> .....	126
8.3	<i>Verwendete Marker und Polymerasen</i> .....	126
8.4	<i>Abkürzungscode der Aminosäuren</i> .....	127
8.5	<i>Verwendete Primer</i> .....	128
8.6	<i>Nukleotid - und Aminosäuresequenz des hnENaC aus CF und nicht-CF Nasenepithel</i> .....	132
	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>146</b>
	<b><i>Lebenslauf</i></b> .....	<b>147</b>

## ***Abbildungsverzeichnis***

<b>Abbildung 1:</b> Vereinfachtes Schema einer Epithelzelle.....	11
<b>Abbildung 2:</b> CFTR Dysfunktion und ENaC Hyperaktivität.....	13
<b>Abbildung 3:</b> Tetramere Struktur des ENaC.....	16
<b>Abbildung 4:</b> Untereinheiten des humanen ENaC ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ).....	20
<b>Abbildung 5:</b> ENaC Regulation.....	24
<b>Abbildung 6:</b> Nasenpolypen.....	25
<b>Abbildung 7:</b> Vektorkarte des pCR®II-TOPO TA Klonierungsvektors.....	33
<b>Abbildung 8:</b> Lambda DNA <i>EcoRI/HindIII</i> .....	41
<b>Abbildung 9:</b> 5' RACE.....	49
<b>Abbildung 10:</b> 3' RACE.....	51
<b>Abbildung 11:</b> Sigmoidaler Verlauf einer PCR.....	53
<b>Abbildung 12:</b> Schematischer Verlauf einer <i>real-time</i> PCR.....	57
<b>Abbildung 13:</b> Fluoreszenzkurven <i>real-time</i> PCR.....	58
<b>Abbildung 14:</b> Teilausschnitt pCR®II-TOPO TA Klonierungsvektor.....	60
<b>Abbildung 15:</b> Schematischer Aufbau eines semi-dry Western Blots.....	67
<b>Abbildung 16:</b> Gesamt-RNA.....	71
<b>Abbildung 17:</b> Aminosäuresequenz $\alpha$ -hnENaC UE im Vergleich zu anderen Geweben.....	74
<b>Abbildung 18:</b> Aminosäuresequenz $\beta$ -hnENaC UE im Vergleich zu anderen Geweben.....	77
<b>Abbildung 19:</b> Aminosäuresequenz $\gamma$ -hnENaC UE im Vergleich zu anderen Geweben.....	81
<b>Abbildung 20:</b> Semi-quantitative RT-PCR.....	84
<b>Abbildung 21:</b> <i>Real-time</i> PCR der drei hnENaC Untereinheiten von CF Patienten im relativen Vergleich mit nicht-CF Gewebe.....	87
<b>Abbildung 22:</b> SDS-PAGE.....	88
<b>Abbildung 23:</b> Western Blots der drei hnENaC UE aus CF und nicht-CF Nasenepithel.....	90
<b>Abbildung 24:</b> Semi-quantitative Proteinexpression des hnENaC.....	92
<b>Abbildung 25:</b> ENaC: Synthese, Degradierung, Recycling.....	102
<b>Abbildung 26:</b> Nukleotid- und Aminosäuresequenz $\alpha$ -hnENaC aus nicht-CF Gewebe.....	134
<b>Abbildung 27:</b> Nukleotid- und Aminosäuresequenz $\beta$ -hnENaC aus nicht-CF Gewebe.....	136
<b>Abbildung 28:</b> Nukleotid- und Aminosäuresequenz $\gamma$ -hnENaC aus nicht-CF Gewebe.....	138
<b>Abbildung 29:</b> Nukleotid- und Aminosäuresequenz $\alpha$ -hnENaC aus CF Gewebe.....	141
<b>Abbildung 30:</b> Nukleotid- und Aminosäuresequenz $\beta$ -hnENaC aus CF Gewebe.....	143
<b>Abbildung 31:</b> Nukleotid- und Aminosäuresequenz $\gamma$ -hnENaC aus CF Gewebe.....	145

## ***Tabellenverzeichnis***

<b>Tabelle 1:</b> Eigenschaften der humanen $\alpha$ -ENaC UE. ....	17
<b>Tabelle 2:</b> Eigenschaften der humanen $\beta$ -ENaC UE. ....	18
<b>Tabelle 3:</b> Eigenschaften der humanen $\gamma$ -ENaC UE. ....	18
<b>Tabelle 4:</b> Funktionelle Unterschiede zwischen dem klassischen ENaC und dem hnENaC aus CF und nicht-CF Nasengewebe. ....	28
<b>Tabelle 5:</b> Genetischer Status der sechs CF-Patienten; Mutationen ....	32
<b>Tabelle 6:</b> anti-ENaC Antikörper und Verdünnungen. ....	67
<b>Tabelle 7:</b> Position des SNP T663A innerhalb der $\alpha$ -hnENaC Sequenz. ....	72
<b>Tabelle 8:</b> Position des Sequenzkonfliktes A314G und des SNP A336P innerhalb der $\beta$ -hnENaC Sequenz. ....	75
<b>Tabelle 9:</b> Position der SNP und der Sequenzkonflikte innerhalb der $\gamma$ -hnENaC Sequenz. ....	79
<b>Tabelle 10:</b> Lokalisation der Sequenzabschnitte des ENaC in der Zellmembran (Übersicht). ....	82
<b>Tabelle 11:</b> Allgemeine Charakteristika des ENaC aus humanem Nasenepithel. ....	82
<b>Tabelle 12:</b> Individuelle mRNA Expression jedes einzelnen CF Patienten im Vergleich zu nicht-CF Patientent (normalisiert auf 1,0). ....	86
<b>Tabelle 13:</b> Furin Konsensus-Motiv in der $\alpha$ -ENaC UE. ....	104
<b>Tabelle 14:</b> Nukleotidsequenzen der Primer zur Klonierung der $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -ENaC Untereinheiten aus humanem Nasenepithel. ....	128
<b>Tabelle 15:</b> Nukleotidsequenzen der Primer 5`RACE. ....	129
<b>Tabelle 16:</b> Nukleotidsequenzen der Primer 3`RACE. ....	129
<b>Tabelle 17:</b> Nukleotidsequenzen der Primer für die semi-quantitative RT-PCR. ....	130
<b>Tabelle 18:</b> Nukleotidsequenzen der Primer für die <i>real-time</i> RT-PCR. ....	131

---

## *Abkürzungsverzeichnis*

---

A	Absorption
$\alpha$	alpha
A	Ampere
AIP	<i>aldosterone-induced-proteins</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARP	<i>aldosterone-repressed-proteins</i>
AS	Aminosäure
ASL	<i>airway surface liquid</i>
$\beta$	beta
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ca.	<i>circa</i>
CF	<i>Cystische Fibrose</i> ; Mukoviszidose
Da	Dalton
dCTP	2'-Desoxy-Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid

---

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid)
EtOH	Ethanol
$\gamma$	gamma
gDNA	genomische DNA
g	Gravitation/ Erdbeschleunigung
g	Gramm
GITC/GTC	Guanidinthiocyanat
HKG	<i>housekeeping gene</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
IgG	Immunglobulin Klasse G
IPTG	Isopropyl-1-Thio- $\beta$ -D-Galactopyranosid
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
$\lambda$	Lambda
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	Milli
$\mu$	Mikro

---

MCC	<i>mucociliary clearance</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure
MMLV-RT	<i>moloney murine leukemia virus</i> Reverse Transkriptase
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
Oligo(dT)	Oligodeoxythymidin
OLR	Offener Leserahmen
p.a.	per analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
PVDF	Polyvenylendifluorid
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )

---

RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelner Nukleotid-Polymorphismus
SOC	Salz-optimiertes Medium mit Glukose ( <i>salt-optimized + carbon</i> )
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS/TBST	Tris buffered saline/Tween
TEMED	N, N, N',N' - Teramethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur ( <i>melting temerature</i> )
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	4-(2', 2', 4', 4' - Tetramethylbutyl) phenyldecaethylenglycol
TSS	<i>transformation storage solution</i>
UE	Untereinheit
U	<i>unit</i>
<i>upstream</i>	oberhalb
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoloyl-β-D-Galactosid
z. B.	Zum Beispiel
%	Prozent

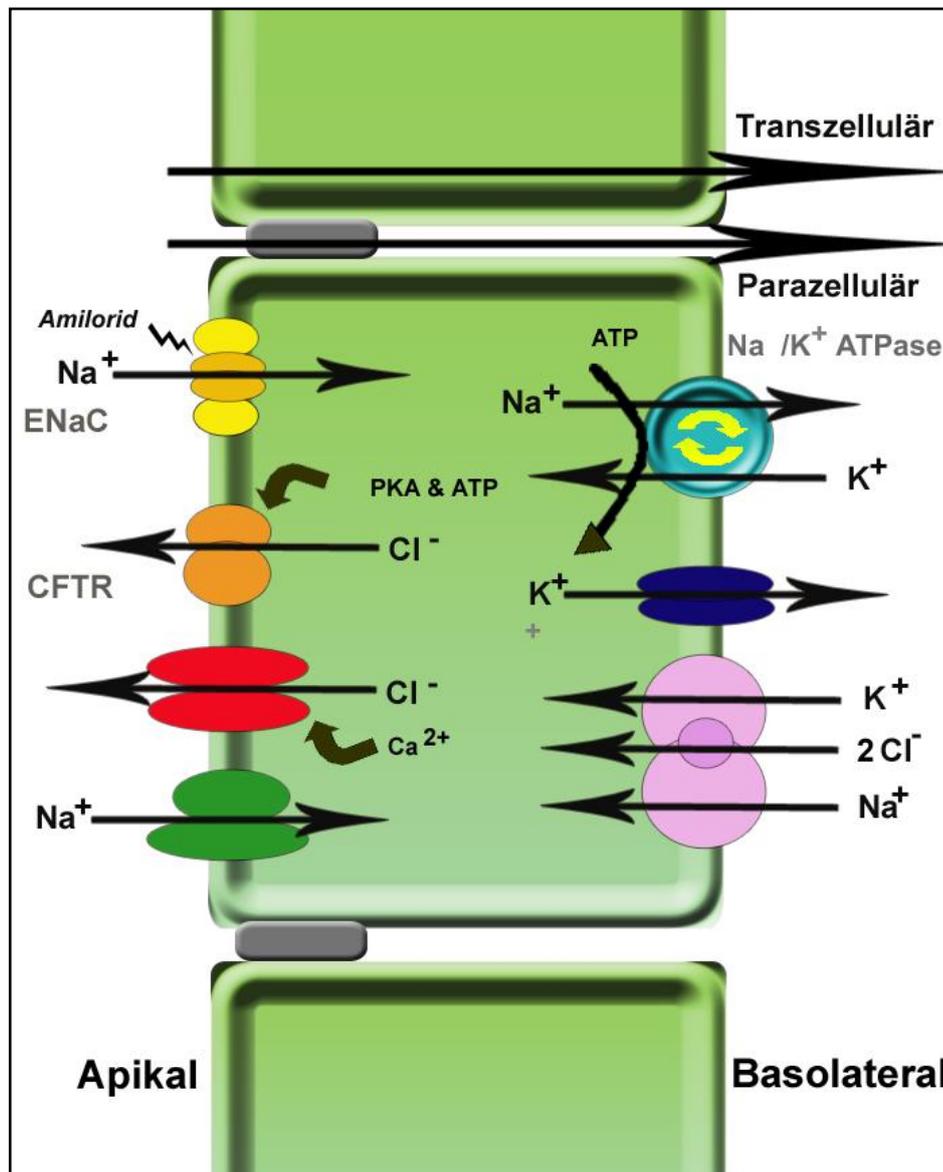
---

# 1 Einleitung

## 1.1 Ionentransport über Epithelien

Der Ionentransport über die Plasmamembran von Epithelzellen erfolgt über eine semipermeable Membran, durch die der Substrat-Transport nur durch spezifische Kanäle oder energieverbrauchende aktive Transportprozesse ermöglicht wird. Wasser gelangt per Diffusion in die Zelle und folgt den transportierten Ionen passiv durch die Membran. Epithelien sind auf vielfältige Weise und je nach Organ spezifisch differenziert. Je nach Funktion unterscheidet man zwischen Oberflächenepithel (z. B. Haut) und sekretorischen Drüsenepithelien. Das Atemwegsepithel stellt auch wie alle Epithelien die Grenzfläche zwischen der Außenwelt und dem organspezifischen Gewebe dar. In den oberen Atemwegen wie dem Nasenepithel, den Bronchien und der Lunge werden Ionen und Flüssigkeit sowohl resorbiert als auch sekretiert. In diesen begeißelten Atemwegsepithelien wird die Viskosität und Ionenzusammensetzung des Mukus in erster Linie durch die Transportvorgänge über die apikale Membran bestimmt. Die vorherrschenden Ionen sind Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) und Natrium ( $\text{Na}^+$ ), welche vorwiegend vom *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) und dem epithelialen Amilorid-sensitiven Natrium Kanal (ENaC) über die apikale Membran der Epithelzellen sekretiert bzw. resorbiert werden. Diese Prozesse werden letztendlich unter Energieverbrauch von der in der basolateralen Membran lokalisierten  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase gerichtet angetrieben. Diese Asymmetrie oder funktionelle Polarität ist eine allen Epithelzellen gemeinsame Eigenschaft und zeichnet sich außer durch strukturelle auch durch funktionelle Unterschiede der apikalen und basolateralen Membran aus. Die apikale Membranseite ist dem Äußeren oder dem Lumen zugewandt und die basolaterale Seite mit dem darunter liegenden Gewebe verbunden. Die  $\text{Cl}^-$ -Ionen gelangen basolateral unter anderem mit Hilfe eines  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporters in die Zelle hinein und verlassen diese durch verschiedene  $\text{Cl}^-$ -Kanäle wie z. B. den  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierbaren  $\text{Cl}^-$ -Kanal oder über den durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und die Protein Kinase A (PKA)-aktivierbaren CFTR. Entgegengesetzt gelangt  $\text{Na}^+$  über den ENaC sowie über Amilorid-insensitive  $\text{Na}^+$ -Kanäle in die Epithelzelle und wird basolateral über die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im Austausch gegen  $\text{K}^+$  aus der Zelle

geschleust. Diese Transportprozesse sind in Abbildung 1 schematisch anhand einer typischen Epithelzelle dargestellt.



**Abbildung 1:** Vereinfachtes Schema einer Epithelzelle.

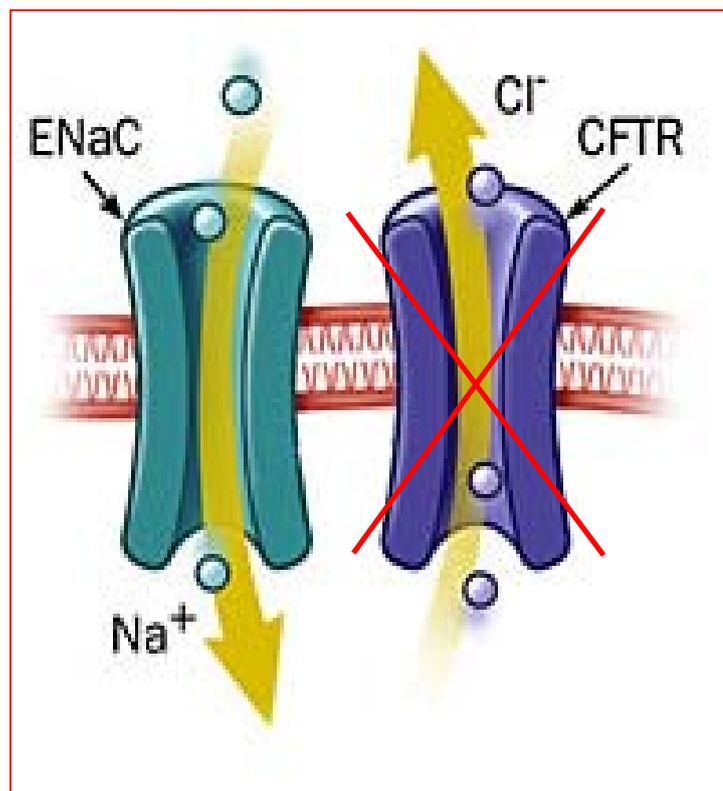
In der apikalen Membran der polaren Epithelzelle sind ENaC und CFTR lokalisiert. In der basolateralen Membran befindet sich die energieverbrauchende  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.  $\text{Na}^+$  gelangt über den ENaC und Amilorid-insensitive  $\text{Na}^+$ -Kanäle in die Zelle und wird durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im Tausch gegen  $\text{K}^+$  hinausgeschleust. Entgegengesetzt wird  $\text{Cl}^-$  über den  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ -Cotransporter basolateral in die Zelle aufgenommen und apikal durch  $\text{Cl}^-$ -Kanäle sekretiert.

## 1.2 Mukoviszidose (*Cystische Fibrose, CF*)

Die beschriebenen Transportprozesse sind sehr fein reguliert. Im Gegensatz zu anderen Organen wie Niere, Darm und auch den Schweißdrüsen dient die Regulation der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration in der Lunge nicht nur der Aufrechterhaltung der Salzhomöostase, sondern in erster Linie der Hydratation des extrazellulären Flüssigkeitsfilms (*airway surface liquid, ASL*), einer dünnen Schicht, welche das Oberflächenepithel im respiratorischen Trakt bedeckt (Boucher 1999; Boucher 2003). Ein Ungleichgewicht in diesem System hat sofort schwerwiegende Stoffwechselstörungen zur Folge, wie es auch bei der Mukoviszidose, der häufigsten angeborenen autosomal rezessiven Erbkrankheit der kaukasischen Bevölkerung, zum Tragen kommt (Lindemann et al. 2004). Ursache für die Mukoviszidose, die auch Cystische Fibrose (CF) genannt wird, ist ein Gendefekt in dem  $\text{Cl}^-$ -Kanal CFTR (Riordan et al. 1989). Die Krankheit führt zu schweren Störungen von Atmung und Verdauung. Die Absonderung bestimmter Körperflüssigkeiten wie Schweiß ist gestört und die Sekrete im respiratorischen Trakt und in der Bauchspeicheldrüse, aber auch in anderen Organen (z.B. in der Leber) sind zäher als bei nicht erkrankten Personen (Quinton 1999). Es existieren sehr viele verschiedene klinische Ausprägungen und Schweregrade dieser Krankheit. Über 1400 Mutationen sind bekannt, die man in die Defektklassen I-V eingeteilt hat, je nachdem welche Art von Defekt im Vordergrund steht. Diese Defekte betreffen die Synthese wie auch die Prozessierung des Proteins und bieten somit unterschiedliche therapeutische Ansatzmöglichkeiten (Pilewski und Frizzell 1999; Guggino und Stanton 2006). Die am häufigsten vorkommende Mutation wird als  $\Delta\text{F508}$  bezeichnet. Damit wird der Verlust einer Aminosäure (AS) (Phenylalanin = F) an der Position 508 im CFTR-Protein bezeichnet. Diese Mutation wird in der Defektklasse II als *Processing-Mutante* bezeichnet und führt zum klassischen Krankheitsbild der Mukoviszidose (Guggino und Stanton 2006). Andere Mutationen verursachen meist schwächere Symptome und werden als *CFTR related disease*, CFTR abhängige Krankheit, bezeichnet. Durch die beschriebene Mutation  $\Delta\text{F508}$  im CFTR wird eine korrekte Proteinfaltung verhindert, so dass kein oder nur ein unvollständiger Transport und Einbau des Kanals in die Plasmamembran erfolgen kann (Riordan et al. 1989).

Der respiratorische Trakt und somit die Lunge als Atmungsorgan ist bei CF Patienten besonders betroffen. Die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion durch den CFTR ist gestört oder verhindert, die

$\text{Na}^+$ -Resorption durch den ENaC ist jedoch drastisch erhöht (Blank et al. 1997; Rückes-Nilges et al. 1999) (Abb. 2). Durch den daraus resultierenden Wasserentzug entsteht ein zäher Mukus (daher rührt auch der Name der Krankheit: Muco = Schleim, Viszidose = erhöhte Zähigkeit), welcher durch die Flimmerhaare der Epithelzellen in der Lunge und den Atemwegen nicht mehr abtransportiert werden kann. Es erfolgt oftmals eine Besiedelung des Mukus mit Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*, welches chronische Infektionen und Gewebeentzündungen zur Folge hat. Nicht selten kommt es im Anschluss zu einer Zerstörung des Lungengewebes und letztendlich zum Lungenversagen, dies wird als häufigste Todesursache bei CF-Patienten beschrieben (Carroll et al. 1993). Da der übermäßige  $\text{Na}^+$ -Transport innerhalb der Pathogenese der CF Atemwegsfunktionsstörungen hauptsächlich durch ENaC verursacht wird, wird unter Punkt 1.5 eingehender die Involvierung des Kanals in dieses Krankheitsbild beschrieben.



**Abbildung 2:** CFTR Dysfunktion und ENaC Hyperaktivität.

Die vorherrschenden Ionentransportprozesse im humanen respiratorischen Epithel über ENaC und CFTR. Im Krankheitsbild der Mukoviszidose sind diese beiden Prozesse gestört. Die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion durch den funktionsunfähigen CFTR ist verhindert und die Amilorid-sensitive  $\text{Na}^+$ -Resorption über den ENaC ist drastisch erhöht.

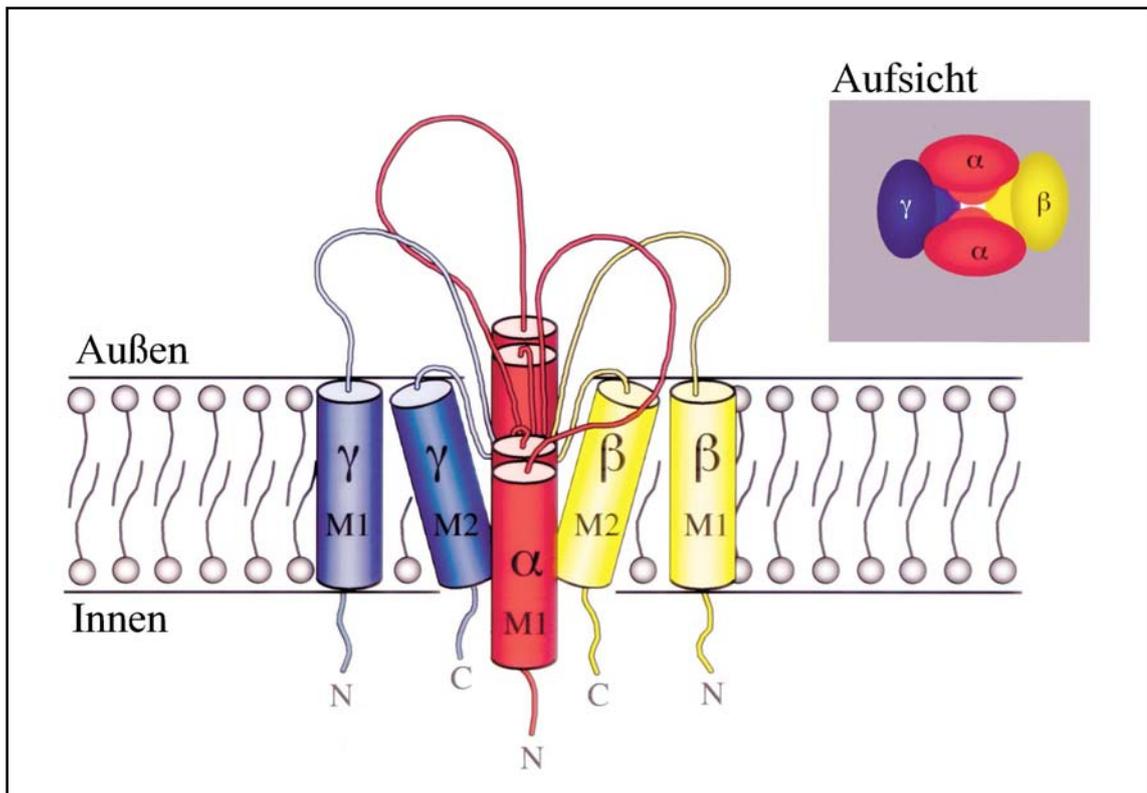
### 1.3 Der Amilorid-sensitive epitheliale Natrium Kanal (ENaC)

ENaC ist ein selektiver, spannungsunabhängiger Kationenkanal, welcher sich durch die Sensitivität gegenüber dem synthetischen  $K^+$ -sparenden Diuretikum Amilorid auszeichnet (Garty und Palmer 1997). ENaC ist Mitglied der ENaC/Degenerin Proteinfamilie, welche eine Klasse von Ionenkanälen darstellt, die Anfang der Neunziger Jahre entdeckt wurde und seitdem stetig untersucht wird (Bianchi und Driscoll 2002). Alle bisher bekannten Mitglieder dieser Proteinfamilie weisen untereinander eine Sequenz-Homologie von 15 bis 20 % auf und unterscheiden sich durch ihre Ionenselektivität, die Affinität zu dem Blocker Amilorid und durch einen speziellen *Gating* Mechanismus (Kellenberger und Schild 2002). Es wurden bereits mehr als 60 Vertreter dieser Proteinfamilie in unterschiedlichen Geweben mit verschiedenen Funktionen beschrieben (Bianchi und Driscoll 2002). Wie bereits zuvor erwähnt, befindet sich ENaC in der apikalen Plasmamembran und vermittelt den  $Na^+$ -Transport über unterschiedliche Epithelien wie Niere, Darm, Schweißdrüsen und eben auch der Lunge als respiratorisches Organ (Garty und Palmer 1997). Darüber hinaus reguliert ENaC den Ionentransport sowie die Viskosität im Bereich des respiratorischen Traktes (Rossier et al. 2002), vor allem durch die Aufrechterhaltung der so genannten *mucociliary clearance* (MCC), einem wichtigen Prozess um Fremdkörper aus der Lunge zu transportieren (Wanner et al. 1996).

### 1.3.1 Struktur des ENaC

Die molekulare Struktur des epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals wurde erstmals 1993 am Beispiel des im Dickdarm lokalisierten ENaC beschrieben (Canessa et al. 1993). ENaC ist ein heterooligomeres Protein und besteht aus drei homologen Untereinheiten (UE) ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), welche erst in Kombination einen voll funktionsfähigen Kanal ausbilden (Canessa et al. 1994; Alvarez de la Rosa et al. 2000). Allerdings scheint die  $\alpha$ -UE bereits allein einen funktionsfähigen Kanal generieren zu können, während  $\beta$  und  $\gamma$  dem Proteinkomplex spezifische und regulatorische Eigenschaften verleihen. Durch die Assoziation dieser beiden UE mit der  $\alpha$ -UE erhöht sich die  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit (Canessa et al. 1994; Alvarez de la Rosa et al. 2000). Außer den drei beschriebenen ENaC-UE existiert noch eine weitere  $\delta$ -ENaC UE, welche vorwiegend in neuronalem Gewebe, Pankreas, Testis und im Ovarium exprimiert wird (Waldmann et al. 1995). Es besteht eine hohe strukturelle und funktionelle Übereinstimmung mit der  $\alpha$ -ENaC UE und es konnte gezeigt werden, dass auch die  $\delta$ -ENaC UE homomere,  $\text{Na}^+$ -leitende Kanäle ausbilden kann und durch eine Assoziation mit der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC UE ebenfalls eine Erhöhung des  $\text{Na}^+$ -Stroms erfolgt (Yamamura et al. 2004).

Die Zusammensetzung der Untereinheiten (UE), d. h. die Stöchiometrie wird bislang kontrovers diskutiert. Manche Gruppen vermuten, dass es sich um eine tetramere Struktur handelt (Firsov et al. 1998; Kosari et al. 1998) mit  $2\alpha$ ,  $1\beta$  und  $1\gamma$ -ENaC UE wie in Abbildung 3 dargestellt, während neueste Untersuchungen darauf hindeuten, dass das integrale Membranprotein ENaC aus einer gleichen Anzahl an UE ( $3\alpha : 3\beta : 3\gamma$ ) gebildet wird (Snyder et al. 1998; Staruschenko et al. 2005). Die physiologische Bedeutung der Stöchiometrie wird durch die Tatsache unterstützt, dass nicht alle  $\text{Na}^+$  absorbierenden Epithelien jede der drei ENaC UE konstant exprimieren, d. h. dass die Zusammensetzung der UE je nach Funktion gewebespezifisch verändert sein kann (Asher et al. 1996; Farman et al. 1997; McNicholas und Canessa 1997). Durch Röntgenstrukturanalysen sowie durch eine Kristallisation des ENaC Proteins sollte in naher Zukunft eine detaillierte Aufklärung der Stöchiometrie erfolgen.



**Abbildung 3:** Tetramere Struktur des ENaC.

Tetramere Anordnung der drei ENaC Untereinheiten ( $2\alpha : 1\beta : 1\gamma$ ). Jede dieser Untereinheiten weist einen intrazellulären N- und C-Terminus, eine große extrazelluläre Domäne sowie zwei Transmembrandomänen auf (M1 und M2) (verändert nach: Rossier et al. 2002).

Die molekulare Struktur des ENaC ist jedoch im Gegensatz zur Stöchiometrie weitgehend bekannt. Während die drei Untereinheiten untereinander nur eine 30-35 %ige Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, sind einzelne homologe Bereiche jeder UE innerhalb der Vertebraten hoch konserviert. Bislang wurden ENaC von verschiedenen Spezies einschließlich Mensch (McDonald et al. 1994; Voilley et al. 1994), Ratte (Canessa et al. 1993), Huhn (Goldstein et al. 1997), Rind (Fuller et al. 1995) und Frosch (Puoti et al. 1995) kloniert, die in der Sequenzlänge und im Molekulargewicht variieren.

Das Protein der humanen  $\alpha$ -ENaC UE aus Geweben wie der Lunge (Acc. No. NM 001038, <http://www.ncbi.nih.gov>) und der Niere (Acc. No. L 29007, <http://www.ncbi.nih.gov>) ist 669 AS lang und weist ein Molekulargewicht von 75,7 kDa auf. Das codierende Gen für diese UE (SCNN1A) ist auf Chromosom 12 lokalisiert. Es existieren weitere 5 Isoformen, welche durch alternatives Splicing entstehen (Tucker et al. 1998).

**Tabelle 1:** Eigenschaften der humanen  $\alpha$ -ENaC UE.

<b>Gen</b>	<b>SCNN1A</b>	<b><i>Accession Number</i></b>
DNA	28,07 kb	NT 009759
mRNA	3168 bp	NM 001038
kodierende Sequenz	2010 bp	NP 001029

Das Protein der humanen  $\beta$ -ENaC UE aus Lunge (Acc. No. X87159, <http://www.ncbi.nih.gov>) und Niere (Acc. No. L36593, <http://www.ncbi.nih.gov>) besteht aus 640 AS mit einem Molekulargewicht von 72,7 kDa. Das codierende Gen für die  $\beta$ -ENaC UE befindet sich im humanen Genom auf Chromosom 16. Durch alternatives Splicing können von dieser UE zwei Isoformen gebildet werden ((Voilley et al. 1995) ;EMBL/GenBank/DDBJ databases).

**Tabelle 2:** Eigenschaften der humanen  $\beta$ -ENaC UE.

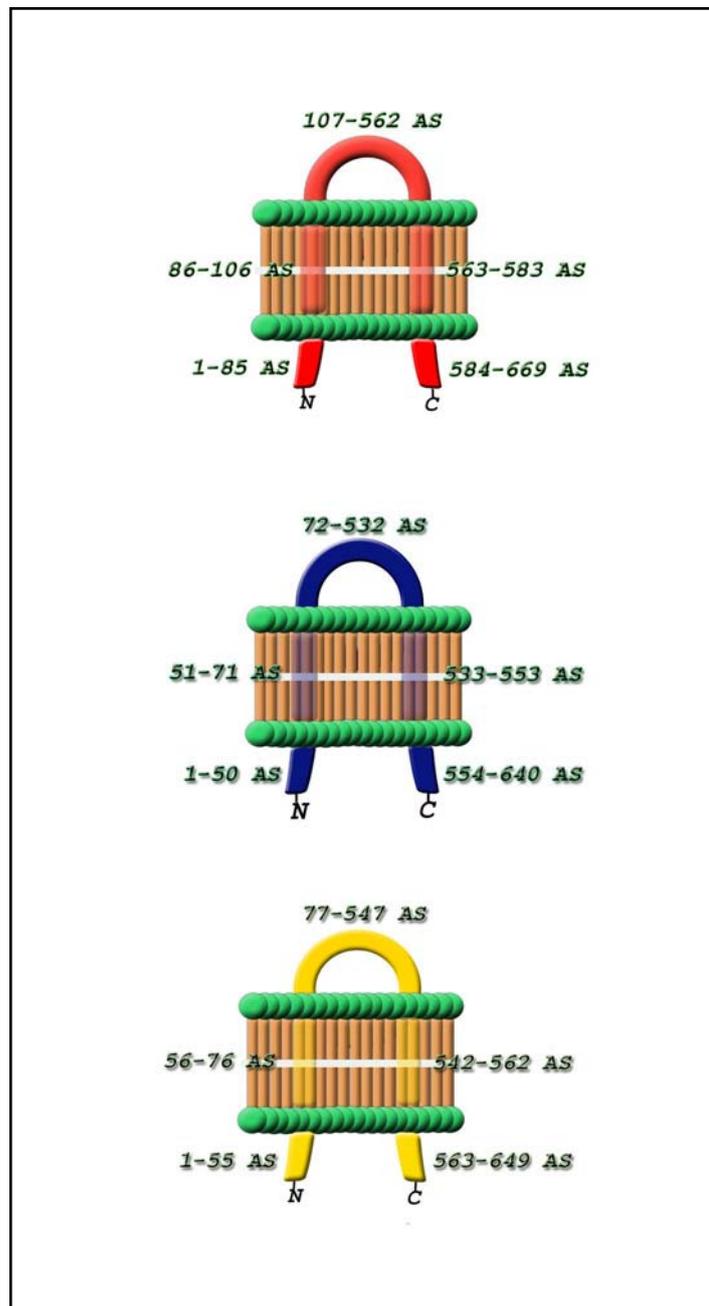
<b>Gen</b>	<b>SCNN1B</b>	<b>Accession Number</b>
DNA	78,98 kb	NT 010393
mRNA	2544 bp	NM 000336
kodierende Sequenz	1923 bp	NP 000327

Das 649 AS lange Protein der humanen  $\gamma$ -ENaC UE aus der Lunge (Acc. No. X87160, <http://www.ncbi.nih.gov>) sowie aus der Niere (Acc. No. L36592, <http://www.ncbi.nih.gov>) besitzt ein Molekulargewicht von 74,3 kDa und das codierende Gen SCNN1G befindet sich ebenfalls wie das der  $\beta$ -ENaC UE auf dem Chromosom 16.

**Tabelle 3:** Eigenschaften der humanen  $\gamma$ -ENaC UE.

<b>Gen</b>	<b>SCNN1G</b>	<b>Accession Number</b>
DNA	30,61 Kb	NT 010393
mRNA	3361 bp	NM 001039
kodierende Sequenz	1950 bp	NP 001030

Jede dieser Untereinheiten weist einen intrazellulären Amino (N) - und Carboxy (C) - Terminus, eine große extrazelluläre Domäne sowie zwei Transmembrandomänen auf (Abb. 4). Der N-Terminus besteht aus einer variablen, sich innerhalb der ENaC/Degenerin Familie unterscheidenden Domäne und einer hoch konservierten, ca. 15 AS langen Domäne, der so genannten pre-TM1-Region (Mano und Driscoll 1999). In dieser pre-TM1-Region befindet sich das HG-Motiv (His-Gly), welches an der Öffnung und Schließung des Kanals beteiligt ist, da Mutationen in diesem Bereich zu einer geringeren Offenwahrscheinlichkeit führen (Kellenberger und Schild 2002). Alle ENaC UE weisen zwei Transmembrandomänen auf. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus transmembranen  $\alpha$ -Helices (M1 und M2) und hydrophoben  $\beta$ -Faltblattstrukturen (H1 und H2) (Canessa et al. 1994). Die zweite hydrophobe, hochkonservierte Domäne M2 vermittelt die Ionenselektivität für  $\text{Na}^+$ , während M1 eher eine Strukturfunktion übernimmt (Mano und Driscoll 1999). Mehr als 60 % der AS der  $\alpha$ -ENaC UE bilden die extrazelluläre Domäne. Dies ist normalerweise ein Charakteristikum für Liganden-gesteuerte Kanäle (Horisberger und Chraïbi 2004). Darüber hinaus befindet sich in allen drei ENaC UE eine Cystein-reiche Region bestehend aus 15 Cysteinen, die innerhalb der Vertebraten konserviert ist. Innerhalb der extrazellulären Domäne befinden sich auch mögliche N-Glykosylierungsstellen. So konnten für die  $\alpha$ -ENaC UE sechs putative, für die  $\beta$ -ENaC UE zwölf und für die  $\gamma$ -ENaC UE fünf N-Glykosylierungsmöglichkeiten identifiziert werden (Kellenberger und Schild 2002). Der C-Terminus der ENaC UE weist mindestens eine prolinreiche Sequenz auf (**PPPXYXXL**). In der  $\alpha$ -ENaC UE befinden sich zwei solcher Regionen, die durch ihre Ähnlichkeit mit einem SH3-bindenden-Motif in der Protein-Protein Interaktion eine große Rolle spielen (Garty und Palmer 1997). Des Weiteren zeigen alle ENaC UE C-terminal ein PY-Motiv (**XPPXY**), welches mit den WW-Domänen anderer Proteine interagiert (Staub und Rotin 1996). Die drei humanen ENaC UE sind in Abbildung 4 vereinfacht dargestellt.



**Abbildung 4:** Untereinheiten des humanen ENaC ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ).

Dargestellt sind die drei homologen Untereinheiten des humanen ENaC ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) mit jeweils zwei Transmembrandomänen, der großen extrazellulären Schleife und dem intrazellulären Amino - bzw. Carboxy-Terminus. Der extrazelluläre Loop umfasst mehr als die Hälfte des Proteins und enthält mehrere mögliche Glykosilierungsstellen. Die  $\alpha$ -ENaC UE stellt mit 669 AS die längste UE dar, während die  $\beta$ -ENaC UE mit 640 UE die kleinste UE ist. Die  $\gamma$ -ENaC UE hat eine Länge von 649 AS.

### 1.3.2 Regulation von ENaC

Die Regulation von ENaC wird über Hormone sowie durch verschiedene assoziierte Proteine und extrazelluläre Faktoren, die direkt und/oder indirekt mit dem Kanal interagieren, vermittelt. Die ENaC Expression erfolgt nicht nur in Aldosteron-sensitiven Geweben wie Niere und Darm, die an der Aufrechterhaltung der Körpersalinität beteiligt sind, sondern auch im distalen und proximalen Bereich des respiratorischen Traktes. In diesen Epithelien bestimmt ENaC vorwiegend die Ionenzusammensetzung des extrazellulären ASL. Die Mechanismen der Steuerung dieser regulatorischen Prozesse sind trotz intensiver Untersuchungen immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein großer Teil der Regulation erfolgt über eine Steuerung der vorhandenen Kanäle in der apikalen Plasmamembran von Epithelzellen (Rossier 2002). Dieser regulatorische Mechanismus wurde und wird intensiv untersucht. Verschiedene Faktoren, inklusive der transkriptionalen und post-transkriptionalen Regulation der ENaC-Synthese, der Degradierung und die Steuerung des Transports der einzelnen UE zwischen intrazellulären Vesikeln und der Plasmamembran sind darin eingeschlossen (Horisberger und Chraïbi 2004).

Allgemein gilt das diuretische Hormon Aldosteron als das primäre Hormon, welches für den Salz- und Wasserhaushalt in allen Vertebraten vor allem in der Niere und im Darm verantwortlich ist und stellt den wichtigsten bekannten Aktivator für ENaC dar. Die Aktivierung von ENaC durch Aldosteron, welches in der *zona glomerulosa* der Nebennierenrinde gebildet wird, ist sehr gewebespezifisch. Diese Aktivierung erfolgt zum einen über eine Modifikation der Genexpression und Neusynthese bestimmter Proteine. Aldosteron gelangt durch die Plasmamembran und bindet an einen zytosolischen Mineral- oder Glukokortikoidrezeptor. Der Rezeptor-Hormon-Komplex wandert zum Nukleus und interagiert mit der Promotorregion bestimmter Gene. Somit wird die Transkription dieser Gene entweder aktiviert oder unterdrückt. Aldosteron-induzierte Proteine (*aldosterone-induced-proteins*; AIP) und durch Aldosteron unterdrückte Proteine (*aldosterone-repressed-proteins*; ARP) vermitteln einen erhöhten Na<sup>+</sup>-Transport. Zu diesen AIP gehören die drei ENaC UE sowie die Serum-Glukokortikoid aktivierbare Serin-Threonin-Kinase (SGK). SGK kann dann wiederum ENaC durch direkte Phosphorylierung oder indirekt über die Phosphorylierung anderer Proteine aktivieren (Alvarez de la Rosa und Canessa 2003). Neben dieser genomisch induzierten Aktivierung existiert ein schnellerer, nicht-genomischer Signalweg

innerhalb weniger Minuten (Zhou und Buben 2001). Ebenfalls konnte eine generelle Aldosteron-Wirkung in humanen Endothelzellen innerhalb weniger Minuten gezeigt werden, die durch die Gabe von Amilorid aufgehoben werden konnte (Oberleithner et al. 2003). Darüber hinaus kann Aldosteron die Offenwahrscheinlichkeit des ENaC innerhalb weniger Sekunden steigern (Kemendy et al. 1992). Andere Hormone wie das antidiuretische Hormon (ADH) (Ausiello et al. 1987) und auch Insulin (Blazer-Yost et al. 1998) modifizieren den Amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Transport ebenfalls über ähnliche Signalkaskaden vornehmlich im Bereich der Niere.

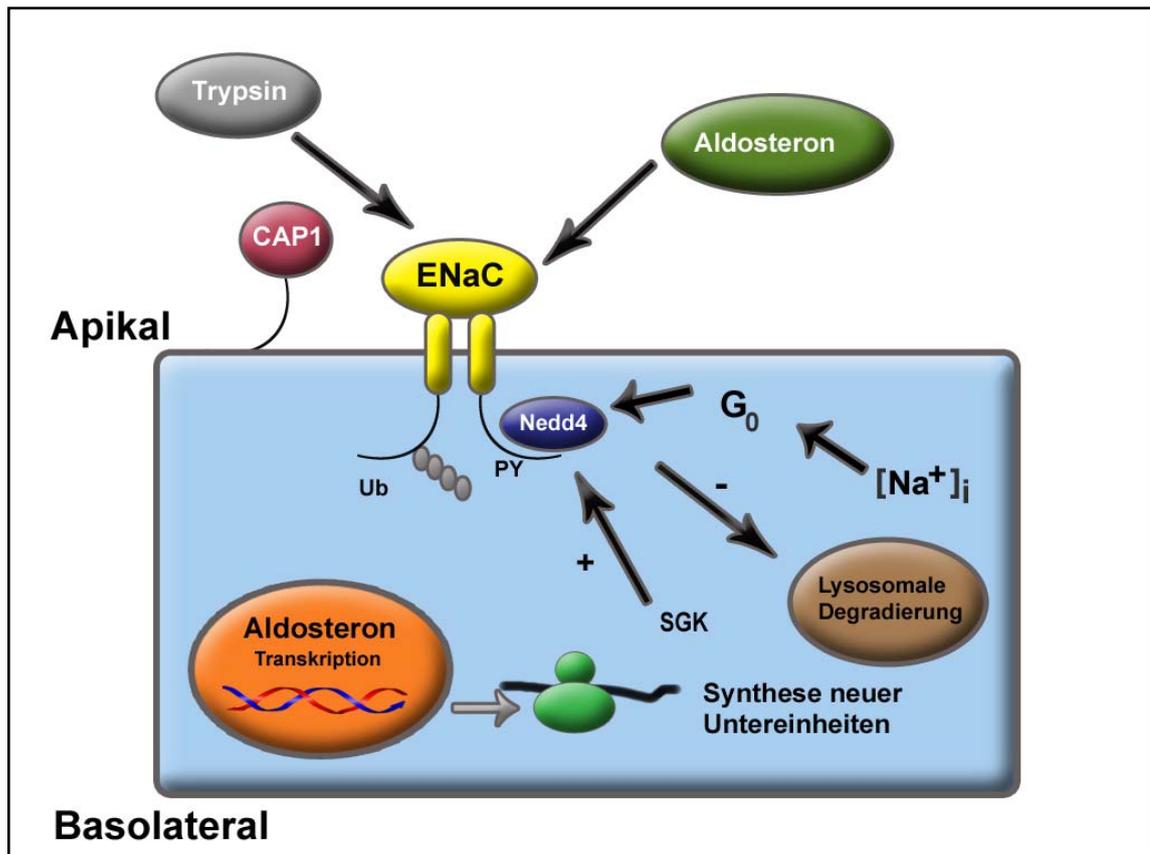
Außer dieser klassischen Regulation der ENaC-Aktivität über hormonelle Signalwege, wird ENaC durch Proteine mit grundlegend anderen Mechanismen reguliert. Von mehreren Autoren konnte gezeigt werden, dass auch Proteasen eine große Rolle bei der Regulation von ENaC spielen. In der Harnblase inaktivieren Proteasen den Natriumkanal indem sie ihn in der Nähe der Ionen-Pore spalten (Lewis und Clausen 1991). Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass für die gewebespezifische ENaC-Regulation Serin-Proteasen wie Trypsin (Caldwell et al. 2004; Vallet et al. 1997) sowie membranständige Proteasen wie CAP (*Channel Activating Protease*) bzw. das humane Ortholog Protsin eine sehr große Rolle bei der Kanal-Aktivierung spielen (Vuagniaux et al. 2000). So aktiviert Trypsin bei einer heterologen Expression von ENaC in Oocyten den Amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Strom (Chraibi et al. 1998). Bisherige Untersuchungen zeigten, dass in diesem Expressions-System proteolytische Modifikationen weder die ENaC Kanal-Anzahl in der Plasmamembran noch den Widerstand eines einzelnen Kanals beeinflussen, jedoch die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle erhöhen (Horisberger und Chraibi 2004). Allerdings konnte unsere Arbeitsgruppe unter Einsatz neuer Techniken vor kurzem zeigen, dass Trypsin durch eine Aktivierung exozytischer Prozesse den Transport und funktionellen Einbau in die Oocyten-Membran katalysiert (Börding et al. 2006). Des Weiteren umfasst der Prozess der Proteinproteolyse durch die Endoprotease Furin, die Proprotein-Prozessierung des unreifen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC Proteins während der Biosynthese (Hughey et al. 2004b). Der genaue Mechanismus der Regulation des ENaC durch Proteasen ist jedoch weiterhin unklar und bedarf eingehender Untersuchungen (Horisberger und Chraibi 2004).

Ein anderer Kandidat für eine Interaktion mit ENaC ist die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2. Man nimmt an, dass die WW Domäne von Nedd4-2 an die prolinreiche Region im Carboxy-Terminus (PY-Motiv) aller ENaC UE bindet und diese ubiquitiniert. Dies ist ein Signal für den Rücktransport der Kanäle aus der Plasmamembran und die

anschließende Degradierung. Durch eine Reduzierung der ENaC Expression an der Zelloberfläche wird so wahrscheinlich der Amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Strom vermindert (Goulet et al. 1998; Abriel et al. 1999). Die Kinasen SGK und PKA verhindern eine Endozytose und Degradierung durch eine Phosphorylierung von Nedd4-2, das somit nicht mehr an ENaC binden kann (Snyder 2005).

Ein großes Interesse liegt in der Aufklärung einer vermeintlichen ENaC-Regulation durch CFTR. Denn seit offensichtlich ist, dass die  $\text{Na}^+$ -Absorption in den Atemwegen von CF-Patienten stark erhöht ist, wird eine Interaktion zwischen ENaC und CFTR vermutet (z. B. Jiang et al. 2000; Kunzelmann et al. 2000). Diese putative ENaC-CFTR Interaktion wird aktuell jedoch kontrovers diskutiert. Während manche Autoren eine direkte Inhibierung des ENaC durch CFTR beschreiben (Mall et al. 1996; Letz und Korbmayer 1997; Jiang et al. 2000; Konstas et al. 2003), konnten andere diesen inhibitorischen Effekt auf ENaC nicht beobachten (Segal et al. 2002a; Nagel et al. 2005). Eine direkte Protein-Protein Interaktion konnte bislang noch nicht gezeigt werden, jedoch ist eine indirekte Interaktion zwischen ENaC, CFTR, cAMP und Protein-Kinasen anzunehmen (Akabas 2000). In diesem Zusammenhang ist der vesikuläre Transport von ENaC und CFTR zur Plasmamembran ebenfalls von Interesse. Transportvesikel in denen zuvor beide Ionenkanäle transportiert wurden, könnten im Fall von CF anstatt des CFTR mehr ENaC zur Membran bringen und somit den Amilorid-sensitiven Strom erhöhen (Alvarez de la Rosa et al. 2000).

Zusätzlich zu all diesen interagierenden Proteinen kann die Zelle selbst die  $\text{Na}^+$ -Absorption durch ENaC über die Mechanismen der *Self-Inhibition* und der *Feedback Regulation* steuern. Bei der *Self-Inhibition* modifiziert extrazelluläres Natrium die Aktivität der Kanäle unabhängig von der intrazellulären Ionenzusammensetzung (Chraïbi und Horisberger 2002). Eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird als Vermittler für die *Feedback Regulation* angesehen. Dabei verändert eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration anscheinend die Antriebskraft für den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch, wodurch es in der Zelle zu einem sekundären Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle kommt. Außerdem wurde eine direkte Hemmung der  $\text{Na}^+$ -Kanäle durch  $\text{Ca}^{2+}$  beobachtet (Garty et al. 1987). Die folgende Abbildung (Abb. 5) soll die postulierten Regulationsmechanismen zusammenfassen.

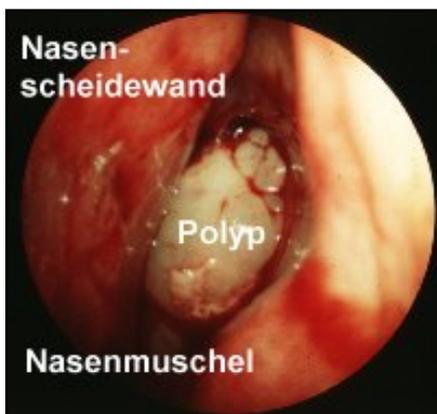


**Abbildung 5:** ENaC Regulation.

Regulationsmechanismus des ENaC in einer epithelialen Zelle. Die Serinproteasen CAP1 und Trypsin sowie Aldosteron aktivieren den Kanal in der apikalen Membran wahrscheinlich direkt. Nedd4-2 bindet an das PY-Motif im C-Terminus und ubiquitiniert die AS der UE um die Endozytose und Degradation in Lysosomen zu vermitteln. Ein intrazellulärer Anstieg der Na<sup>+</sup>-Konzentration wird über G<sub>0</sub>-Proteine zu Nedd4-2 übermittelt, um wiederum die Kanäle zu entfernen. Über einen anderen Mechanismus bindet Aldosteron an einen Rezeptor, dieser wandert in den Nukleus und löst die Transkription der AIP (*aldosterone-induced-proteins*) wie ENaC und SGK aus. SGK kann ENaC durch direkte Phosphorylierung oder indirekt über die Phosphorylierung anderer Proteine aktivieren (verändert nach: Alvarez de la Rosa et al. 2000).

### 1.4 Der ENaC im respiratorischen Epithel

In der Vergangenheit dienten Primärkulturen aus humanen operativ entfernten Nasenpolypen bereits als Modell für Untersuchungen der Ionentransportvorgänge des respiratorischen Traktes in Zusammenhang mit CF. Diese Zellen bilden in Kultur polarisierte Monolayer mit einem relativ hohen transepithelialen Widerstand, welcher eine wichtige Voraussetzung für transepitheliale elektrophysiologische Messungen darstellt. Da die Zellen humanen Ursprungs sind, haben die Untersuchungen an diesen Zellen darüber hinaus einen direkten klinischen Bezug (Blank et al. 1995; Rückes-Nilges et al. 1999). Auch in dieser Arbeit wurden humane Nasenpolypen als Untersuchungsmodell für das respiratorische Epithel gewählt. Das Oberflächenepithel der Nase ist operativ relativ leicht zugänglich und bietet sich demnach als repräsentatives Modell zur molekularen und funktionellen Untersuchung des respiratorischen Traktes an. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass sich die elektrophysiologischen Parameter des respiratorischen Epithels aus unterschiedlichen Entnahmbereichen der Nasenregion nicht unterscheiden (Blank 1996). Die gutartigen Wucherungen des Nasenepithels werden als Nasenpolypen (*polyposis nasi*) bezeichnet. Diese sind an der Nasenschleimhaut gestielt und variieren in der Größe und Form oftmals beträchtlich. Die Polypen wachsen in den Nasennebenhöhlen und aus den Ausführungsgängen dieser Nebenhöhlen in die Nasenhaupthöhle und können so die Nasenräume ganz verschließen (Abb. 6). Die Ursache für diese gutartigen Epithelwucherungen ist bislang unbekannt, es wurden jedoch verschiedene Faktoren wie die chronische Entzündung des Epithels, eine Sensitivität gegenüber Aspirin, Asthma sowie eine individuelle Veranlagung beschrieben (Bachert et al. 2003).



**Abbildung 6:** Nasenpolypen.

Nasenpolypen befinden sich oftmals wie auf diesem Bild zwischen Nasenscheidewand und Nasenschleimhaut ([www.uni-koeln.de](http://www.uni-koeln.de)).

### 1.5 Die Rolle von ENaC bei CF

Bei Untersuchungen an primären Zellkulturen aus operativ entferntem Nasenepithelgewebe konnte bereits gezeigt werden, dass hier dem  $\text{Na}^+$ -Transport generell eine größere Rolle als dem  $\text{Cl}^-$ -Transport zukommt. Die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion über den CFTR oder andere  $\text{Cl}^-$ -Kanäle ist in CF und auch nicht-CF Nasengewebe scheinbar vernachlässigbar. Den Hauptanteil des transepithelialen Ionen-Transportes vermittelt demnach ENaC (Rückes-Nilges et al. 1999). Darüber hinaus unterscheiden sich die Eigenschaften des humanen ENaC aus Nasenepithel (hnENaC) von denen der zuvor beschriebenen epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanäle grundlegend (Rückes et al. 1997). So wird in humanem Nasenepithel ENaC nicht durch Aldosteron aktiviert, cAMP zeigt keinen Effekt und das pharmakologische Profil weicht von dem des klassischen ENaC aus Niere und Lunge ab (Tabelle 4). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass hnENaC entweder zu einer neuen Unterklasse der ENaC Proteinfamilie gehört, dass die  $\text{Na}^+$ -Absorption im humanen Nasenepithel durch alternative Mechanismen reguliert wird (Rückes et al. 1997) oder dass ENaC gewebespezifisch eine andere Stöchiometrie mit veränderten Kanaleigenschaften aufweist. Darüber hinaus unterscheidet sich die  $\text{Na}^+$ -Absorption über das humane Nasenepithel von CF Patienten und nicht-CF Patienten ebenfalls in zahlreichen pharmakologischen und biophysikalischen Aspekten. Wie schon zuvor erwähnt, ist die Amilorid-sensitive  $\text{Na}^+$ -Absorption bei CF Patienten drastisch erhöht. Das Ergebnis ist eine zwei- bis dreifach erhöhte Rate der transepithelialen  $\text{Na}^+$ -Absorption in CF Epithelien gegenüber nicht-CF Gewebe (Blank et al. 1997; Hofmann et al. 1998). Somit stellt sich die Frage, wie genau der ENaC aus humanem respiratorischem Epithel in das Krankheitsbild der Mukoviszidose involviert ist. Sollte die ENaC-Überaktivität auf eine veränderte molekulare Struktur zurückzuführen sein, würden eine Klonierung und Sequenzierung des hnENaC Aufschlüsse über putative Mutationen des hnENaC aus CF genauso wie aus nicht-CF Gewebe ermöglichen. Eine Mutation des ENaC führt zu bereits bekannten Krankheitsbildern. Mutationen in der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC UE führen zu schwerwiegenden Krankheiten wie z.B. dem Liddle's Syndrom (Bubien et al. 1996) und Pseudohypoaldosteronismus (PHA) (Alvarez de la Rosa et al. 2000). Somit könnte eine zusätzliche Mutation des ENaC bei CF eine veränderte Proteinfaltung mit einer modifizierten Funktion zur Folge haben. PHA ist eine Krankheit, die einige Symptome mit CF gemein hat: Es konnten erhöhte Elektrolyte im Schweiß und eben auch

Infektionen durch *P. aeruginosa* in der Lunge gezeigt werden (Hanukoglu et al. 1994; Marthinsen et al. 1998). Damit wird eine Involvierung des ENaC in die Sekundärerkrankungen auch bei Mukoviszidose deutlich. Tatsächlich haben Mall et al. in einem murinen Model kürzlich gezeigt, dass eine Na<sup>+</sup>-Hyperabsorption in den Atemwegen alle CF-ähnlichen Symptome hervorrufen kann, selbst wenn der CFTR endogen funktionsfähig exprimiert wird (Mall et al. 2004).

Auch auf transkriptionaler Ebene könnte die ENaC Regulation in CF modifiziert sein. Einige Autoren spekulierten bereits, dass das Krankheitsbild auf molekularer Ebene von CF nicht in einer veränderten ENaC Expression (mRNA) begründet ist, sondern die veränderte Na<sup>+</sup>-Hyperabsorption durch den fehlenden und angeblich repressiv wirkenden CFTR verursacht wird (Burch et al. 1995). Im Gegensatz dazu fanden andere heraus, dass eine erhöhte β-ENaC Expression in murinen Atemwegen Symptome, wie sie für CF typisch sind, hervorruft (Mall et al. 2004). Einen weiteren Hinweis auf eine starke Beteiligung der ENaC Regulation auf Transkriptionsebene bringt die Beobachtung, dass die β-ENaC mRNA in einem weiteren murinen Model transient erhöht ist, welches zuvor mit *P. aeruginosa* infiziert worden ist (Dagenais et al. 2005). *P. aeruginosa* ist das zuvor beschriebene Hauptpathogen chronischer Lungeninfektionen bei Mukoviszidose. Aufgrund dieser Ergebnisse spekulierten die Autoren, dass eine Infektion mit *P. aeruginosa* eine Modulation der ENaC UE Expression bewirkt und so eine Entstehung von Ödemen (Gewebewasseransammlung) und die MCC in den Atemwegen beeinflusst. Die molekularen Mechanismen sind jedoch noch ungeklärt. Diese Beispiele zeigen deutlich, dass die Überaktivität von ENaC durchaus allein für die CF-Symptome verantwortlich sein kann und einen zusätzlichen Ansatzpunkt für therapeutische Maßnahmen in der Behandlung von Mukoviszidose darstellt.

**Tabelle 4:** Funktionelle Unterschiede zwischen dem klassischen ENaC und dem hnENaC aus CF und nicht-CF Nasengewebe.

	ENaC	nicht-CF hnENaC	CF hnENaC
<b>Stimulation durch Aldosteron</b>	+ <sup>a</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
<b>Stimulation durch cAMP</b>	+ <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
<b>Inhibierung durch DPC</b>	Keine Daten vorhanden	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>
<b>Reversible Blockierung durch Phenamil</b>	- <sup>a</sup>	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>

<sup>a</sup> (Garty und Palmer 1997)

<sup>b</sup> (Stutts et al. 1997)

<sup>c</sup> (Blank et al. 1997)

## 1.6 Ziele der Arbeit

Seit der Klonierung von CFTR im Jahre 1989 erhoffte man sich durch die Erforschung der molekularen Mechanismen von CFTR und dessen Mutationen, Erkenntnisse für mögliche Therapien der Mukoviszidose zu gewinnen (Riordan et al. 1989). Lange Zeit setzte man auf Methoden der Gentherapie, bisher jedoch erfolglos. Obwohl auch viele Forschungsansätze unternommen wurden, die Rolle der ENaC-Überaktivität bei Mukoviszidose aufzuklären, blieben die genauen molekularen Mechanismen bisher unbekannt. Es konnte jedoch bereits früh gezeigt werden, dass die  $\text{Na}^+$ -Hyperabsorption ein substantielles Merkmal von CF ist (Blank et al. 1995; Rückes-Nilges et al. 1999). Neuere Ergebnisse bestätigen diese Befunde und zeigen, dass genau diese  $\text{Na}^+$ -Hyperabsorption im respiratorischen Epithel durch ENaC ausreicht, die grundlegenden Atemwegssymptome der Mukoviszidose auszulösen (Mall et al. 2004). Die daraus resultierenden Erkenntnisse sind von fundamentalem medizinischem Interesse.

Da bisher keine molekularen Daten über den ENaC aus Geweben von an CF erkrankten Patienten vorlagen und somit putative Mutationen, welche die Aktivität und Eigenschaften des Kanals beeinflussen würden, nicht ausgeschlossen werden konnten, ergab sich als erste Zielsetzung des vorliegenden Forschungsprojekts die Charakterisierung des ENaC aus humanem Nasenepithel von CF Patienten zunächst auf molekularer Ebene. Somit sollte zunächst der hnENaC aus von CF Patienten kloniert und sequenziert werden. Zusätzlich sollte der hnENaC von nicht-CF Patienten kloniert und sequenziert werden, um auf diese Weise Unterschiede zwischen nicht-CF und CF hnENaC zum einen und zum anderen Unterschiede zu ENaC aus anderen Geweben bzw. Organismen (zusammengefasst in Tab. 4) aufzuklären. Anschließend ergibt sich die Möglichkeit, durch Sequenzvergleiche feststellen zu können, ob die Veränderungen in der Funktion des hnENaC aus CF und nicht-CF Gewebe auf Veränderungen in der Aminosäuresequenz zurückzuführen sind.

Die ENaC Expression erfolgt, wie zuvor beschrieben, gewebespezifisch sowohl in Aldosteron-sensitiven Geweben, wie der Niere und dem Darm, als auch in den Atemwegen, in denen über unterschiedliche assoziierte Proteine und extrazelluläre Faktoren, die mit dem Kanal interagieren eine Regulation stattfindet. Falls eine transkriptionale Modifikation der ENaC UE in CF zu einer erhöhten Expression des

ENaC führen würde, könnte dadurch eine gesteigerte Na<sup>+</sup>-Absorption in dem respiratorischen Epithel verursacht werden. Diese Hypothese sollte zunächst über eine Quantifizierung der mRNA-Menge in CF und nicht-CF Gewebe mit Hilfe einer semi-quantitativen RT-PCR bestimmt und anschließend mittels *real-time* PCR überprüft und optimiert werden. Da nicht unbedingt eine direkte Korrelation zwischen der transkriptionalen (mRNA-) und translationalen (Protein-) Ebene bestehen muß und vice versa (May et al. 1997), war es das Ziel den hnENaC in CF und nicht-CF Epithel ebenfalls proteinbiochemisch nachzuweisen, zu quantifizieren und zu vergleichen, um so eventuelle Unterschiede auf Protein-Ebene zu erfassen. Diese Bestimmung der hnENaC UE in CF und nicht-CF Nasenepithel sollte mit spezifischen anti-ENaC Antikörpern durch Western Blot Analysen erfolgen. Um die molekularen Mechanismen der Na<sup>+</sup>-Hyperabsorption bei Mukoviszidose aufzuklären, sollte in der vorliegenden Arbeit der hnENaC aus CF und nicht-CF Gewebe auf diese Weise auf mRNA- und Protein-Ebene charakterisiert werden.

## 2 *Material und Methoden*

### 2.1 *Gewebeproben: Menschliche Nasenpolypen*

Operativ gewonnenes Polypengewebe von CF und nicht-CF Patienten wurde von der HNO-Klinik Münster (Kooperation mit Prof. Dr. med. Claudia Rudack, HNO Klinik, WWU Münster) sowie der Kinderklinik Giessen (Kooperation Dipl. Biol. Claudia Nilges, Kinderklinik der Justus Liebig Universität, Giessen) zur Verfügung gestellt. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der WWU Münster genehmigt (Reg.- Nr. 4IVKusche). Außerdem wurden die Patienten über das Forschungsvorhaben unterrichtet und erklärten sich zur Weiterverwendung der entnommenen Gewebeproben für wissenschaftliche Zwecke ausdrücklich bereit. Für die molekulare Klonierung, die semi-quantitative und die *real-time* PCR wurden vier nicht-CF Polypenproben vereinigt. Um exakte Werte für jeden individuellen CF Patienten aus den *real-time* PCR Experimenten zu erhalten, wurden sechs CF Proben einzeln zum relativen Vergleich mit den vereinigten nicht-CF Proben herangezogen. Es wurden fünf Patienten homozygot für  $\Delta F508$  und ein Patient mit einer so genannten *Compound Heterozygotie* für  $\Delta F508/R553X$  untersucht (Tab. 5). Eine *Compound Heterozygotie* beschreibt zwei verschiedene Mutationen am gleichen Gen. Letzterer wurde ebenfalls für die molekulare Klonierung der drei hnENaC Untereinheiten aus CF Gewebe und die semi-quantitative RT-PCR verwandt. Alle CF Patienten zeigten ein ausgeprägtes klinisches Krankheitsbild für Mukoviszidose.

**Tabelle 5:** Genetischer Status der sechs CF-Patienten; Mutationen

<b>Probe</b>	<b>Genstatus</b>
CF 1	$\Delta$ F508 homozygot
CF 2	$\Delta$ F508 homozygot
CF 3	$\Delta$ F508/R553X <i>Compound Heterozygotie</i>
CF 4	$\Delta$ F508 homozygot
CF 5	$\Delta$ F508 homozygot
CF 6	$\Delta$ F508 homozygot

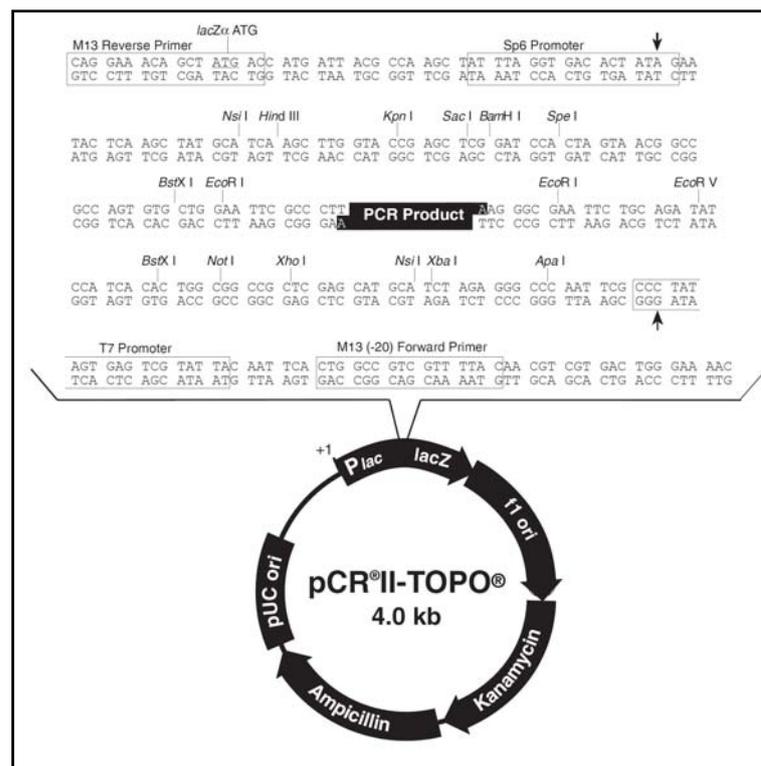
## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Bakterienstamm

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der Bakterienstamm XL-1-Blue (Stratagene, Heidelberg, Deutschland), ein Derivat des K12 Stammes der Art *Escherichia coli*, verwendet.

### 2.2.2 Plasmidvektor

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der pCR<sup>®</sup>II-TOPO TA Klonierungsvektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet (Abb. 7).



**Abbildung 7:** Vektorkarte des pCR<sup>®</sup>II-TOPO TA Klonierungsvektors.

Der Vektor ist 4.0 kb groß und besitzt 5' und 3'-wärts der *multiple cloning site* (MCS) jeweils einen Promotor (T7 bzw. SP6). Die Restriktionsschnittstellen der MCS sind in der Ausschnittvergrößerung gekennzeichnet. Der Vektor kann durch eine Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz in weiteren Anwendungen selektiert werden (TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Handbuch, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

### 2.2.3 Nährmedien und Agarplatten

#### **LB-Medium (pro Liter) pH 7,0**

NaCl	10 g
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g

LB-Agar: 20 g Agar-Agar auf 1 Liter LB-Medium

Das Medium wurde bei 121 °C (1,0 bar) im Autoklaven sterilisiert und auf ca. 55 °C in einem Wasserbad abgekühlt. Anschließend konnte das Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt werden, um ein selektives Wachstum von Bakterien zu erreichen. Selektiven Agarplatten wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 mg/l hinzugefügt.

### 2.2.4 Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion beruht auf einer Unterbrechung des lacZ-Gens im Klonierungsvektor, welches für das N-terminale  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase kodiert. Dieses  $\alpha$ -Fragment erreicht lediglich eine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach dem Zusammenschluss mit dem ebenfalls inaktiven C-terminalen  $\omega$ -Fragment. Dieser Mechanismus wird als  $\alpha$ -Komplementation bezeichnet. Das Substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) wird von dem lacZ-Genprodukt, der  $\beta$ -Galaktosidase, umgesetzt. Wenn das lacZ-Gen durch ein DNA-Fragment unterbrochen ist, bleiben die Bakterienkolonien, nach erfolgter Inkubation mit dem Induktor der Transkription IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid), weiß. Bakterienkolonien, die ein Plasmid ohne eine Insertion im lacZ-Gen besitzen, exprimieren das  $\alpha$ -Fragment und sind somit blau gefärbt.

**X-Gal/Amp/IPTG Agar-Platten (250 ml)**

---

X-Gal (48 mg/ml DMF)	250 $\mu$ l
IPTG (200 mg/ml)	250 $\mu$ l
Ampicillin (100 mg/ml)	125 $\mu$ l

---

*2.2.5 Glycerinkultur*

Bakterienzellen, welche ein Plasmid aufgenommen haben, sind in Nährmedien und als Ausstrich auf Agarplatten nur begrenzt haltbar. Zur längeren Aufbewahrung wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 700  $\mu$ l frische Flüssigkultur mit 300  $\mu$ l sterilem Glycerin vermischt und bei - 80 °C gelagert. Solche Glycerinkulturen sind für mehrere Jahre stabil und die Bakterien können durch ein erneutes Ausstreichen wieder aktiviert werden.

*2.2.6 Flüssigkulturen*

Bakterienzellen, die ein bestimmtes Plasmid tragen, wurden als Einzelkolonien kultiviert. Hierzu wurde eine Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte isoliert und in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin (0,5  $\mu$ l Ampicillin (100 mg/ml) pro ml LB-Medium) überführt. Diese Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

### 2.2.7 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Plasmid-DNA zu vermehren, muß diese in Bakterien eingeschleust werden. Dazu mussten die Bakterien zunächst aufnahmefähig, d. h. kompetent gemacht werden. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit die TSS-Methode verwendet. XL-1-Blue Bakterien wurden in 3 ml LB-Medium mit 4,5 µl Tetracyclin (10 mg/ml) über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde 1 ml zur Beimpfung von 100 ml LB-Medium, welches zuvor mit 150 µl Tetracyclin (10 mg/ml) versetzt wurde, eingesetzt.

Anschließend konnten die Bakterien bei 37 °C und 200 rpm auf dem Schüttler bis zu einer  $OD_{600} \approx 0,5$  heranwachsen. Nach dem Erreichen der OD wurden die Bakterien 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4000 g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet in 5 ml eiskaltem TSS-Medium aufgenommen und die Bakterien wurden so 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die nun kompetenten Bakterien zu 100 µl in Eppendorf-Gefäßen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In diesem Zustand konnten die Bakterien bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert werden.

#### 2 X TSS

---

LB-Medium	pH 6,5
PEG8000 (Polyethylenglykol)	20 % (w/v)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	10 % (w/v)
MgSO <sub>4</sub>	100 mM

---

### 2.2.8 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden zunächst 100 µl kompetente XL-1-Blue Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde Plasmid-DNA (10 bis 100 ng) hinzugefügt, vorsichtig mit der Pipettenspitze umgerührt und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 1 min im Wasserbad. Danach wurde der Ansatz sofort für 2 min auf Eis gestellt und 980 µl SOC-Medium sowie 20 µl 1 M Glukose (sterilfiltriert) hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wurde in einer Vorrichtung horizontal auf dem Schüttler befestigt und bis zu 2 Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden für 2 min bei 2000 g abzentrifugiert und das entstandene Pellet in 100 ml SOC-Medium resuspendiert. Die transformierten Bakterien wurden auf selektiven LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

#### **SOC-Medium**

---

Bacto-trypton	2 % (w/v)
Bacto-Hefe Extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glukose	20 mM

---

pH 7,0

## 2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Präzipitation von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren zu konzentrieren können diese präzipitiert, d. h. gefällt werden. Dazu wurde die Nukleinsäure-Lösung mit dem 0,1-fachen Volumen eines monovalenten Salzes (3 M Natriumacetat pH 4,8 - 5,2; 6 M Ammoniumacetat) und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol p.a. (100 %), bzw. 0,7-fachen Volumen Isopropanol p. a. (100 %) versetzt. Nach dem Mischen wurde die Lösung für mindestens 2 Stunden, jedoch besser über Nacht bei - 20 °C gefällt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 60 min bei  $\geq 10\,000\text{ g}$  um die Nukleinsäure zu pelletieren. Durch das Waschen mit 70 % Ethanol wurde das DNA-Pellet von Salz- und Phenolresten gereinigt, erneut für 15 min zentrifugiert und in der Vakuumzentrifuge bei 45 °C getrocknet. Anschließend konnte die Nukleinsäure in einem bestimmten Volumen H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei - 20 °C gelagert werden.

### 2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte photometrisch über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm. Dabei errechnet sich die Nukleinsäurekonzentration aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung der Probe, der Schichtdicke der Küvette und einem für DNA bzw. RNA spezifischen Multiplikationsfaktor. Für die Konzentrationbestimmung gilt demnach:

$$1 \text{ OD}_{260} \approx 50 \text{ } \mu\text{g/ml dsDNA}$$

$$1 \text{ OD}_{260} \approx 40 \text{ } \mu\text{g/ml RNA}$$

Außerdem erhält man aus dem Verhältnis der OD<sub>260nm</sub> und der OD<sub>280nm</sub>, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, eine Aussage über die Proteinverunreinigung der Probe. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist ein Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> von 1,7 bis 2,1 für DNA bzw. 1,9 bis 2,1 für RNA auf.

### 2.3.3 *Präparation von Plasmid-DNA*

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birboim und Doly 1979) mit dem E.Z.N.A. Plasmid-Miniprep-Kit-I (Peqlab, Erlangen, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Bei diesem Verfahren macht man sich die selektiven und reversiblen DNA-Bindungseigenschaften von Silikamembranen zu nutze. Nach der Zelllyse bindet die Plasmid-DNA an die in einer Säule enthaltene Silikamembran und kann somit durch Waschen von Kontaminationen und Enzyminhibitoren gereinigt werden. Nachdem die Säule getrocknet wurde, konnte die saubere Plasmid-DNA in 50 µl Elutionspuffer (10 mM Tris) oder H<sub>2</sub>O eluiert und bei - 20 °C aufbewahrt werden.

### 2.3.4 *Restriktionsverdau*

Für den analytischen Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, welche eine definierte Zielsequenz innerhalb der DNA erkennen und an dieser Stelle schneiden. Diese spezifischen Erkennungssequenzen sind in der Regel Palindrome, d. h. diese vier bis acht Basenpaare sind symmetrisch und in beiden Strängen identisch. Die Restriktionsenzyme wurden von unterschiedlichen Herstellern bezogen und somit das Protokoll nach den jeweiligen Empfehlungen optimiert. Die Inkubation des Standard-Restriktionsansatzes erfolgte bei 37 °C im Wasserbad für ca. 2,5 Stunden.

**Standard Restriktionsansatz:**

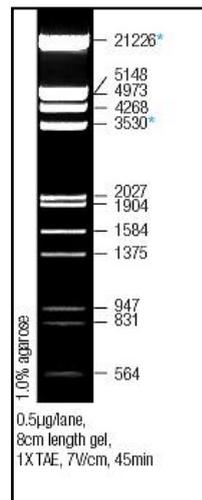
<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Plasmid-DNA	200 ng bis 1 µg
10 X Puffer	2 µl
Enzym	5 U
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

*(1 U (unit) schneidet 1 µg DNA pro Stunde unter optimalen Bedingungen)*

### 2.3.5 DNA-Gelelektrophorese

Bei der Elektrophorese werden DNA-Fragmente anhand der Größe in einem elektrischen Feld getrennt. Die Trennung wird durch die im Gel vorhandenen Poren erreicht, die wie ein Sieb wirken und deren Größe die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA bestimmen. Durch die Agarosekonzentration werden die Porengröße des Gels und damit der Trennbereich festgelegt. In dieser Arbeit wurden 0,8 %ige DNA-Standardagarosegele verwendet. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einer horizontalen Gelapparatur (Biometra, Göttingen, Germany) bei einer Spannung von 120 bis 128 Volt. Um die DNA im Gel sichtbar zu machen, wurde die zuvor geschmolzene Agarose mit Ethidiumbromid (EtBr) versetzt. Dabei interkalieren einzelne EtBr-Moleküle zwischen die Basen der Nukleinsäure, dadurch verändert sich das Anregungsspektrum des EtBr charakteristisch. Die Nukleinsäurekonzentration und die Fluoreszenzintensität unter UV-Licht verhalten sich dabei proportional zueinander. So konnte das DNA-Agarosegel mit einer Digitalkamera (Canon, Krefeld, Deutschland), die mit einem *BioDocAnalyze* System (Biometra, Göttingen, Deutschland) verbunden war, aufgenommen werden. Als DNA-Größenstandard wurde durch *EcoRI* und *HindIII* verdaute  $\lambda$ -DNA der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet (Abb. 8).

**Abbildung 8:** Lambda DNA *EcoRI/HindIII* Größenstandard (Fermentas, St. Leon-Rot). Der Marker ist in 13 DNA-Fragmente (bp) aufgeteilt: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564 und 125.



### 2.3.6 Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese

#### 10 X TBE Puffer (pH 8,3)

---

0,9 M Tris

0,9 M Borsäure

20 mM EDTA

---

#### 0,8 %iges Agarosegel

---

1,6 g LE Agarose

200 ml 0,5 X TBE-Puffer

5 µl EtBr (10 mg/ml)

---

---

**10 X DNA Probenpuffer**

---

50 % Glycerin (v/v)

0,02 % Bromphenolblau (w/v)

1 % SDS

---

*2.3.7 RNA-Gelelektrophorese*

Die RNA wurde in einem 1 %igen denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei werden durch Formaldehyd die Wasserstoffbrückenbindungen und damit die Sekundärstruktur der RNA zerstört. Zu jeder Probe wurde die entsprechende Menge frisch angesetzten Denaturierungspuffer gegeben und diese dann für 10 min bei 65 °C im Wasserbad denaturiert. Anschließend wurden 1 µl EtBr (400 µg/ml) und 1 µl 10 X RNA-Probenpuffer hinzugegeben, die Probe kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen.

**1 %iges Agarosegel**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Agarose LE	500 mg
RNase freies H <sub>2</sub> O	37,5 ml
Formaldehyd (37 %)	2,5 ml
5 X RNA Laufpuffer	10 ml

---

**Denaturierungspuffer**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
5 X RNA-Laufpuffer	1 $\mu$ l
Formaldehyd (37 %)	0,5 $\mu$ l
Formamid	5 $\mu$ l
RNA-Probe	X $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu$ l

**5 X RNA-Laufpuffer**

---

0,1 M MOPS

50 mM NaAc

pH 7,0

5 mM EDTA (pH 8,0)

---

(vor Licht schützen!)

**10 X RNA-Probenpuffer**

---

0,4 % Bromphenolblau

1 mM EDTA

50 % Glycerin

---

### 2.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Nukleinsäure im Agarosegel wurde die DNA-Bande unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Da die DNA sehr empfindlich gegenüber UV-Licht ist, erfolgte dieser Vorgang schnell, so dass die DNA nicht beschädigt wurde. Anschließend erfolgte eine Gelextraktion mit dem QIAquick Gelextraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers.

### 2.3.9 Präparation von Gesamt-RNA aus Nasenpolypen

Das Polypengewebe wurde entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in einem RNA-Stabilisierungspuffer (RNAlater, Qiagen, Hilden, Deutschland) bei - 80 °C im Gefrierschrank gelagert. Die tiefgefrorenen Gewebeproben wurden nun zunächst mit einem Mörser und Pistill zerkleinert, so dass definierte Stücke abgewogen werden konnten. Anschließend wurden die Gewebestücke in einem denaturierenden mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und GTC (Guanidinthiocyanat) versetzten Puffer mittels eines Ultra-Turrax lysiert und homogenisiert. Diese Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokollangaben. Bei dieser Methode werden genomische DNA Verunreinigungen mit Hilfe einer so genannten *gDNA Eliminator* Säule effektiv entfernt. Die aufgereingte RNA konnte somit direkt zur cDNA Synthese eingesetzt werden. Bei der Präparation von RNA wurden verschiedene Vorkehrungen getroffen, um die RNA vor der Degradierung durch RNAsen zu schützen. Alle Glaswaren (Pipetten), Metallteile (Ultra-Turrax, Pinzetten, Spatel) sowie Mörser und Pistill wurden für mindestens 4 Stunden bei 180 °C im Trockenschrank erhitzt. Die Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden nukleasefrei geliefert und zusätzlich autoklaviert. Es wurde ausschließlich mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O gearbeitet und eluiert. Nach jeder Präparation wurde die Qualität der RNA in einem 1 %igen Agarosegel überprüft.

## 2.4 PCR Techniken

### 2.4.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die PCR ist eine Methode, um DNA zu vervielfältigen. Ein PCR-Programm besteht aus drei Schritten, einem Denaturierungsschritt, einem *annealing*-Schritt und einem Elongationsschritt. Die Denaturierung erfolgt bei 94 °C, dadurch werden die beiden Stränge der *template*-DNA getrennt. Abhängig vom *template* wird die Temperatur auf die jeweilige *annealing*-Temperatur gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige *template*-DNA kommt. Daraufhin erfolgt eine Temperaturerhöhung auf 72 °C, dies ist das Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase. Dabei wird der Primer verlängert bis wieder eine doppelsträngige DNA, die komplementär zur *template*-DNA ist, vorliegt. Diese Komplementierung läuft an beiden Strängen der *template*-DNA ab, so dass nach einem Zyklus die Anzahl der *template*-DNA verdoppelt vorliegt. Am Anfang der PCR wird die DNA zunächst für 2 bis 4 min denaturiert und am Ende jeder PCR erfolgt eine finale Elongation für 7 bis 10 min. Die *Taq*-Polymerase besitzt eine *template*-unabhängige Aktivität und hängt an das 3'Ende des *template*-Stranges noch ein zusätzliches Adenosin, dies erleichtert nachfolgende Klonierungsexperimente in TA-Vektoren.

#### Standard PCR Ansatz:

---

10 X PCR-Puffer	5 µl
dNTPmix (10 mM)	1 µl
Primer <i>sense</i> (10 pmol/µl)	1 µl
Primer <i>antisense</i> (10 pmol/µl)	1 µl
<i>template</i>	x µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

---

**Standard-Cycler Programm (PCR)**

---

Initiale Denaturierung	2 min	
Denaturierung	45 sec	} 35 Zyklen
<i>annealing</i>	45 sec	
Elongation	1 min	
Finale Elongation	7 min	

---

## 2.5 PCR Techniken mit RNA

### 2.5.1 Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Bei dieser Methode dient das Enzym Reverse Transkriptase (RT) dazu, RNA in einzelsträngige cDNA umzuschreiben, um im Anschluß daran in einer PCR spezifische Sequenzen zu amplifizieren. Für die reverse Transkription wurde in dieser Arbeit fast ausschließlich die SuperScript™ II RT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet, eine modifizierte M-MLV-RT mit einer erhöhten Thermostabilität und einer reduzierten RNase H Aktivität. Zunächst wurden die RNA und oligo(dT)-Primer zusammengegeben und der Ansatz für 5 min auf 65 °C erhitzt, um RNA-Sekundärstrukturen aufzuschmelzen. Der oligo(dT)-Primer bestand aus 30 Thymidinen, welche an den Poly-A<sup>+</sup>-Schwanz der mRNA binden, und somit nahezu die komplette cDNA synthetisieren. Anschließend wurden Puffer, Nukleotide, RNase-Inhibitor und als letztes die RT hinzugefügt und 50 min bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion wurde bei 70 °C für 15 min gestoppt, und die synthetisierte cDNA konnte anschließend via PCR amplifiziert werden. Für die *real-time* RT-PCR wurde die cDNA vorher 1:10 verdünnt. Die Durchführung der RT-PCR erfolgte ausnahmslos nach den Angaben des Herstellers.

#### **Standard RT-PCR Ansatz:**

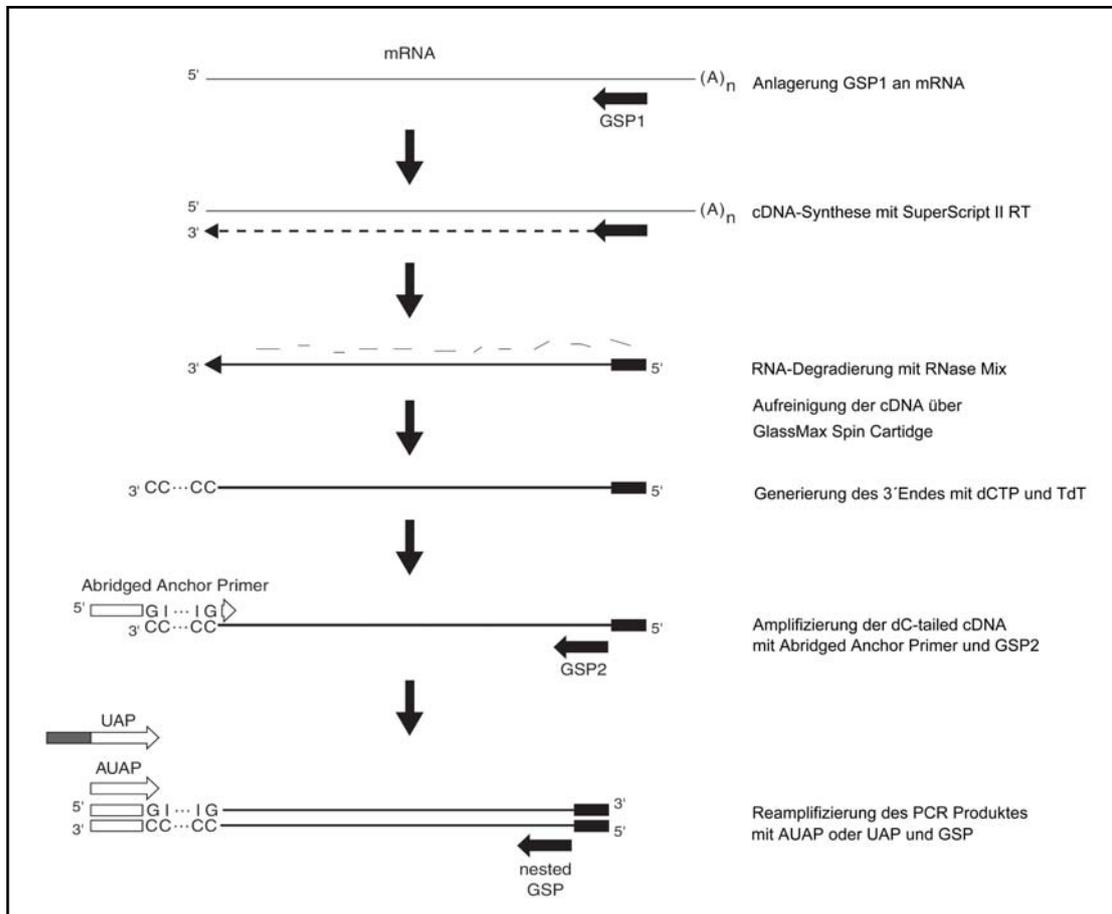
---

Gesamt RNA (1 µg)	x µl
Oligo(dT) <sub>30</sub> (10 pmol/µl)	1 µl
dNTPmix (10 mM)	1 µl
5 X Erststrangpuffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	1 µl
SuperScript™ II RT (200 U/µl)	1 µl
RNase-freies H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

---

### 2.5.2 5`RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

Da durch PCR Reaktionen nicht immer vollständige Sequenzen amplifiziert werden konnten wurde zur Vervollständigung der 5`Enden ein 5`RACE durchgeführt. Bei dieser modifizierten RT wird ein genspezifischer Primer (GSP) verwendet und anschließend mit Hilfe einer *Terminalen deoxynukleotididyl Transferase* (TdT) ein Poly-dC-Schwanz an das 5`Ende der cDNA gehängt. In einem zweiten Schritt wird dann mit einem Oligo-dG-Anker-Primer (*Abridged Anchor Primer*) und weiteren transkriptspezifischen Primern (GSP2), sowie verschiedenen *Universal Amplification* Primern (UAP) das unbekannte Fragment via *nested* PCR amplifiziert (Abb. 9). Bei der *nested* PCR wird das Produkt einer PCR als *template* für eine erneute Amplifikation mit einem weiter in der Sequenz liegenden Primer verwendet. So können auch sehr geringe *template*-Mengen spezifisch amplifiziert werden. Für die 5` RACE Reaktion wurden 5 µg Gesamt-RNA aus humanem Nasengewebe eingesetzt und weiter nach den Angaben des Herstellers verfahren (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Anschließend wurden die PCR-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Agarosegel extrahiert und in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO TA Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert.

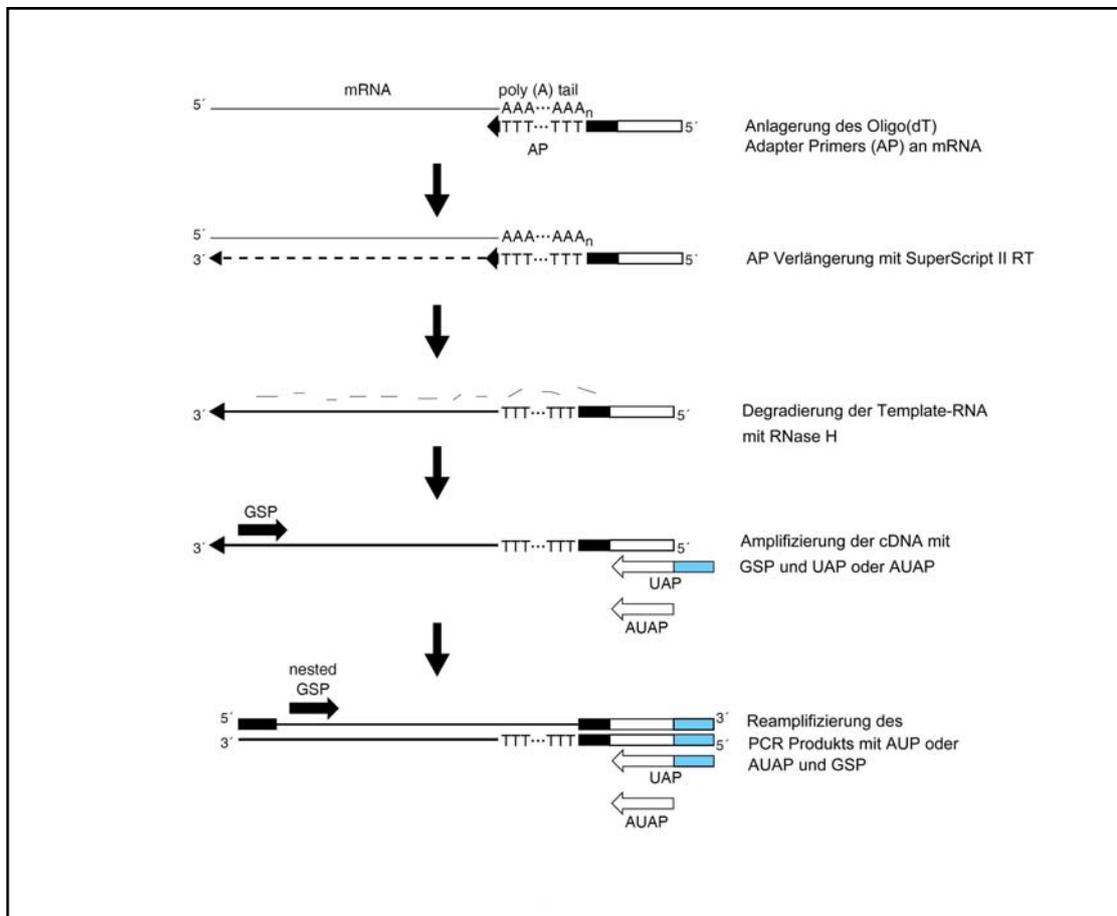


**Abbildung 9:** 5' RACE.

Übersicht über den 5' RACE Mechanismus (verändert nach dem 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Handbuch, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

### 2.5.3 3`RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

Genau wie bei dem zuvor beschriebenen Mechanismus wird bei diesem 3`RACE durch eine modifizierte RT-PCR ein unvollständiges C-terminales Sequenzende amplifiziert. Dafür wird die cDNA-Synthese mit einem Oligo(dT)-Ankerprimer durchgeführt. Die Amplifizierung der cDNA erfolgt wiederum mit einer *nested* PCR unter Verwendung eines sequenz- und eines ankerspezifischen Primers (Abb. 10). Für die 3`RACE Reaktion wurden, wie auch beim 5`RACE, 5 µg Gesamt-RNA aus humanem Nasengewebe eingesetzt und anschließend weiter nach den Angaben des Herstellers verfahren (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Die spezifischen Primersequenzen für die jeweiligen Verfahren befinden sich im Anhang (Tab. 14 und Tab. 15). Die PCR-Fragmente wurden in einer Gelelektrophorese analysiert, aus dem Gel isoliert und ebenfalls in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO TA Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) inkloniert.



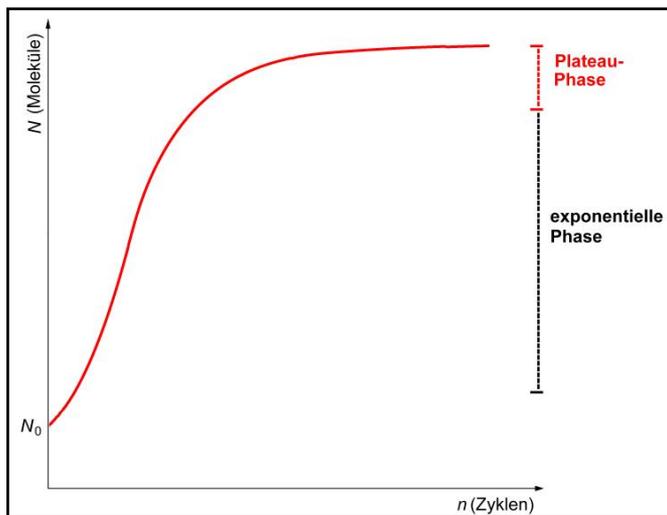
**Abbildung 10:** 3'RACE.

Zusammenfassung des 3'RACE Mechanismus (verändert nach dem 3'RACE *System for Rapid Amplification of cDNA Ends* Handbuch, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

#### 2.5.4 Semi-quantitative RT-PCR

Für die quantitative Bestimmung der hnENaC mRNA wurde eine semi-quantitative RT-PCR mit spezifischen Primern für die entsprechenden Gene der Untereinheiten durchgeführt (Anhang, Tab. 16). Typischerweise verläuft eine PCR exponentiell bis zu einer bestimmten Zyklenzahl und geht dann in eine Plateauphase über (Abb. 11).

In der ersten Phase der Amplifikation einer PCR ist die *template*-Menge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich *template*, Primer und Polymerase treffen, suboptimal. In der dritten Phase der Amplifikation steigt die Menge der Produkte (DNA, Pyrophosphat, Monophosphatnucleotide) an, so dass es zur Hemmung der PCR durch diese kommt. In dieser Phase hybridisieren die Produktfragmente miteinander und die Substrate werden langsam verbraucht. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet sich nur in der Phase dazwischen. Demnach ist es von großer Bedeutung, die PCR für eine vergleichende Bestimmung unter optimalen und kalkulierbaren Bedingungen ablaufen zu lassen. Bei der semi-quantitativen RT-PCR wird die PCR aus diesem Grund in der exponentiellen Phase gestoppt und zusätzlich ein sogenanntes *housekeeping gene* (HKG) verwendet, welches als externer Standard zusätzlich zur *template*-DNA amplifiziert wird. Dieses HKG sollte in dem zu untersuchenden Gewebe konstant exprimiert werden. In dieser Arbeit wurden für die semi-quantitative RT-PCR spezifische Primer für die hGAP-DH (humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) verwendet, die ein Fragment in der Größe von 239 bp einschließen. Die Erststrangsynthese (RT-PCR) erfolgte mit der SuperScript™ II-RT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Angaben des Herstellers wie unter 2.5.1 beschrieben. Von der synthetisierten cDNA wurden dann 2 µl mit spezifischen Primern für die jeweilige Untereinheit amplifiziert. Die Anzahl der Zyklen wurde so gewählt, dass der exponentielle Bereich der PCR nicht verlassen wurde.



**Abbildung 11:** Sigmoidaler Verlauf einer PCR.

Die amplifizierte Moleküle ( $N$ ) sind gegen die Zyklenzahl ( $n$ ) aufgetragen. Die *template*-Ausgangsmenge ( $N_0$ ) wird zunächst exponentiell vervielfältigt und geht zyklenzahlabhängig in eine Sättigungskurve (Plateau-Phase) über.

### Standard-Ansatz für semi-quantitative RT-PCR

10 X PCR-Puffer	5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ l
Primer <i>sense</i> (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Primer <i>antisense</i> (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
GAP-DH <i>sense</i> (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
GAP-DH <i>antisense</i> (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
<i>template</i> (cDNA)	2 $\mu$ l
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

Für die  $\alpha$ -ENaC Untereinheit wurde ein Standard-Cycler-Programm mit 35 Zyklen bei 56 °C verwendet. Für die  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC Untereinheiten wurde die PCR mit 32 Zyklen bei 58 °C durchgeführt.

#### **Standard-Cycler Programm**

---

Initiale Denaturierung	2 min	
Denaturierung	45 sec	} 32 oder 35 Zyklen
<i>annealing</i>	45 sec	
Elongation	1 min	
Final Elongation	7 min	

---

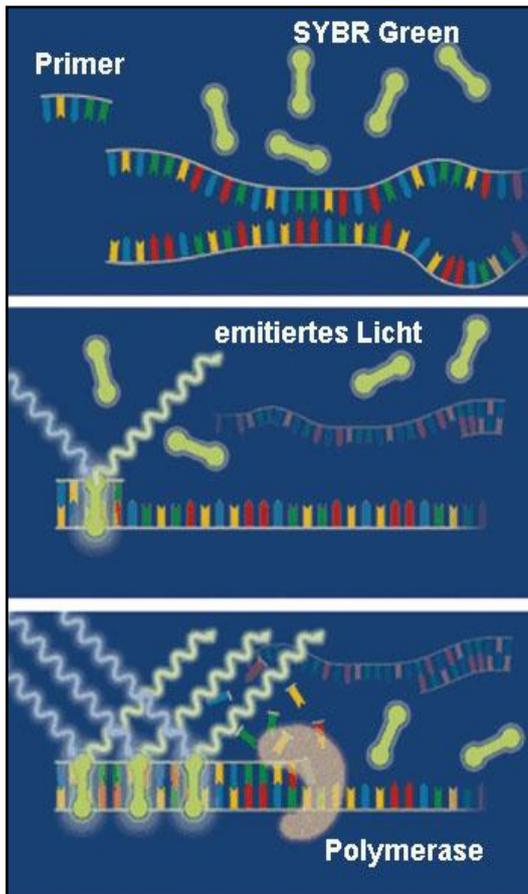
#### *2.5.5 Semi-quantitative Analyse der RT-PCR*

Die semi-quantitative RT-PCR wurde in einem 0,8 %igen EtBr-Agarosegel sichtbar gemacht und digitalisiert. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch über die *ImageJ analysis software* 1.36 (Abramoff et al. 2004). Das Verhältnis zwischen der Proben-RNA und GAP-DH wurde berechnet und somit konnte das Ergebnis normalisiert werden. Dadurch wurden Abweichungen, die z. B. durch eine Gewebepreparation entstehen, herausgerechnet und die Reaktionseffizienz der jeweiligen PCR bestimmt.

### 2.5.6 Real-time PCR mit Sybr Green I

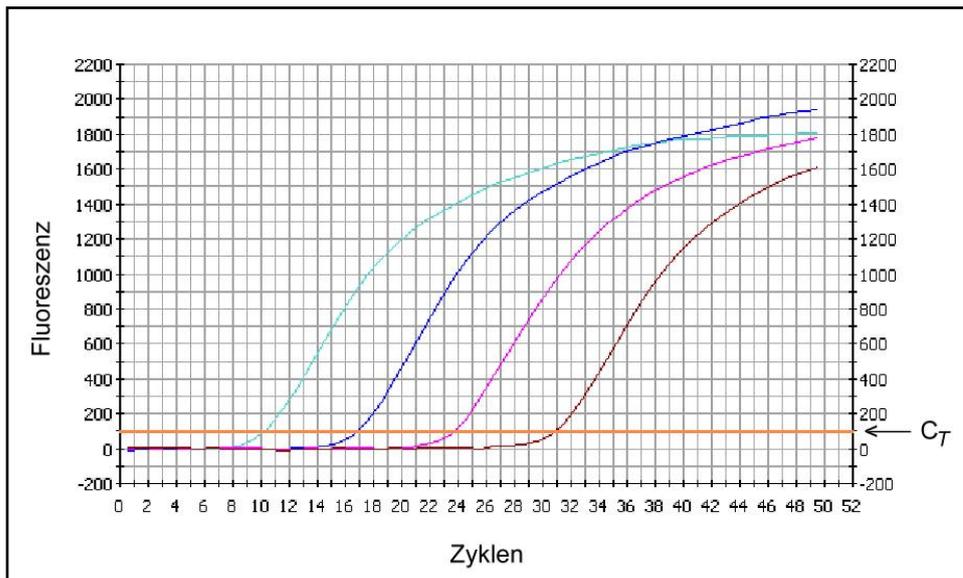
Eine genauere Methode der mRNA Quantifizierung als die semi-quantitative RT-PCR stellt die Echtzeit-PCR (*real-time* RT-PCR oder qRT-PCR) dar. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs (Sybr Green I), der unspezifisch in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA interkaliert und dadurch die Fluoreszenz messbar erhöht (Abb. 12). Der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei 498 nm und emittiert grünes Licht bei 522 nm. Detektiert wird der Fluoreszenzanstieg während und am Ende des PCR-Zyklus über den LightCycler, welcher mit einer speziellen Software (iCycler iQ Software Version 3.1 (Biorad, München, Deutschland)) individuell programmiert werden kann. Da, wie unter 2.5.4 beschrieben, am Anfang der PCR eine weitgehend exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente stattfindet, wird in diesem Bereich der sogenannte Schwellenwert ( $C_T$ -Wert) ermittelt. Der  $C_T$ -Wert ist der zyklenabhängige Zeitpunkt, bei dem sich das Fluoreszenzsignal gerade noch deutlich und konstant vom Hintergrund abhebt und ist umgekehrt proportional zur vorhandenen Nukleinsäuremenge zu Beginn der jeweiligen Reaktion. In Abb. 13 sind exemplarisch Fluoreszenzkurven für vier Amplifikationen mit unterschiedlichen *template*-DNA-Mengen abhängig von der Fluoreszenz und der Zyklenzahl dargestellt. Ein großer Vorteil dieser Methode ist es, dass die PCR-Fragmente nicht mehr gelelektrophoretisch aufgetrennt werden müssen, die Daten sofort verfügbar sind und das Kontaminationsrisiko somit gering ist. Es gibt zwei generelle Möglichkeiten eine Quantifizierung mittels *real-time* PCR durchzuführen. Zum einen die absolute Quantifizierung mit einer Kalibrierungskurve. Zum anderen die relative Quantifizierung, welche in dieser Arbeit verwendet wurde. Bei dieser Methode wird die Expression des Zielgens auf einen HKG-Index, welcher sich aus mehreren nicht regulierten HKG zusammensetzt, bezogen. Dafür wurde ein Struktur-bezogenes Gen (humanes  $\beta$ -Actin), ein Stoffwechsel-bezogenes Gen (humane GAP-DH) und ein Transkription-bezogenes Gen (humane RNA Polymerase IIa (RPIIa)) verwendet. Dieses Verfahren wird als Normalisierung der Expressionsergebnisse bezeichnet. Darüber hinaus wurden die unterschiedlichen *real-time* PCR-Effizienzen der untersuchten Faktoren mit in die Auswertung einbezogen. Somit handelt es sich um eine effizienz-korrigierte relative Quantifizierung mittels *real-time* PCR. Zunächst wurde, wie unter 2.5.1 beschrieben, die cDNA aus Polypengewebe-RNA synthetisiert. Anschließend wurde die cDNA von vier nicht-CF Patienten vereinigt um eine

statistische Streuung in diesem Kontrollgewebe zu verhindern. Die Oligonukleotid-Primer wurden spezifisch für humane cDNA ausgewählt und über Exon/Exon Grenzen der hENaC Sequenz gelegt, damit keine genomische DNA amplifiziert wurde. Die spezifischen Primer für die *real-time* PCR produzieren alle ein 100 bp langes Fragment und sind im Anhang in Tabelle 17 aufgelistet. Die *real-time* Experimente wurden mit dem iQ5 Real-Time PCR Detection System (Biorad, München, Deutschland) und dem iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Biorad, München, Deutschland) durchgeführt. Optimale Versuchsbedingungen wurden mit 12,5 µl 2 X iQ<sup>TM</sup> SYBER<sup>®</sup> Green Supermix (100 mM KCl, 40 mM Tris HCl, pH 8,4, 0,4 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), *iTaq* DNA Polymerase 50 U/ml, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I, 20 nM Fluorescein und Stabilisator), 5 µM von jedem Primer und 4 µl der zuvor verdünnten cDNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl erreicht. Die Amplifikation erfolgte zunächst durch 2 min *template*-Denaturierung bei 95 °C, gefolgt von 45 Zyklen für 10 sec bei 95 °C Denaturierung und einem kombinierten *annealing*- und Elongations-Schritt bei der jeweiligen transkriptspezifischen Primertemperatur (60 °C) für 30 sec. Am Ende jeder PCR wurde eine Schmelzkurve mit einer Temperaturerhöhung von 60 °C bis 95 °C in 3 °C min<sup>-1</sup> Schritten erstellt. Die Fluoreszenzerhöhung wurde alle 10 sec automatisch gemessen um eine Fluoreszenzveränderung zu detektieren und um die Amplifikationsspezifität zu gewährleisten. Um die Primer-Effizienz zu überprüfen, erfolgte eine Verdünnungsreihe (1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25) mit nicht-CF cDNA als *template*. Alle Proben wurden als Triplikate amplifiziert und die C<sub>T</sub>-Werte für weitere Berechnungen ermittelt.



**Abbildung 12:** Schematischer Verlauf einer *real-time* PCR.

Der Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green I interkaliert während der PCR unspezifisch in doppelsträngige DNA. Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist (verändert nach [www.thaiscience.com](http://www.thaiscience.com)).



**Abbildung 13:** Fluoreszenzkurven *real-time* PCR.

Fluoreszenzkurven für vier Amplifikationen mit unterschiedlichen *template*-DNA-Mengen. Die Zyklenzahl ist gegen die Fluoreszenz aufgetragen und der ermittelte  $C_T$ -Wert ( $\leftarrow$ ) befindet sich im exponentiellen Bereich der PCR.

### 2.5.7 *Real-time* PCR Datenanalyse

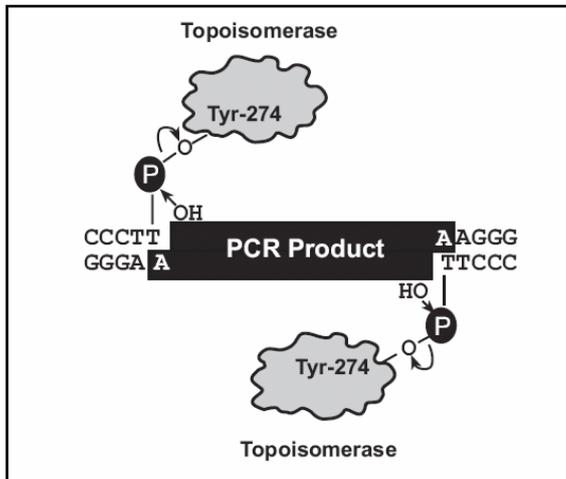
Die ermittelten Daten wurden mit der iCycler iQ Software Version 3.1 (Biorad, Munich, Germany) analysiert. Diese spezielle Software ermittelt den jeweiligen Zyklus, bei dem der Schwellenwert erreicht ist ( $C_T$ ), welcher sich immer während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion befindet. Für eine relative Quantifizierung wurden die erhaltenden  $C_T$ -Werte mit dem HKG-Index normalisiert. Die Normalisierung erfolgte durch eine Mittelung berechnet durch die REST<sup>®</sup>-Software (*Relative Expression Software Tool* V1.9.9<sup>©</sup>2005, Corbett Research Pty.Ltd.). Das verwendete mathematische Modell basiert auf der Ableitung der PCR-Effizienz und des mittleren Schwellenwertes (Pfaffl 2001; Pfaffl et al. 2002).

### 2.5.8 Klonierung von PCR-Fragmenten

Nach einer erfolgreichen PCR überführt man ein DNA-Fragment in einen Vektor, damit die DNA an Stabilität gewinnt und zudem noch in *E. coli* vermehrt sowie langfristig gelagert werden kann. Somit wurde nach der PCR und der Gelextraktion das Fragment in einen pCR<sup>®</sup>II-TOPO TA Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert.

### 2.5.9 Das TOPO TA System

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der pCR<sup>®</sup>II-TOPO TA Klonierungsvektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Es handelt sich dabei um einen bidirektionalen Klonierungsvektor, welcher zwei Promotorbindungsstellen aufweist (T7 und SP6). Dadurch werden mögliche anschließende Methoden wie eine Sequenzierung oder eine *in vitro* Transkription erleichtert. Der TOPO TA Vektor wird mit der *Vaccinia* Topoisomerase I aktiviert, welche die DNA an einer bestimmten Schnittstelle erkennt, schneidet und über eine 3`Phosphotyrosyl-Bindung kovalent an der DNA gebunden bleibt. Der TOPO-Vektor besitzt zwei solche benachbarte Schnittstellen. Die Selbstligation wird unterbunden, da beide Enden des linearen Vektors durch die Topoisomerase blockiert werden. Die Bindung zwischen dem Enzym und der Vektor-DNA wird von dem 5`Hydroxylrest der zu klonierenden DNA gelöst und kann in den so aktivierten Vektor ligieren. Für die vorherige Amplifikation der PCR-Fragmente wurde fast ausschließlich eine *Taq*-Polymerase verwendet, die an das 3`Ende ein Adenosintriphosphat hängt. Daher konnte dieses TOPO TA System, welches mit überhängenden Thymintriphosphaten arbeitet, direkt verwendet werden. Schematisch ist dieser Mechanismus in Abb. 14 skizziert.



**Abbildung 14:** Teilausschnitt pCR®II-TOPO TA Klonierungsvektor.

Die Topoisomerase I ist über einen Tyrosinrest (Tyr-274) kovalent an das 3'Phosphat des geschnittenen DNA-Strangs gebunden (TOPO TA Cloning® Handbuch, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

Die DNA-Konzentration wurde nach erfolgter Gelextraktion zunächst durch eine elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel abgeschätzt, um das einzusetzende Volumen gegebenenfalls zu variieren. Zumeist wurden jedoch 3 µl (10 - 100 ng) Gelextraktion für einen Klonierungsansatz verwendet. Nach Angaben des Herstellers war die Ligationsreaktion bereits nach 5 min beendet, konnte jedoch bis zu 30 min verlängert werden. In dieser Arbeit erfolgte die Reaktion für 25 min bei Raumtemperatur.

### 2.5.10 DNA-Sequenzierung und Sequenzdatenanalyse

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Genterprise in Mainz nach dem *Taq Dye Terminator Cycle Sequencing*-Prinzip durchgeführt. Mit Hilfe eines sogenannten *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) wurden die molekularen Sequenzen mit Einträgen aus einer Sequenz-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen. Durch eine Sequenzähnlichkeit kann so die Identität und/oder Funktion der Sequenz ermittelt werden. Die Sequenzen wurden anschließend in dem Computerprogramm GeneDoc 2.6 aligniert und zuvor gegebenenfalls mit dem Programm Chromas Version 1.55 (Technelysium Pty Ltd.) editiert. Für weitere Analysen wie die Kalkulation des Molekulargewichtes wurden die Serviceprogramme, die vom *Expasy Molecular Biology Server of the Swiss Institute of Bioinformatics* (<http://www.expasy.ch>) und dem *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) angeboten werden verwendet.

## 2.6 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

### 2.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte photometrisch nach Bradford (Bradford 1976). Bei dieser Methode bildet der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G/R 250 in saurer Lösung mit den Proteinseitenketten einen Farbkomplex. Durch diese Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm auf 595 nm. Diese Veränderung ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Probe.

### 2.6.2 Bradford Lösung

#### **Stammlösung (4X)**

Zunächst wurden 100 mg Coomassie-Brilliant Blue G 250 in 50 ml Ethanol p.a. (95 %ig) gelöst. Anschließend wurden 100 ml Phosphorsäure (85 %ig) hinzugegeben, um dann die Lösung mit H<sub>2</sub>O auf 250 ml aufzufüllen. Vor jedem Versuch wurde diese Lösung frisch 1:6 verdünnt.

### 2.6.3 Eichgerade zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Erstellung der Eichgerade erfolgte mit Rinderserumalbumin (BSA, bovines Serumalbumin). Eine BSA-Stammlösung (10 mg/ml) wurde zunächst 1:10 verdünnt und eine Verdünnungsreihe (1:1,3; 1:2; 1:4; 1:10) im linearen Messbereich erstellt. Die Bestimmung erfolgte zweifach und die Messwerte wurden als Eichgerade graphisch aufgetragen. Die Funktion dieser Geraden dient der Berechnung der Proteinproben.

Für den zu bestimmenden Ansatz wurde 1 ml Bradford-Verdünnung mit 20 µl Probe gemischt. Der Leerwert (H<sub>2</sub>O) und der Wert jeder Probe wurden ebenfalls zweifach bestimmt. Die Extinktion bei  $\lambda = 595$  nm wurde anfangs und nach exakt 10 min gemessen und die Zeit mit Zugabe der jeweiligen Probe gestartet.

#### 2.6.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode um Proteine anhand des Molekulargewichtes aufzutrennen. Die Proteine wurden mit dem starken Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) und DTT (Dithiothreitol) bzw.  $\beta$ -Mercaptoethanol und durch Erhitzen (95 °C) vollständig denaturiert und dissoziiert. Dabei reduziert das DTT die Disulfidbrücken der Proteinkomplexe und das SDS bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine. Durch diese Bindung wird die Eigenladung des Proteins durch eine negative Ladung überdeckt und die Proteinmonomere können somit nach dem Molekulargewicht separiert werden. Die Proteinproben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt, der neben SDS und DTT noch Bromphenolblau enthält (Laemmli 1970). Das Bromphenolblau wandert aufgrund der physikalischen Eigenschaften immer vor der Proteinfront und zeigt so den Fortlauf der Elektrophorese an. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsstandard mit Proteinen bekannter Molekulargewichte auf das Gel aufgetragen, um über einen Bandenvergleich das Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins abschätzen zu können.

#### 2.6.5 Probenvorbereitung

Die Gewebeproben, in der Regel humane Nasenpolypen, wurden zunächst in Lysispuffer bei 4 °C mit dem Ultra-Turrax zerkleinert und mit dem Ultraschallgerät homogenisiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach erfolgter Zentrifugation für 30 min bei 4000 g (4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung nach Bradford und die Proben wurden anschließend in Probenpuffer 5 min bei 95 °C denaturiert.

**Probenpuffer (4 X)**

---

Tris; pH 6,8	0,32 M
EDTA	4 mM
Glycerin	40 % (w/v)
SDS	8 % (w/v)
DTT (1 M)	10 % (v/v)
Bromphenolblau	0,04 % (w/v)

---

**Lysispuffer**

---

Tris	1 mM
NaCl	15 mM
EDTA	0,2 mM
Triton X-100	2 %

→ zum Lysispuffer immer frisch dazu:

Leupeptin	10 mM
Trypsininhibitor	1 mg/ml
Pefablock	25 $\mu$ M
PMSF	100 mM

### 2.6.6 Gelzusammensetzung (SDS-PAGE)

#### Trenngelgemisch für 6 Minigele

	7,5 %	10 %	12,5 %
30 % Acrylamid	7,5 ml	10 ml	12,5 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
H <sub>2</sub> O	14,8 ml	12,3 ml	9,8 ml
Temed	10 µl	10 µl	10 µl
10 % APS	200 µl	200 µl	200 µl

#### Sammelgelgemisch für 4 Minigele

	3,9 %
30 % Acrylamid	1,3 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	6,2 ml
Temed	10 µl
10 % APS	100 µl

#### Trenngelpuffer

Tris	1,5 M
SDS	0,4%

pH 8,8 mit konz. HCl einstellen

#### Sammelgelpuffer

Tris	0,5 M
SDS	0,4 %

pH 6,8 mit konz. HCl einstellen

### **Elektrophorese Laufpuffer**

---

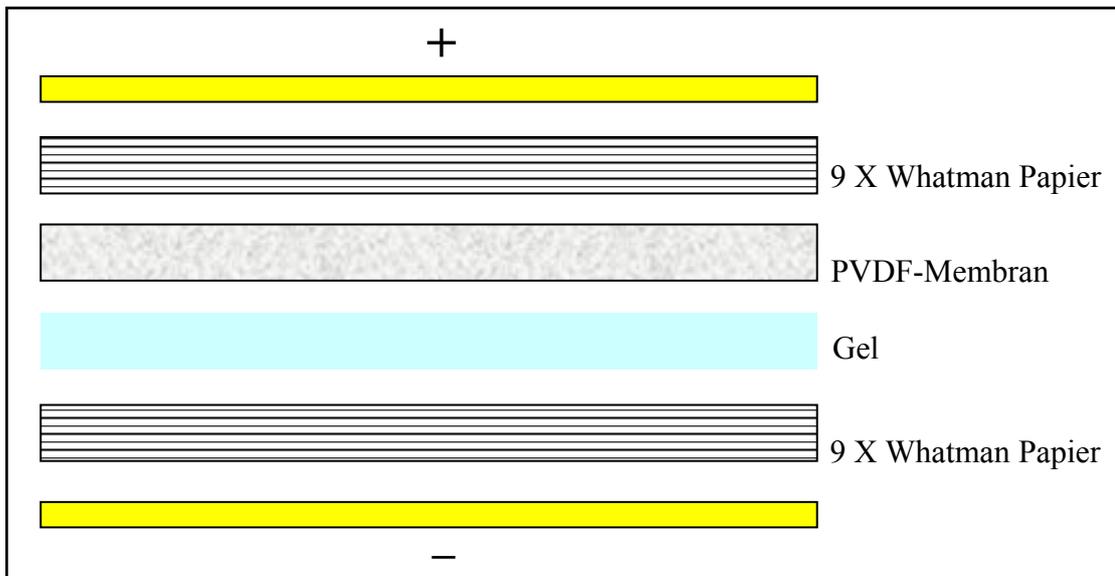
Tris	23 mM
Glycin	190 mM
SDS	0,2 %

---

pH 8,3

#### *2.6.7 Semidry Western Blot*

Die zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch das Anlegen der Stromstärke ( $0,8 \text{ mA cm}^{-2}$ ) auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran transferiert. Für diesen elektrophoretischen Transfer wurde das Semidry-Blot-System verwendet (Kyhse-Andersen 1984). Der prinzipielle Blot-Aufbau ist in Abbildung 15 schematisch dargestellt. Anschließend konnten an die Membran gebundene Proteine reversibel mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt und mit dem Scanner digitalisiert werden. Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte die Detektion des ENaC mit spezifischen Antikörpern für die drei UE. Dafür mussten zunächst die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da sich die Antikörper ansonsten an diese Bindungsstellen heften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen würden. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgte mit 5 % Magermilchpulver in TBST für mindestens 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  mit dem jeweiligen Antikörper in 5 % bzw. 1 % Magermilchpulver/ TBST verdünnt inkubiert (siehe Tab. 6). Danach wurde die Membran 3 X 15 min in TBST gewaschen und daraufhin für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper (IgG *goat anti-rabbit* Antikörper, konjugiert mit alkalischer Phosphatase), verdünnt 1:10000 in 5 % Magermilchpulver/TBST ( $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC Untereinheit), bzw. 1 % Magermilchpulver/ TBST ( $\beta$ -ENaC Untereinheit) inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder in TBST gewaschen und die Detektion der Proteine erfolgte dann kolorimetrisch mit NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chlorid) und BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salz).



**Abbildung 15:** Schematischer Aufbau eines semi-dry Western Blots.

Beim semi-dry Blotting werden Gel und immobilisierende PVDF-Membran zwischen die neun zuvor in Transferpuffer getränkten Filterpapiere gelegt, die direkten Kontakt zu zwei Graphitplatten mit hoher Leitfähigkeit haben. Da die Proteine durch das SDS eine negative Ladung aufweisen, wandern sie aus dem Gel in Richtung Anode und bleiben so auf der mit Methanol aktivierten PVDF-Membran hängen.

**Tabelle 6:** anti-ENaC Antikörper und Verdünnungen.

Protein	Antikörper	Verdünnung
human $\alpha$ -ENaC	anti- $\alpha$ -ENaC (PA1-920, Dianova, Hamburg)	1:2500 in 5 % Magermilchpulver/TBST
human $\beta$ -ENaC	anti- $\beta$ -ENaC (sc-21013, Santa Cruz, Heidelberg)	1:100 in 1 % Magermilchpulver/TBST
human $\gamma$ -ENaC	anti- $\gamma$ -ENaC (PA1-922, Dianova, Hamburg)	1:2500 in 5 % Magermilchpulver/TBST

### 2.6.8 Lösungen Semidry Western Blot

#### **Transferpuffer (pH 8,3)**

---

Glycin	39 mM
Tris	48 mM
SDS	0,037 %
Methanol	20 %

---

#### **10 X TBS (pH 7,5)**

---

Tris/HCl	10 mM
NaCl	1,5 M

---

#### **1 X TBST (1000 ml)**

---

10 X TBS	100 ml
Tween	3 ml
ad H <sub>2</sub> O	1000 ml

---

#### **Entwicklungspuffer (pH 9,5)**

---

Tris/HCl	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl	5 mM

---

NBT-Stammlösung: 50 mg/ml NBT in 70 % Dimethylformamid (DMF)

BCIP-Stammlösung: 50 mg/ml BCIP in 100 % Dimethylformamid (DMF)

### 2.6.9 Densitometrische Auswertung der Western Blots

Die PVDF-Membranen wurden eingescannt und die Proteinbanden densitometrisch und semi-quantitativ über die *IMAGEJ analysis software* 1.36 (Abramoff et al. 2004) ausgewertet.

### 3 *Ergebnisse*

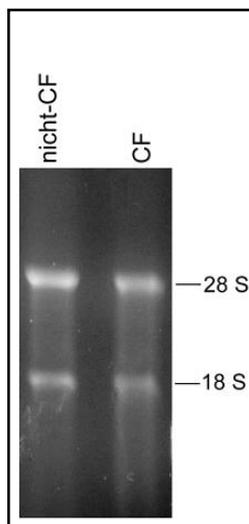
#### 3.1 *Molekulare Charakterisierung der $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -hnENaC Untereinheiten aus CF und nicht-CF Nasenepithel*

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mögliche Unterschiede zwischen dem ENaC aus humanem Nasenepithel und allen bisher untersuchten epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanälen sowie im Speziellen zwischen CF und nicht-CF Gewebe untersucht. An primären Zellkulturen aus operativ entfernten Nasenepithelzellen von Patienten mit chronischer Sinusitis konnte bereits gezeigt werden, dass die funktionellen Eigenschaften des humanen ENaC aus Nasenepithel (hnENaC) sich von denen der zuvor beschriebenen epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanäle aus anderen Geweben bzw. Organismen unterscheiden (Rückes et al. 1997). Darüber hinaus ist die Na<sup>+</sup>-Absorption über das humane Nasenepithel von CF Patienten und nicht-CF Patienten ebenfalls in zahlreichen pharmakologischen und biophysikalischen Aspekten verändert (Blank et al. 1997). Um einen Überblick über diese Unterschiede auf molekularer Ebene zu bekommen, wurde in dieser Arbeit die Sequenzstruktur des hnENaC aus CF und nicht-CF Gewebe charakterisiert und verglichen. Hierzu erfolgte zunächst eine Klonierung und Sequenzierung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -hnENaC Untereinheiten aus humanem CF und nicht-CF Polypengewebe. Für die Klonierung der drei hnENaC Untereinheiten aus humanem Nasenepithel von CF und nicht-CF Gewebe über RT-PCR wurden die jeweiligen spezifischen Oligonukleotidprimer anhand der bereits veröffentlichten hENaC-Sequenz aus respiratorischen Lungengewebe ausgesucht (Acc. No, NM\_001038, X\_87159, X\_87160, [http, www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)); die Primersequenzen sind in tabellarischer Form im Anhang zu finden (Tab. 13). Zur Vervollständigung nicht kompletter Klone wurde zusätzlich für die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -hnENaC Untereinheiten jeweils ein 5'RACE bzw. für die  $\alpha$ -hnENaC Untereinheit ein 3'RACE durchgeführt. Die erfolgreich klonierten und sequenzierten hnENaC UE wurden in einem Multi-Sequenz-Alignment untereinander und mit bereits sequenzierten humanen ENaC aus der Datenbank

([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) auf AS-Ebene verglichen. Die Nukleotidsequenzen der drei hnENaC UE aus CF und nicht-CF Nasenepithel befinden sich im Anhang.

### 3.1.1 Überprüfung der Qualität von Gesamt-RNA

Vor allen Anwendungen auf RNA Basis wurde die Qualität der aus den Nasenpolypen extrahierten Gesamt-RNA in einem 1 %igen RNA-Gel überprüft. Hierzu wurden 1,5 µg der zuvor photometrisch bestimmten Gesamt-RNA in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Die humane ribosomale RNA (rRNA) war nach erfolgreicher Präparation als zwei Banden bei 5,0 kb (28 S) und 1,9 kb (18 S) in einem Intensitätsverhältnis von 2:1 zu erkennen (Abb. 16), und somit intakt.



**Abbildung 16:** Gesamt-RNA.

Denaturierendes Agarosegel (1 %) von Gesamt-RNA aus CF und nicht-CF Gewebe. Es wurden 1,5 µg pro Geltasche aufgetragen. Die humane 28 S rRNA (5,0 kb) und die 18 S rRNA (1,9 kb) Banden zeigen das richtige Verhältnis von 2:1.

### 3.1.2 Molekulare Charakterisierung der $\alpha$ -hnENaC Untereinheit aus CF und nicht-CF Nasenepithel

Die Sequenzen der  $\alpha$ -hnENaC UE aus CF und nicht-CF Gewebe sind 3081 bp lang (hinzu kommt ein PolyA-Schwanz von 38 bp) und beinhalten einen offenen Leserahmen (OLR) von 2010 bp. Das Polyadenylierungssignal (AATAAA) befindet sich 18 bp *upstream* des PolyA-Schwanzes. Durch Translation ergibt sich ein Polypeptid von 669 AS mit einem berechneten Molekulargewicht von 75,63 kDa (<http://www.expasy.ch>). Darüber hinaus weisen beide Sequenzen aus CF und nicht-CF Gewebe einen T663A *single nucleotide polymorphism* (SNP) auf (Arai et al. 1999; Saxena et al. 2002). Ein SNP ist ein punktueller Unterschied in der Basensequenz, der bei Individuen innerhalb der menschlichen Population unterschiedlich sein kann. Ein Sequenzkonflikt beschreibt dagegen verschiedene Bezugsquellen in der Datenbank mit unterschiedlichen Angaben zu der betreffenden Base. Der SNP T663A befindet sich C-terminal im Bereich der cytoplasmatischen Domäne (Tab. 10). In dieser Position erfolgte ein Tausch der mittelgroßen, polaren AS Thr (T) gegen die kleinere, hydrophobe AS Ala (A). Ein Sequenzausschnitt ist in Tabelle 7 dargestellt. Untereinander verglichen sind die Sequenzen der  $\alpha$ -hnENaC UE aus CF und nicht-CF Gewebe identisch und als AS-Alignment in Abbildung 17 im Vergleich mit dem  $\alpha$ -hENaC aus Lunge (Acc. No, NM\_001038), Niere (Acc. No, L\_29007) und der  $\alpha$ -hENaC Sequenz aus einer vereinigten Probe von Darm/Niere/Magen (DNM) (Acc. No, BC\_062613) dargestellt. Die  $\alpha$ -hENaC DNM Sequenz weist ebenfalls den beschriebenen T663A SNP auf.

**Tabelle 7:** Position des SNP T663A innerhalb der  $\alpha$ -hnENaC Sequenz.

Sequenzausschnitt SNP T663A  $\alpha$ -ENaC:

---

**643** AYATLGPRPSPGGGSA**GASSS** **T** CPLGGP **669**

**643** AYATLGPRPSPGGGSA**GASSS** **A** CPLGGP **669**

---

	*	20	*	40	*	60	
nicht-CF :	MEGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFE						60
CF :	MEGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFE						60
DNM :	MEGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFE						60
Lunge :	MEGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFE						60
Niere :	MEGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQOPTAEEEEALIEFHRSYRELFE						60

	*	80	*	100	*	120	
nicht-CF :	FFCNNTTIHGAI RLVCSQHNRMKTAFWAVLWLCTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINL						120
CF :	FFCNNTTIHGAI RLVCSQHNRMKTAFWAVLWLCTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINL						120
DNM :	FFCNNTTIHGAI RLVCSQHNRMKTAFWAVLWLCTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINL						120
Lunge :	FFCNNTTIHGAI RLVCSQHNRMKTAFWAVLWLCTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINL						120
Niere :	FFCNNTTIHGAI RLVCSQHNRMKTAFWAVLWLCTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINL						120

	*	140	*	160	*	180	
nicht-CF :	NSDKLVFPVAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRDDL						180
CF :	NSDKLVFPVAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRDDL						180
DNM :	NSDKLVFPVAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRDDL						180
Lunge :	NSDKLVFPVAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRDDL						180
Niere :	NSDKLVFPVAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITEQTLFDLYKYSSFTTLVAGSRSRDDL						180

	*	200	*	220	*	240	
nicht-CF :	RGTLPHP LQRLRVPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSDCFYQT						240
CF :	RGTLPHP LQRLRVPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSDCFYQT						240
DNM :	RGTLPHP LQRLRVPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSDCFYQT						240
Lunge :	RGTLPHP LQRLRVPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSDCFYQT						240
Niere :	RGTLPHP LQRLRVPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSDCFYQT						240

	*	260	*	280	*	300	
nicht-CF :	YSSGVDVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHHP						300
CF :	YSSGVDVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHHP						300
DNM :	YSSGVDVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHHP						300
Lunge :	YSSGVDVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHHP						300
Niere :	YSSGVDVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHHP						300

	*	320	*	340	*	360	
nicht-CF :	MYGNCYTFNDKNSNLWSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEPA						360
CF :	MYGNCYTFNDKNSNLWSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEPA						360
DNM :	MYGNCYTFNDKNSNLWSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEPA						360
Lunge :	MYGNCYTFNDKNSNLWSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEPA						360
Niere :	MYGNCYTFNDKNSNLWSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEPA						360

	*	380	*	400	*	420	
nicht-CF :	FMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRGGDYGDCTKNGSDVPVENLYPSKYTQQVCIHSC						420
CF :	FMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRGGDYGDCTKNGSDVPVENLYPSKYTQQVCIHSC						420
DNM :	FMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRGGDYGDCTKNGSDVPVENLYPSKYTQQVCIHSC						420
Lunge :	FMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRGGDYGDCTKNGSDVPVENLYPSKYTQQVCIHSC						420
Niere :	FMDDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRGGDYGDCTKNGSDVPVENLYPSKYTQQVCIHSC						420

	*	440	*	460	*	480	
nicht-CF :	FQESMIKECGCAYIFYPRPQNVEYCDYRKHSSWGICYCYKLQVDFSSDHLGCFTKCRKPCS						480
CF :	FQESMIKECGCAYIFYPRPQNVEYCDYRKHSSWGICYCYKLQVDFSSDHLGCFTKCRKPCS						480
DNM :	FQESMIKECGCAYIFYPRPQNVEYCDYRKHSSWGICYCYKLQVDFSSDHLGCFTKCRKPCS						480
Lunge :	FQESMIKECGCAYIFYPRPQNVEYCDYRKHSSWGICYCYKLQVDFSSDHLGCFTKCRKPCS						480
Niere :	FQESMIKECGCAYIFYPRPQNVEYCDYRKHSSWGICYCYKLQVDFSSDHLGCFTKCRKPCS						480

	*	500	*	520	*	540	
nicht-CF :	VTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNNKRNGVAKVNIFFKELNYKTNSESP						: 540
CF :	VTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNNKRNGVAKVNIFFKELNYKTNSESP						: 540
DNM :	VTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNNKRNGVAKVNIFFKELNYKTNSESP						: 540
Lunge :	VTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNNKRNGVAKVNIFFKELNYKTNSESP						: 540
Niere :	VTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNNKRNGVAKVNIFFKELNYKTNSESP						: 540
	*	560	*	580	*	600	
nicht-CF :	SVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLLVIMFLMLLRRFRSRYWSPGRGGR						: 600
CF :	SVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLLVIMFLMLLRRFRSRYWSPGRGGR						: 600
DNM :	SVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLLVIMFLMLLRRFRSRYWSPGRGGR						: 600
Lunge :	SVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLLVIMFLMLLRRFRSRYWSPGRGGR						: 600
Niere :	SVTMVTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLLVIMFLMLLRRFRSRYWSPGRGGR						: 600
	*	620	*	640	*	660	
nicht-CF :	GAQEVASTLASSPPSHFCPHPMSLSLSQPGPAPSPALTAPPPAYATLGPRPSPGGSAGAS						: 660
CF :	GAQEVASTLASSPPSHFCPHPMSLSLSQPGPAPSPALTAPPPAYATLGPRPSPGGSAGAS						: 660
DNM :	GAQEVASTLASSPPSHFCPHPMSLSLSQPGPAPSPALTAPPPAYATLGPRPSPGGSAGAS						: 660
Lunge :	GAQEVASTLASSPPSHFCPHPMSLSLSQPGPAPSPALTAPPPAYATLGPRPSPGGSAGAS						: 660
Niere :	GAQEVASTLASSPPSHFCPHPMSLSLSQPGPAPSPALTAPPPAYATLGPRPSPGGSAGAS						: 660
nicht-CF :	SSACPLGGP						: 669
CF :	SSACPLGGP						: 669
DNM :	SSACPLGGP						: 669
Lunge :	SSTCPLGGP						: 669
Niere :	SSTCPLGGP						: 669

**Abbildung 17:** Aminosäuresequenz  $\alpha$ -hnENaC UE im Vergleich zu anderen Geweben.

Die  $\alpha$ -hnENaC Aminosäuresequenz aus CF und nicht-CF Gewebe wurde mit der Sequenz aus DNM, Lunge und Niere verglichen. Die  $\alpha$ -hnENaC Aminosäuresequenz aus CF und nicht-CF Gewebe sowie die Sequenz des  $\alpha$ -hENaC DNM sind identisch und weisen gegenüber der  $\alpha$ -hENaC Aminosäuresequenz aus Lunge und Niere einen T663A SNP auf (blau markiert).

### 3.1.3 Molekulare Charakterisierung der $\beta$ -hnENaC Untereinheit aus CF und nicht-CF Nasenepithel

Das komplette Referenzgen aus der bereits veröffentlichten  $\beta$ -ENaC-Sequenz aus humanem Lungengewebe (Acc. No. NM\_X87159) umfasst insgesamt 2544 bp. Der innerhalb dieser Arbeit klonierte und sequenzierte OLR Bereich der  $\beta$ -hnENaC UE aus CF und nicht-CF humanem Nasenepithel umfasst 1923 bp. Das Protein der  $\beta$ -hnENaC UE besteht aus 640 AS mit einem Molekulargewicht von 72,67 kDa (<http://www.expasy.ch>). Bei der Sequenzanalyse der  $\beta$ -hnENaC UE konnten ein A314G Sequenzkonflikt (Voilley et al. 1995) zu dem hENaC aus Lungengewebe und ein A336P SNP (McDonald et al. 1995; Arai et al. 1999) im Vergleich mit dem hENaC aus Nierenepithel (Acc. No. L\_36593) in beiden CF und nicht-CF  $\beta$ -hnENaC Sequenzen detektiert werden. Sowohl der Sequenzkonflikt als auch der SNP befinden sich in der extrazellulären Domäne der  $\beta$ -hnENaC UE (Tab. 10). Der Sequenzkonflikt beschreibt einen Austausch der kleinen, hydrophoben AS Ala (A) gegen die kleinste, hydrophile AS Gly (G). Der SNP beinhaltet einen Tausch der AS Ala (A) gegen die mittelgroße, hydrophobe AS Pro (P). Auch die  $\beta$ -hnENaC UE aus CF und nicht-CF humanem Nasenepithel zeigen auf molekularer Sequenzebene keine Unterschiede (Abb. 18).

**Tabelle 8:** Position des Sequenzkonfliktes A314G und des SNP A336P innerhalb der  $\beta$ -hnENaC Sequenz.

Sequenzausschnitt Konflikt A314G  $\beta$ -ENaC:

---

**301** IGQEDYVPFLAST **A** GVRLMLHEQRSY **320**

**301** IGQEDYVPFLAST **G** GVRLMLHEQRSY **320**

---

Sequenzausschnitt SNP A336P  $\beta$ -ENaC:

---

**316** VRLMLHEQRSYPFIRDEGIY **A** SGTE **340**

**316** VRLMLHEQRSYPFIRDEGIY **P** SGTE **340**

---

	*	20	*	40	*	60	
nicht-CF :	MHVKKYLLRGLHRLQRGPGYTYKELLVWYCDNTNTHGPKRIICEGPKKKAMWFLLTLLFA						: 60
CF :	MHVKKYLLKGLHRLQKGPYTYKELLVWYCDNTNTHGPKRIICEGPKKKAMWFLLTLLFA						: 60
Lunge :	MHVKKYLLKGLHRLQKGPYTYKELLVWYCDNTNTHGPKRIICEGPKKKAMWFLLTLLFA						: 60
Niere :	MHVKKYLLKGLHRLQKGPYTYKELLVWYCDNTNTHGPKRIICEGPKKKAMWFLLTLLFA						: 60
	*	80	*	100	*	120	
nicht-CF :	ALVCWQWGIFIRTYLSWEVSVSLVSGFKTMDFPVAVTICNASPFKYSKIKHLLKDLDELME						: 120
CF :	ALVCWQWGIFIRTYLSWEVSVSLVSGFKTMDFPVAVTICNASPFKYSKIKHLLKDLDELME						: 120
Lunge :	ALVCWQWGIFIRTYLSWEVSVSLVSGFKTMDFPVAVTICNASPFKYSKIKHLLKDLDELME						: 120
Niere :	ALVCWQWGIFIRTYLSWEVSVSLVSGFKTMDFPVAVTICNASPFKYSKIKHLLKDLDELME						: 120
	*	140	*	160	*	180	
nicht-CF :	AVLERILAPELSHANATRNLNFSIWNHTPLVVIDERNPHHPMVLDLFGDNHNGLTSSAS						: 180
CF :	AVLERILAPELSHANATRNLNFSIWNHTPLVVIDERNPHHPMVLDLFGDNHNGLTSSAS						: 180
Lunge :	AVLERILAPELSHANATRNLNFSIWNHTPLVVIDERNPHHPMVLDLFGDNHNGLTSSAS						: 180
Niere :	AVLERILAPELSHANATRNLNFSIWNHTPLVVIDERNPHHPMVLDLFGDNHNGLTSSAS						: 180
	*	200	*	220	*	240	
nicht-CF :	EKICNAHGCKMAMRLCSLNRTQCTFRNFTSATQALTEWYILQATNIFAQVPQOELVMSY						: 240
CF :	EKICNAHGCKMAMRLCSLNRTQCTFRNFTSATQALTEWYILQATNIFAQVPQOELVMSY						: 240
Lunge :	EKICNAHGCKMAMRLCSLNRTQCTFRNFTSATQALTEWYILQATNIFAQVPQOELVMSY						: 240
Niere :	EKICNAHGCKMAMRLCSLNRTQCTFRNFTSATQALTEWYILQATNIFAQVPQOELVMSY						: 240
	*	260	*	280	*	300	
nicht-CF :	PGEQMILACLFGAEPNYRNFTSIFYPHYGNCYIFNWGMTEKALPSANPGTEFGLKLILD						: 300
CF :	PGEQMILACLFGAEPNYRNFTSIFYPHYGNCYIFNWGMTEKALPSANPGTEFGLKLILD						: 300
Lunge :	PGEQMILACLFGAEPNYRNFTSIFYPHYGNCYIFNWGMTEKALPSANPGTEFGLKLILD						: 300
Niere :	PGEQMILACLFGAEPNYRNFTSIFYPHYGNCYIFNWGMTEKALPSANPGTEFGLKLILD						: 300
	*	320	*	340	*	360	
nicht-CF :	IGQEDYVPFLASTAGVRLMLHEQRSYPFIRDEGIYAMSGTETSIGVLVDKLRMGEPYSP						: 360
CF :	IGQEDYVPFLASTAGVRLMLHEQRSYPFIRDEGIYAMSGTETSIGVLVDKLRMGEPYSP						: 360
Lunge :	IGQEDYVPFLASTAGVRLMLHEQRSYPFIRDEGIYAMSGTETSIGVLVDKLRMGEPYSP						: 360
Niere :	IGQEDYVPFLASTAGVRLMLHEQRSYPFIRDEGIYAMSGTETSIGVLVDKLRMGEPYSP						: 360
	*	380	*	400	*	420	
nicht-CF :	CTVNGSEVPVQNFYSDYNTTYSIQACLRSCFQDHMIRNCNCGHYLYPLPRGEKYCNNRDF						: 420
CF :	CTVNGSEVPVQNFYSDYNTTYSIQACLRSCFQDHMIRNCNCGHYLYPLPRGEKYCNNRDF						: 420
Lunge :	CTVNGSEVPVQNFYSDYNTTYSIQACLRSCFQDHMIRNCNCGHYLYPLPRGEKYCNNRDF						: 420
Niere :	CTVNGSEVPVQNFYSDYNTTYSIQACLRSCFQDHMIRNCNCGHYLYPLPRGEKYCNNRDF						: 420
	*	440	*	460	*	480	
nicht-CF :	PDWAHCYSDLQMSVAQRETCIGMCKESCNDTQYKMTISMADWPSEASEDWIFHVLSQERD						: 480
CF :	PDWAHCYSDLQMSVAQRETCIGMCKESCNDTQYKMTISMADWPSEASEDWIFHVLSQERD						: 480
Lunge :	PDWAHCYSDLQMSVAQRETCIGMCKESCNDTQYKMTISMADWPSEASEDWIFHVLSQERD						: 480
Niere :	PDWAHCYSDLQMSVAQRETCIGMCKESCNDTQYKMTISMADWPSEASEDWIFHVLSQERD						: 480
	*	500	*	520	*	540	
nicht-CF :	QSTNITLSRKGIVKLNIFYQEFNYRTIEESAANNIVWLLSNLGGQFGFWMGGSVLCLIEF						: 540
CF :	QSTNITLSRKGIVKLNIFYQEFNYRTIEESAANNIVWLLSNLGGQFGFWMGGSVLCLIEF						: 540
Lunge :	QSTNITLSRKGIVKLNIFYQEFNYRTIEESAANNIVWLLSNLGGQFGFWMGGSVLCLIEF						: 540
Niere :	QSTNITLSRKGIVKLNIFYQEFNYRTIEESAANNIVWLLSNLGGQFGFWMGGSVLCLIEF						: 540

	*	560	*	580	*	600	
nicht-CF :	GEI I I D F V W I T I I K L V A L A K S L R Q R R A Q A S Y A G P P P T V A E L V E A H T N F G F Q P D T A P R S P N						: 600
CF :	GEI I I D F V W I T I I K L V A L A K S L R Q R R A Q A S Y A G P P P T V A E L V E A H T N F G F Q P D T A P R S P N						: 600
Lunge :	GEI I I D F V W I T I I K L V A L A K S L R Q R R A Q A S Y A G P P P T V A E L V E A H T N F G F Q P D T A P R S P N						: 600
Niere :	GEI I I D F V W I T I I K L V A L A K S L R Q R R A Q A S Y A G P P P T V A E L V E A H T N F G F Q P D T A P R S P N						: 600
	*	620	*	640			
nicht-CF :	T G P Y P S E Q A L P I P G T P P P N Y D S L R L Q P L D V I E S D S E G D A I						* : 640
CF :	T G P Y P S E Q A L P I P G T P P P N Y D S L R L Q P L D V I E S D S E G D A I						* : 640
Lunge :	T G P Y P S E Q A L P I P G T P P P N Y D S L R L Q P L D V I E S D S E G D A I						* : 640
Niere :	T G P Y P S E Q A L P I P G T P P P N Y D S L R L Q P L D V I E S D S E G D A I						* : 640

**Abbildung 18:** Aminosäuresequenz  $\beta$ -hnENaC UE im Vergleich zu anderen Geweben.

Die  $\beta$ -hnENaC Aminosäuresequenz aus CF und nicht-CF Gewebe wurde mit der Sequenz aus humanem Lungengewebe und Niere verglichen. Die  $\beta$ -hnENaC Aminosäuresequenzen aus CF und nicht-CF Gewebe sind identisch. Beide weisen einen A314G Sequenzkonflikt zu dem  $\beta$ -hENaC aus Lunge und einen A336P SNP gegenüber der  $\beta$ -hENaC Aminosäuresequenz aus Niere auf (blau markiert).

### 3.1.4 Molekulare Charakterisierung der $\gamma$ -hnENaC Untereinheit aus CF und nicht-CF Nasenepithel

Der 1950 bp lange OLR der CF bzw. nicht-CF  $\gamma$ -hnENaC UE wurde ebenfalls erfolgreich kloniert und sequenziert. Alle SNP und Konflikte sind in der CF und nicht-CF  $\gamma$ -hnENaC UE vorhanden, so dass auch diese UE sich in den untersuchten Geweben nicht unterscheidet. Die Translation ergab für die  $\gamma$ -hnENaC UE 649 AS mit einem theoretischen Molekulargewicht von 74,22 kDa (<http://www.expasy.ch>). Beide CF und nicht-CF  $\gamma$ -hnENaC Sequenzen enthielten drei SNP (R178W, A502P, A614S (McDonald et al. 1995; Arai et al. 1999; Voilley et al. 1995)) im Vergleich mit dem  $\gamma$ -ENaC aus Niere (Acc. No. L\_36592) und fünf Sequenzkonflikte (F339S, A350T, Y369S, D375G, S458R (Voilley et al. 1995)) zu dem  $\gamma$ -ENaC aus humanem Lungengewebe (Acc. No. X\_87160). Darüber hinaus zeigte ein Sequenzvergleich mit dem humanen  $\gamma$ -ENaC aus Plazenta (Acc. No. BC\_059391) keinen Unterschied zu dem  $\gamma$ -hnENaC aus CF und nicht-CF Epithelien (Abb. 19). Bei dem ersten SNP handelt es sich um einen Tausch der großen basischen AS Arg (R) gegen die große aromatische AS Trp (W). Ein weiterer SNP beinhaltet einen Tausch der kleinen hydrophoben AS Ala (A) zu der etwas größeren AS Pro (P), die jedoch die gleichen physiko-chemischen Eigenschaften aufweist. Diese beiden SNP sind in der extrazellulären Domäne lokalisiert. Der dritte SNP zeigt einen AS Tausch von Ala (A) zu der kleinen, polaren AS Ser (S) und befindet sich in der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne (Tab. 10). Die jeweiligen Sequenzausschnitte sind in Tabelle 9 aufgeführt. Der erste Sequenzkonflikt ist durch einen Tausch der hydrophoben und aromatischen AS Phe (F) gegen die kleine, hydrophile AS Ser (S) charakterisiert. Der Tausch der kleinen hydrophoben AS Ala (A) gegen die lipophile und aromatische AS Thr (T) beschreibt einen weiteren Sequenzkonflikt innerhalb der  $\gamma$ -hnENaC UE. Die lipophile und aromatische AS Tyr (T) ist in einem weiteren Sequenzkonflikt gegen die kleine hydrophile AS Ser (S) ausgetauscht. In den folgenden Konflikten ist der Tausch der sauren und meist negativ geladene AS Asp (D) gegen die einfache AS Gly (G) sowie der Ersatz der kleinen hydrophilen AS Ser (S) durch die basische und meist positiv geladene AS Arg (R) beschrieben.

**Tabelle 9:** Position der SNP und der Sequenzkonflikte innerhalb der  $\gamma$ -hnENaC Sequenz.Sequenzausschnitte der SNP und Konflikte innerhalb der  $\gamma$ -hnENaC UE

SNP R178W	Konflikt F339S
<b>168</b> K GKARDFFTG <b>R</b> KRKVGGSIH <b>188</b>	<b>330</b> IIHRQDEYP <b>F</b> VEDVGTEIETA <b>350</b>
<b>168</b> K GKARDFFTG <b>W</b> KRKVGGSIH <b>188</b>	<b>330</b> IIHRQDEYP <b>S</b> VEDVGTEIETA <b>350</b>
SNP A502P	Konflikt A350T
<b>492</b> VNKKLNKTDL <b>A</b> KLLIFYKDLN <b>522</b>	<b>340</b> VEDVGTEIET <b>A</b> MVTSIGMHLT <b>360</b>
<b>492</b> VNKKLNKTDL <b>P</b> KLLIFYKDLN <b>522</b>	<b>340</b> VEDVGTEIET <b>T</b> MVTSIGMHLT <b>360</b>
SNP A614S	Konflikt Y369S
<b>604</b> TFNSALHLPP <b>A</b> LGTQVPGTPP <b>624</b>	<b>360</b> TESFKLSEP <b>Y</b> SQCTEDGSDVP <b>380</b>
<b>600</b> TFNSALHLPP <b>S</b> LGTQVPGTPP <b>624</b>	<b>360</b> TESFKLSEP <b>S</b> SQCTEDGSDVP <b>380</b>
	Konflikt D375G
	<b>360</b> TESFKLSEPYSQCTE <b>D</b> GSDVP <b>380</b>
	<b>360</b> TESFKLSEPYSQCTE <b>G</b> GSDVP <b>380</b>
	Konflikt S458R
	<b>430</b> QSVCKEAC <b>S</b> FKEWTLTSLAQ <b>470</b>
	<b>430</b> QSVCKEAC <b>R</b> FKEWTLTSLAQ <b>470</b>

	*	20	*	40	*	60	
nicht-CF :	MAPGEKIKAKIKKNLPVTGPQAPTIKELMRWYCLNTNTHGCRRIVVSRGLRRLRLWIGFT						: 60
CF :	MAPGEKIKAKIKKNLPVTGPQAPTIKELMRWYCLNTNTHGCRRIVVSRGLRRLRLWIGFT						: 60
Plazenta :	MAPGEKIKAKIKKNLPVTGPQAPTIKELMRWYCLNTNTHGCRRIVVSRGLRRLRLWIGFT						: 60
Niere :	MAPGEKIKAKIKKNLPVTGPQAPTIKELMRWYCLNTNTHGCRRIVVSRGLRRLRLWIGFT						: 60
Lunge :	MAPGEKIKAKIKKNLPVTGPQAPTIKELMRWYCLNTNTHGCRRIVVSRGLRRLRLWIGFT						: 60
	*	80	*	100	*	120	
nicht-CF :	LTAVALILWQCALLVFSFYTVSVSIKVHFRKLDPAVTICNINPYKYSTVRHLLADLEQE						: 120
CF :	LTAVALILWQCALLVFSFYTVSVSIKVHFRKLDPAVTICNINPYKYSTVRHLLADLEQE						: 120
Plazenta :	LTAVALILWQCALLVFSFYTVSVSIKVHFRKLDPAVTICNINPYKYSTVRHLLADLEQE						: 120
Niere :	LTAVALILWQCALLVFSFYTVSVSIKVHFRKLDPAVTICNINPYKYSTVRHLLADLEQE						: 120
Lunge :	LTAVALILWQCALLVFSFYTVSVSIKVHFRKLDPAVTICNINPYKYSTVRHLLADLEQE						: 120
	*	140	*	160	*	180	
nicht-CF :	TREALKSLYGFPEsrkrREAESWNSVSEgKQPRFShRIPLLI FDQDEK GKARDFF TGRKR						: 180
CF :	TREALKSLYGFPEsrkrREAESWNSVSEgKQPRFShRIPLLI FDQDEK GKARDFF TGRKR						: 180
Plazenta :	TREALKSLYGFPEsrkrREAESWNSVSEgKQPRFShRIPLLI FDQDEK GKARDFF TGRKR						: 180
Niere :	TREALKSLYGFPEsrkrREAESWNSVSEgKQPRFShRIPLLI FDQDEK GKARDFF TGRKR						: 180
Lunge :	TREALKSLYGFPEsrkrREAESWNSVSEgKQPRFShRIPLLI FDQDEK GKARDFF TGRKR						: 180
	*	200	*	220	*	240	
nicht-CF :	KVGGSIIHKASNMHIESKQVVGfQLCSNDTSDCATYTFSSGINAIQEWYKLHYMNIMAQ						: 240
CF :	KVGGSIIHKASNMHIESKQVVGfQLCSNDTSDCATYTFSSGINAIQEWYKLHYMNIMAQ						: 240
Plazenta :	KVGGSIIHKASNMHIESKQVVGfQLCSNDTSDCATYTFSSGINAIQEWYKLHYMNIMAQ						: 240
Niere :	KVGGSIIHKASNMHIESKQVVGfQLCSNDTSDCATYTFSSGINAIQEWYKLHYMNIMAQ						: 240
Lunge :	KVGGSIIHKASNMHIESKQVVGfQLCSNDTSDCATYTFSSGINAIQEWYKLHYMNIMAQ						: 240
	*	260	*	280	*	300	
nicht-CF :	VPLEKKINMSYSAEELLVTCFFDGVSCDARNFTLFHHPMHGNCYTFNNRENETILSTSMG						: 300
CF :	VPLEKKINMSYSAEELLVTCFFDGVSCDARNFTLFHHPMHGNCYTFNNRENETILSTSMG						: 300
Plazenta :	VPLEKKINMSYSAEELLVTCFFDGVSCDARNFTLFHHPMHGNCYTFNNRENETILSTSMG						: 300
Niere :	VPLEKKINMSYSAEELLVTCFFDGVSCDARNFTLFHHPMHGNCYTFNNRENETILSTSMG						: 300
Lunge :	VPLEKKINMSYSAEELLVTCFFDGVSCDARNFTLFHHPMHGNCYTFNNRENETILSTSMG						: 300
	*	320	*	340	*	360	
nicht-CF :	GSEYGLQVILYINEEEYNPFLVSSSTGAKVIIHRQDEYPFVEDVGTEIETAMVTSIGMHLT						: 360
CF :	GSEYGLQVILYINEEEYNPFLVSSSTGAKVIIHRQDEYPFVEDVGTEIETAMVTSIGMHLT						: 360
Plazenta :	GSEYGLQVILYINEEEYNPFLVSSSTGAKVIIHRQDEYPFVEDVGTEIETAMVTSIGMHLT						: 360
Niere :	GSEYGLQVILYINEEEYNPFLVSSSTGAKVIIHRQDEYPFVEDVGTEIETAMVTSIGMHLT						: 360
Lunge :	GSEYGLQVILYINEEEYNPFLVSSSTGAKVIIHRQDEYPSVEDVGTEIETMVTISIGMHLT						: 360
	*	380	*	400	*	420	
nicht-CF :	ESFKLSEPYsQCTEDGSDVPIRNIYNAAYSLQICLHSCFQTKMVEKCGCAQYSQPLPPAA						: 420
CF :	ESFKLSEPYsQCTEDGSDVPIRNIYNAAYSLQICLHSCFQTKMVEKCGCAQYSQPLPPAA						: 420
Plazenta :	ESFKLSEPYsQCTEDGSDVPIRNIYNAAYSLQICLHSCFQTKMVEKCGCAQYSQPLPPAA						: 420
Niere :	ESFKLSEPYsQCTEDGSDVPIRNIYNAAYSLQICLHSCFQTKMVEKCGCAQYSQPLPPAA						: 420
Lunge :	ESFKLSEPSQCTEGSDVPIRNIYNAAYSLQICLHSCFQTKMVEKCGCAQYSQPLPPAA						: 420
	*	440	*	460	*	480	
nicht-CF :	NYCNYQQHPNWMYCYYQLHRAFVQEELGCQSVCKEACSFKEWTLTTSLAQWPSVSEKWL						: 480
CF :	NYCNYQQHPNWMYCYYQLHRAFVQEELGCQSVCKEACSFKEWTLTTSLAQWPSVSEKWL						: 480
Plazenta :	NYCNYQQHPNWMYCYYQLHRAFVQEELGCQSVCKEACSFKEWTLTTSLAQWPSVSEKWL						: 480
Niere :	NYCNYQQHPNWMYCYYQLHRAFVQEELGCQSVCKEACSFKEWTLTTSLAQWPSVSEKWL						: 480
Lunge :	NYCNYQQHPNWMYCYYQLHRAFVQEELGCQSVCKEACRFKEWTLTTSLAQWPSVSEKWL						: 480

	*	500	*	520	*	540	
nicht-CF :	LPVLTWDQGRQVNKKLNKTDLAKLLIFYKDLNQRSIMESPANSIEMLLSNFGGQLGLWMS						: 540
CF :	LPVLTWDQGRQVNKKLNKTDLAKLLIFYKDLNQRSIMESPANSIEMLLSNFGGQLGLWMS						: 540
Plazenta :	LPVLTWDQGRQVNKKLNKTDLAKLLIFYKDLNQRSIMESPANSIEMLLSNFGGQLGLWMS						: 540
Niere :	LPVLTWDQGRQVNKKLNKTDL <b>S</b> KLKLLIFYKDLNQRSIMESPANSIEMLLSNFGGQLGLWMS						: 540
Lunge :	LPVLTWDQGRQVNKKLNKTDLAKLLIFYKDLNQRSIMESPANSIEMLLSNFGGQLGLWMS						: 540
	*	560	*	580	*	600	
nicht-CF :	CSVVCVIEIIEVFFIDFFSIIARRQWQKAKEWWAWKQAPPCPEAPRSPQGQDNPALDIDD						: 600
CF :	CSVVCVIEIIEVFFIDFFSIIARRQWQKAKEWWAWKQAPPCPEAPRSPQGQDNPALDIDD						: 600
Plazenta :	CSVVCVIEIIEVFFIDFFSIIARRQWQKAKEWWAWKQAPPCPEAPRSPQGQDNPALDIDD						: 600
Niere :	CSVVCVIEIIEVFFIDFFSIIARRQWQKAKEWWAWKQAPPCPEAPRSPQGQDNPALDIDD						: 600
Lunge :	CSVVCVIEIIEVFFIDFFSIIARRQWQKAKEWWAWKQAPPCPEAPRSPQGQDNPALDIDD						: 600
	*	620	*	640	*		
nicht-CF :	DLPTFNSALHLPALGTQVPGTPPPKYNTLRLERAFSNQLTDTQMLDEL*						: 649
CF :	DLPTFNSALHLPALGTQVPGTPPPKYNTLRLERAFSNQLTDTQMLDEL*						: 649
Plazenta :	DLPTFNSALHLPALGTQVPGTPPPKYNTLRLERAFSNQLTDTQMLDEL*						: 649
Niere :	DLPTFNSALHLP <b>S</b> LGTQVPGTPPPKYNTLRLERAFSNQLTDTQMLDEL*						: 649
Lunge :	DLPTFNSALHLPALGTQVPGTPPPKYNTLRLERAFSNQLTDTQMLDEL*						: 649

**Abbildung 19:** Aminosäuresequenz  $\gamma$ -hnENaC UE im Vergleich zu anderen Geweben.

Die  $\gamma$ -hnENaC Aminosäuresequenz aus CF und nicht-CF Gewebe wurde mit der Sequenz aus Plazenta, humanem Lungengewebe und Niere verglichen. Die  $\gamma$ -hnENaC Aminosäuresequenzen aus CF und nicht-CF Gewebe sind untereinander und mit der Sequenz aus humaner Plazenta identisch; diese Sequenzen weisen fünf Sequenzkonflikte (F339S, A350T, Y369S, D375G, S458R) zu dem  $\gamma$ -hENaC aus Lunge und drei SNP (R178W, A502P, A614S) gegenüber der  $\gamma$ -hENaC Aminosäuresequenz aus Niere auf (blau markiert).

**Tabelle 10:** Lokalisation der Sequenzabschnitte des ENaC in der Zellmembran (Übersicht).

Die Bereiche der jeweiligen Untereinheiten, in denen die Sequenzkonflikte und SNP der hnENaC UE vorwiegend auftreten, sind rot markiert.

	$\alpha$ -ENaC (SCNN1A)	$\beta$ -ENaC (SCNN1B)	$\gamma$ -ENaC (SCNN1G)
Lokalisation	AS	AS	AS
Cytoplasmatische Domäne (N-Terminus)	1-85	1-50	1-55
Transmembrandomäne I	86-106	51-71	56-76
Extrazelluläre Domäne	107-562	72-532	77-541
Transmembrandomäne II	563-583	533-553	542-562
Cytoplasmatische Domäne (C-Terminus)	584-669	554-640	563-649

Die generellen Eigenschaften wie Sequenzlänge und Molekulargewicht stimmen hervorragend mit zuvor publizierten Daten für den hENaC aus Niere und Lunge überein und sind für den hnENaC in Tabelle 11 zusammengefasst. Die vollständigen Sequenzen der nicht-CF  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -hnENaC cDNA sind in der NCBI-GenBank verfügbar, die Sequenzen der CF  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -hnENaC cDNA sind identisch zu den nicht-CF Sequenzen.

**Tabelle 11:** Allgemeine Charakteristika des ENaC aus humanem Nasenepithel.

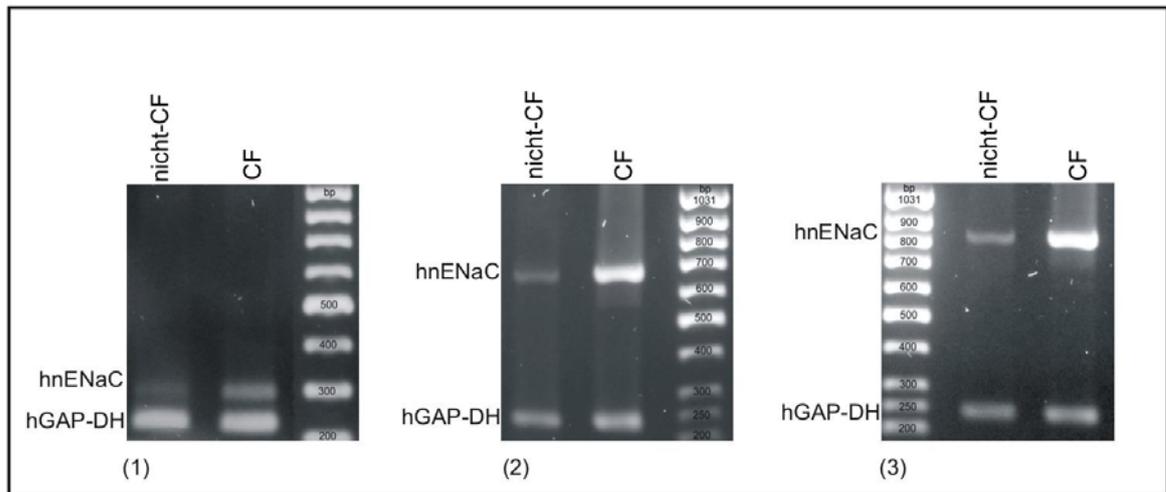
Genname	SCNN1A	SCNN1B	SCNN1G
Accession number	DQ_402522	DQ_402523	DQ_402524
Proteinname	humaner Amilorid-sensitiver Natriumkanal ( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -UE)		
Gewebe	Humane CF und nicht-CF Nasenpolypen		
Länge	669 AS	640 AS	649 AS
Molekulargewicht	75,63 kDa	72,67 kDa	74,22 kDa

### 3.2 *Expression der $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -hnENaC Untereinheiten aus CF und nicht-CF Nasenepithel*

Da auf molekularer Ebene keine Unterschiede zwischen dem hnENaC aus CF und nicht-CF Gewebe detektiert werden konnten und somit die beobachteten funktionellen Unterschiede unerklärt blieben, erfolgten Experimente, die Aufschluss über das Expressionsverhalten der drei UE in diesem Gewebe geben sollten. Zu diesem Zweck wurde als Vorversuch eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt und zur exakten Datenüberprüfung eine *real-time* RT-PCR angeschlossen.

#### 3.2.1 *Semi-quantitative RT-PCR*

Inwiefern die erhöhte Na<sup>+</sup>-Absorption bei CF-Patienten mit einer gesteigerten mRNA-Expression und Menge der drei hnENaC Untereinheiten in Korrelation steht, wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht. Zunächst wurde hierzu die Zyklenzahl, die *template*-Menge und die *annealing*-Temperatur der hnENaC spezifischen Primer optimiert, so dass ein semi-quantitativer Vergleich erst möglich wurde. Für die  $\alpha$ -ENaC Untereinheit wurde ein Standard-Cycler-Programm mit 35 Zyklen bei 56 °C verwendet. Für die  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC Untereinheiten wurde die PCR mit 32 Zyklen bei 58 °C durchgeführt. Die Anzahl der Zyklen sollte normalerweise für semi-quantitative Analysen so gewählt werden, dass der exponentielle Bereich der PCR nicht verlassen wird. Bei einer Zyklenzahl von über 30 befindet sich die PCR nicht mehr in diesem Bereich. Dennoch waren die Zyklenzahlen für die drei hnENaC UE so optimiert, dass die amplifizierten Fragmente im Agarosegel gerade sichtbar und auswertbar waren. Nach der densitometrischen Auswertung wurden die CF und nicht-CF Proben dann untereinander verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Menge der  $\alpha$ -hnENaC UE mRNA 1,6-fach (n = 9), die der  $\beta$ -hnENaC UE 3,5-fach (n = 7) und die mRNA Menge der  $\gamma$ -hnENaC UE 5-fach (n = 7) in dem untersuchten CF Gewebe im Gegensatz zu nicht-CF Gewebe erhöht ist (Abb. 20). Als externe Kontrolle und für die Normalisierung der Proben wurde hGAP-DH verwendet.



**Abbildung 20:** Semi-quantitative RT-PCR.

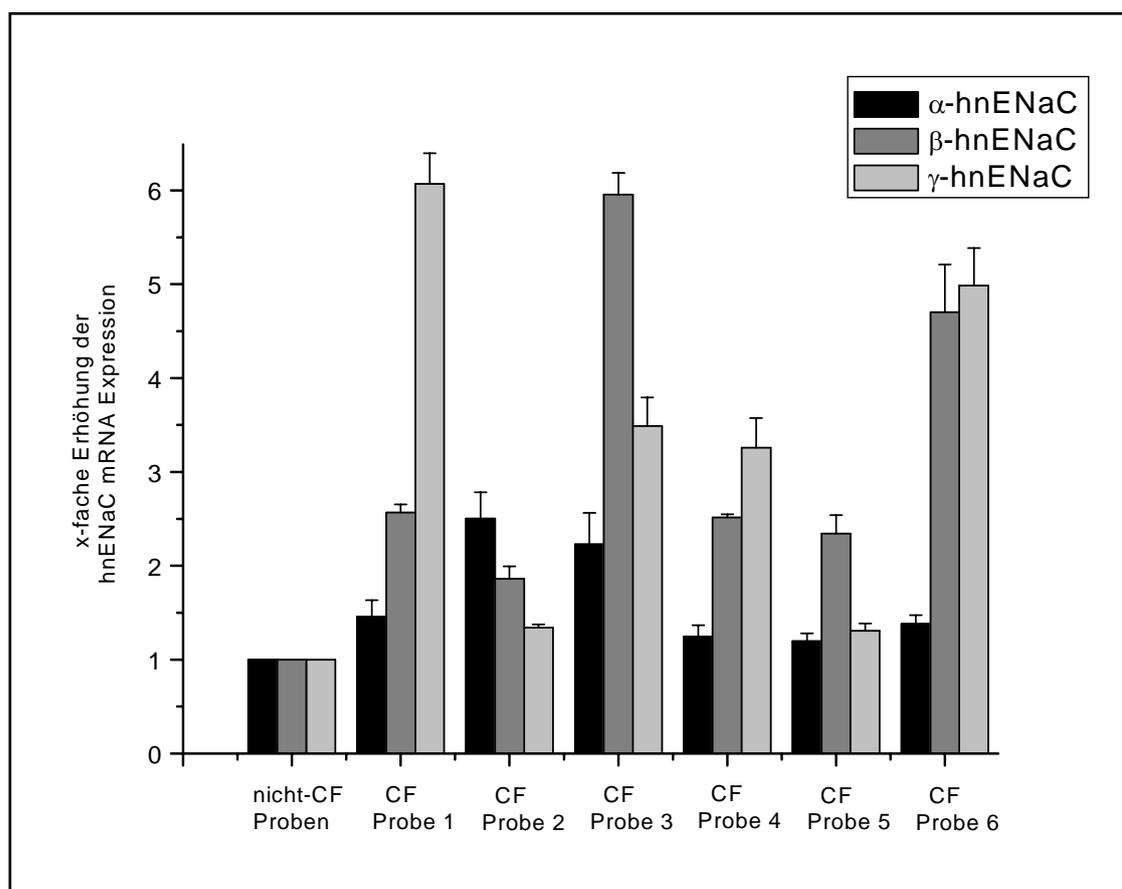
In dieser Abbildung ist die semi-quantitative RT-PCR der drei ENaC UE ( $\alpha$ -hnENaC (1),  $\beta$ -hnENaC (2) und  $\gamma$ -hnENaC (3)) aus CF und nicht-CF Gewebe dargestellt. Die Fragmente wurden in einem 0,8 %igem Agarosegel aufgetrennt und densitometrisch ausgewertet. Die Expression der  $\alpha$ -UE (306 bp Fragment) ist 1,6-fach ( $n = 9$ ), die der  $\beta$ -UE (688 bp Fragment) ist 3,5-fach ( $n = 7$ ) und die der  $\gamma$ -UE (832 bp Fragment) 5-fach ( $n = 7$ ) in CF Gewebe erhöht im Vergleich mit nicht-CF Nasenepithel. Als externer Standard wurde hGap-DH (239 bp Fragment) verwendet.

### 3.2.2 *real-time PCR*

Bei der *real-time PCR* erfolgt die Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus und somit unterscheidet sich diese Messmethode von der semi-quantitativen PCR, die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet wird. Eine genauere Quantifizierung wird dadurch ermöglicht, dass die Fluoreszenz mit der Menge der PCR-Produkte proportional ansteigt und direkt detektiert wird. Darüberhinaus müssen die PCR-Fragmente nicht gelelektrophoretisch aufgetrennt werden, so dass eine direkte Datenanalyse folgen kann. Bei dieser *real-time PCR* erfolgte die Berechnung der mRNA Transkriptionsmenge über eine relative Quantifizierung mittels HKG-Index. Die  $C_T$  Werte wurden wie zuvor beschrieben durch die REST<sup>®</sup> Software ausgewertet. Anschließend wurde die Expression der  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -hnENaC UE in humanem Nasengewebe von sechs CF Patienten der vereinigten Probe von vier nicht-CF Patienten (normalisiert auf 1,0) relativ gegenübergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass im Allgemeinen die Zusammensetzung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -hnENaC UE in humanem CF Nasengewebe individuellen Schwankungen unterliegt, die Menge der mRNA Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe jedoch deutlich und signifikant erhöht ist. Für einen anschaulichen und generellen Vergleich wurden die ermittelten Werte der einzelnen CF Proben zunächst wie folgt gemittelt: Die mRNA Expression der  $\alpha$ -hnENaC UE der CF Gruppe zeigte eine mittlere 1,7-fache Erhöhung im Vergleich zu der nicht-CF Gruppe. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die  $\beta$ -hnENaC mRNA Expression in humanem CF Nasengewebe um das 3,3-fache erhöht ist. Des Weiteren konnte ein Anstieg der mittleren  $\gamma$ -hnENaC mRNA Expression in CF Gewebe um das 3,4-fache im Vergleich zu gesundem Gewebe beobachtet werden. Diese Werte stimmen hervorragend mit den zuvor durch eine semi-quantitative RT-PCR ermittelten Daten überein. Die exakten individuellen Werte der hnENaC UE der einzelnen CF Patienten sind in Tabelle 12 aufgeführt und zudem in einem Diagramm (Abb. 21) dargestellt.

**Tabelle 12:** Individuelle mRNA Expression jedes einzelnen CF Patienten im Vergleich zu nicht-CF Patienten (normalisiert auf 1,0).

CF Patient	$\alpha$ -hnENaC	$\beta$ -hnENaC	$\gamma$ -hnENaC
	mRNA Expression (x-fache Erhöhung)	mRNA Expression (x-fache Erhöhung)	mRNA Expression (x-fache Erhöhung)
CF Probe 1	1,46 ± 0,17	2,57 ± 0,09	6,07 ± 0,33
CF Probe 2	2,50 ± 0,28	1,86 ± 0,13	1,34 ± 0,03
CF Probe 3	2,23 ± 0,33	5,96 ± 0,23	3,49 ± 0,31
CF Probe 4	1,25 ± 0,12	2,51 ± 0,04	3,26 ± 0,32
CF Probe 5	1,20 ± 0,08	2,34 ± 0,20	1,31 ± 0,08
CF Probe 6	1,38 ± 0,09	4,70 ± 0,51	4,99 ± 0,40



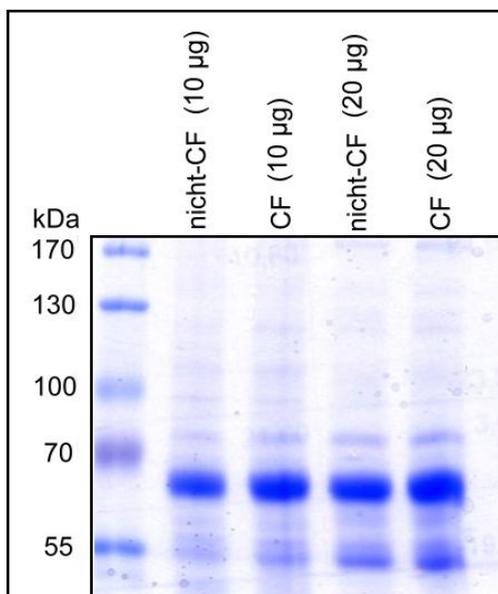
**Abbildung 21:** *Real-time* PCR der drei hnENaC Untereinheiten von CF Patienten im relativen Vergleich mit nicht-CF Gewebe.

*Real-time* PCR der drei hnENaC Untereinheiten ( $\alpha$ -hnENaC,  $\beta$ -hnENaC und  $\gamma$ -hnENaC) von CF Patienten im relativen Vergleich mit nicht-CF Gewebe. Die Werte wurden durch *real-time* PCR ermittelt und als  $x$ -facher Anstieg  $\pm$  S.E. der mRNA Expression jeder einzelnen UE und jedes CF Patienten dargestellt. Die relative mRNA Expression der vereinigten nicht-CF Gruppe wurde auf 1,0 (100 %) normalisiert. Die  $\alpha$ -hnENaC mRNA Expression wurde als schwarzer Balken dargestellt; für die CF Proben wurden folgende Werte ermittelt: CF Probe 1: 1,46-fach  $\pm$  0,17; CF Probe 2: 2,5-fach  $\pm$  0,28; CF Probe 3: 2,23-fach  $\pm$  0,33; CF Probe 4: 1,25-fach  $\pm$  0,12; CF Probe 5: 1,20-fach  $\pm$  0,08; CF Probe 6: 1,38-fach  $\pm$  0,09. Die  $\beta$ -hnENaC mRNA Expression ist als dunkel-grauer Balken aufgeführt; die Werte für die CF Proben sind: CF Probe 1: 2,57-fach  $\pm$  0,09; CF Probe 2: 1,86-fach  $\pm$  0,13; CF Probe 3: 5,96-fach  $\pm$  0,23; CF Probe 4: 2,51-fach  $\pm$  0,04; CF Probe 5: 2,34-fach  $\pm$  0,20; CF Probe 6: 4,70-fach  $\pm$  0,51. Die  $\gamma$ -hnENaC mRNA Expression der CF Proben wurde als hell-grauer Balken dargestellt; die Werte der CF Proben sind: CF Probe 1: 6,07-fach  $\pm$  0,33; CF Probe 2: 1,34-fach  $\pm$  0,03; CF Probe 3: 3,49-fach  $\pm$  0,31; CF Probe 4: 3,26-fach  $\pm$  0,32; CF Probe 5: 1,31-fach  $\pm$  0,08; CF Probe 6: 4,99-fach  $\pm$  0,40.

### 3.3 Biochemische Charakterisierung der $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -hnENaC Untereinheiten aus CF und nicht-CF Nasenepithel

Die beobachteten Unterschiede bezüglich der erhöhten hnENaC mRNA Expression in humanem CF Nasenepithel wurden anschließend auf proteinbiochemischer Ebene analysiert. Hierzu wurde Gesamtprotein aus CF und nicht-CF Nasenpolypen aufgereinigt und zwischen 10 und 20  $\mu\text{g}$  mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Um sicherzustellen, dass identische Proteinmengen für beide Proben aufgetragen wurden, erfolgte nach jeder SDS-PAGE eine Coomassie Färbung des Gesamtproteins aus CF und nicht-CF Nasengewebe. Exemplarisch ist in Abbildung 22 die mit Coomassie gefärbte SDS-PAGE für 10 und 20  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein aus CF und nicht-CF Gewebe dargestellt.

Mit spezifischen anti-ENaC Antikörpern wurde die jeweilige Untereinheit im Western Blot detektiert. Anschließend erfolgte eine densitometrische Quantifizierung der hnENaC Untereinheiten in CF und nicht-CF Gewebe, um weitere Aussagen über eine Proteinexpression in den untersuchten Proben vornehmen zu können.



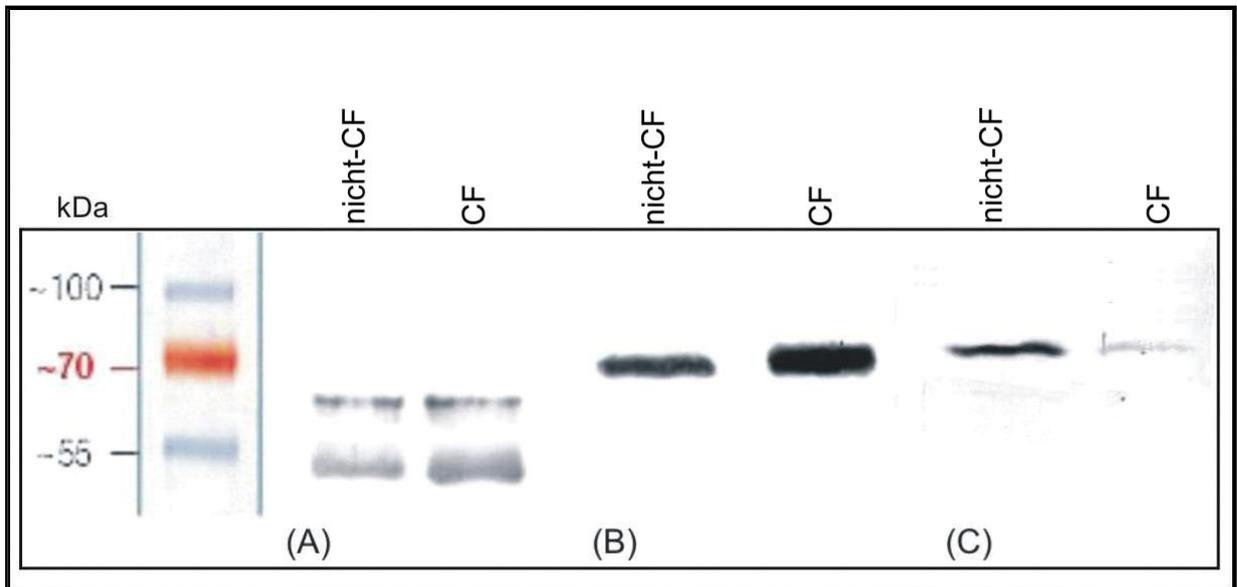
**Abbildung 22:** SDS-PAGE.

Es wurden jeweils 10 und 20  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein aus CF und nicht-CF Nasenpolypengewebe nach erfolgter SDS-PAGE mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Die Proteinmengen der jeweiligen Ansätze sind vergleichbar.

### *3.3.1 Nachweis des hnENaC in CF und nicht-CF Nasenepithel im Western Blot*

Der Nachweis des hnENaC aus CF und nicht-CF Gewebe erfolgte mit Hilfe von Western Blot Analysen generell und semi-quantitativ. Nach der SDS-PAGE konnte eine distinkte  $\alpha$ -hnENaC spezifische Bande im Bereich von 66 kDa detektiert werden. Darüber hinaus wurde durch den anti- $\alpha$ -ENaC spezifischen Antikörper eine zweite deutliche Bande im Bereich von 55 kDa in CF und nicht-CF Nasenpolypengewebe nachgewiesen. Die 66 kDa große Bande und das Fragment im Bereich von 55 kDa repräsentieren wahrscheinlich eine ENaC-Reifeform, welche durch eine proteolytische Spaltung des Kanals durch Proteasen hervorgeht. Diese proteolytische Modifikation könnte z. B. durch die Protease Furin während des Reifungsprozesses erfolgen und würde so eine Aktivierung des ENaC bewirken (Hughey et al. 2003; Hughey et al. 2004a).

Der anti- $\beta$ -ENaC Antikörper erkannte eine spezifische Bande im Bereich von 73 kDa und mit dem anti- $\gamma$ -ENaC Antikörper wurde eine Bande von ca. 74 kDa in CF und nicht-CF Nasenepithel identifiziert. Alle drei detektierten hnENaC UE wurden von den spezifischen Antikörpern in unglykolisierter Form detektiert. Das Molekulargewicht der  $\beta$ - and  $\gamma$ -hnENaC UE stimmt mit der zuvor berechneten unglykolisierten Form und den bereits publizierten Daten überein (McDonald et al. 1995). In Abbildung 23 sind repräsentative Western Blots für alle drei hnENaC UE aus CF und nicht-CF Nasengewebe dargestellt.



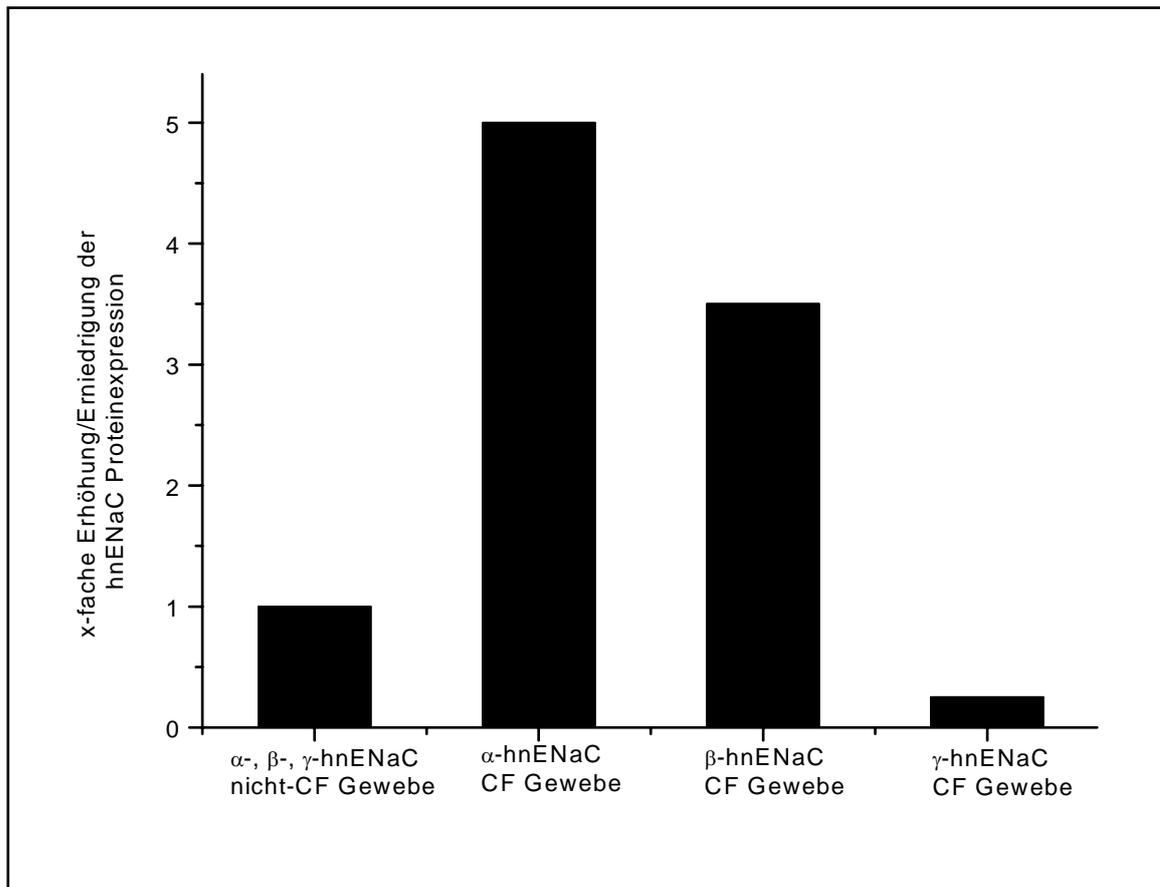
**Abbildung 23:** Western Blots der drei hnENaC UE aus CF und nicht-CF Nasenepithel.

Gesamtprotein aus humanem Nasengewebe von CF und nicht-CF Gewebe wurde mit 2 % Triton X-100 isoliert und in einem 7,5 %igen SDS-Acrylamidgel aufgetrennt. Um die einzelnen UE nachzuweisen wurden ENaC spezifische Antikörper verwendet. In beiden Proben wurden jeweils zwei  $\alpha$ -ENaC spezifische Banden im Bereich von 66 und 55 kDa detektiert (A), eine  $\beta$ -ENaC spezifische Bande bei 73 kDa (B) und eine  $\gamma$ -ENaC spezifische bande bei 74 kDa (C).

### 3.3.2 Densitometrische Quantifizierung der hnENaC Untereinheiten aus CF und nicht-CF Nasenepithel

Um die detektierten hnENaC spezifischen Banden densitometrisch zu quantifizieren, wurden die Western Blots zunächst digitalisiert und die Menge des jeweiligen hnENaC Proteins anschließend mit dem *ImageJ* Programm 1.36 (Abramoff et al. 2004) bestimmt und ausgewertet.

Das beobachtete Muster der Proteinexpression in CF und nicht-CF Gewebe ist offensichtlich stark unterschiedlich. Es konnte gezeigt werden, dass im Western Blot die Menge der unteren  $\alpha$ -hnENaC spezifischen Bande in CF Nasenepithel im Gegensatz zu normalen Nasenepithel 5-fach und die Proteinmenge der  $\beta$ -hnENaC UE in CF Gewebe 3,5-fach erhöht ist. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen ist die Menge an  $\gamma$ -hnENaC Protein in CF Gewebe 4-fach im Vergleich zu den nicht-CF Proben erniedrigt. Die semi-quantitative densitometrische Auswertung der spezifischen hnENaC Banden ist in Abbildung 24 gezeigt.



**Abbildung 24:** Semi-quantitative Proteinexpression des hnENaC.

Semi-quantitative Proteinexpression des hnENaC in CF und nicht-CF Nasenpolypengewebe. Die Expression der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -hnENaC UE wurde auf Proteinebene in CF und nicht-CF Nasenepithel in einem Western Blot untersucht und densitometrisch mit *ImageJ* 1.36 quantifiziert. Es wurde eine 5-fache Erhöhung des  $\alpha$ -hnENaC Proteins ( $n = 5$ ), eine 3,5-fache Erhöhung des  $\beta$ -hnENaC ( $n = 6$ ) und eine 4-fache Erniedrigung des  $\gamma$ -hnENaC Proteins ( $n = 5$ ) in CF Gewebe verglichen mit nicht-CF Gewebe detektiert. Die relative Proteinexpression des nicht-CF hnENaC Proteins wurde auf 1,0 normalisiert (100 %).

## 4 Diskussion

Die Atemwegssymptome der Mukoviszidose zeichnen sich durch eine reduzierte  $\text{Cl}^-$ -Sekretion und eine  $\text{Na}^+$ -Hyperabsorption im humanen respiratorischen Epithel aus. Diese erhöhte  $\text{Na}^+$ -Absorption wurde bereits mit verschiedenen Methoden gemessen und untersucht. Einige Autoren konnten mittels *Patch-Clamp* Technik eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit apikaler, nicht-selektiver  $\text{Na}^+$ -leitender Kanäle beschreiben (Chinet et al. 1994). Eine andere Gruppe zeigte deutlich eine drastisch erhöhte  $\text{Na}^+$ -Absorption durch ENaC in humanem CF Nasenepithel, indem der transepitheliale Amilorid-sensitive  $\text{Na}^+$ -Strom in Ussing-Kammern bestimmt wurde (Blank et al. 1996; Blank et al. 1997; Rückes-Nilges et al. 1999). Darüber hinaus konnte durch Messungen der Potentialdifferenz (PD) an humanem Nasenepithel ein signifikanter Anstieg der Amilorid-sensitiven PD bei CF Patienten beobachtet werden (Hofmann et al. 1998; Blank et al. 1997). Während die CFTR Mutationen intensiv untersucht und beschrieben wurden, blieben die molekularen Mechanismen, welche die ENaC-Überaktivität hervorrufen, weitgehend unaufgeklärt. Dennoch haben mehrere Untersuchungen gezeigt, dass genau diese  $\text{Na}^+$ -Hyperabsorption durch ENaC im respiratorischen Epithel ausreicht, um allein alle Atemwegssymptome auszulösen, die für CF charakteristisch sind (Rückes-Nilges et al. 1999; Mall et al. 2004). Bisher fehlte jedoch eine molekulare Charakterisierung des hnENaC aus CF und nicht-CF Gewebe, welche möglicherweise Aufschlüsse für die Ursache der verstärkten  $\text{Na}^+$ -Absorption in CF Epithel geben würde. Strukturelle Unterschiede, d. h. Mutationen in der hnENaC Sequenz würden zu einer veränderten Aktivität und zu modifizierten Eigenschaften des Kanals führen. Darüber hinaus könnten transkriptionale und translationale Modifikationen bei CF zu einer erhöhten Expression des hnENaC führen und somit eine erhöhte  $\text{Na}^+$ -Absorption verursachen.

Die vorliegende Arbeit hatte es daher zum Ziel:

- hnENaC von CF und nicht-CF Patienten zu klonieren, zu sequenzieren und anschließend zu vergleichen (untereinander und mit ENaC aus anderen humanen Geweben)
- Quantitative Bestimmung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -hnENaC UE aus CF und nicht-CF Gewebe auf mRNA Ebene
- Quantitative Bestimmung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -hnENaC UE aus CF und nicht-CF Gewebe auf Protein Ebene

Im Folgenden werden nun alle erhaltenen Daten diskutiert und mögliche Konsequenzen für die Regulation von ENaC in CF, die zu einer  $\text{Na}^+$ -Hyperaktivität führen könnten, dargelegt.

#### 4.1 *Molekulare Klonierung von hnENaC aus CF und nicht-CF Nasenepithel*

ENaC wurde bereits aus verschiedenen Organismen und Geweben kloniert, unter anderem auch aus der humanen Lunge und Niere (Voilley et al. 1994; Voilley et al. 1995; McDonald et al. 1994; McDonald et al. 1995); bisher sind jedoch keine ENaC Sequenzen aus Gewebe von CF Patienten sequenziert und veröffentlicht worden. Aus diesen Gründen und um die Frage zu klären, ob die molekulare Struktur des Kanals in menschlichem Nasenepithel generell verändert ist oder ob vielleicht der ENaC bei Mukoviszidose ebenfalls mutiert ist, wurden zu Beginn dieser Arbeit alle drei hnENaC UE von CF und nicht-CF Nasengewebe kloniert und sequenziert. Diese sechs Nukleotidsequenzen wurden in einem Multi-Sequenz-Alignment zunächst untereinander verglichen. Dadurch konnte klar gezeigt werden, dass die molekularen Strukturen des hnENaC aus CF und nicht-CF Nasenepithel identisch sind und ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Na<sup>+</sup>-Absorption in CF Gewebe auf Sequenz-Modifikationen des Kanals zurückzuführen ist.

Der Vergleich der hnENaC Sequenzen mit bereits veröffentlichten Sequenzdaten von ENaC aus humaner Lunge und Niere zeigte verschiedene SNP und Sequenzkonflikte. Dabei bestehen die SNP des hnENaC nur im Vergleich mit dem humanen ENaC aus Niere und die Konflikte betreffen ausschließlich die Sequenz des humanen ENaC aus Lunge. Ein SNP ist ein punktueller Unterschied in der Basensequenz, der bei Individuen innerhalb der menschlichen Population verschieden sein kann. Ein Sequenzkonflikt beschreibt dagegen verschiedene Bezugsquellen (z.B. Datenbank) mit unterschiedlichen Angaben zu der betreffenden Base. In diesem Zusammenhang ist es äußerst interessant, inwiefern Polymorphismen eine Auswirkung auf die ENaC-Aktivität und die Reaktion auf klassische regulatorische Einflüsse haben. So können Polymorphismen beispielsweise den Salzhaushalt negativ beeinflussen, wenn sie gleichzeitig mit anderen Proteinen auftreten, welche ebenfalls einen genetischen Defekt aufweisen und darüber hinaus auch an der Zellhomöostase beteiligt sind (Arai et al. 1999). In der CF und nicht-CF Sequenz der  $\alpha$ -hnENaC Untereinheit wurde ein in der Bevölkerung häufig auftretender T663A Polymorphismus im C-Terminus identifiziert. In dieser Position erfolgte ein Tausch der mittelgroßen, polaren AS Thr (T) gegen die kleinere, hydrophobe AS Ala (A). Bekanntermaßen sind 20 - 30 % der menschlichen Proteine polymorph, d.h. dass die Aminosäuresequenzen innerhalb der Bevölkerungsgruppen

variieren (Lehninger et al. 2001). Diese Variationen müssen nicht zwingend einen Einfluss auf die Funktion des Proteins haben, jedoch können Bereiche der Aminosäuresequenz wichtige Substrukturen enthalten, die für die biologische Funktion unerlässlich sind. So ist die Prolin-reiche Region im C-Terminus eine wichtige Bindungsstelle für regulatorische Proteine wie die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 und verantwortlich für die Stabilisierung des Kanals innerhalb der Plasmamembran (Rotin et al. 1994). Die molekulare Variation T663A kommt in der kaukasischen Bevölkerung im Vergleich zur afro-amerikanischen Population doppelt so häufig vor (Samaha et al. 2004). Während manche Autoren keine Veränderungen in der ENaC Funktion bei einer heterologen Expression in *Xenopus* Oocyten im Zusammenhang mit einem T663A Polymorphismus fanden (Ambrosius et al. 1999), konnten andere eine offensichtliche Verringerung der Kanalaktivität beobachten (Tong et al. 2006). Ebenfalls wurde eine erhöhte ENaC-Oberflächenexpression detektiert, so dass angenommen wurde, dass dieser Polymorphismus den intrazellulären Transport von ENaC-Molekülen zur Plasmamembran (*ENaC-Trafficking*) beeinflusst (Samaha et al. 2004).

Darüber hinaus konnte in der CF und nicht-CF  $\beta$ -hnENaC UE ein A314G Sequenzkonflikt (Voilley et al. 1995) und ein A336P SNP (Arai et al. 1999; McDonald et al. 1995) detektiert werden. Der Sequenzkonflikt beschreibt einen Austausch der kleinen, hydrophoben AS Ala (A) gegen die kleinste, hydrophile AS Gly (G) und der SNP beinhaltet einen Tausch der AS Ala (A) gegen ein mittelgroßes, hydrophobes Pro (P). Beide AS-Austausche befinden sich in der extrazellulären Domäne der  $\beta$ -hnENaC UE.

Außerdem wurden drei SNP (R178W, P502A, A614S (Arai et al. 1999; Voilley et al. 1995; McDonald et al. 1995)) und fünf Konflikte (F339S, A350T, Y369S, D375G, S458R (Voilley et al. 1995)) innerhalb der sequenzierten  $\gamma$ -hnENaC aus CF und nicht-CF Proben gefunden. Bei dem ersten SNP handelt es sich um einen Tausch der großen basischen AS Arg (R) gegen die große aromatische AS Trp (W). Ein weiterer SNP beinhaltet einen Tausch der kleinen hydrophoben AS Ala (A) zu der etwas größeren AS Pro (P), die jedoch die gleichen physiko-chemischen Eigenschaften aufweist. Diese beiden SNP sind in der extrazellulären Domäne lokalisiert. Der dritte SNP zeigt einen AS Tausch von Ala (A) zu der kleinen, polaren AS Ser (S) und befindet sich in der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne. Der erste Sequenzkonflikt ist durch einen Tausch der hydrophoben und aromatischen AS Phe (F) gegen die kleine, hydrophile AS Ser (S) charakterisiert. Der Tausch der kleinen hydrophoben AS Ala (A) gegen die

lipophile und aromatische AS Thr (T) beschreibt einen weiteren Sequenzkonflikt innerhalb der  $\gamma$ -hnENaC UE. Die lipophile und aromatische AS Tyr (Y) ist in einem weiteren Sequenzkonflikt gegen die kleine hydrophile AS Ser (S) ausgetauscht. In den folgenden Konflikten ist der Tausch der sauren und meist negativ geladene AS Asp (D) gegen die einfache AS Gly (G) sowie der Ersatz der kleinen hydrophile AS Ser (S) durch die basische und meist positiv geladene AS Arg (R) beschrieben. Alle Sequenzkonflikte befinden sich in der extrazellulären Domäne des ENaC (siehe Tab. 10).

Über diese Sequenztausche der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC UE wurden bisher keine funktionellen Studien veröffentlicht. Vermutlich sind aber die Sequenzkonflikte des hnENaC zu dem ENaC aus Lungengewebe entweder ebenfalls häufig vorkommende Polymorphismen oder auf Ungenauigkeiten durch veraltete Sequenzier- und PCR-Techniken zurückzuführen, da die Klonierung und Sequenzierung des ENaC aus menschlicher Lunge schon gut 10 Jahre zurückliegt. Seitdem sind diese Techniken wesentlich besser und genauer geworden. Darüber hinaus sind nicht zuletzt durch das Humane Genomprojekt viele Sequenzen in der Datenbank verfügbar.

Die extrazelluläre Domäne der ENaC UE und die Interaktion mit extrazellulären Liganden spielt eine ausschlaggebende Rolle in der Regulation der Kanal-Offenwahrscheinlichkeit von ENaC (Horisberger und Chraïbi 2004). Somit könnten Tausche gerade in dieser Region der Aminosäuren mit oftmals sehr unterschiedlichen Eigenschaften zu Veränderungen der Gesamtstruktur bzw. Proteinfaltung führen. Die Aminosäuresequenz erlaubt Rückschlüsse auf die dreidimensionale Struktur, die Funktion und die Lokalisation des Proteins in der Zelle bzw. der Membran. Die Proteinfaltung umfasst den Prozess, in dem das Protein eine dreidimensionale Struktur und eine spezifische Funktion erlangt (Primär-, Sekundär-, Tertiär und Quartärstruktur). Darüber hinaus dienen bestimmte Aminosäuresequenzen als Signale für die Lage des Proteins in der Zelle und die chemische Modifizierung. Ergänzende Untersuchungen werden zukünftig Einblicke ermöglichen, inwieweit Polymorphismen die ENaC Prozessierung und Oberflächenexpression beeinflussen.

## 4.2 Vergleich der hnENaC mRNA Expression in CF und nicht-CF Nasenepithel

Die Regulation und die Expression des ENaC erfolgt auf transkriptionaler und post-transkriptionaler Ebene in starker Abhängigkeit von dem jeweiligen Gewebetypus. Die  $\text{Na}^+$ -Hyperabsorption im respiratorischen Trakt von CF Patienten könnte demnach auf eine Erhöhung einer Expression der ENaC UE auf transkriptionaler Ebene zurückzuführen sein. Diese Hypothese sollte zunächst über eine Bestimmung der mRNA Menge in CF und nicht-CF Gewebe mit Hilfe einer semi-quantitativen RT-PCR bestimmt und anschließend mittels *real-time* PCR genauer untersucht und verglichen werden.

Zunächst wurde die semi-quantitative RT-PCR mit hnENaC spezifischen Primern für alle drei UE durchgeführt. Als externe Kontrolle und für die Normalisierung der Proben wurde das HKG hGAP-DH verwendet. Die relative Menge der drei hnENaC UE war in CF Nasengewebe im Vergleich zu den nicht-CF Proben offensichtlich erhöht. Über eine Quantifizierung der cDNA Banden im Agarosegel mit dem Computerprogramm *ImageJ* zeigte sich deutlich, dass die Menge der  $\alpha$ -hnENaC mRNA 1,6-fach, die der  $\beta$ -hnENaC mRNA 3,5-fach und die der  $\gamma$ -hnENaC mRNA sogar 5-fach in CF Gewebe im Gegensatz zu nicht-CF Gewebe erhöht ist.

Eine semi-quantitative RT-PCR ist jedoch meistens fehlerbehaftet und oftmals ungenau. Es ist relativ schwierig, optisch (Agarosegel) den optimalen Zeitpunkt zu ermitteln, in dem sich die PCR in der exponentiellen und damit vergleichbaren Phase befindet. Außerdem handelt es sich hierbei um eine sogenannte Multiplex-PCR, in der das HKG als Standard mitamplifiziert wird. Diese Tatsache birgt das Problem, dass beide Fragmente nicht genau gleich amplifiziert werden und auch die unterschiedlichen Primer nicht unbedingt mit gleicher Effizienz hybridisieren. Darüberhinaus können längere Fragmente schlechter amplifiziert werden als kurze und somit kann die Vermehrungsrate unterschiedlich sein, wenn man nicht gleichgroße Fragmente amplifiziert.

Um die Ergebnisse der semi-quantitativen RT-PCR zu überprüfen und zu bestätigen, wurde eine *real-time* PCR durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgt bei dieser Methode während des PCR-Zyklus direkt mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen mit Sybr Green. Die entstandenen PCR-Fragmente müssen nicht mehr elektrophoretisch

aufgetrennt werden und die Messdaten sind unmittelbar verfügbar. Die verwendeten Primer wurden spezifisch über Exon/Exon Grenzen der hENaC Sequenz gelegt, damit keine genomische DNA amplifiziert wurde und flankierten alle ein gleichlanges Fragment (100 bp). Durch die präzise Methode der *real-time* PCR wurde die mRNA Expression der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -hnENaC UE in humanem Nasenepithel von sechs CF Patienten relativ zu der Expression der vereinigten Kontrollprobe aus vier nicht-CF Patienten, die zuvor auf 1,0 normalisiert wurde, bestimmt. Die Kontroll-Proben wurden zuvor einzeln getestet und zeigten so gut wie keine Abweichungen, so dass eine Vereinigung erfolgen konnte.

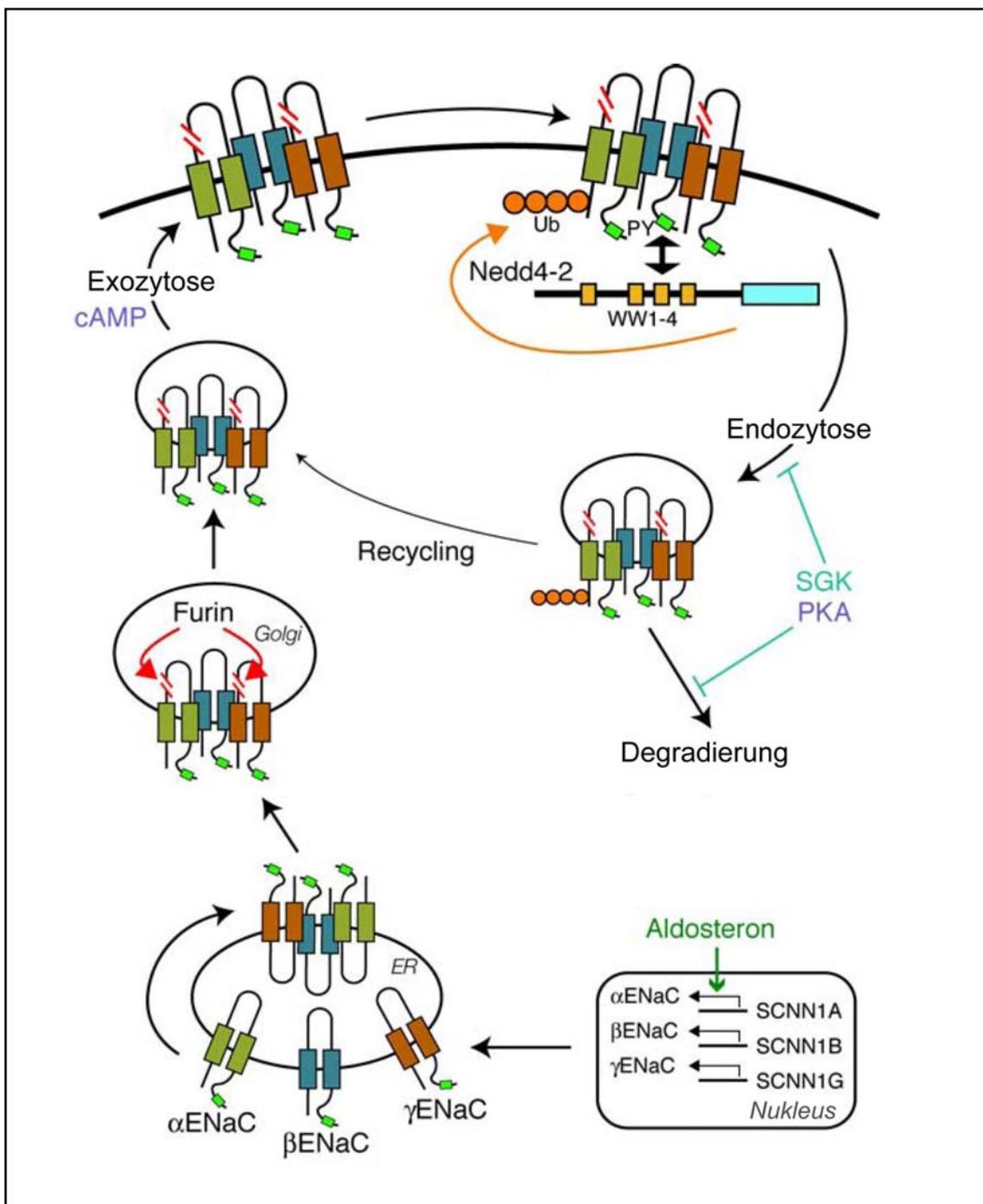
Die Daten der *real-time* PCR stimmten interessanterweise ausgezeichnet mit den davor bereits ermittelten Werten der semi-quantitativen RT-PCR überein. Zur besseren Übersicht wurden die Daten der sechs CF Patienten (fünf Patienten homozygot für  $\Delta F508$  und einer mit einer *Compound Heterozygotie* für  $\Delta F508/R553X$ ) gemittelt. Die Einzelwerte sind jedoch tabellarisch unter Punkt 3.6.2 in Tabelle 12 aufgeführt. Bei allen CF Patienten handelte es sich um Kinder im Alter zwischen 10 und 15 Jahren mit einem phänotypisch ausgeprägten CF Krankheitsbild. Für das Gen der  $\alpha$ -hnENaC UE konnte eine mittlere 1,7-fache Erhöhung der mRNA Transkription in der CF Gruppe im Vergleich zu der Kontrolle berechnet werden. Die  $\beta$ -hnENaC mRNA Expression im CF Gewebe war gemittelt 3,3-fach erhöht, die  $\gamma$ -hnENaC mRNA Expression zeigte eine 3,4-fache Erhöhung in humanem CF Nasenepithel verglichen mit der Kontrolle. Die einzelnen patientenspezifischen Werte für die jeweiligen UE sind teilweise drastisch erhöht. Ein CF Patient (CF Probe 3) zeigte einen 5,96-fachen Anstieg der  $\beta$ -hnENaC UE Expression, während ein weiterer CF Patient (CF Probe 6) eine 4,7-fache Erhöhung in dieser UE aufweist. Insoweit sind diese individuellen Werte beinahe doppelt so hoch wie der Mittelwert von 3,2 für die  $\beta$ -hnENaC UE in CF Nasenepithel. Ebenso variieren die Werte für die  $\gamma$ -hnENaC UE der CF Proben. Zwei CF Patienten weisen eine stark erhöhte  $\gamma$ -hnENaC mRNA Menge auf (CF Probe 1: 6,07-fach; CF Probe 6: 4,99-fach), die wiederum fast doppelt so hoch wie der Mittelwert (3,4-fach) für die  $\gamma$ -hnENaC UE ist. Die Ergebnisse könnten eine veränderte Stöchiometrie von ENaC in CF Gewebe widerspiegeln, welche bis dato noch nicht aufgeklärt ist. So könnte man aufgrund dieser Daten eine UE Komposition von  $1\alpha : 2\beta : 2\gamma$  in CF Gewebe vermuten, die dem Kanal andere Eigenschaften verleihen würde (McNicholas und Canessa 1997; Fyfe und Canessa 1998) und gegebenenfalls zu einer gesteigerten  $\text{Na}^+$ -Absorption bei CF führen

könnten. Jedoch muß es durch Veränderungen in der mRNA Expression nicht unbedingt zu Unterschieden auf der Protein Ebene kommen und umgekehrt.

Darüber hinaus zeigen diese Ergebnisse zum ersten Mal eine offensichtliche Korrelation zwischen CF und der Menge an ENaC mRNA. Im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Daten (Burch et al. 1995), konnten in dieser Arbeit signifikante Unterschiede in der hnENaC mRNA Menge zwischen CF und nicht-CF Nasenpolypengewebe aufzeigt werden. Inwiefern ENaC in die CF Symptome involviert ist unterliegt einer langen Diskussion, somit könnten diese Daten die These unterstützen, dass in erster Linie die Na<sup>+</sup>-Hyperabsorption durch ENaC im respiratorischen Trakt der CF Patienten für die Atemwegssymptome verantwortlich ist. Die Ursache für die erhöhte mRNA Expression in humanem CF Gewebe ist nun von fundamentalem Interesse.

Wie kommt es zu der Regulation bzw. zum Stimulus der vermehrten mRNA Synthese in CF Gewebe im Gegensatz zu nicht-CF Epithel? Dafür erscheint es notwendig, alle bekannten Faktoren, die ENaC regulatorisch beeinflussen, mit einzubeziehen. Das Zusammenspiel aller bekannten Regulations-Mechanismen sollte jedoch gerade im respiratorischen Trakt der CF Patienten sehr komplex sein, da dort das Gleichgewicht in der Zellhomöostase gestört ist. Die ENaC Aktivität wird transkriptional und translational gewebespezifisch durch unterschiedliche Regulatoren wie Hormone, verschiedene assoziierte Proteine und extrazelluläre Faktoren, welche direkt oder indirekt auf den Kanal wirken (Garty und Palmer 1997; Alvarez de la Rosa et al. 2000) sowie Proteasen (Vallet et al. 1997; Caldwell et al. 2004) gesteuert. Ein großer Teil der ENaC Regulation erfolgt, wie bereits in der Einleitung beschrieben, durch die Kontrolle der Kanaldichte in der apikalen Membran der Epithelzellen (Rossier 2002). Diese regulatorischen Mechanismen wurden und werden intensiv untersucht. Offenbar sind an diesem Prozess sehr viele unterschiedliche Faktoren beteiligt, einschließlich der transkriptionalen und post-transkriptionalen Regulation der Menge der synthetisierten ENaC Moleküle, die Geschwindigkeit der Kanal-Degradation und die Kontrolle des Protein-UE-Transports zwischen dem intrazellulären Kanal-Reservoir und der apikalen Plasmamembran. In verschiedenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine Co-Expression mit Proteasen die durch ENaC vermittelten Amilorid-sensitiven Ströme verstärkt wurden (Vallet et al. 1997; Vuagniaux et al. 2000; Donaldson et al. 2002; Adachi et al. 2001). Extrazelluläre und membrangebundene Serin-Proteasen, wie Trypsin (Chraibi et al. 1998), CAP1,2,3 (Vallet et al. 1997; Vuagniaux et al. 2002), TMPRSS3 (Guipponi et al. 2002) und die Neutrophilelastase

(Caldwell et al. 2005) aktivieren ENaC durch eine proteolytische Modifizierung des Kanals. In diesem Zusammenhang ist es natürlich ebenfalls von Bedeutung, dass die extrazelluläre Protease Prostasin zu 76 % mit der murinen CAP identisch ist (Shipway et al. 2004), welche eine Steigerung der ENaC Aktivität vermittelt. Prostasin wird im Oberflächen-Mucus von Nase, Bronchien und den alveolaren Epithelzellen exprimiert (Verghese et al. 2004; Donaldson et al. 2002). Darüber hinaus konnten Hughey et al. zeigen, dass während der Kanalreifung die extrazellulären Domänen der murinen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC UE durch die Proprotease Furin geschnitten werden (Hughey et al. 2003). Furin ist eine endogene Aprotinin-insensitive Konvertase (Nakayama 1997), welche im trans-Golgi-Apparat lokalisiert ist und sich zwischen diesem und der Plasmamembran bewegt. Im Golgi schneidet Furin spezifische Stellen in der extrazellulären Domäne der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC UE. Durch Proteasen werden bekanntermaßen so genannte *near-silent* Kanäle, d. h. Kanäle mit einer sehr geringen Offenwahrscheinlichkeit, in aktive  $\text{Na}^+$  transportierende Kanäle verwandelt (Caldwell et al. 2004). Einige ENaC Moleküle erreichen prozessiert die Zellmembran, während andere der proteolytischen Spaltung entkommen (Hughey et al. 2004b). Diese inaktiven Kanäle können jedoch anschließend und schnell durch die bereits genannten Proteasen aktiviert werden. Erst kürzlich zeigte eine Arbeitsgruppe, dass diese permanente Ansammlung von *near-silent* ENaC-Kanälen in CF Lungenepithel konstitutiv aktiv ist und die  $\alpha$ -ENaC UE einer erhöhten proteolytischen Prozessierung unterliegt (Myerburg et al. 2006). Hier wird vermutet, dass die ENaC-Aktivität in CF überwiegend über eine Regulation des ASL-Volumen gesteuert wird. Dies geschieht über eine Modifikation des Gleichgewichtes zwischen Serin-Proteasen und Protease-Inhibitoren in dieser den respiratorischen Trakt überdeckenden Schicht. Ein Ungleichgewicht führt nach Meinung der Autoren demnach zu einer gesteigerten  $\text{Na}^+$ -Absorption bei Mukoviszidose. Ein allgemeiner Mechanismus für die Entstehung, die Dregrierung und die Wiederverwertung der ENaC-Moleküle innerhalb der Zelle ist in Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 25:** ENaC: Synthese, Degradierung, Recycling.

Aldosteron stimuliert die Transkription der  $\alpha$ -ENaC UE (z. B. in der Niere), dadurch werden neue Kanalkomplexe aufgebaut und es erfolgt eine erleichterte Entlassung von ENaC-Molekülen aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Im Golgi-Apparat werden teilweise ENaC in der extrazellulären Domäne der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -UE proteolytisch geschnitten und somit aktiviert. An der Plasmamembran bindet Nedd4-2 an ENaC und vermittelt somit die Endozytose und die Degradierung. In diesem Schritt werden meistens die N-terminalen Lysinreste der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -UE ubiquitiniert. SGK und PKA verhindern eine Endozytose und Degradierung durch eine Phosphorylierung von Nedd4-2, das somit nicht mehr an ENaC bindet (verändert nach: Snyder 2005).

Hinsichtlich dieser Modifizierung, verläuft die ENaC Reifung ähnlich wie die einiger anderer Proteasen und Hormone, die erst von einem Proprotein zu einer aktiven Form prozessiert werden. Obwohl die vermeintlichen Schnittstellen von Furin und Protsasin identifiziert wurden (Hughey et al. 2004a; Shipway et al. 2004), bleibt der genaue Mechanismus der ENaC Aktivierung durch Proteasen weiterhin nicht vollständig aufgeklärt.

Furin ist ebenfalls unerlässlich für die proteolytische Aktivierung verschiedener virulenter Moleküle einer großen Vielfalt von Pathogenen. Somit stellt diese Proprotease ein interessantes Ziel für die Entwicklung neuer antimikrobieller Substanzen mit einer breiten Basis dar. Interessanterweise wurde bereits die Beeinflussung der Furin-Menge als Strategie für die Bekämpfung von akuten bakteriellen Pathogenen wie *P. aeruginosa* vorgestellt (Jean et al. 2000). *P. aeruginosa* stellt als Erreger die häufigste Ursache von Pneumonien bei Patienten mit Mukoviszidose dar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in einem Mausmodell, welches mit diesem Pathogen infiziert wurde, die Menge der  $\beta$ -ENaC mRNA transient erhöht war, so dass eine transkriptionale ENaC-Regulation wahrscheinlich erscheint (Dagenais et al. 2005). Offensichtlich existiert ein starker Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression der ENaC UE im respiratorischen Trakt von CF-Patienten, sowie der  $\text{Na}^+$ -Hyperaktivität und der Besiedelung des zähen Mukus mit pathogenen Keimen.

Darüber hinaus zeigen die bronchealen und trachealen Drüsenzellen bei CF Patienten eine veränderte Zytokin-Produktion, welche schlussendlich über eine äußerst komplizierte pathophysiologische Kaskade zur Zerstörung der Lunge in CF führt (Terheggen-Lagro et al. 2005). Zytokine sind körpereigene Peptide, welche von aktivierten T-Zellen und anderen Zellen im Zuge der natürlichen und spezifischen Immunantwort freigesetzt werden. Ihre Funktion umfasst eine pro-inflammatorische und immunregulatorische Steuerung der Zell-Proliferation und Differenzierung. Zu diesen Zytokinen werden unter anderem die Interleukine, die Interferone und die Wachstumsfaktoren gezählt. Diese Mediatoren könnten durchaus auf die ENaC-Regulation in CF wirken und somit die Transkription der UE anregen. Die Mechanismen, durch die ENaC reguliert wird, sind offensichtlich sehr vielfältig und werden durch Faktoren, welche als Antwort auf eine Entzündungsreaktion bei CF Patienten erst aktiv werden, außerordentlich komplex. Sicher ist jedoch, dass eine erhöhte Transkription der drei hnENaC UE bei den von uns untersuchten sechs CF Patienten vorliegt.

### 4.3 Vergleich der hnENaC Protein Expression in CF und nicht-CF Nasenepithel

Inwiefern die gesteigerte Expression der drei hnENaC UE in CF Gewebe sich auch auf Proteinebene widerspiegelt, wurde durch einen Proteinnachweis mittels Immunoblotting überprüft. Es wurde ein Lysat aus Gesamtproteinen, welches zuvor aus humanem CF und nicht-CF Nasenpolypengewebe extrahiert wurde, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Es erfolgte eine Detektion der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -hnENaC UE mit spezifischen polyklonalen und Epitopgereinigten Antikörpern.

In humanem Nasenepithel wurde eine scharfe  $\alpha$ -hnENaC-spezifische Bande im Bereich von 66 kDa detektiert und zusätzlich erkannte der anti- $\alpha$ -ENaC spezifische Antikörper eine zweite Bande bei 55 kDa in CF und nicht-CF Gewebe.

Hughey et al. identifizierten im Western Blot zusätzlich zu einer 95 kDa  $\alpha$ -ENaC spezifischen Bande eine weitere, kleinere Bande mit einem Molekulargewicht von 65 kDa (Hughey et al. 2003). Diese zweite Bande erwies sich als eine durch proteolytische Spaltung hervorgegangene, glykosilierte Form der  $\alpha$ -ENaC UE. Durch verschiedene Untersuchungen wurde ersichtlich, dass die Proprotease Furin die  $\alpha$ -ENaC und  $\gamma$ -ENaC UE in der extrazellulären Domäne während der Kanalreifung im Golgi-Apparat schneidet. Die Autoren spekulierten außerdem, dass diese ENaC-Spaltung mit einer Aktivierung des Kanals einhergeht, denn in Furin-defizienten CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) war der Amilorid-sensitive  $\text{Na}^+$ -Strom signifikant erniedrigt gegenüber der Kontrollgruppe (Hughey et al. 2003). Es konnte darüber hinaus nicht ausgeschlossen werden, dass ENaC zusätzlich von anderen Proprotein Konvertasen gespalten wird. Es erfolgte die Identifikation der Furin-Konsensussequenz (Tab. 13), welche ein minimales Konsensus-Motiv von RYYR↓ aufweisen muß, damit die Proprotease Furin schneidet (Hughey et al. 2004a).

**Tabelle 13:** Furin Konsensus-Motiv in der  $\alpha$ -ENaC UE

Spezies	Position (AS)	Sequenz	Position (AS)	Sequenz
Mensch	173-181	GSRSRDLR	199-204	GARRAR

In der  $\alpha$ -hnENaC Sequenz existieren also mindestens zwei dieser Motive. ENaC durchläuft eine aufwändige post-translationale Prozessierung, zum einen durch den Anhang funktionaler Gruppen (Glykosilierung) und zum anderen, wie bereits beschrieben, durch proteolytische Spaltung. Diese Prozessierung könnte in den Western Blots Banden mit unterschiedlichen ENaC Molekulargewichten aus verschiedenen Zellarten und Geweben ergeben. Eine Zusammenstellung der bisher beschriebenen, stark variierenden Molekulargewichte wurde erst kürzlich veröffentlicht (Johnson et al. 2006). Die proteinbiochemischen Gewebeaufreinigungen erfolgten in dieser Arbeit ausschließlich unter Einsatz von Protease-Inhibitoren, so dass eine unspezifische Proteolyse unwahrscheinlich ist. Daher wurde bei diesen Ergebnissen angenommen, dass es sich bei der 66 kDa und 55 kDa Bande aus CF und nicht-CF Nasenepithel um während der Kanal-Reifung proteolytisch modifizierte  $\alpha$ -ENaC UE handelt. Je nachdem in welchem Zustand der Prozessierung sich das Protein befindet und welche funktionalen Gruppen bereits angehängt wurden, verändert sich auch das Molekulargewicht der UE. Da sich die beschriebenen putativen Furinschnittstellen in einem Abstand von nur 18 AS befinden, beträgt das theoretisch berechnete Molekulargewicht der unprozessierten Form der humanen  $\alpha$ -ENaC UE bei der ersten Schnittstelle 55 kDa und bei der zweiten 52 kDa (<http://www.expasy.ch>). Somit repräsentiert die 66 kDa Bande möglicherweise die bereits beschriebene glykosilierte und die 55 kDa spezifische Banden eine unglykolytierte Reifungsform der  $\alpha$ -hnENaC UE.

Der anti- $\beta$ -ENaC Antikörper detektierte eine spezifische Bande bei ungefähr 73 kDa und der anti- $\gamma$ -ENaC Antikörper erkannte eine spezifische Bande bei 74 kDa. Damit stimmen diese Molekulargewichte mit den bekannten und bereits publizierten Daten anderer unglykosilierter ENaC-Formen überein (Voilley et al. 1995).

Darüber hinaus konnte ein Unterschied im Expressionsmuster der ENaC UE zwischen CF und nicht-CF Gewebe beobachtet werden. Bei der densitometrischen Auswertung der Western Blots war offensichtlich die untere 55 kDa  $\alpha$ -hnENaC spezifische Bande in CF Nasengewebe verstärkt. Wie zuvor beschrieben, scheint die untere Bande eine andere Form der  $\alpha$ -ENaC UE darzustellen, hervorgerufen durch eine post-translationale proteolytische Modifikation. Diese untere  $\alpha$ -ENaC spezifische Bande war nach einer semi-quantitativen Bestimmung in CF-Gewebe 5-fach und die  $\beta$ -hnENaC UE 3,5-fach verstärkt im direkten Vergleich mit nicht-CF Gewebe. Im Gegensatz dazu war die Menge an  $\gamma$ -hnENaC Protein interessanterweise 4-fach geringer in CF Gewebe

verglichen mit dem nicht-CF-Gewebe. Da dieses Ergebnis nicht mit den zuvor ermittelten Daten der *real-time* PCR übereinstimmt, liegt es nahe, dass vielleicht die translationalen und post-translationalen Mechanismen in CF Nasenepithel sich von denen in nicht-CF Gewebe unterscheiden. Darüber hinaus könnte man ebenso eine modifizierte UE Anordnung in der Plasmamembran und zugleich in den intrazellulären Vesikeln von humanem Nasengewebe annehmen. Durch eine veränderte Stöchiometrie ist auch die Kanal-Aktivität stark verändert (Canessa et al. 1994; McNicholas und Canessa 1997). Ein Vorschlag für die UE Stöchiometrie von ENaC ist die heterotetramere Struktur, bestehend aus 2 $\alpha$ -, 1 $\beta$ - und 1 $\gamma$ -UE (Firsov et al. 1998; Kosari et al. 1998). Diese Versuche erfolgten zunächst in einem *Xenopus laevis* Expressions-System. Basierend auf weiteren Untersuchungen in einem Säugetier-Expressions-System (COS-7 und CHO Zellen), wurde eine andere Variante postuliert, welche eine identische Anzahl der ENaC UE aufweist (1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1 $\gamma$ ) (Staruschenko et al. 2005). Diese Möglichkeiten werden zurzeit kontrovers diskutiert und es ist gegenwärtig nicht klar, inwieweit eine heterologe Expression auf eine Expression in nativem Gewebe zu übertragen ist. Die ENaC Stöchiometrie kann in verschiedenen Geweben und auch Organen, abhängig von der jeweiligen Funktion durchaus unterschiedlich sein. So wurde bereits in respiratorischem Epithel von Ratten eine heterogene ENaC Expression beobachtet. Eine deutliche Verbreitung von Kanälen, welche ausschließlich aus der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC Untereinheit bestehen, konnte so in Alveolarzellen, in trachealem Epithel sowie in nasalen und trachealen Acini der Drüsenzellen dieser Tiere detektiert werden (Farman et al. 1997). Dort wurde die  $\beta$ -UE nur in geringen Mengen oder gar nicht gefunden. Im Darmepithel wird die Expression der ENaC UE sehr stark durch Aldosteron reguliert. Normalerweise exprimieren diese Zellen im Darmepithel ebenfalls von Ratten vorwiegend die  $\alpha$ -ENaC UE und erst nach einer Stimulation des Epithels durch Aldosteron wurden die  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC UE in hohem Maß exprimiert (Asher et al. 1996). Die höchste Na<sup>+</sup>-Affinität, die höchste Amilorid-Sensitivität und somit auch die größte Kapazität zur Na<sup>+</sup>-Absorption ist gegeben, wenn alle drei ENaC UE gleichzeitig exprimiert werden (Canessa et al. 1994). Eine veränderte Expression der ENaC UE könnte ein Mechanismus sein, der die Na<sup>+</sup>-Absorption in den unterschiedlichsten Geweben reguliert; denn epitheliale Na<sup>+</sup> Kanäle oder auch multimere Proteine besitzen die Fähigkeit einer komplexen Regulierung durch eine unterschiedliche Expression der UE unter dem Einfluss von verschiedenen Hormonen und Stimuli (McNicholas und Canessa 1997). Wenn man nun aufgrund der proteinbiochemischen Analyse davon

ausgehen würde, dass in humanem Nasengewebe von CF Patienten die  $\gamma$ -UE geringer oder gar nicht exprimiert wird, würden die Kanäle in diesem Epithel vornehmlich eine  $\alpha\beta$ -Kombination bilden.  $\alpha\beta$ -Kanäle weisen eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit auf, d.h. die Kanäle sind konstitutiv geöffnet, besitzen jedoch eine geringere  $\text{Na}^+$ -Affinität (Fyfe und Canessa 1998). Dadurch ist die  $\text{Na}^+$ -Absorption normalerweise begrenzt, kann aber gesteigert werden, wenn die angebotene  $\text{Na}^+$ -Konzentration erheblich ansteigt (McNicholas und Canessa 1997). Bei CF könnte im respiratorischen Epithel durch den Wasserentzug ebenfalls eine temporäre und lokale Erhöhung der  $\text{Na}^+$ -Konzentration im Mukus erfolgen, so dass eine Aktivierung putativer Kanäle mit einer  $\alpha\beta$ -Kombination erfolgen würde.

Dennoch gibt es keine absolute Übereinstimmung der proteinbiochemischen Experimente mit den Resultaten der *real-time* PCR. Die Regulation der ENaC UE variiert wie bereits beschrieben in unterschiedlichen Geweben. Darüber hinaus müssen Unterschiede auf mRNA Ebene nicht zwingend mit Veränderungen auf Proteine Ebene einhergehen und umgekehrt (May et al. 1997). Eine einzelne mRNA kann in der Zelle mehrfach und gleichzeitig an so genannten Polysomen, das sind Anhäufungen von mehreren Ribosomen, abgelesen werden. So kann von demselben mRNA-Molekül viel Protein erzeugt werden. Dieser Translations-Prozess unterliegt einer zelleigenen Regulation, denn die benötigte Proteinmenge ist abhängig von mehreren Faktoren einschließlich Zellalter und Zellzyklus. Dementsprechend könnte die Translationsrate der  $\gamma$ -hnENaC UE in humanem CF Nasengewebe im Vergleich zu nicht-CF Gewebe herab reguliert sein. Da zurzeit kein physiologisch vertretbarer Sinn in der geringeren  $\gamma$ -hnENaC Proteinexpression ersichtlich scheint, könnte dieser Mechanismus ebenfalls auf inhibitorische Faktoren, resultierend aus z.B. Entzündungsreaktionen in CF Gewebe, zurückzuführen sein. Diese Unstimmigkeit bedarf jedoch einer weiteren Überprüfung durch ergänzende Experimente die Proteinexpression und Regulation von ENaC in CF betreffend.

## 5 *Ausblick*

Zukünftige Untersuchungen sollten zunächst eine Aufklärung der proteinbiochemischen Ergebnisse betreffen. Zu diesem Zweck werden die Zellen aus Primärkulturen von CF und nicht-CF Gewebe auf speziellen Objektträgern subkonfluent ausgesät. Zur Detektion werden spezifische anti- $\alpha$ -, $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC Erstantikörper eingesetzt und anschließend Fluoreszenz-gekoppelte Zweitantikörper (Quantum Dots) verwendet. Durch den Einsatz der drei verschiedenen Antikörper und der Quantum Dots, wird es möglich sein einzelne ENaC-Moleküle in der Plasmamembran zu detektieren und auch zu quantifizieren (Nechyporuk-Zloy et al. 2006). Darüber hinaus könnte durch diese Methode eine Unterscheidung der in der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln lokalisierten ENaC Moleküle durch eine Permeabilisierung der Zellen erfolgen. Gegebenenfalls könnte sogar eine Analyse der Stöchiometrie der hnENaC in Nasengewebe von CF und nicht-CF Patienten ermöglicht werden.

Ein weiterer Versuchsansatz betrifft die Optimierung der Primärkultur. Die ENaC mRNA-Expression soll dabei über einen längeren Zeitraum (8 - 10 Tage) mittels *real-time* PCR und Immunoblots dokumentiert werden. Somit werden genauere Einblicke in den Expressionsverlauf ermöglicht. Außerdem sollten die CF-Patienten anhand ihres Alters und der individuellen Pathogenese eingeteilt und unterschieden werden.

Eine funktionelle Charakterisierung des hnENaC kann durch eine Ligation der bereits klonierten hnENaC UE in Fluoreszenz-gekoppelte Expressionsvektoren erfolgen, wodurch eine optische Detektion ermöglicht werden kann. Diese Konstrukte könnten anschließend in *Xenopus leavis* Oocyten injiziert werden, entweder in Form eines Plasmidvektors als DNA in den Zellkern oder nach einer *in vitro* Transkription als cRNA in das Cytoplasma der Oocyte selbst. Nach einer Expression des hnENaC in der Oocyten Plasmamembran könnte so eine funktionelle Charakterisierung der Kanal-Eigenschaften erfolgen.

Gleichzeitig würde eine Transfektion dieser Konstrukte in stabile humane Zelllinien, die z.B. endogen keinen ENaC exprimieren, eine Möglichkeit bieten, direkt in einem humanen Modellsystem Inhibitoren zu applizieren um die hnENaC-Aktivität zu vermindern. Da verschiedene medizinische Behandlungen wie die Amilorid/Benzamil Therapie (Blank et al. 1997; Hirsh et al. 2004) in der Vergangenheit in der Anwendung nicht die erhofften langfristigen Erfolge erzielen, sollte der Fokus in der Zukunft auf der Etablierung und Optimierung neuer innovativer Methoden liegen. So kann die ENaC Expression durch eine Blockierung mit *antisense*-Oligonukleotiden (AON) längerfristig unterdrückt werden (Segal et al. 2002b). Darüber hinaus oder alternativ kann die ENaC Expression mittels RNA-Interferenz (RNAi) reguliert werden. Durch diese Methode kommt es zu einer Translationsblockade der ENaC mRNA durch synthetische siRNA Konstrukte, wodurch die Produktion des Proteins gestoppt wird.

In der Vergangenheit wurden bereits häufig ENaC aus verschiedenen Organismen wie Ratte, Maus und *Xenopus*, sowie aus unterschiedlichen Geweben wie der humanen Niere für derartige Experimente verwendet. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht unbedingt übertragbar auf den hnENaC, da sich die Sequenz und die Regulation deutlich von der anderer Organismen (Ratte, *Xenopus*) unterscheidet und teilweise auch nicht absolut mit der Sequenz aus anderen Gewebetypen wie Niere und Lunge (siehe SNP und Konflikte) übereinstimmt. So sind z. B. der ENaC aus Ratte und der hnENaC nur zu ca. 80 % identisch. Da bekanntermaßen der Tausch von nur einer AS zu grundlegenden Modifikationen der Kanal-Eigenschaften führen kann, ist es sehr wichtig für derartige Transfer-Aussagen auch den, den jeweiligen Organismus betreffenden ENaC zu verwenden.

Ein sehr wichtiger Ansatzpunkt betrifft die ENaC Regulation durch Proteasen. Da das Ionen-Gleichgewicht bei CF gestört ist, kommt es im Verlauf der Krankheit und der fortschreitenden Entzündungsreaktion auch zu einer veränderten Zusammensetzung der Zytokine und Proteasen im respiratorischen Trakt der Patienten. Somit würde die Inhibierung z. B. der ENaC aktivierenden Proteasen wie Furin oder Prostasin die Na<sup>+</sup>-Hyperabsorption in CF Gewebe vermindern und könnte als alternative Therapieform bei Mukoviszidose genutzt werden.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Verfahren entwickelt, durch eine CFTR Gentherapie Mukoviszidose ursächlich zu behandeln. Die Probleme bei diesen Versuchsansätzen liegen bisher in einer geringen Effizienz des Gentransfers und einer

---

unerwünschten Abwehrreaktionen des menschlichen Immunsystems. Da viele Ergebnisse einschließlich dieser Arbeit deutlich zeigen, dass ENaC für die drastische Na<sup>+</sup>-Hyperabsorption bei CF verantwortlich ist, werden zukünftig Therapieformen entwickelt werden, die langfristig die Blockierung des ENaC im respiratorischen Trakt von CF-Patienten ermöglichen.

## 6 Zusammenfassung

Mukoviszidose beruht auf einem CFTR-Gendefekt und ist charakterisiert durch eine reduzierte  $\text{Cl}^-$  Sekretion und eine drastisch erhöhte  $\text{Na}^+$ -Absorption, die durch ENaC hervorgerufen wird. Viele Untersuchungen in diesem Bereich befassen sich mit der Charakterisierung des mutierten CFTR-Proteins sowie der Wiederherstellung der Proteinfunktion von CFTR. Während die CFTR-Mutationen gründlich untersucht und beschrieben wurden, blieben die molekularen Mechanismen, welche die  $\text{Na}^+$ -Hyperaktivität durch ENaC verursachen, weitgehend unaufgeklärt. Um putative Mutationen im ENaC ausschließen zu können, welche eine veränderte Kanaleigenschaft hervorrufen würden und somit zu einer gesteigerten  $\text{Na}^+$ -Absorption führen könnten, wurde der hnENaC aus CF und nicht-CF Gewebe kloniert und sequenziert. In dieser Arbeit konnte deutlich gezeigt werden, dass die Sequenzen des hnENaC aus CF und nicht-CF Gewebe identisch sind. Die  $\text{Na}^+$  Hyperaktivität in CF ist demnach nicht auf Mutationen, welche eine vermehrte  $\text{Na}^+$ -Absorption verursachen würden, zurückzuführen. Außerdem wurde dargelegt, dass die molekulare Struktur des hnENaC überwiegend, d.h. außer einiger SNP und den Konflikten, mit den bereits sequenzierten und veröffentlichten humanen ENaC aus anderen Geweben übereinstimmt. Die Untersuchung der ungewissen Rolle, welche die SNP in der Bestimmung des Salzhaushaltes über eine Beeinflussung der ENaC-Aktivität haben könnten, stellt jedoch auch zukünftig eine interessante Aufgabe dar. Die beschriebenen pharmakologischen Unterschiede zwischen dem hnENaC und den bereits sequenzierten ENaC (Tab. 4) sind aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nicht auf eine veränderte molekulare Struktur zurückzuführen.

Klar gezeigt werden konnte darüber hinaus, dass die Menge an ENaC in humanem Nasenepithel von CF Patienten auf mRNA- und auch Protein-Ebene im direkten Vergleich mit den nicht-CF Proben erhöht ist. Die verminderte Menge an  $\gamma$ -hnENaC Protein in CF Nasengewebe deutet auf eine modifizierte ENaC Expression und Stöchiometrie hin. Diese Ergebnisse sind möglicherweise auf eine krankheitsbedingte und veränderte ENaC Expression und Regulation in CF Gewebe zurückzuführen. Da aus der Literatur ebenfalls einige Beispiele bekannt sind, in denen eine modifizierte Expression der drei ENaC UE erfolgte, weisen diese Resultate die Richtung für

---

zukünftige Untersuchungs- und Therapieansätze. Denn nur wenn auch die molekularen Mechanismen der Na<sup>+</sup>-Hyperabsorption durch ENaC in CF vollständig aufgeklärt sind, können geeignete Lösungen zur Linderung der Atemwegssymptome der CF Patienten entwickelt werden.

## 7 *Literaturverzeichnis*

**Abramoff MD, Magelhaes PJ und Ram SJ.** Image Processing with ImageJ. *Biophot Intern* 11: 36-42, 2004.

**Abriel H, Loffing J, Rebhun JF, Pratt HJ, Schild L, Horisberger J-D, Rotin D und Staub O.** Defective regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest* 103: 667-673, 1999.

**Adachi M, Kitamura K, Miyoshi T, Narikiyo T, Iwashita K, Shiraishi N, Nonoguchi H und Tomita K.** Activation of epithelial sodium channels by prostaticin in *Xenopus oocytes*. *J Am Soc Nephrol* 12: 1114-1121, 2001.

**Akabas MH.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 275: 3729-3732, 2000.

**Alvarez de la Rosa D und Canessa CM.** Role of SGK in hormonal regulation of epithelial sodium channel in A6 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C404-C414, 2003.

**Alvarez de la Rosa D, Canessa CM, Fyfe GK und Zhang P.** Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol* 62: 573-594, 2000.

**Ambrosius WT, Bloem LJ, Zhou L, Rebhun JF, Snyder PM, Wagner MA, Guo C und 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.

**Arai K, Zachman K, Shibasaki T und Chrousos GP.** Polymorphisms of amiloride-sensitive sodium channel subunits in five sporadic cases of pseudohypoaldosteronism: do they have pathologic potential? *J Clin Endocrinol Metab* 84: 2434-2437, 1999.

**Asher C, Wald H, Rossier BC und Garty H.** Aldosterone-induced increase in the abundance of Na<sup>+</sup> channel subunits. *Am J Physiol* 271: C605-C611, 1996.

**Ausiello DA, Skorecki KL, Verkman AS und Bonventre JV.** Vasopressin signaling in kidney cells. *Kidney Int* 31: 521-529, 1987.

**Bachert C, Hormann K, Mosges R, Rasp G, Riechelmann H, Muller R, Luckhaupt H, Stuck BA und Rudack C.** An update on the diagnosis and treatment of sinusitis and nasal polyposis. *Allergy* 58: 176-191, 2003.

**Bianchi L und Driscoll M.** Protons at the gate: DEG/ENaC ion channels help us feel and remember. *Neuron* 34: 337-340, 2002.

**Birnboim HC und Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523, 1979.

**Blank U.** Regulation des Ionentransports im menschlichen respiratorischen Epithel. (Dissertation) 1996.

**Blank U, Clauss W und Weber W-M.** Effects of benzamil in human cystic fibrosis airway epithelium. *Cell Physiol Biochem* 5: 385-390, 1995.

**Blank U, Glanz H, Eistert B, Fryen A, Lindemann H, Hüls G, Clauss W und Weber W-M.** Benzamil und Mukoviszidose: Primärkultur der Nasenschleimhaut als elektrophysiologisches In-vitro-Modell. *HNO* 44: 172-177, 1996.

**Blank U, Rückes C, Clauss W, Hofmann T, Lindemann H, Münker G und Weber W-M.** Cystic fibrosis and non-cystic fibrosis human nasal epithelium show analogous Na<sup>+</sup> absorption and reversible block by phenamil. *Pflügers Arch* 434: 19-24, 1997.

**Blazer-Yost BL, Liu X und Helman SI.** Hormonal regulation of ENaCs: insulin and aldosterone. *Am J Physiol* 274: C1373-C1379, 1998.

**Börding C, Kusche K und Weber W-M.** Effect of trypsin on the activation of the epithelial sodium channel in *Xenopus laevis* oocytes. *Acta Physiol* 186: 260, 2006.

**Boucher RC.** Molecular insights into the physiology of the 'thin film' of airway surface liquid. *J Physiol (Lond)* 516: 631-638, 1999.

**Boucher RC.** Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflügers Arch* 445: 495-498, 2003.

**Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.

**Bubien JK, Ismailow II, Berdiev BK, Cornwell T, Lifton RP, Fuller CM, Achard J-M, Benos DJ und Warnock DG.** Liddle's disease: abnormal regulation of amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channels by  $\beta$ -subunit mutation. *Am J Physiol* 270: C208-C213, 1996.

**Burch LH, Talbot CR, Knowles MR, Canessa CM, Rossier BC und Boucher RC.** Relative expression of the human epithelial Na<sup>+</sup> channel subunits in normal and cystic fibrosis airways. *Am J Physiol* 269: C511-C518, 1995.

**Caldwell RA, Boucher RC und Stutts MJ.** Serine protease activation of near-silent epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C190-C194, 2004.

**Caldwell RA, Boucher RC und Stutts MJ.** Neutrophil elastase activates near-silent epithelial Na<sup>+</sup> channels and increases airway epithelial Na<sup>+</sup> transport. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L813-L819, 2005.

**Canessa CM, Horisberger J-D und Rossier BC.** Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 361: 467-470, 1993.

**Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger J-D und Rossier BC.** Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367: 463-467, 1994.

**Carroll TP, Schwiebert EM und Guggino WB.** CFTR: structure and function. *Cell Physiol Biochem* 3: 388-399, 1993.

**Chinet TC, Fullton JM, Yankaskas JR, Boucher RC und Stutts MJ.** Mechanism of sodium hyperabsorption in cultured cystic fibrosis nasal epithelium: a patch-clamp study. *Am J Physiol* 266: C1061-C1068, 1994.

**Chraibi A und Horisberger J-D.** Na self inhibition of human epithelial Na channel: temperature dependence and effect of extracellular proteases. *J Gen Physiol* 120: 133-145, 2002.

**Chraibi A, Vallet V, Firsov D, Hess SK und Horisberger J-D.** Protease modulation of the activity of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 111: 127-138, 1998.

**Dagenais A, Gosselin D, Guilbault C, Radzioch D und Berthiaume Y.** Modulation of epithelial sodium channel (ENaC) expression in mouse lung infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Respir Res* 6: 2, 2005.

**Donaldson SH, Hirsh A, Li DC, Holloway G, Chao J, Boucher RC und Gabriel SE.** Regulation of the epithelial sodium channel by serine proteases in human airways. *J Biol Chem* 277: 8338-8345, 2002.

**Farman N, Talbot CR, Boucher RC, Fay M, Canessa CM, Rossier BC und Bonvalet J-P.** Noncoordinated expression of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -subunit mRNAs of epithelial  $\text{Na}^+$  channel along rat respiratory tract. *Am J Physiol* 272: C131-C141, 1997.

**Firsov D, Gautschi I, Merillat A-M, Rossier BC und Schild L.** The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J* 17: 344-352, 1998.

**Fuller CM, Awayda MS, Arrate P, Bradford AL, Morris RG, Canessa CM, Rossier BC und Benos DJ.** Cloning of a bovine renal epithelial  $\text{Na}^+$  channel subunit. *Am J Physiol* 269: C641-C654, 1995.

**Fyfe GK und Canessa CM.** Subunit composition determines the single channel kinetics of the epithelial sodium channel. *J Gen Physiol* 112: 423-432, 1998.

**Garty H, Asher C und Yeger O.** Direct inhibition of epithelial Na-channels by a pH-dependent interaction with calcium, and by other divalent ions. *J Membr Biol* 95: 151-162, 1987.

**Garty H und Palmer LG.** Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Phys Rev* 77: 359-396, 1997.

**Goldstein O, Asher C und Garty H.** Cloning and induction by low NaCl intake of avian intestine  $\text{Na}^+$  channel subunits. *Am J Physiol* 272: C270-C277, 1997.

**Goulet CC, Volk KA, Adams CM, Prince LS, Stokes JB und Snyder PM.** Inhibition of the epithelial  $\text{Na}^+$  channel by interaction of Nedd4 with a PY motif deleted in Liddle's syndrome. *J Biol Chem* 273: 30012-30017, 1998.

**Guggino WB und Stanton BA.** New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 426-436, 2006.

**Guipponi M, Vuagniaux G, Wattenhofer M, Shibuya K, Vazquez M, Dougherty L, Scamuffa N, Guida E, Okui M, Rossier C, Hancock M, Buchet K, Reymond A, Hummler E, Marzella PL, Kudoh J, Shimizu N, Scott HS, Antonarakis SE und Rossier BC.** The transmembrane serine protease (TMPRSS3) mutated in deafness DFNB8/10 activates the epithelial sodium channel (ENaC) in vitro. *Hum Mol Genet* 11: 2829-2836, 2002.

**Hanukoglu A, Bistrizter T, Rakover Y und Mandelberg A.** Pseudohypoaldosteronism with increased sweat and saliva electrolyte values and frequent lower respiratory tract infections mimicking cystic fibrosis. *J Pediatr* 125: 752-755, 1994.

**Hirsh AJ, Sabater JR, Zamurs A, Smith RT, Paradiso AM, Hopkins S, Abraham WM und Boucher RC.** Evaluation of second generation amiloride analogs as therapy for cystic fibrosis lung disease. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 929-938, 2004.

**Hofmann T, Stutts MJ, Ziersch A, Rückes C, Weber W-M, Knowles MR, Lindemann H und Boucher RC.** Effects of topically delivered benzamil and amiloride on nasal potential difference and sodium absorption in cystic fibrosis respiratory epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1844-1849, 1998.

**Horisberger J-D und Chraibi A.** Epithelial sodium channel: a ligand-gated channel? *Nephron Physiol* 96(2): 37-41, 2004.

**Hughey RP, Bruns JB, Kinlough CL, Harkleroad KL, Tong Q, Carattino MD, Johnson JP, Stockand JD und Kleyman TR.** Epithelial sodium channels are activated by furin-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 279: 18111-18114, 2004a.

**Hughey RP, Bruns JB, Kinlough CL und Kleyman TR.** Distinct pools of epithelial sodium channels are expressed at the plasma membrane. *J Biol Chem* 279: 48491-48494, 2004b.

**Hughey RP, Mueller GM, Bruns JB, Kinlough CL, Poland PA, Harkleroad KL, Carattino MD und Kleyman TR.** Maturation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel involves proteolytic processing of the alpha- and gamma-subunits. *J Biol Chem* 278: 37073-37082, 2003.

**Jean F, Thomas L, Molloy SS, Liu G, Jarvis MA, Nelson JA und Thomas G.** A protein-based therapeutic for human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2864-2869, 2000.

**Jiang Q, Li J, Dubroff R, Ahn YJ, Foskett JK, Engelhardt J und Kleyman TR.** Epithelial sodium channels regulate cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 275: 13266-13274, 2000.

**Johnson MD, Bao HF, Helms MN, Chen XJ, Tigue Z, Jain L, Dobbs LG und Eaton DC.** Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 4964-4969, 2006.

**Kellenberger S und Schild L.** Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Phys Rev* 82: 735-767, 2002.

**Kemendy AE, Kleyman TR und Eaton DC.** Aldosterone alters the open probability of amiloride-blockable sodium channels in A6 epithelia. *Am J Physiol* 263: C825-C837, 1992.

**Konstas AA, Koch JP und Korbmacher C.** cAMP-dependent activation of CFTR inhibits the epithelial sodium channel (ENaC) without affecting its surface expression. *Pflügers Arch* 445: 513-521, 2003.

**Kosari F, Sheng S, Li J, Mak D-OD, Foskett JK und Kleyman TR.** Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 273: 13469-13474, 1998.

**Kunzelmann K, Schreiber R, Nitschke R und Mall M.** Control of the epithelial Na<sup>+</sup> conductance by the cystic fibrosis conductance regulator. *Pflügers Arch* 440: 193-201, 2000.

**Kyhse-Andersen J.** Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10: 203-209, 1984.

**Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

**Lehninger AL, Nelson DL und Cox MM.** Prinzipien der Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag* 2001.

**Letz B und Korbmacher C.** cAMP stimulates CFTR-like Cl<sup>-</sup> channels and inhibits amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channels in mouse CCD cells. *Am J Physiol* 272: C657-C666, 1997.

**Lewis SA und Clausen C.** Urinary proteases degrade epithelial sodium channels. *J Membr Biol* 122: 77-88, 1991.

**Lindemann H, Tümmler B und Dockter G.** Mukoviszidose - Zystische Fibrose. *Georg Thieme Verlag KG* 2004.

**Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK und Boucher RC.** Increased airway epithelial Na<sup>+</sup> absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* 10: 487-493, 2004.

**Mall M, Hipper A, Greger R und Kunzelmann K.** Wild type but not  $\Delta F508$  CFTR inhibits Na<sup>+</sup> conductance when coexpressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 381: 47-52, 1996.

**Mano I und Driscoll M.** DEG/ENaC channels: a touchy superfamily that watches its salt. *BioAssays* 21: 568-578, 1999.

**Marthinsen L, Kornfalt R, Aili M, Andersson D, Westgren U und Schaedel C.** Recurrent *Pseudomonas* bronchopneumonia and other symptoms as in cystic fibrosis in a child with type I pseudohypoaldosteronism. *Acta Paediatr* 87: 472-474, 1998.

**May A, Puoti A, Gaeggeler H-P, Horisberger J-D und Rossier BC.** Early effect of aldosterone on the rate of synthesis of the epithelial sodium channel  $\alpha$  subunit in A6 renal cells. *J Am Soc Nephrol* 8: 1813-1822, 1997.

**McDonald FJ, Price MP, Snyder PM und Welsh MJ.** Cloning and expression of the  $\beta$ - and  $\gamma$ -subunits of the human epithelial sodium channel. *Am J Physiol* 268: C1157-C1163, 1995.

**McDonald FJ, Snyder PM, McCray PB und Welsh MJ.** Cloning, expression, and tissue distribution of a human amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  channel. *Am J Physiol* 266: L728-L734, 1994.

**McNicholas CM und Canessa CM.** Diversity of channels generated by different combinations of epithelial channel subunits. *J Gen Physiol* 109: 681-692, 1997.

**Myerburg MM, Butterworth MB, McKenna EE, Peters KW, Frizzell RA, Kleyman TR und Pilewski JM.** Airway surface liquid volume regulates ENaC by altering the serine protease-protease inhibitor balance: A mechanism for sodium hypersorption in cystic fibrosis. *J Biol Chem* 2006.

**Nagel G, Barbry P, Chabot H, Brochiero E, Hartung K und Grygorczyk R.** CFTR fails to inhibit the epithelial sodium channel ENaC expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 564: 671-682, 2005.

**Nakayama K.** Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* 327 ( Pt 3): 625-635, 1997.

**Nechyporuk-Zloy V, Stock C, Schillers H, Oberleithner H und Schwab A.** Single plasma membrane  $\text{K}^+$  channel detection by using dual-color quantum dot labeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C266-C269, 2006.

**Oberleithner H, Schneider SW, Albermann L, Hillebrand U, Ludwig T, Riethmuller C, Shahin V, Schafer C und Schillers H.** Endothelial cell swelling by aldosterone. *J Membr Biol* 196: 163-172, 2003.

**Pfaffl MW.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45, 2001.

**Pfaffl MW, Horgan GW und Dempfle L.** Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30: e36, 2002.

**Pilewski JM und Frizzell RA.** Role of CFTR in airway disease. *Phys Rev* 79: 215-255, 1999.

**Puoti A, May A, Canessa CM, Horisberger J-D, Schild L und Rossier BC.** The highly selective low-conductance epithelial Na channel of *Xenopus laevis* A6 kidney cells. *Am J Physiol* 269: C188-C197, 1995.

**Quinton PM.** Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Phys Rev* 79: S3-S22, 1999.

**Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsik N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS und Tsui L-C.** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073, 1989.

**Rossier BC.** Hormonal regulation of the epithelial sodium channel ENaC: N or P<sub>o</sub>? *J Gen Physiol* 120: 67-70, 2002.

**Rossier BC, Pradervand S, Schild L und Hummler E.** Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annu Rev Physiol* 64: 877-897, 2002.

**Rotin D, Bar-Sagi D, O'Brodivich H, Merilainen J, Lehto VP, Canessa CM, Rossier BC und Downey GP.** An SH3 binding region in the epithelial Na<sup>+</sup> channel (alpha rENaC) mediates its localization at the apical membrane. *EMBO J* 13: 4440-4450, 1994.

**Rückes C, Blank U, Möller K, Rieboldt J, Lindemann H, Münker G, Clauss W und Weber W-M.** Amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channels in human nasal epithelium are different from classical epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Biochem Biophys Res Com* 237: 488-491, 1997.

**Rückes-Nilges C, Weber U, Lindemann H, Münker G, Clauss W und Weber W-M.** Minor role of Cl<sup>-</sup> secretion in non-cystic fibrosis and cystic fibrosis human nasal epithelium. *Cell Physiol Biochem* 9: 1-11, 1999.

**Samaha FF, Rubenstein RC, Yan W, Ramkumar M, Levy DI, Ahn YJ, Sheng S und 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.

**Saxena A, Hanukoglu I, Saxena D, Thompson RJ, Gardiner RM und Hanukoglu A.** Novel mutations responsible for autosomal recessive multisystem pseudohypoaldosteronism and sequence variants in epithelial sodium channel alpha-, beta-, and gamma-subunit genes. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3344-3350, 2002.

**Segal A, Ullrich ND, Eggermont J, Van Driessche W und Weber W-M.** ENaC promotes expression of CFTR while CFTR does not inhibit ENaC. *Pflügers Arch* 443: 182, 2002a.

**Segal A, Van Driessche W und Weber W-M.** Specific effects of antisense oligonucleotides on ENaC expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Arch* 443: 228, 2002b.

**Shipway A, Danahay H, Williams JA, Tully DC, Backes BJ und Harris JL.** Biochemical characterization of prostaticin, a channel activating protease. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 953-963, 2004.

**Snyder PM.** Minireview: regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channel trafficking. *Endocrinol* 146: 5079-5085, 2005.

**Snyder PM, Cheng C, Prince LS, Rogers JC und Welsh MJ.** Electrophysiological and biochemical evidence that DEG/ENaC cation channels are composed of nine subunits. *J Biol Chem* 273: 681-684, 1998.

**Staruschenko A, Adams E, Booth RE und Stockand JD.** Epithelial Na<sup>+</sup> channel subunit stoichiometry. *Biophys J* 88: 3966-3975, 2005.

**Staub O und Rotin D.** WW domains. *Structure* 4: 495-499, 1996.

**Stutts MJ, Rossier BC und Boucher RC.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inverts protein kinase A-mediated regulation of epithelial sodium channel single channel kinetics. *J Biol Chem* 272: 14037-14040, 1997.

**Terheggen-Lagro SW, Rijkers GT und van der Ent CK.** The role of airway epithelium and blood neutrophils in the inflammatory response in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 4 Suppl 2: 15-23, 2005.

**Tong Q, Menon AG und Stockand JD.** Functional polymorphisms in the alpha-subunit of the human epithelial Na<sup>+</sup> channel increase activity. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F821-F827, 2006.

**Tucker JK, Tamba K, Lee Y-J, Shen L-L, Warnock DG und Oh Y.** Cloning and functional studies of splice variants of the  $\alpha$ -subunit of the amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel. *Am J Physiol* 274: C1081-C1089, 1998.

**Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler H-P, Horisberger J-D und Rossier BC.** An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 389: 607-610, 1997.

**Verghese GM, Tong ZY, Bhagwandin V und Caughey GH.** Mouse prostaticin gene structure, promoter analysis, and restricted expression in lung and kidney. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 519-529, 2004.

**Voilley N, Bassilana F, Mignon C, Merscher S, Mattei MG, Carle GF, Lazdunski M und 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* 28: 560-565, 1995.

**Voilley N, Lingueglia E, Champigny G, Mattei M-G, Waldmann R, Lazdunski M und Barbry P.** The lung amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel: Biophysical properties, pharmacology, ontogenesis, and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 247-251, 1994.

**Vuagniaux G, Vallet V, Fowler-Jaeger N, Pfister C, Bens M, Farman N, Courtois-Coutry N, Vandewalle A, Rossier BC und Hummler E.** Activation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel by the serine protease mCAP1 expressed in a mouse cortical collecting duct cell line. *J Am Soc Nephrol* 11: 828-834, 2000.

**Vuagniaux G, Vallet V, Jaeger NF, Hummler E und Rossier BC.** Synergistic activation of ENaC by three membrane-bound channel-activating serine proteases (mCAP1, mCAP2, and mCAP3) and serum- and glucocorticoid-regulated kinase (Sgk1) in *Xenopus* Oocytes. *J Gen Physiol* 120: 191-201, 2002.

**Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Voilley N und Lazdunski M.** Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 270: 27411-27414, 1995.

**Wanner A, Salathé M und O'Riordan TG.** Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1868-1902, 1996.

**Yamamura H, Ugawa S, Ueda T, Nagao M und Shimada S.** Protons activate the delta-subunit of the epithelial Na<sup>+</sup> channel in humans. *J Biol Chem* 279: 12529-12534, 2004.

**Zhou ZH und Buben JK.** Nongenomic regulation of ENaC by aldosterone. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1118-C1130, 2001.

## 8 *Anhang*

### 8.1 *Verwendete Chemikalien*

<b>Substanz</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz (Deutschland)</b>
Acrylamid	Roth	Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth	Karlsruhe
Agar Agar	Roth	Karlsruhe
Agarose	Segenetic	Borken
Ampicillin	Roth	Karlsruhe
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP)	Omnilab	Bremen
Borsäure	Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau	Merk	Darmstadt
Chloroform	Roth	Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250	Roth	Karlsruhe
dNTPs	MBI Fermentas	St. Leon-Rot
Essigsäure (Eisessig)	Roth	Karlsruhe
Ethanol 99,8 % p.a.	Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth	Karlsruhe
Formamid	AppliChem	Darmstadt
Formaldehyd (37 %)	AppliChem	Darmstadt
Glycerin	Merk	Darmstadt
Glycin	Roth	Karlsruhe
HCL (Salzsäure)	Roth	Karlsruhe
Hefe-extrakt	AppliChem	Darmstadt

---

IPTG	Roth	Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth	Karlsruhe
Magermilchpulver	Frema Reform	Lüneburg
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Fluka	Taufkirchen
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth	Karlsruhe
Methanol p.a.	Roth	Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth	Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth	Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	Karlsruhe
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	AppliChem	Darmstadt
PEG 8000	Roth	Karlsruhe
Tetrazyklin	Roth	Karlsruhe
Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe
Tris	Roth	Karlsruhe
Trypton	Roth	Karlsruhe
X-Gal	Roth	Karlsruhe

---

## 8.2 *Verwendete Geräte*

<b>Gerät</b>	<b>Name</b>	<b>Firmensitz</b>
Zentrifugen	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	MiniSpin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Photometer	S2100 Diode Array Spectrophotometer	WPA Biowave, Cambridge, UK
Autoklav	Autoklav 3850 EL	Systec, Wettendorf, Deutschland
pH-Meter	inolab Level 2	Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten, Weilheim, Deutschland
Ultra-Turrax	Ultra-Turrax T8	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Sonifier	Sonifier®ultrasonic cell disrupter	Branson, Danbury, USA
Thermocycler	Biometra T Gradient	Biometra, Göttingen, Deutschland
	Biometra T Personal	Biometra, Göttingen, Deutschland

## 8.3 *Verwendete Marker und Polymerasen*

	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz (Deutschland)</b>
PageRuler™ Prestained Protein ladder	Fermentas	St. Leon-Rot
λ DNA-Marker <i>EcoRI/HindIII</i>	Fermentas	St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/μl)	Segenetic	Borken
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/μl)	Invitrogen	Karlsruhe

#### 8.4 *Abkürzungscodes der Aminosäuren*

<b>A</b>	Ala	Alanin	<b>M</b>	Met	Methionin
<b>C</b>	Cys	Cystein	<b>N</b>	Asn	Asparagin
<b>D</b>	Asp	Aspartat	<b>P</b>	Pro	Prolin
<b>E</b>	Glu	Glutamat	<b>Q</b>	Gln	Glutamin
<b>F</b>	Phe	Phenylalanin	<b>R</b>	Arg	Arginin
<b>G</b>	Gly	Glycin	<b>S</b>	Ser	Serin
<b>H</b>	His	Histidin	<b>T</b>	Thr	Threonin
<b>I</b>	Ile	Isoleucin	<b>V</b>	Val	Valin
<b>K</b>	Lys	Lysin	<b>W</b>	Trp	Tryptophan
<b>L</b>	Leu	Leucin	<b>Y</b>	Tyr	Tyrosin

### 8.5 *Verwendete Primer*

**Tabelle 14:** Nukleotidsequenzen der Primer zur Klonierung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC Untereinheiten aus humanem Nasenepithel.

Gen	Sequenzen 5' - 3'	Fragmentlänge (bp)	$T_m$ (°C)
$\alpha$ -hnENaC	CTGATCGAGTTCCACCGCTCCTACC	306	61
	GCTCCTCCAGCTCCTCTTTAATTTCCG		62
$\alpha$ -hnENaC	CTGATCGAGTTCCACCGCTCCTACC	844	61
	GACAGACCGTTGTTGATTCCAGGCATG		61
$\alpha$ -hnENaC	GCCCGTCGAGCCCGTAGCGTG	2178	64
	CAAAAGTAATGGTGTCTGAGCAGGGT		58
$\beta$ -hnENaC	GCCCGAGCAGGTGCCACTATGC	1957	62
	GGTGGACAGGGGCAGGGTTAGATG		59
$\gamma$ -hnENaC	CCCCTACAAGTACAGCACCGTTCG	1644	60
	GCCTCAGAGCTCATCCAGCATC		59

$T_m$ , Schmelztemperatur

**Tabelle 15:** Nukleotidsequenzen der Primer 5' RACE.

Gen	Sequenzen 5' - 3'	Fragmentlänge (bp)	$T_m$ (°C)
$\alpha$ -hnENaC	CACGAGAGTGGTGAAGGAG	513	52
$\alpha$ -hnENaC	GCTCCTCCAGCTCCTCTTTAATTTCCG	448	62
$\alpha$ -hnENaC	GCTGACGGGGTAGCTGAAGTACTC	345	60
$\gamma$ -hnENaC	CCCTGTGAAGAAGTCCCTGG	531	53
$\gamma$ -hnENaC	GGACTCTGGAAAGCCATACAGGGAC	402	59
$\gamma$ -hnENaC	CGAACGGTGCTGTACTTGTAGGGG	332	60

$T_m$ , Schmelztemperatur

**Tabelle 16:** Nukleotidsequenzen der Primer 3' RACE.

Gen	Sequenzen 5' - 3'	Fragmentlänge (bp)	$T_m$ (°C)
$\alpha$ -hnENaC	CGTGCCCTCACAGAGCCATGCCCC	ca. 400	65
$\alpha$ -hnENaC	GCATCCCTTAGAACCTGCTCAGAC	ca. 300	59

$T_m$ , Schmelztemperatur

**Tabelle 17:** Nukleotidsequenzen der Primer für die semi-quantitative RT-PCR.

Gen	Sequenzen 5' - 3'	Fragmentlänge (bp)	$T_m$ (°C)
$\alpha$ -hnENaC	CTGATCGAGTTCCACCGCTCCTACC	306	61
	GCTCCTCCAGCTCCTCTTTAATTTCCG		62
$\beta$ -hnENaC	GCTACCCAGGCATTGACAGAGTGG	688	60
	CAGGTCTCTCTCTGCGCCACGC		63
$\gamma$ -hnENaC	GAGACCAGAGAGGCCCTGAAGTCC	832	60
	GAATGAAGGCAGATCTGGAGCGAG		60
h-GAP-DH	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	239	56
	TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT		60

$T_m$ , Schmelztemperatur

**Tabelle 18:** Nukleotidsequenzen der Primer für die *real-time* RT-PCR.

Gen	Sequenzen 5' - 3'	Fragmentlänge (bp)	$T_m$ (°C)
$\alpha$ -hnENaC	CCTCTGTCACGATGGTCACCTCC	113	60
	CTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTG		60
$\beta$ -hnENaC	CCAATATCACCTGAGCAGGAAGGG	112	60
	CAATAACATCGTCTGGCTGCTCTCG		61
$\gamma$ -hnENaC	GAGCCCAGCCAACAGTATTGAGATG	93	59
	CTCTGTTGTCTGCGTCATCGAGATC		60
h-GAP-DH	CATCACCATCTTCCAGGAGCGAG	109	59
	CACCACCATGGAGAAGGCTGGGG		60
h- $\beta$ Actin	CCTGGAGAAGAGCTACGAGCTG	107	60
	CCTTCCTTCCTGGGCATGGAGTC		59
h-PolRIIa	CTTGTGTGATAACCATGACCTGTCGTG	115	60
	CCTTTGAGGAAACGGTGGACGTGC		60

$T_m$ , Schmelztemperatur

## 8.6 Nukleotid - und Aminosäuresequenz des hnENaC aus CF und nicht-CF Nasenepithel

### $\alpha$ -hnENaC nicht-CF

```

AGCTGGAGGAGCAGGACCCTAGACCTCTGCAGCCCATACCAGGTCTCATGGAGGGGAACAAG 62
                                     M E G N K 5
CTGGAGGAGCAGGACTCTAGCCCTCCACAGTCCACTCCAGGGCTCATGAAGGGGAACAAG 122
L E E Q D S S P P Q S T P G L M K G N K 25
CGTGAGGAGCAGGGGCTGGGCCCCGAACCTGCGGCGCCCCAGCAGCCCACGGCGGAGGAG 182
R E E Q G L G P E P A A P Q Q P T A E E 45
GAGGCCCTGATCGAGTTCCACCGCTCCTACCGAGAGCTCTTCGAGTTCTTCTGCAACAAC 242
E A L I E F H R S Y R E L F E F F C N N 65
ACCACCATCCACGGCGCCATCCGCCTGGTGTGTCTCCAGCACAACCGCATGAAGACGGCC 302
T T I H G A I R L V C S Q H N R M K T A 85
TTCTGGGCAGTGTGTGGCTCTGCACCTTTGGCATGATGTACTGGCAATTCGGCCTGCTT 362
F W A V L W L C T F G M M Y W Q F G L L 105
TTCGGAGAGTACTTCAGCTACCCCGTCAGCCTCAACATCAACCTCAACTCGGACAAGCTC 422
F G E Y F S Y P V S L N I N L N S D K L 125
GTCTTCCCCGCAGTGACCATCTGCACCCTCAATCCCTACAGGTACCCGAAATTAAGAG 482
V F P A V T I C T L N P Y R Y P E I K E 145
GAGCTGGAGGAGCTGGACCGCATCACAGAGCAGACGCTCTTTGACCTGTACAAATACAGC 542
E L E E L D R I T E Q T L F D L Y K Y S 165
TCCTTACCACCTCTCGTGGCCGGCTCCCGCAGCCGTCGCGACCTGCGGGGGACTCTGCCG 602
S F T T L V A G S R S R R D L R G T L P 185
CACCCCTTGAGCGCCTGAGGGTCCCGCCCCGCTCACGGGGCCCGTCGAGCCCGTAGC 662
H P L Q R L R V P P P P H G A R R A R S 205
GTGGCCTCCAGCTTGCGGGACAACAACCCCGAGGTGGACTGGAAGGACTGGAAGATCGGC 722
V A S S L R D N N P Q V D W K D W K I G 225
TTCCAGCTGTGCAACCAGAACAATCGGACTGCTTCTACCAGACATACTCATCAGGGGTG 787
F Q L C N Q N K S D C F Y Q T Y S S G V 245
GATGCGGTGAGGGAGTGGTACCGCTTCCACTACATCAACATCCTGTGAGGCTGCCAGAG 842
D A V R E W Y R F H Y I N I L S R L P E 265
ACTCTGCCATCCCTGGAGGAGGACACGCTGGGCAACTTCATCTTCGCCTGCCGCTTCAAC 902
T L P S L E E D T L G N F I F A C R F N 285
CAGGTCTCCTGCAACCAGGCGAATTACTCTCACTTCCACCACCCGATGTATGGAAACTGC 962
Q V S C N Q A N Y S H F H H P M Y G N C 305
TATACTTTCAATGACAAGAACAACCTCCAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCTGGAATCAAC 1022
Y T F N D K N N S N L W M S S M P G I N 325
AACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCGCAGAGCAGAATGACTTCATTCCCCTGCTGTCCACA 1082
N G L S L M L R A E Q N D F I P L L S T 345

```

GTGACTGGGGCCCGGGTAATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGT 1142  
V T G A R V M V H G Q D E P A F M D D G 365  
GGCTTTAACTTGC GGCC TGGCGTGGAGACCTCCATCAGCATGAGGAAGGAAACCTGGAC 1202  
G F N L R P G V E T S I S M R K E T L D 385  
AGACTTGGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGATGTTCCCTGTTGAACAG 1262  
R L G G D Y G D C T K N G S D V P V E N 405  
CTTTACCCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGTATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAGCATG 1322  
L Y P S K Y T Q Q V C I H S C F Q E S M 425  
ATCAAGGAGTGTGGCTGTGCCTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTGGAGTACTGT 1382  
I K E C G C A Y I F Y P R P Q N V E Y C 445  
GACTACAGAAAGCACAGTTCCTGGGGTACTGCTACTATAAGCTCCAGGTTGACTTCTCC 1442  
D Y R K H S S W G Y C Y Y K L Q V D F S 465  
TCAGACCACCTGGGCTGTTTACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAG 1502  
S D H L G C F T K C R K P C S V T S Y Q 485  
CTCTCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCCAGGAATGGGTCTTCCAGATG 1562  
L S A G Y S R W P S V T S Q E W V F Q M 505  
CTATCGCGACAGAACAATTACACCGTCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAAC 1622  
L S R Q N N Y T V N N K R N G V A K V N 525  
ATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTCTGAGTCTCCCTCTGTACGATGGTC 1682  
I F F K E L N Y K T N S E S P S V T M V 545  
ACCCTCCTGTCCAACCTGGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGGCTCCTCGGTGTTGTCT 1742  
T L L S N L G S Q W S L W F G S S V L S 565  
GTGGTGGAGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTCATCATGTTCCCTCATGCTGCTC 1802  
V V E M A E L V F D L L V I M F L M L L 585  
CGAAGGTTCCGAAGCCGATACTGGTCTCCAGGCCGAGGGGGCAGGGGTGCTCAGGAGGTA 1862  
R R F R S R Y W S P G R G G R G A Q E V 605  
GCCTCCACCCTGGCATCCTCCCCTCCTTCCCCTTCTGCCCCACCCCATGTCTCTGTCC 1922  
A S T L A S S P P S H F C P H P M S L S 625  
TTGTCCCAGCCAGGCCCTGCTCCCTCTCCAGCCTTGACAGCCCCTCCCCCTGCCTATGCC 1982  
L S Q P G P A P S P A L T A P P P A Y A 645  
ACCCTGGGCCCCCGCCATCTCCAGGGGGCTCTGCAGGGGCCAGTTCCTCCGCCTGTCTCT 2042  
T L G P R P S P G G S A G A S S S A C P 665  
CTGGGGGGGCCCTGAAGAGGGAAGGAGAGGTTTCTCACACCAAGGCAGATGCTCCTCTGGT 2102  
L G G P - 669  
GGGAGGGTGTGGCCCTGGCAAGATTGAAGGATGTGCAGGGCTTCCCTCTCAGAGCCGCCC 2162  
AAACTGCCGTTGATGTGTGGAGGGGAAGCAAGATGGGTAAGGGCTCAGGAAGTTGCTCCA 2222  
AGAACAGTAGCTGATGAAGCTGCCCAGAAGTGCCTTGGCTCCAGCCCTGTACCCCTTGGT 2282  
ACTGCCTCTGAACACTCTGGTTTCCCCACCAACTGCGGCTAAGTCTCTTTTTTCCCTTGG 2342  
ATCAGCCAAGCGAAACTTGGAGCTTTGACAAGGAACTTTCCTAAGAAACCGCTGATAACC 2402  
AGGACAAAACACAACCAAGGTACACGCAGGCATGCACGGGTTTCTGCCAGCGACGGC 2462  
TTAAGCCAGCCCCGACTGGCCTGGCCCACTGCTCTCCAGTAGCACAGATGTCTGCTCC 2522  
TCCTCTTGAACCTGGGTGGGAAACCCACCCAAAAGCCCCCTTTGTTACTTAGGCAATTC 2582

CCCTTCCCTGACTCCCGAGGGCTAGGGCTAGAGCAGACCCGGGTAAGTAAAGGCAGACCC	2642
AGGGCTCCTCTAGCCTCATAACCCGTGCCCTCACAGAGCCATGCCCCGGCACCTCTGCCCT	2702
GTGTCTTTCATACCTCTACATGTCTGCTTGAGATATTTCCCTCAGCCTGAAAGTTTCCCCA	2762
ACCATCTGCCAGAGAACTCCTATGCATCCCTTAGAACCCCTGCTCAGACACCATTACTTTT	2822
GTGAACGCTTCTGCCACATCTTGTCTTCCCCAAAATTGATCACTCCGCCTTCTCCTGGGC	2882
TCCCGTAGCACACTATAACATCTGCTGGAGTGTTGCTGTTGCACCATACTTTCTTGTACA	2942
TTTGTGTCTCCCTTCCCAGACTAGACTGTAAGTGCCTTGCGGTGAGGGACTGAATCTTGCC	3002
CGTTTATGTATGCTCCATGTCTAGCCCATCATCCTGCTTGGAGCAAGTAGGCAGGAGCTC	3062
<b>AATAAA</b> TGTTTGTTCATGAAA	3119

**Abbildung 26:** Nukleotid- und Aminosäuresequenz  $\alpha$ -hnENaC aus nicht-CF Gewebe.

Abgebildet ist die gesamte Nukleotidsequenz des  $\alpha$ -hnENaC aus nicht-CF Gewebe, sowie die Translation in Aminosäuren.

Startcodon: rot unterlegt.

Stopcodon: gelb unterlegt.

Polyadenylierungssignal: liegt 19 Nukleotide vor dem PolyA<sup>+</sup>-Schwanz und ist grün unterlegt.

$\beta$ -hnENaC nicht-CF

**ATG**CACGTGAAGAAGTACCTGCTGAGGGGCTGCATCGGCTGCAGAGGGGCCCCGGCTAC 60  
 M H V K K Y L L R G L H R L Q R G P G Y 20  
 ACGTACAAGGAGCTGCTGGTGTGGTACTGCGACAACACCAACACCCACGGCCCCAAGCGC 120  
 T Y K E L L V W Y C D N T N T H G P K R 40  
 ATCATCTGTGAGGGGCCAAGAAGAAAGCCATGTGGTTCCTGCTCACCTGCTCTTCGCC 180  
 I I C E G P K K K A M W F L L T L L F A 60  
 GCCCTCGTCTGCTGGCAGTGGGGCATCTTCATCAGGACCTACTTGAGCTGGGAGGTCAGC 240  
 A L V C W Q W G I F I R T Y L S W E V S 80  
 GTCTCCCTCTCCGTAGGCTTCAAGACCATGGACTTCCCCGCCGTACCCATCTGCAATGCT 300  
 V S L S V G F K T M D F P A V T I C N A 100  
 AGCCCCCTCAAGTATTCCAAAATCAAGCATTTGCTGAAGGACCTGGATGAGCTGATGGAA 360  
 S P F K Y S K I K H L L K D L D E L M E 120  
 GCTGTCTGGAGAGAATCCTGGCTCCTGAGCTAAGCCATGCCAATGCCACCAGGAACCTG 420  
 A V L E R I L A P E L S H A N A T R N L 140  
 AACTTCTCCATCTGGAACCACACACCCCTGGTCCTTATTGATGAACGGAACCCCCACCAC 480  
 N F S I W N H T P L V L I D E R N P H H 160  
 CCCATGGTCCTTGATCTCTTTGGAGACAACCACAATGGCTTAACAAGCAGCTCAGCATCA 540  
 P M V L D L F G D N H N G L T S S S A S 180  
 GAAAAGATCTGTAATGCCACGGGTGCAAAATGGCCATGAGACTATGTAGCCTCAACAGG 600  
 E K I C N A H G C K M A M R L C S L N R 200  
 ACCCAGTGACCTTCCGGAACCTCACCAGTGCTACCCAGGCATTGACAGAGTGGTACATC 660  
 T Q C T F R N F T S A T Q A L T E W Y I 220  
 CTGCAGGCCACCAACATCTTTGCACAGGTGCCACAGCAGGAGCTAGTAGAGATGAGCTAC 720  
 L Q A T N I F A Q V P Q Q E L V E M S Y 240  
 CCCGGCGAGCAGATGATCCTGGCCTGCCTATTCCGAGCTGAGCCCTGCAACTACCGGAAC 780  
 P G E Q M I L A C L F G A E P C N Y R N 260  
 TTCACGTCCATCTTCTACCCTCACTATGGCAACTGTTACATCTTCAACTGGGGCATGACA 840  
 F T S I F Y P H Y G N C Y I F N W G M T 280  
 GAGAAGGCACTTCTTCGGCCAACCCTGGAAGTGAATTCGGCCTGAAGTTGATCCTGGAC 900  
 E K A L P S A N P G T E F G L K L I L D 300  
 ATAGGCCAGGAAGACTACGTCCCCTTCTTGCCTCCACGGCCGGGGTCAGGCTGATGCTT 960  
 I G Q E D Y V P F L A S T A G V R L M L 320  
 CACGAGCAGAGGTCATACCCCTTCATCAGAGATGAGGGCATCTACGCCATGTGCGGGACA 1020  
 H E Q R S Y P F I R D E G I Y A M S G T 340  
 GAGACGTCCATCGGGTACTCGTGGACAAGCTTCAGCGCATGGGGGAGCCCTACAGCCCG 1080  
 E T S I G V L V D K L Q R M G E P Y S P 360  
 TGCACCGTGAATGGTTCTGAGGTCCCCGTCCAAAATTCTACAGTGACTACAACACGACC 1140  
 C T V N G S E V P V Q N F Y S D Y N T T 380  
 TACTCCATCCAGGCCTGTCTTCGCTCCTGCTTCCAAGACCACATGATCCGTAAGTCAAC 1200  
 Y S I Q A C L R S C F Q D H M I R N C N 400

```

TGTGGCCACTACCTGTACCCACTGCCCCGTGGGGAGAAATACTGCAACAACCGGGACTTC 1260
  C G H Y L Y P L P R G E K Y C N N R D F 420
CCAGACTGGGCCCATTGCTACTCAGATCTACAGATGAGCGTGGCGCAGAGAGAGACCTGC 1320
  P D W A H C Y S D L Q M S V A Q R E T C 440
ATTGGCATGTGCAAGGAGTCTGCAATGACACCCAGTACAAGATGACCATCTCCATGGCT 1380
  I G M C K E S C N D T Q Y K M T I S M A 460
GACTGGCCTTCTGAGGCCTCCGAGGACTGGATTTTTCCACGTCTTGTCTCAGGAGCGGGAC 1440
  D W P S E A S E D W I F H V L S Q E R D 480
CAAAGCACC AATATCACCCCTGAGCAGGAAGGGAATTGTCAAGCTCAACATCTACTTCCAA 1500
  Q S T N I T L S R K G I V K L N I Y F Q 500
GAATTTAACTATCGCACCATTGAAGAATCAGCAGCCAATAACATCGTCTGGCTGCTCTCG 1560
  E F N Y R T I E E S A A N N I V W L L S 520
AATCTGGGTGGCCAGTTTGGCTTCTGGATGGGGGGCTCTGTGCTGTGCCTCATCGAGTTT 1620
  N L G G Q F G F W M G G S V L C L I E F 540
GGGGAGATCATCATCGACTTTGTGTGGATCACCATCATCAAGCTGGTGGCCTTGGCCAAG 1680
  G E I I I D F V W I T I I K L V A L A K 560
AGCCTACGGCAGCGGCGAGCCCAAGCCAGCTACGCTGGCCCACCGCCCACCGTGGCCGAG 1740
  S L R Q R R A Q A S Y A G P P P T V A E 580
CTGGTGGAGGCCACACCAACTTTGGCTTCCAGCCTGACACGGCCCCCGCAGCCCCAAC 1800
  L V E A H T N F G F Q P D T A P R S P N 600
ACTGGGCCCTACCCCAGTGAGCAGGCCCTGCCCATCCCAGGCACCCCGCCCCCAACTAT 1860
  T G P Y P S E Q A L P I P G T P P P N Y 620
GACTCCCTGCGTCTGCAGCCGCTGGACGTCATCGAGTCTGACAGTGAGGGTGATGCCATC 1920
  D S L R L Q P L D V I E S D S E G D A I 640
TAA
-

```

**Abbildung 27:** Nukleotid- und Aminosäuresequenz  $\beta$ -hnENaC aus nicht-CF Gewebe.

Abgebildet ist die gesamte Nukleotidsequenz des  $\beta$ -hnENaC aus nicht-CF Gewebe, sowie die Translation in Aminosäuren.

Startcodon: rot unterlegt.

Stopcodon: gelb unterlegt.

$\gamma$ -hnENaC nicht-CF

**ATC**GCACCCGGAGAGAAGATCAAAGCCAAAATCAAGAAGAATCTGCCCGTGACGGGCCCT 60  
**M A P G E K I K A K I K K N L P V T G P** 20  
 CAGGCGCCGACCATTAAAGAGCTGATGCGGTGGTACTGCCTCAACACCAACACCCATGGC 120  
**Q A P T I K E L M R W Y C L N T N T H G** 40  
 TGTCGCCGCATCGTGGTGTCCCGCGGCCGTCTGCGCCGCCTCCTCTGGATCGGGTTTACA 180  
**C R R I V V S R G R L R R L L W I G F T** 60  
 CTGACTGCCGTGGCCCTCATCCTCTGGCAGTGCGCCCTCCTCGTCTTCTCCTTCTATACT 240  
**L T A V A L I L W Q C A L L V F S F Y T** 80  
 GTCTCAGTTTCCATCAAAGTCCACTTCCGGAAGCTGGATTTTCTGCAGTCACCATCTGC 300  
**V S V S I K V H F R K L D F P A V T I C** 100  
 AACATCAACCCCTACAAGTACAGCACCGTTCCGCCACCTTCTAGCTGACTTGGAACAGGAG 360  
**N I N P Y K Y S T V R H L L A D L E Q E** 120  
 ACCAGAGAGGCCCTGAAGTCCCTGTATGGCTTTCCAGAGTCCCAGGAAAGCGCCGAGAGCG 420  
**T R E A L K S L Y G F P E S R K R R E A** 140  
 GAGTCTGGAACTCCGTCTCAGAGGGAAAGCAGCCTAGATTCTCCACCGGATTCCGCTG 480  
**E S W N S V S E G K Q P R F S H R I P L** 160  
 CTGATCTTTGATCAGGATGAGAAGGGCAAGGCCAGGGACTTCTTACAGGGAGGAAGCGG 540  
**L I F D Q D E K G K A R D F F T G R K R** 180  
 AAAGTCGGCGGTAGCATCATTACAAGGCTTCAAATGTCATGCACATCGAGTCCAAGCAA 600  
**K V G G S I I H K A S N V M H I E S K Q** 200  
 GTGGTGGGATTCCAACCTGTGCTCAAATGACACCTCCGACTGTGCCACCTACACCTTACGC 660  
**V V G F Q L C S N D T S D C A T Y T F S** 220  
 TCGGGAATCAATGCCATTCCAGGAGTGGTATAAGCTACACTACATGAACATCATGGCACAG 720  
**S G I N A I Q E W Y K L H Y M N I M A Q** 240  
 GTGCCCTCTGGAGAAGAAAATCAACATGAGCTATTCTGCTGAGGAGCTGCTGGTGACCTGC 780  
**V P L E K K I N M S Y S A E E L L V T C** 260  
 TTCTTTGATGGAGTGTCTGTGATGCCAGGAATTTCCAGCTTTTCCACCACCCGATGCAT 840  
**F F D G V S C D A R N F T L F H H P M H** 280  
 GGGAAATTGCTATACTTTCAACAACAGAGAAAATGAGACCATTCTCAGCACCTCCATGGGG 900  
**G N C Y T F N N R E N E T I L S T S M G** 300  
 GGCAGCGAATATGGGCTGCAAGTCATTTTGTACATAAACGAAGAGGAATACAACCCATTC 960  
**G S E Y G L Q V I L Y I N E E E Y N P F** 320  
 CTCGTGTCTCCACTGGAGCTAAGGTGATCATCCATCGGCAGGATGAGTATCCCTTCGTC 1020  
**L V S S T G A K V I I H R Q D E Y P F V** 340  
 GAAGATGTGGGAACAGAGATTGAGACAGCAATGGTCACCTCTATAGGAATGCACCTGACA 1080  
**E D V G T E I E T A M V T S I G M H L T** 360  
 GAGTCTTCAAGCTGAGTGAGCCCTACAGTCAGTGCACGGAGGACGGGAGTGACGTGCCA 1140  
**E S F K L S E P Y S Q C T E D G S D V P** 380  
 ATCAGGAACATCTACAACGCTGCCTACTCGCTCCAGATCTGCCTTCATTCATGCTTCCAG 1200

I R N I Y N A A Y S L Q I C L H S C F Q	400
ACAAAGATGGTGGAGAAATGTGGGTGTGCCCAGTACAGCCAGCCTCTACCTCCTGCAGCC	1260
T K M V E K C G C A Q Y S Q P L P P A A	420
AACTACTGCAACTACCAGCAGCACCCCAACTGGATGTATTGTTACTACCAACTGCATCGA	1320
N Y C N Y Q Q H P N W M Y C Y Y Q L H R	440
GCCTTTGTCCAGGAAGAGCTGGGCTGCCAGTCTGTGTGCAAGGAAGCCTGCAGCTTTAAA	1380
A F V Q E E L G C Q S V C K E A C S F K	460
GAGTGGACACTAACCACAAGCCTGGCACAATGGCCATCTGTGGTTTCGGAGAAGTGGTTG	1440
E W T L T T S L A Q W P S V V S E K W L	480
CTGCCTGTTCTCACTTGGGACCAAGGCCGGCAAGTAAACAAAAAGCTCAACAAGACAGAC	1500
L P V L T W D Q G R Q V N K K L N K T D	500
TTGGCCAAACTCTTGATATTCTACAAAGACCTGAACCAGAGATCCATCATGGAGAGCCCA	1560
L A K L L I F Y K D L N Q R S I M E S P	520
GCCAACAGTATTGAGATGCTTCTGTCCAACCTTCGGTGGCCAGCTGGGCCTGTGGATGAGC	1620
A N S I E M L L S N F G G Q L G L W M S	540
TGCTCTGTTGTCTGCGTCATCGAGATCATCGAGGTCTTCTTCATTGACTTCTTCTCTATC	1680
C S V V C V I E I I E V F F I D F F S I	560
ATTGCCCGCCGCCAGTGGCAGAAAGCCAAGGAGTGGTGGGCCTGGAAACAGGCTCCCCCA	1740
I A R R Q W Q K A K E W W A W K Q A P P	580
TGTCCAGAAGCTCCCCGTAGCCACAGGGCCAGGACAATCCAGCCCTGGATATAGACGAT	1800
C P E A P R S P Q G Q D N P A L D I D D	600
GACCTACCCACTTTCAACTCTGCTTTGCACCTGCCTCCAGCCCTAGGAACCCAAGTGCCC	1860
D L P T F N S A L H L P P A L G T Q V P	620
GGCACACCGCCCCCAAATACAATACCTTGCCTTGGAGAGGGCCTTTTCCAACCAGCTC	1920
G T P P P K Y N T L R L E R A F S N Q L	640
ACAGATACCCAGATGCTGGATGAGCTCTGA	1950
T D T Q M L D E L -	649

**Abbildung 28:** Nukleotid- und Aminosäuresequenz  $\gamma$ -hnENaC aus nicht-CF Gewebe.

Abgebildet ist die gesamte Nukleotidsequenz des  $\gamma$ -hnENaC aus nicht-CF Gewebe, sowie die Translation in Aminosäuren.

Startcodon: rot unterlegt.

Stopcodon: gelb unterlegt.

$\alpha$ -hnENaC CF

TTAAAGAGGAGCTGGAGGAGCAGGACCCTAGACCTCTGCAGCCCATACCAGGTCTC**ATG**GAG 62  
M E 2

GGGAACAAGCTGGAGGAGCAGGACTCTAGCCCTCCACAGTCCACTCCAGGGCTCATGAAG 122  
G N K L E E Q D S S P P Q S T P G L M K 22

GGGAACAAGCGTGAGGAGCAGGGGCTGGGCCCCGAACCTGCGGCGCCCCAGCAGCCCACG 182  
G N K R E E Q G L G P E P A A P Q Q P T 42

GCGGAGGAGGAGGCCCTGATCGAGTTCCACCGCTCCTACCGAGAGCTCTTCGAGTTCTTC 242  
A E E E A L I E F H R S Y R E L F E F F 62

TGCAACAACACCACCATCCACGGCGCCATCCGCCTGGTGTGCTCCCAGCACAACCGCATG 302  
C N N T T I H G A I R L V C S Q H N R M 82

AAGACGGCCTTCTGGGCAGTGCTGTGGCTCTGCACCTTTGGCATGATGTACTGGCAATTC 362  
K T A F W A V L W L C T F G M M Y W Q F 102

GGCCTGCTTTTCGGAGAGTACTTCAGCTACCCCGTCAGCCTCAACATCAACCTCAACTCG 422  
G L L F G E Y F S Y P V S L N I N L N S 122

GACAAGCTCGTCTTCCCCGAGTGACCATCTGCACCCTCAATCCCTACAGGTACCCGGAA 482  
D K L V F P A V T I C T L N P Y R Y P E 142

ATTAAGAGGAGCTGGAGGAGCTGGACCGCATCACAGAGCAGACGCTCTTTGACCTGTAC 542  
I K E E L E E L D R I T E Q T L F D L Y 162

AAATACAGCTCCTTACCACCTCTCGTGGCCGGCTCCCGCAGCCGTCGCGACCTGCGGGGG 602  
K Y S S F T T L V A G S R S R R D L R G 182

ACTCTGCCGACCCCTTGCAGCGCCTGAGGGTCCCGCCCCGCCTCACGGGGCCCGTCTGA 662  
T L P H P L Q R L R V P P P P H G A R R 202

GCCCGTAGCGTGGCCTCCAGCTTGCGGGACAACAACCCCGAGGTGGACTGGAAGGACTGG 722  
A R S V A S S L R D N N P Q V D W K D W 222

AAGATCGGCTTCCAGCTGTGCAACCAGAACAATCGGACTGCTTCTACCAGACATACTCA 782  
K I G F Q L C N Q N K S D C F Y Q T Y S 242

TCAGGGGTGGATGCGGTGAGGGAGTGGTACCGCTTCCACTACATCAACATCCTGTGAGG 842  
S G V D A V R E W Y R F H Y I N I L S R 262

CTGCCAGAGACTCTGCCATCCCTGGAGGAGGACACGCTGGGCAACTTCATCTTCGCTGC 902  
L P E T L P S L E E D T L G N F I F A C 282

CGCTTCAACCAGGTCTCCTGCAACCAGGCGAATTACTCTCACTTCCACCACCCGATGTAT 962  
R F N Q V S C N Q A N Y S H F H H P M Y 302

GGAAACTGCTATACTTTCAATGACAAGAACAACCTCCAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCT 1022  
G N C Y T F N D K N N S N L W M S S M P 322

GGAATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCGCAGAGCAGAATGACTTCATTCCCCTG 1082  
G I N N G L S L M L R A E Q N D F I P L 342

CTGTCCACAGTACTGGGGCCCGGTAATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATG 1142  
L S T V T G A R V M V H G Q D E P A F M 362

GATGATGGTGGCTTTAACTTGGCGCCTGGCGTGGAGACCTCCATCAGCATGAGGAAGGAA 1202  
D D G G F N L R P G V E T S I S M R K E 382

ACCCTGGACAGACTTGGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGATGTTCTT 1262  
T L D R L G G D Y G D C T K N G S D V P 402  
GTTGAGAACCTTTACCCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGTATTCACTCCTGCTTCCAG 1322  
V E N L Y P S K Y T Q Q V C I H S C F Q 422  
GAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGTGCCTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTG 1382  
E S M I K E C G C A Y I F Y P R P Q N V 442  
GAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCTGGGGGTACTGCTACTATAAGCTCCAGGTT 1442  
E Y C D Y R K H S S W G Y C Y Y K L Q V 462  
GACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTCACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGCGTGACC 1502  
D F S S D H L G C F T K C R K P C S V T 482  
AGCTACCAGCTCTCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCCAGGAATGGGTC 1562  
S Y Q L S A G Y S R W P S V T S Q E W V 502  
TTCCAGATGCTATCGCGACAGAACAATTACACCGTCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCC 1622  
F Q M L S R Q N N Y T V N N K R N G V A 522  
AAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTCTGAGTCTCCCTCTGTC 1682  
K V N I F F K E L N Y K T N S E S P S V 542  
ACGATGGTCACCCTCCTGTCCAACCTGGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCCGGCTCCTCG 1742  
T M V T L L S N L G S Q W S L W F G S S 562  
GTGTTGTCTGTGGTGGAGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTCATCATGTTCTCT 1802  
V L S V V E M A E L V F D L L V I M F L 582  
ATGCTGCTCCGAAGGTTCCGAAGCCGATACTGGTCTCCAGGCCGAGGGGGCAGGGGTGCT 1862  
M L L R R F R S R Y W S P G R G G R G A 602  
CAGGAGGTAGCCTCCACCCTGGCATCCTCCCCTCCTTCCCACTTCTGCCCCACCCCATG 1922  
Q E V A S T L A S S P P S H F C P H P M 622  
TCTCTGTCTTGTCCCAGCCAGGCCCTGCTCCCTCTCCAGCCTTGACAGCCCCTCCCCCT 1982  
S L S L S Q P G P A P S P A L T A P P P 642  
GCCTATGCCACCCTGGGCCCCCGCCATCTCCAGGGGGCTCTGCAGGGGCCAGTTCCTCC 2042  
A Y A T L G P R P S P G G S A G A S S S 662  
GCCTGTCTCTGGGGGGGCCCTGAGAGGGAAGGAGAGGTTTCTCACACCAAGGCAGATGC 2102  
A C P L G G P - 669  
TCCTCTGGTGGGAGGGTGTGGCCCTGGCAAGATTGAAGGATGTGCAGGGCTTCTCTCA 2162  
GAGCCGCCAAACTGCCGTTGATGTGTGGAGGGGAAGCAAGATGGGTAAGGGCTCAGGAA 2222  
GTTGCTCCAAGAACAGTAGCTGATGAAGCTGCCAGAAGTGCCTTGGCTCCAGCCCTGTA 2282  
CCCCTTGGTACTGCCTCTGAACACTCTGGTTTCCCCACCCAAGTGCAGGCTAAGTCTCTTT 2342  
TTCCCTTGGATCAGCCAAGCGAACTTGGAGCTTTGACAAGGAACTTTTCTAAGAAACCG 2402  
CTGATAACCAGGACAAAACACAACCAAGGGTACACGCAGGCATGCACGGGTTTCTGCCC 2462  
AGCGACGGCTTAAGCCAGCCCCGACTGGCCCTGGCCACACTGCTCTCCAGTAGCACAGAT 2522  
GTCTGCTCCTCCTCTTGAACCTTGGGTGGGAAACCCACCCAAAAGCCCCCTTTGTTACTT 2582  
AGGCAATTCCCCTTCCCTGACTCCCCGAGGGCTAGGGCTAGAGCAGACCCGGGTAAGTAAA 2642  
GGCAGACCCAGGGCTCCTCTAGCCTCATAACCGTGCCCTCACAGAGCCATGCCCCGGCAC 2702  
CTCTGCCCTGTGTCTTTCATACCTCTACATGTCTGCTTGGAGATATTTCTCAGCCTGAAA 2762  
GTTTCCCCAACCATCTGCCAGAGAACTCCTATGCATCCCTTAGAACCCCTGCTCAGACACC 2822

ATTACTTTTGTGAACGCTTCTGCCACATCTTGTCTTCCCCAAAATTGATCACTCCGCCTT	2882
CTCCTGGGCTCCCGTAGCACACTATAACATCTGCTGGAGTGTTGCTGTTGCACCATACTT	2942
TCTTGTACATTTGTGTCTCCCTTCCCAACTAGACTGTAAGTGCCTTGCGGTCAGGGACTG	3002
AATCTTGCCCGTTTATGTATGCTCCATGTCTAGCCCATCATCCTGCTTGGAGCAAGTAGG	3062
CAGGAGCTCAATAAATGTTTGTTCATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	3122
AAAAAA	3128

**Abbildung 29:** Nukleotid- und Aminosäuresequenz  $\alpha$ -hnENaC aus CF Gewebe.

Abgebildet ist die gesamte Nukleotidsequenz des  $\alpha$ -hnENaC aus CF Gewebe, sowie die Translation in Aminosäuren.

Startcodon: rot unterlegt.

Stopcodon: gelb unterlegt.

Polyadenylierungssignal: liegt 19 Nukleotide vor dem PolyA<sup>+</sup>-Schwanz und ist grün unterlegt.

$\beta$ -hnENaC CF

**ATC**CACGTGAAGAAGTACCTGCTGAAGGGCCTGCATCGGCTGCAGAAGGGCCCCGGCTAC 60  
**M** H V K K Y L L K G L H R L Q K G P G Y 20  
 ACGTACAAGGAGCTGCTGGTGTGGTACTGCGACAACACCAACACCCACGGCCCCAAGCGC 120  
**T** Y K E L L V W Y C D N T N T H G P K R 40  
 ATCATCTGTGAGGGGCCAAGAAGAAAGCCATGTGGTTCCTGCTCACCTGCTCTTCGCC 180  
**I** I C E G P K K K A M W F L L T L L F A 60  
 GCCCTCGTCTGCTGGCAGTGGGGCATCTTCATCAGGACCTACTTGAGCTGGGAGGTGAGC 240  
**A** L V C W Q W G I F I R T Y L S W E V S 80  
 GTCTCCCTCTCCGTAGGCTTCAAGACCATGGACTTCCCCGCCGTACCATCTGCAATGCT 300  
**V** S L S V G F K T M D F P A V T I C N A 100  
 AGCCCCCTCAAGTATTCCAAAATCAAGCATTGCTGAAGGACCTGGATGAGCTGATGGAA 360  
**S** P F K Y S K I K H L L K D L D E L M E 120  
 GCTGTCTGGAGAGAATCCTGGCTCCTGAGCTAAGCCATGCCAATGCCACCAGGAACCTG 420  
**A** V L E R I L A P E L S H A N A T R N L 140  
 AACTTCTCCATCTGGAACCACACACCCCTGGTCCTTATTGATGAACGGAACCCCCACCAC 480  
**N** F S I W N H T P L V L I D E R N P H H 160  
 CCCATGGTCCTTGATCTCTTTGGAGACAACCACAATGGCTTAACAAGCAGCTCAGCATCA 540  
**P** M V L D L F G D N H N G L T S S S A S 180  
 GAAAAGATCTGTAATGCCACGGGTGCAAAATGGCCATGAGACTATGTAGCCTCAACAGG 600  
**E** K I C N A H G C K M A M R L C S L N R 200  
 ACCCAGTGTACCTCCGGAACCTCACCAAGTGCTACCCAGGCATTGACAGAGTGGTACATC 660  
**T** Q C T F R N F T S A T Q A L T E W Y I 220  
 CTGCAGGCCACCAACATCTTTGCACAGGTGCCACAGCAGGAGCTAGTAGAGATGAGCTAC 720  
**L** Q A T N I F A Q V P Q Q E L V E M S Y 240  
 CCCGGCGAGCAGATGATCCTGGCCTGCCTATTCCGAGCTGAGCCCTGCAACTACCGGAAC 780  
**P** G E Q M I L A C L F G A E P C N Y R N 260  
 TTCACGTCCATCTTCTACCCTCACTATGGCAACTGTTACATCTTCAACTGGGGCATGACA 840  
**F** T S I F Y P H Y G N C Y I F N W G M T 280  
 GAGAAGGCACTTCCTTCGGCCAACCCTGGAAGTGAATTCGGCCTGAAGTTGATCCTGGAC 900  
**E** K A L P S A N P G T E F G L K L I L D 300  
 ATAGGCCAGGAAGACTACGTCCCCTTCCTTGCCTCCACGGCCGGGGTCAGGCTGATGCTT 960  
**I** G Q E D Y V P F L A S T A G V R L M L 320  
 CACGAGCAGAGGTCATACCCCTTCATCAGAGATGAGGGCATCTACGCCATGTCGGGGACA 1020  
**H** E Q R S Y P F I R D E G I Y A M S G T 340  
 GAGACGTCCATCGGGTACTCGTGGACAAGCTTCAGCGCATGGGGGAGCCCTACAGCCCC 1080  
**E** T S I G V L V D K L Q R M G E P Y S P 360  
 TGCACCGTGAATGGTTCGAGGTCCCCGTCCAAAATTCTACAGTACTACAACACGACC 1140  
**C** T V N G S E V P V Q N F Y S D Y N T T 380  
 TACTCCATCCAGGCCTGTCTTCGCTCCTGCTTCCAAGACCACATGATCCGTAACCTGCAAC 1200  
**Y** S I Q A C L R S C F Q D H M I R N C N 400

```

TGTGGCCACTACCTGTACCCACTGCCCCGTGGGGAGAAATACTGCAACAACCGGGACTTC 1260
  C G H Y L Y P L P R G E K Y C N N R D F 420
CCGACTGGGCCCATTGCTACTCAGATCTACAGATGAGCGTGGCGCAGAGAGAGACCTGC 1320
  P D W A H C Y S D L Q M S V A Q R E T C 440
ATTGGCATGTGCAAGGAGTCCTGCAATGACACCCAGTACAAGATGACCATCTCCATGGCT 1380
  I G M C K E S C N D T Q Y K M T I S M A 460
GACTGGCCTTCTGAGGCCTCCGAGGACTGGATTTTTCCACGTCTTGTCTCAGGAGCGGGAC 1440
  D W P S E A S E D W I F H V L S Q E R D 480
CAAAGCACC AATATCACCCCTGAGCAGGAAGGGAATTGTCAAGCTCAACATCTACTTCCAA 1500
  Q S T N I T L S R K G I V K L N I Y F Q 500
GAATTTAACTATCGCACCATTGAAGAATCAGCAGCCAATAACATCGTCTGGCTGCTCTCG 1560
  E F N Y R T I E E S A A N N I V W L L S 520
AATCTGGGTGGCCAGTTTGGCTTCTGGATGGGGGGCTCTGTGCTGTGCCTCATCGAGTTT 1620
  N L G G Q F G F W M G G S V L C L I E F 540
GGGGAGATCATCATCGACTTTGTGTGGATCACCATCATCAAGCTGGTGGCCTTGGCCAAG 1680
  G E I I I D F V W I T I I K L V A L A K 560
AGCCTACGGCAGCGGCGAGCCCAAGCCAGCTACGCTGGCCCACCGCCCACCGTGGCCGAG 1740
  S L R Q R R A Q A S Y A G P P P T V A E 580
CTGGTGGAGGCCACACCAACTTTGGCTTCCAGCCTGACACGGCCCCCGCAGCCCCAAC 1800
  L V E A H T N F G F Q P D T A P R S P N 600
ACTGGGCCCTACCCCAGTGAGCAGGCCCTGCCCATCCCAGGCACCCCGCCCCCAACTAT 1860
  T G P Y P S E Q A L P I P G T P P P N Y 620
GACTCCCTGCGTCTGCAGCCGCTGGACGTCATCGAGTCTGACAGTGAGGGTGATGCCATC 1920
  D S L R L Q P L D V I E S D S E G D A I 640

```

TAA

-

**Abbildung 30:** Nukleotid- und Aminosäuresequenz  $\beta$ -hnENaC aus CF Gewebe.

Abgebildet ist die gesamte Nukleotidsequenz des  $\beta$ -hnENaC aus CF Gewebe, sowie die Translation in Aminosäuren.

Startcodon: rot unterlegt.

Stopcodon: gelb unterlegt.

$\gamma$ -hnENaC CF

**ATC**GCACCCGGAGAGAAGATCAAAGCCAAAATCAAGAAGAATCTGCCCGTGACGGGCCCT 60  
**M** **A** **P** **G** **E** **K** **I** **K** **A** **K** **I** **K** **K** **N** **L** **P** **V** **T** **G** **P** 20  
CAGGCGCCGACCATTAAAGAGCTGATGCGGTGGTACTGCCTCAACACCAACACCCATGGC 120  
**Q** **A** **P** **T** **I** **K** **E** **L** **M** **R** **W** **Y** **C** **L** **N** **T** **N** **T** **H** **G** 40  
TGTCGCCGCATCGTGGTGTCCCGCGGCCGTCTGCGCCGCCTCCTCTGGATCGGGTTCACA 180  
**C** **R** **R** **I** **V** **V** **S** **R** **G** **R** **L** **R** **R** **L** **L** **W** **I** **G** **F** **T** 60  
CTGACTGCCGTGGCCCTCATCCTCTGGCAGTGCGCCCTCCTCGTCTTCTCCTTCTATACT 240  
**L** **T** **A** **V** **A** **L** **I** **L** **W** **Q** **C** **A** **L** **L** **V** **F** **S** **F** **Y** **T** 80  
GTCTCAGTTTCCATCAAAGTCCACTTCCGGAAGCTGGATTTTCTGCAGTCACCATCTGC 300  
**V** **S** **V** **S** **I** **K** **V** **H** **F** **R** **K** **L** **D** **F** **P** **A** **V** **T** **I** **C** 100  
AACATCAACCCCTACAAGTACAGCACCGTTCCGCACCTTCTAGCTGACTTGGAACAGGAG 360  
**N** **I** **N** **P** **Y** **K** **Y** **S** **T** **V** **R** **H** **L** **L** **A** **D** **L** **E** **Q** **E** 120  
ACCAGAGAGGCCCTGAAGTCCCTGTATGGCTTTCCAGAGTCCCAGGAAAGCGCCGAGAGGGC 420  
**T** **R** **E** **A** **L** **K** **S** **L** **Y** **G** **F** **P** **E** **S** **R** **K** **R** **R** **E** **A** 140  
GAGTCCTGGAACTCCGTCTCAGAGGGAAAGCAGCCTAGATTCTCCACCGGATTCCGCTG 480  
**E** **S** **W** **N** **S** **V** **S** **E** **G** **K** **Q** **P** **R** **F** **S** **H** **R** **I** **P** **L** 160  
CTGATCTTTGATCAGGATGAGAAGGGCAAGGCCAGGGACTTCTTACAGGGAGGAAGCGG 540  
**L** **I** **F** **D** **Q** **D** **E** **K** **G** **K** **A** **R** **D** **F** **F** **T** **G** **R** **K** **R** 180  
AAAGTCGGCGGTAGCATCATTACAAGGCTTCAAATGTCATGCACATCGAGTCCAAGCAA 600  
**K** **V** **G** **G** **S** **I** **I** **H** **K** **A** **S** **N** **V** **M** **H** **I** **E** **S** **K** **Q** 200  
GTGGTGGGATTCCAACCTGTGCTCAAATGACACCTCCGACTGTGCCACCTACACCTTCAGC 660  
**V** **V** **G** **F** **Q** **L** **C** **S** **N** **D** **T** **S** **D** **C** **A** **T** **Y** **T** **F** **S** 220  
TCGGGAATCAATGCCATTGAGGAGTGGTATAAGCTACACTACATGAACATCATGGCACAG 720  
**S** **G** **I** **N** **A** **I** **Q** **E** **W** **Y** **K** **L** **H** **Y** **M** **N** **I** **M** **A** **Q** 240  
GTGCCCTCTGGAGAAGAAAATCAACATGAGCTATTCTGCTGAGGAGCTGCTGGTGACCTGC 780  
**V** **P** **L** **E** **K** **K** **I** **N** **M** **S** **Y** **S** **A** **E** **E** **L** **L** **V** **T** **C** 260  
TTCTTTGATGGAGTGTCTGTGATGCCAGGAATTTTACGCTTTTCCACCACCCGATGCAT 840  
**F** **F** **D** **G** **V** **S** **C** **D** **A** **R** **N** **F** **T** **L** **F** **H** **H** **P** **M** **H** 280  
GGGAATTGCTATACTTTCAACAACAGAGAAAATGAGACCATTCTCAGCACCTCCATGGGG 900  
**G** **N** **C** **Y** **T** **F** **N** **N** **R** **E** **N** **E** **T** **I** **L** **S** **T** **S** **M** **G** 300  
GGCAGCGAATATGGGCTGCAAGTCATTTTGTACATAAACGAAGAGGAATACAACCCATTC 960  
**G** **S** **E** **Y** **G** **L** **Q** **V** **I** **L** **Y** **I** **N** **E** **E** **E** **Y** **N** **P** **F** 320  
CTCGTGTCTCCACTGGAGCTAAGGTGATCATCCATCGGCAGGATGAGTATCCCTTCGTC 1020  
**L** **V** **S** **S** **T** **G** **A** **K** **V** **I** **I** **H** **R** **Q** **D** **E** **Y** **P** **F** **V** 340  
GAAGATGTGGGAACAGAGATTGAGACAGCAATGGTCACCTCTATAGGAATGCACCTGACA 1080  
**E** **D** **V** **G** **T** **E** **I** **E** **T** **A** **M** **V** **T** **S** **I** **G** **M** **H** **L** **T** 360  
GAGTCCTTCAAGCTGAGTGAGCCCTACAGTCAGTGCACGGAGGACGGGAGTGACGTGCCA 1140  
**E** **S** **F** **K** **L** **S** **E** **P** **Y** **S** **Q** **C** **T** **E** **D** **G** **S** **D** **V** **P** 380  
ATCAGGAACATCTACAACGCTGCCTACTCGCTCCAGATCTGCCTTCATTCATGCTTCCAG 1200  
**I** **R** **N** **I** **Y** **N** **A** **A** **Y** **S** **L** **Q** **I** **C** **L** **H** **S** **C** **F** **Q** 400

ACAAAGATGGTGGAGAAATGTGGGTGTGCCAGTACAGCCAGCCTCTACCTCTGCAGCC	1260
T K M V E K C G C A Q Y S Q P L P P A A	420
AACTACTGCAACTACCAGCAGCACCCCAACTGGATGTATTGTTACTACCAACTGCATCGA	1320
N Y C N Y Q Q H P N W M Y C Y Y Q L H R	440
GCCTTTGTCCAGGAAGAGCTGGGCTGCCAGTCTGTGTGCAAGGAAGCCTGCAGCTTTAAA	1380
A F V Q E E L G C Q S V C K E A C S F K	460
GAGTGGACACTAACCACAAGCCTGGCACAATGGCCATCTGTGGTTTCGGAGAAGTGGTTG	1440
E W T L T T S L A Q W P S V V S E K W L	480
CTGCCTGTTCTCACTTGGGACCAAGGCCGGAAGTAAACAAAAAGCTCAACAAGACAGAC	1500
L P V L T W D Q G R Q V N K K L N K T D	500
TTGGCCAAACTCTTGATATTCTACAAAGACCTGAACCAGAGATCCATCATGGAGAGCCCA	1560
L A K L L I F Y K D L N Q R S I M E S P	520
GCCAACAGTATTGAGATGCTTCTGTCCAACCTTCGGTGGCCAGCTGGGCCTGTGGATGAGC	1620
A N S I E M L L S N F G G Q L G L W M S	540
TGCTCTGTTGTCTGCGTCATCGAGATCATCGAGGTCTTCTTCATTGACTTCTTCTCTATC	1680
C S V V C V I E I I E V F F I D F F S I	560
ATTGCCCGCCGCCAGTGGCAGAAAGCCAAGGAGTGGTGGGCCTGGAAACAGGCTCCCCCA	1740
I A R R Q W Q K A K E W W A W K Q A P P	580
TGTCCAGAAGCTCCCCGTAGCCACAGGGCCAGGACAATCCAGCCCTGGATATAGACGAT	1800
C P E A P R S P Q G Q D N P A L D I D D	600
GACCTACCCACTTTCAACTCTGCTTTGCACCTGCCTCCAGCCCTAGGAACCCAAGTGCCC	1860
D L P T F N S A L H L P P A L G T Q V P	620
GGCACACCGCCCCCAATAACAATACCTTGCCTTGGAGAGGGCCTTTTCCAACCAGCTC	1920
G T P P P K Y N T L R L E R A F S N Q L	640
ACAGATACCCAGATGCTGGATGAGCTCTGA	1950
T D T Q M L D E L -	649

**Abbildung 31:** Nukleotid- und Aminosäuresequenz  $\gamma$ -hnENaC aus CF Gewebe.

Abgebildet ist die gesamte Nukleotidsequenz des  $\gamma$ -hnENaC aus CF Gewebe, sowie die Translation in Aminosäuren.

Startcodon: rot unterlegt.

Stopcodon: gelb unterlegt.

## *Danksagung*

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. W.-M. Weber für die sehr interessante Themenstellung, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die vielseitigen Anregungen danken.

Herrn Prof. Dr. H. Oberleithner möchte ich für die Bereitschaft danken, meine Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Kristina Kusche für die großartige Betreuung meiner Arbeit, für die fantastische Unterstützung in schweren Zeiten und ihre Freundschaft.

Ich danke meiner Freundin Katja ganz herzlich für die Hilfe und Geduld bei einfach Allem.

Der gesamten Arbeitsgruppe und insbesondere Conni Rohe und Christina Börding möchte ich für die schöne Zeit und die stetige Hilfsbereitschaft danken.

Christoph Dahlhoff danke ich für die erfolgreiche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein Dank dem gesamten Institut für Tierphysiologie /Zoophysiologie, die mir die letzten Jahre zu einer unvergesslichen Zeit gemacht haben. Ein besonderer Dank gilt dabei Dr. Frank Nunes für die vielseitigen Anregungen, Tipps und natürlich die lustigen Anekdoten.

Für das gewährte Stipendium danke ich der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster und vor allem Frau Ulrike Kohrt-Sinner für die netten Gespräche und aufbauenden Worte.

Meiner Freundin Ruth danke ich dafür, dass sie einfach immer für mich da ist.

Darüber hinaus möchte ich ebenfalls Rita und Peter danken, die mich in dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

Danken möchte ich vor allem meinem Vater und meiner Schwester Ines, die immerzu an mich glauben und mich bei einfach allen Plänen unterstützen.

Der größte Dank gilt meinem Freund Tobias für seine Rücksichtnahme, sein Verständnis und die Unterstützung seit einer so langen Zeit. Ohne seine Liebe wäre ich nicht so weit gekommen.

*Lebenslauf*

