

**Aus dem Universitätsklinikum Münster**  
**Institut für Physiologie II**  
**-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Schwab-**

**Amilorid reduziert die Steifigkeit des endothelialen**  
**Kortex durch Blockade des ENaC**

**INAUGURAL – DISSERTATION**  
**zur**  
**Erlangung des doctor medicinae**  
**der Medizinischen Fakultät**  
**der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**  
**vorgelegt von Fischer, Felix**  
**aus Duisburg, Deutschland**  
**2015**

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster**

**Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. Dr. Wilhelm Schmitz**

**1. Berichterstatter: Frau Priv.-Doz. Dr. Kristina Kusche-Vihrog**

**2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Giuliano Ciarimboli**

**Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2015**

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie II

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Albrecht Schwab-

Referent: Priv.-Doz. Dr. Kristina Kusche-Vihrog

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Giuliano Ciarimboli

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Amilorid reduziert die Steifigkeit des endothelialen

Kortex durch Blockade des EnNaC

Fischer, Felix

Kürzlich wurde der epitheliale Natrium Kanal (ENaC) im Endothel nachgewiesen. Dieser als EnNaC bezeichnete Kanal beeinflusst die mechanischen Eigenschaften der Endothelzellen und damit einhergehend deren Funktion. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Anzahl von EnNaC-Molekülen in der endothelialen Plasmamembran zu einer Versteifung des Zellkortex und damit zu endothelialer Dysfunktion führt. Im Gegensatz dazu kann durch die funktionelle Blockade dieses Kanals die kortikale Steifigkeit der Endothelzellen verringert werden.

Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht verstanden und sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Dazu wurde mittels *Atomic Force Microscopy* zunächst überprüft, ob es sich um einen langsamen genomischen oder schnellen nicht-genomischen Mechanismus handelt. Im zweiten Schritt wurde der Einfluss des EnNaC auf das kortikale Aktinskelett untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der kortikalen Steifigkeit durch die funktionelle Blockade des EnNaC auf einem schnellen, nicht-genomischen Mechanismus beruht. Dieser Effekt konnte durch Blockade einer Aktin-Depolymerisation verhindert werden. Es wird daher postuliert, dass der Einfluss des EnNaC auf die mechanischen Eigenschaften über die Interaktion mit dem kortikalen Aktin-Skelett abläuft.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2015

## **ERKLÄRUNG**

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel: „Amilorid reduziert die Steifigkeit des endothelialen Kortex durch Blockade des EnNaC“

im Institut für Physiologie II der Medizinischen Fakultät der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster

unter der Anleitung von: Frau. Priv.-Doz. Dr. Kristina Kusche-Vihrog

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster , 03.12.2015

Felix Fischer

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1	<b>Aufbau der GefäÙe.....</b>	<b>3</b>
1.2	<b>Aufbau des Endothels .....</b>	<b>3</b>
1.3	<b>Das Membranskelett.....</b>	<b>4</b>
1.4	<b>Funktion des Endothels .....</b>	<b>5</b>
1.5	<b>Regulation des GefäÙmuskeltonus und endotheliale Dysfunktion.....</b>	<b>5</b>
1.6	<b>ENaC.....</b>	<b>7</b>
1.6.1	Regulation des ENaC .....	8
1.7	<b>EnNaC.....</b>	<b>9</b>
1.8	<b>Ziel der Arbeit .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1	<b>Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1.1	EA.hy 926-Zellen .....	13
2.1.2	Kultivierung der Zellen.....	13
2.1.3	Subkultivierung der Zellen .....	14
2.2	<b>Rasterkraftmikroskopie.....</b>	<b>14</b>
2.3	<b>Experiment 1: Zeitreihe Zellsteifigkeit.....</b>	<b>17</b>
2.4	<b>Experiment 2: Stabilisierung der Aktinfilamente.....</b>	<b>19</b>
2.5	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>22</b>
3.1	<b>Amilorid reduziert die kortikale Steifigkeit innerhalb von Minuten .....</b>	<b>22</b>
3.2	<b>Benzamil reduziert die kortikale Steifigkeit innerhalb von Minuten.....</b>	<b>25</b>
3.3	<b>EnNaC beeinflusst das kortikale Aktin.....</b>	<b>27</b>
3.3.1	Kontrollexperiment 1: HEPES + Amilorid .....	28
3.3.2	Kontrollexperiment 2: JAS + HEPES .....	30
3.3.3	Aktin-Stabilisierung 1: 0,5 µM JAS + Amilorid .....	31
3.3.4	Aktin-Stabilisierung 2: 1,0 µM JAS + Amilorid .....	32
3.3.5	Zusammenfassung Aktin-Experimente .....	34
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>35</b>
4.1	<b>Amilorid reduziert die kortikale Steifigkeit innerhalb einer Minute .....</b>	<b>35</b>

4.2	Stabilisierung der Aktinfilamente verringert EnNaC-abhängige Reduktion der kortikalen Steifigkeit.....	36
4.3	Das kortikale Aktin beeinflusst die Anzahl der apikalen EnNaC-Kanäle und damit die kortikale Steifigkeit .....	38
4.4	Pathophysiologische Relevanz .....	40
4.5	Ausblick .....	43
5	Quellenverzeichnis .....	44
6	Abkürzungen.....	54
7	Chemikalien.....	56
8	Arbeitsmaterialien und Geräte.....	57
8.1	Arbeitsmaterialien .....	57
8.2	Geräte .....	57
9	Tabellenverzeichnis.....	59
10	Abbildungsverzeichnis .....	60
11	Lebenslauf.....	61
12	Danksagung.....	63

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau der Gefäße

Die Wände der Blutgefäße, ausgenommen der Kapillaren, bestehen aus drei Schichten. Von innen nach außen sind das *Intima*, *Media* und *Adventitia*. Die *Intima* wird aus Endothel und subendothelialer Schicht gebildet. Die *Media* besteht aus glatter Muskulatur; über die bindegewebige *Adventitia* ist das Gefäß mit den umliegenden Geweben verbunden. Zwischen *Intima* und *Media* bzw. *Media* und *Adventitia* kann jeweils eine dünne bindegewebige Schicht vorhanden sein, die als *Membrana elastica interna* bzw. *externa* bezeichnet wird (82). Die Ausprägung der einzelnen Schichten richtet sich nach den jeweiligen physiologischen Anforderungen und ist regional verschieden.

## 1.2 Aufbau des Endothels

Das Endothel ist die innerste Schicht aller Blut- und Lymphgefäße und bildet die Kapillaren. Es ist ein *monolayer* aus polygonalen Zellen, die auf einer Basalmembran verankert sind. Die Endothelzellen richten sich mit ihrer Längsachse parallel zum Blutstrom aus. Zahlreiche unterschiedliche interzelluläre Kontakte (Adhärenskontakte, *tight junctions*, *gap junctions*), kleine Fenster (*fenestrae*) und unterschiedliche zelluläre Transportmechanismen machen es zu einer selektiv permeablen Barriere zwischen Intravasalraum und tiefer liegenden Schichten (125). Auf der luminalen Seite der Endothelzellen befindet sich die Glykokalyx. Sie trägt durch ihre negativen Ladungen ebenfalls zur selektiven Permeabilität des Endothels bei. Negativ geladene Moleküle werden abgestoßen und können die Barriere nicht passieren (30). Im Gegensatz dazu bindet die Glykokalyx intravasal positiv geladene Moleküle (93). Unterhalb der Glykokalyx liegt die endotheliale Plasmamembran (PM). Sie ist durch Einstülpungen (*Caveolae*) gekennzeichnet, die der Oberflächenvergrößerung und Unterbringung von z.B. Kanälen oder Rezeptoren dienen (82). Darunter befindet sich eine 50-200 nm dicke Schicht, die als Zellkortex bezeichnet wird (42). In diesem Bereich der Zelle bildet v.a. Aktin ein flexibles aber gleichzeitig stabiles Membranskelett und soll im Folgenden näher beschrieben werden.



### 1.3 Das Membranskelett

Das Membranskelett der Endothelzellen ist im sogenannten Zellkortex lokalisiert. Neben Intermediärfilamenten und Mikrotubuli besteht es v.a. aus Aktinfilamenten (104) und ist maßgeblich für die Zellform verantwortlich (82). Die Aktinfilamente können entweder als globuläres (G-) Aktin oder als filamentäres (F-) Aktin vorliegen, was zu einem insgesamt weichen (hoher Anteil an G-Aktin) beziehungsweise steifen (hoher Anteil an F-Aktin) Zellkortex führt. Diese mechanischen Eigenschaften des Membranskeletts (weicher oder steifer Zellkortex), beeinflussen die Funktion des gesamten Endothels, was im Laufe dieser Arbeit näher beschrieben wird. Das Membranskelett ist also nicht ausschließlich für die Zellform ausschlaggebend. Vielmehr haben seine mechanische Eigenschaften weitreichende Bedeutungen für die Funktion der Endothelzelle. Zudem dient das Membranskelett als Verankerung verschiedener membranständiger Proteine, wodurch deren Lateraldiffusion verringert wird (82). Zusammen mit Clathrin ist das Membranskelett an der Endozytose beteiligt, indem es Einstülpungen (*pits*) bildet, die dann als Vesikel ins Zellinnere gelangen. Im Grundzustand ist Aktin ein globuläres Protein (G-Aktin), das durch Polymerisierung Filamente bilden kann. Dieses filamentäre Aktin (F-Aktin) bildet dann mit seinen zahlreichen Begleitproteinen ein komplexes polygonales Netzwerk (105), das wiederum in ein grobes, steifes Netz und ein dünnes, feines Netz unterteilt werden kann, die miteinander verbunden sind (104). Dieser Aufbau gewährleistet sowohl Stabilität als auch Flexibilität und unterliegt einer hohen Dynamik. Der stetige Auf-, Ab- und Umbau, also die Polymerisierung von G- zu F-Aktin und umgekehrt, lässt sich wie folgt beschreiben: Etwa 250 Adenosintriphosphat (ATP) tragende G-Aktin-Monomere können sich unter Hydrolyse von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) zu F-Aktin zusammenlagern. Mehrere F-Aktine winden sich helikal umeinander und bilden so ein Filament (136). Dieses besteht aus mehreren tausend G-Aktin-Einheiten (88). Es entsteht eine rechtsdrehende Helix mit einem Plus- und einem Minus-Ende. Am Plus-Ende kann sich G-Aktin schnell anlagern. Dort findet allerdings auch ein schneller Zerfall des Filaments statt. Am Minus-Ende läuft dieser Auf- und Abbau langsamer ab. Ebenso können vorhandene Filamente an ihrem Plus-Ende G-Aktin anbauen, während gleichzeitig an ihrem Minus-Ende ein kontinuierlicher Zerfall stattfindet. Dieser Vorgang wird als *treadmilling*, oder Tretmühlenmechanismus bezeichnet (29). Dabei kann sich ein Gleichgewicht aus Auf- und Abbau (*steady-state*) einstellen. Abgespaltenes ADP-tragendes G-Aktin ersetzt aufgrund von unterschiedlicher Affinität der Triphosphate zum Aktin sein ADP durch ATP (120). Es kann nun wieder an ein Filament angelagert

werden, oder zum Start eines neuen F-Aktins verwendet werden. Polymerisierung, Depolymerisierung, Zusammen- und Anlagerung des Aktins zu Filamenten, Bündeln oder Netzen, sowie die Assoziation des Aktins mit der PM und deren Membranbestandteilen werden von vielen der über 160 Aktin-assoziierten-Proteinen, der sog. *actin-binding-proteins* (ABP) kontrolliert (109).

#### **1.4 Funktion des Endothels**

Das Endothel ist ein dynamischer Zellverbund, der, je nach Ort und Art des Gefäßes unterschiedlichste Funktionen erfüllt. Grundsätzlich bildet es aber eine Intra- und Extravasalraum trennende Barriere. Makromolekulare Bestandteile des Blutplasmas werden durch die Glykokalyx der Endothelzellen und interzelluläre *tight-junctions* an der Diffusion in subendotheliale Schichten gehindert (15). Des Weiteren reguliert das Endothel die Adhäsion von Blutbestandteilen. So verhindert z.B. die endotheliale Glykokalyx durch ihre negative Ladung die Adhäsion der ebenfalls negativ geladenen Blutzellen. Wird das Endothel jedoch z.B. durch Zytokine stimuliert/aktiviert, exprimiert es Selektine und Adhäsionsmoleküle, welche die Leukozytenmigration begünstigen (30). Die endotheliale Sekretion und Expression von pro- und antithrombotischen Proteinen, Proteoglykanen und Gerinnungsfaktoren verhindert im physiologischen Zustand die Bildung von Thromben und fördert im Gegenzug die lokale Blutgerinnung nach Verletzung des Gefäßes (112, 122). Zusätzlich synthetisieren die Endothelzellen Extrazellulärmatrix-Bestandteile für die basal liegende subendotheliale Schicht (82). Auch Änderungen des Blutdrucks werden durch das Endothel detektiert (76), wodurch vasodilatativ (z.B. Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin) und vasokonstriktorisch (z.B. Endothelin) wirkende Substanzen produziert und sezerniert werden (43, 83, 87). Jedoch stellt NO den Hauptstimulus für die Verringerung des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur dar (43). Die physiologische Funktion des Endothels beruht auf einem eng kontrollierten Gleichgewicht aus u.a. Pro- und Antiinflammation, pro- und antithrombotischen Signalen, Vasodilatoren und Vasokonstriktoren (37).

#### **1.5 Regulation des Gefäßmuskeltonus und endotheliale Dysfunktion**

Der Gefäßmuskeltonus wird über diverse Mechanismen gesteuert. Dabei werden lokale und zentrale Steuerungen unterschieden, die jeweils metabolisch, chemisch, mechanisch, neural und hormonal wirken können. An dieser Stelle soll allerdings ausschließlich auf die lokal-chemische Regulation durch das endothelial gebildete NO

eingegangen werden. Die Freisetzung von NO kann durch chemische und mechanische Stimuli ausgelöst werden. Verschiedene Substanzen wie Bradykinin, Histamin, Acetylcholin und einige Prostaglandine binden an Rezeptoren in der PM und führen G-Protein-vermittelt zu einer Erhöhung der Konzentration des intrazellulären freien Calciums ( $Ca^{2+}$ ). Dadurch wird über die Calmodulin-Kaskade die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aktiviert und NO freigesetzt (6, 22). Der physiologisch bedeutendere Aktivierungsweg führt allerdings über den mechanischen Stimulus des *shear-stress* (36). Die direkte, parallel zum Gefäß verlaufende Krafteinwirkung des Blutstroms wird *shear-stress* (Schubspannung) bezeichnet. Sie deformiert den weiter oben beschriebenen Zellkortex und aktiviert dadurch die eNOS (134). Der Signalweg ist noch nicht vollständig verstanden. Es ist allerdings bekannt, dass er im Gegensatz zur chemischen Aktivierung  $Ca^{2+}$ -unabhängig ablaufen kann (67). Mechanische und chemische Stimuli aktivieren die eNOS, die durch Oxidation aus Arginin NO abspaltet. NO diffundiert durch die Zellwand in Richtung der weiter außen liegenden Schicht aus glatter Muskulatur. Der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur hängt vom Phosphorylierungsgrad der leichten Kette des Myosins (MLC) ab und wird über zwei Enzyme reguliert: Die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) erhöht den Phosphorylierungsgrad und damit auch den Muskeltonus. Der Gefäßdurchmesser wird verringert. Die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) verringert den Phosphorylierungsgrad und damit den Muskeltonus; der Gefäßdurchmesser wird erweitert. NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase (sGC) in Gefäßmuskelzellen (45). Diese bildet aus Guanosintriphosphat (GTP) zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), welches die Protein Kinase G (PKG) aktiviert. Die PKG aktiviert die MLCP durch Phosphorylierung. Das Gefäß wird weiter und der Druck nimmt ab.

Ein erhöhter Blutdruck führt durch Deformation der Endothelzellen zu NO Produktion und Freisetzung und damit über Verringerung des Gefäßmuskeltonus zur Vasodilatation und Abnahme des Blutdrucks. Findet keine ausreichende NO-Freisetzung der Endothelzellen mehr statt, führt dies zu einem pathologisch erhöhten Tonus der glatten Gefäßmuskulatur (101). Dieser Zustand stellt das Hauptmerkmal der endothelialen Dysfunktion dar. Zudem zeigt dysfunktionales Endothel eine erhöhte Neigung zu entzündlichen Prozessen und Thrombosen (33), sowie eine verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Radikalen (113) und erhöht das Artherosklerose Risiko (33, 56-58, 116, 129). Diesem Prozess zugrunde liegt unter anderem eine Versteifung des endothelialen Zellkortex. Dieser

kann nicht mehr adäquat durch den *shear-stress* verformt werden. Das wird als *stiff endothelial cell syndrome, SECS* (74) bezeichnet. Dadurch wird die Aktivierung der eNOS und die reaktive NO-Produktion verringert.

Die Pathogenese der endothelialen Dysfunktion ist noch nicht hinreichend geklärt, allerdings konnte gezeigt werden, dass u.a. eine erhöhte Aufnahme von Kochsalz (NaCl) und damit einhergehend eine erhöhte Plasma-Natrium-Konzentration (>145 mM) zu einer Versteifung des endothelialen Kortex führt und somit die Entstehung der endothelialen Dysfunktion begünstigt. (40, 114). Ebenso gibt es Anzeichen für die Beteiligung eines Amilorid-sensitiven Natrium-Kanals an der pathologischen Versteifung des endothelialen Kortex und der damit einhergehenden verminderten Relaxationsfähigkeit der Gefäße (69). Dieser Kanal soll im Folgenden genauer beschrieben werden.

## 1.6 ENaC

Der Amilorid-sensitive Natrium-Kanal, oder epitheliale Natrium-Kanal (ENaC) ist der am besten beschriebene Vertreter der ENaC-Degenerin-Familie von Ionenkanälen. Dabei handelt es sich um hochselektive Natrium- ( $\text{Na}^+$ -) Kanäle, die auf der apikalen Membran von diversen Epithelien zu finden sind. Dazu gehören, im klassischen Verständnis, die Hauptzellen des distalen Nephrons und des Sammelrohrs der Niere, Schweißdrüsen, Atemwege und Geschmackszellen. Der Kanal beeinflusst direkt den  $\text{Na}^+$ -Haushalt und den Blutdruck sowie indirekt den Kalium- ( $\text{K}^+$ -) und Säure-Basen-Haushalt. Er vermittelt in der Niere den limitierenden Schritt der  $\text{Na}^+$ -Resorption, ist allerdings auch an der  $\text{Na}^+$ -Aufnahme beteiligt, da u.a. die Translation des Geschmacks von Salzigem durch ENaC-Kanäle in den *Papillae fungiformes* auf der Zunge vermittelt wird (79). Der ENaC besteht aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten (UE). Jede dieser UE besteht aus zwei Transmembransegmenten (M1 und M2). Sie tragen extrazellulär eine große hydrophile Domäne (zwischen M1 und M2), die eine Schlaufe (*loop*) ausbildet. Zytoplasmatisch liegen jeweils zwei kleine, hydrophile Domänen, die  $\text{NH}_2$ - (N-) und  $\text{COOH}$ - (C-) Termini tragen (siehe Abbildung 1) und Prolin-reiche Regionen (*proline-rich-motifs, PY*) beinhalten. Die genaue stöchiometrische Zusammensetzung des Kanals ist unklar. Diskutiert werden heterotrimere bis heterononamere Multimere (110). Die M2-Domänen der Untereinheiten bilden eine Pore, die nur dehydriertem  $\text{Na}^+$  und Lithium den Durchtritt erlaubt und so die hohe Selektivität des Kanals gewährleistet (3, 100). Die Guanodinegruppe des Diuretikums

Amilorid kann von extrazellulär den Eingang der Pore penetrieren und so den Kanal blockieren (3).

### 1.6.1 Regulation des ENaC

Die Regulation des ENaC ist komplex, gewebespezifisch und bis dato noch nicht vollständig verstanden, da eine Vielzahl von extrinsischen und intrinsischen Stimuli daran beteiligt sind (9). Als Hauptregulator wird das Mineralokortikoidhormon Aldosteron angesehen. Aldosteron bindet an den zytosolischen Mineralokortikoidrezeptor (MR). Dadurch dissoziieren die an den MR gebundenen *heat-shock*-Proteine (HSP, Chaperonen) und es bilden sich MR-Dimere. Diese Dimere

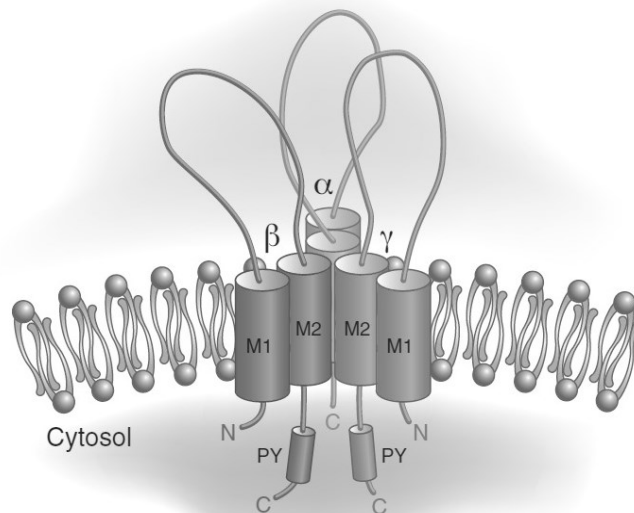


Abbildung 1: Struktur des ENaC Dargestellt als Heterotrimer. Die M2 Segmente der UE bilden die Pore des ENaC. Die UE weisen große Extrazellulärdomänen auf, die jeweils eine Schlaufe bilden. Intrazellulär liegen kleinere Domänen mit N- und C-Termini. Aus Bhalla et al. 2008.

gelangen in den Zellkern und wirken dort als Transkriptionsfaktoren in zweierlei Hinsicht: Zum einen erhöhen sie die Expression von Aldosteron-induzierten Proteinen, wie die  $\alpha$ -Untereinheit des ENaC und die *Serum/Glucocorticoid-regulated Kinase 1* (SGK1) (110, 134). Zum anderen inhibieren sie die Expression von Aldosteron-unterdrückten Proteinen (16, 128). Zusätzlich zum langsamen, genomischen Mechanismus kann Aldosteron auch über schnellere nicht-genomische Signalwege wirken (50, 51, 102). Es konnte z.B. gezeigt werden, dass Aldosteron den Ubiquitinierungsprozess von ENaC und damit deren Internalisierung beeinflusst (35,

130). So wird die Verweildauer und dementsprechend auch die Anzahl von ENaC in der PM erhöht (106, 131).

Durch Ubiquitinisierung wird ENaC in der Plasmamembran für die Internalisierung und anschließende Degradierung markiert (127). Dabei interagiert die WW-Domäne der Ubiquitin-Protein-Ligase *neuronal precursor cells expressed developmentally down-regulated 4-2* (NEDD4-2) mit den Prolin-reichen Regionen des C-Terminus der ENaC-UE und ubiquitiniert den Kanal und markiert ihn so für die Internalisierung (126). Internalisierte Kanäle können entweder im Lysosom abgebaut, oder enzymatisch deubiquitiniert und wieder in die PM eingebaut werden (1, 23). SGK1 phosphoryliert die WW-Domänen von NEDD4-2 und vermindert so die Interaktion zwischen Kanal und Ubiquitin-Ligase. Das führt zu einer Reduzierung der Ubiquitinisierung und damit zu einer verlängerten Verweildauer des ENaC in der Plasmamembran (111). Eine pathologisch verlängerte Verweildauer findet zum Beispiel beim *Liddle's Syndrome* (70). Dabei sind die Prolin-reichen Regionen des ENaC von Mutationen betroffen, was die Interaktion mit NEDD4-2 und damit die Ubiquitinisierung erschwert (1, 48). Dies führt zu einer reduzierten Internalisierungsrate des Kanals und resultiert in einer pathologisch erhöhten renalen  $\text{Na}^+$ -Reabsorption,  $\text{K}^+$ -Sekretion, sowie Bluthochdruck (17, 48, 96, 99, 121, 127).

Des Weiteren führt eine Erhöhung der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration über niederaffine Wechselwirkungen mit den Extrazellulärdomänen des ENaC zu einer verminderten Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Dieser Prozess wird als *self-inhibition* bezeichnet (28). Ebenso verringert eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals, was als *feedback-inhibition* bezeichnet wird (103).

## 1.7 EnNaC

Bis vor wenigen Jahren galt der ENaC als ein rein epithelialer Kanal. Jedoch wurde kürzlich ein Amilorid-sensitiver  $\text{Na}^+$ -Kanal *in vitro* und *ex vivo* in Endothelzellen nachgewiesen (47, 61, 68, 132, 134). Dieser Kanal wurde von David Warnock als endothelialer  $\text{Na}^+$ -Kanal (EnNaC) bezeichnet (135). Wie der epitheliale ENaC wurde er als Heteromultimer mit  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -UE identifiziert (90).

Aldosteron reguliert, auch im Endothel, die Aktivität und Expression des EnNaC (69). Dabei legt die endotheliale Expression des MR nahe, dass Aldosteron auch in Endothelzellen über einen MR-Signalweg wirkt (72, 138). Diese Annahme konnte auch

durch Verifizierung der Wirksamkeit von MR-spezifischen Blockersubstanzen, wie z.B. Spironolaktone, im Endothel bestätigt werden (38, 98). Aldosteron fördert, innerhalb von Stunden, sowohl die Transkription des ENaC als auch seinen Einbau in die PM (71). Des Weiteren wurde auch in Endothelzellen ein nicht-genomischer Aldosteron-Effekt nachgewiesen. Dieser führt innerhalb von Minuten zu einer erhöhten Anzahl apikaler ENaC-Kanäle (unpublizierte Daten unseres Labors). Es wird diskutiert, ob diese Wirkung auf unter der Plasmamembran in Vesikeln gespeicherten funktionstüchtigen ENaC-Molekülen beruht, da diese bereits für Epithelien und den ENaC nachgewiesen wurden (24). Dabei induziert Aldosteron die Membraninsertion des ENaC. Eine weitere diskutierte Möglichkeit ist die Stimulation von SGK1 durch Aldosteron. Durch Phosphorylierung von NEDD4-2 würde der ENaC-Ausbau aus der PM reduziert und so ebenfalls die Anzahl apikaler Kanäle erhöht (69).

Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der ENaC-Kanäle in der PM zusätzlich auch die mechanischen Eigenschaften der Endothelzellen beeinflusst (61). Es wird vermutet, dass die Aufgabe des ENaC weniger im gerichteten  $\text{Na}^+$ -Transport, sondern eher in der Beeinflussung der Zellmechanik liegt. Dafür spricht auch, dass die Anzahl apikaler ENaC-Kanäle im Endothel im Vergleich zum ENaC im Epithel etwa ein Drittel beträgt (68) und, dass aufgrund der Durchlässigkeit des Endothels der meiste  $\text{Na}^+$ -Transport parazellulär stattfindet (69). Darüber hinaus konnte in *knock-down* Experimenten unseres Labors gezeigt werden, dass durch Deletion der  $\alpha$ -UE des ENaC die Steifigkeit des endothelialen Kortex signifikant reduziert wird (61). Ebenso wurde ein Effekt von Amilorid auf die Zellmechanik der Endothelzellen nachgewiesen. Wang et al. konnten 2009 durch ihre *Patch-Clamp* Experimente zunächst zeigen, dass das Schleifendiuretikum Amilorid und seine Derivate die  $\alpha$ -UE des ENaC auch in Endothelzellen funktionell blockieren. Dabei reichten 0,5  $\mu\text{M}$  Amilorid um eine Reduktion des ENaC-abhängigen  $\text{Na}^+$ -Einstroms zu erreichen und 5  $\mu\text{M}$  Amilorid um diesen komplett zu beseitigen (132). Des Weiteren belegen Experimente unseres Labors, dass die funktionelle Blockade des ENaC durch diese spezifischen Blocker nicht nur den  $\text{Na}^+$ -Einstrom reduziert, sondern auch mit einer verringerten kortikalen Steifigkeit und zusätzlich dem Verschwinden des Kanals aus der Plasmamembran einhergeht (69).

Im Gegensatz zeigt sich nach Inkubation mit Aldosteron eine signifikante Erhöhung der ENaC Anzahl in der PM und der kortikalen Steifigkeit der Endothelzellen (61, 92). Auch erhöhte  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen ( $>145 \text{ mM}$ ) führen, im Gegensatz zum Epithel, innerhalb von Minuten zu einer Erhöhung der ENaC Anzahl in der PM und dadurch zu

einer Versteifung des endothelialen Kortex (65, 91). Wahrscheinlich ist, dass ein Anstieg der Plasma  $\text{Na}^+$ -Konzentration über einen *feed-forward*-Mechanismus MR-abhängig zu einer schnellen Insertion von ENaC-Vesikeln in die PM führt (65).

Der bekannte Einfluss des ENaC auf die mechanischen Eigenschaften der Zelle und besonders des Zellkortex lassen sich demnach wie folgt zusammenfassen:  $\text{Na}^+$  und Aldosteron führen zu einer erhöhten Anzahl von ENaC-Molekülen in der PM und zu einer Versteifung des Kortex. Die Blockade des MR oder des Kanals reduziert die Anzahl von apikalem ENaC und verringert die kortikale Steifigkeit. Der Mechanismus dieser Reaktion ist bis dato noch nicht aufgeklärt. Eine Möglichkeit wäre die ENaC-abhängige Umstrukturierung des kortikalen Aktins. Dafür spricht, dass der ENaC über ABP wie Spektrin und Ankyrin in direkter Verbindung mit dem Aktin-Skelett des Kortex steht und mit diesem interagiert (25, 84, 85). Ob diese Interaktion auch im Endothel stattfindet und welche Auswirkungen sie auf die Zellmechanik hat, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

## 1.8 Ziel der Arbeit

Jüngst wurde ein Amilorid-sensitiver  $\text{Na}^+$ -Kanal in Endothelzellen nachgewiesen. Den bisherigen Forschungsergebnissen nach, ist es wahrscheinlich, dass die Funktion dieses als ENaC bezeichneten Kanals nicht hauptsächlich in der  $\text{Na}^+$ -Resorption liegt, sondern vielmehr darin, die mechanischen Eigenschaften der Zelle zu bestimmen und somit Einfluss auf die Funktion der gesamten Endothelzelle und bestimmter Gefäßabschnitte zu nehmen. Es konnte gezeigt werden, dass eine durch Aldosteron verursachte erhöhte Kanaldichte in der PM mit einer ebenfalls erhöhten Steifigkeit des Zellkortex korreliert (d.h.: Je mehr ENaC, desto steifer der Kortex). Blockade des Mineralokortikoidrezeptors (MR) durch dessen spezifischen Antagonisten Spironolakton führt im Gegensatz dazu zu einer Reduktion der ENaC-Kanäle in der PM, was wiederum mit einer reduzierten kortikalen Steifigkeit der Endothelzelle korreliert. Amilorid blockiert den Natrium Einstrom durch den ENaC in die Zelle und damit die Funktion des Kanals. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die kortikale Steifigkeit nach Applikation von Amilorid reduziert. Des Weiteren führt Amilorid zu einer verringerten Membranexpression des ENaC auf der endothelialen Plasmamembran.

Es wird postuliert, dass Interaktionen des ENaC mit dem kortikalen Zytoskelett, zu einer Verringerung der kortikalen Steifigkeit führen. Dieser Mechanismus ist allerdings noch nicht verstanden.



Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktion des EnNaC mit dem kortikalen Zytoskelett besser zu verstehen und den zugrunde liegenden Mechanismus aufzuklären. Zunächst soll geklärt werden, ob es sich um einen genomischen (langsam ablaufenden) oder nicht-genomischen (schnell-ablaufenden) Mechanismus handelt. Dazu ist es essenziell, den Zeitverlauf der durch Veränderung des EnNaC hervorgerufenen Steifigkeitsänderung nachzuvollziehen. In der ersten Serie von Experimenten wurde deshalb der EnNaC funktionell blockiert und die Steifigkeit einer einzelnen Zelle über 30 min aufgezeichnet. Besonders von Interesse ist dabei der Zeitpunkt, ab dem Amilorid eine signifikante Änderung der Steifigkeit hervorruft. In der zweiten Serie von Experimenten sollte dann der Mechanismus als solcher genauer erforscht werden. Da in vorhergegangenen Publikationen mehrfach eine Verbindung des ENaC zum kortikalen Aktinskelett nachgewiesen wurde, sollte nun die Depolymerisation des Aktins blockiert werden, um zu überprüfen, ob die Veränderung der kortikalen Steifigkeit durch Blockade des EnNaC aufgrund einer Reorganisation des kortikalen Aktins stattfindet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden an einer Sterilbank und mit sterilfiltrierten Flüssigkeiten durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden.

#### 2.1.1 EA.hy 926-Zellen

Bei EA.hy 926 Zellen handelt es sich um eine Linie von Hybridzellen, die durch Fusion von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) mit Rhodamin 6G behandelten Lungenkarzinomzellen A549 immortalisiert wurden. Sie prägen über viele Passagen hinweg stabil Endothelzellmerkmale aus (39). Die Zellen bilden in Zellkulturen einen homogenen Monolayer und wurden bei geeigneter Konfluenz weiter passagiert.

#### 2.1.2 Kultivierung der Zellen

Die EA.hy 926 Zellen wurden in T-25 Zellkulturflaschen in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), dem fetales Kälberserum, Penicillin G und Streptomycin hinzugefügt wurden (siehe Tabelle 1), gezüchtet. Um eine optimale Versorgung der Zellen zu gewährleisten, fand alle drei Tage ein Wechsel des Mediums statt. Täglich wurden lichtmikroskopisch Zellwachstum und Zustand der Zellen kontrolliert. Experimente wurden mit Zellen der Passagen 20-35 durchgeführt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Zellkulturmediums

Substanz	Anteil
DMEM	89%
Fetales Kälberserum	10%
Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)	zusammen 1%

### 2.1.3 Subkultivierung der Zellen

Beim Passagieren wurden die konfluent gewachsenen Zellen verdünnt und in neue T-25 Zellkulturflaschen überführt. Zunächst wurde das Medium aus der Zellkulturflasche durch 7 ml PBS<sup>-/-</sup> (*Phosphate Buffered Saline* ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) ersetzt. Die Zellkulturflasche wurde nun für 2 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Durch den Mangel an Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, die für die Zell-Zell-Adhäsion essenziell sind, werden die Zellen voneinander gelöst. Dies wurde nach Ablauf der Inkubationszeit unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Das PBS<sup>-/-</sup> wurde nun abgesaugt und es wurde 1 ml eines Gemisches aus Trypsin (0,05%) und Ethyldiamintetraacetat (EDTA) (0,02%) hinzugegeben, um die Zellen, während einer ca. einminütigen Inkubationszeit im Brutschrank, voneinander und vom Boden der Flasche zu lösen. Dieser Prozess konnte durch leichtes Klopfen an die Flasche unterstützt werden. Das enthaltene EDTA bindet die Ca<sup>2+</sup>-Ionen und stört so die Zell-Zell-Kontakte. Trypsin löst als Serinprotease zusätzlich diese Kontakte durch Spaltung von Peptidbindungen. Durch Zugabe von 10 ml des Zellkulturmediums wurde dieser Prozess gestoppt. Mehrmaliges Resuspendieren löste die noch am Boden verbliebenen Zellen. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 800 g für 5 min zentrifugiert. Am Boden des Röhrchens bildete sich ein Pellet aus Zellen und darüber ein Überstand, der abgesaugt wurde, um das Trypsin zu entfernen. Das Pellet wurde durch Resuspendieren mit 2 ml frischem Zellkulturmedium gelöst und verdünnt. Neue T-25 Zellkulturflaschen wurden mit je 7 ml des Zellkulturmediums gefüllt und die gewünschte Menge Zellsuspension hinzugegeben. Die Zellen adhäreren danach eigenständig.

Um für Versuche mit dem Rasterkraftmikroskop vorzubereiten wurden entfettete und sterilisierte Deckgläschen (Langenbrinck, Ø 35 mm) in Zellkulturschalen (Beckton, Ø 35 mm) gelegt, 2,5 ml Zellkulturmedium und die gewünschte Menge Zellsuspension hinzugegeben. Nur Gläschen mit konfluent gewachsenen Zellen wurden für Versuche verwendet. Während der Experimente wurde das Zellkulturmedium durch HEPES-Puffer (siehe Tabelle 2) ersetzt.

## 2.2 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie wird auch als *Atomic Force Microscopy* (AFM) bezeichnet und wurde 1986 von Binnig, Quate und Gerber erfunden (11). Sie ermöglicht es, Oberflächen und ihre physikalischen Eigenschaften im Nanobereich aufzulösen. An der Spitze eines als Blattfeder fungierenden golbeschichteten Metallplättchens, des

sog. *cantilever*, befindet sich eine nanoskopisch kleine Kugel oder Nadel (*tip*). In den Experimenten dieser Arbeit wurde eine Kugelspitze mit 10  $\mu\text{m}$  Durchmesser verwendet, wie sie auch in Abbildung 2 zu sehen ist.

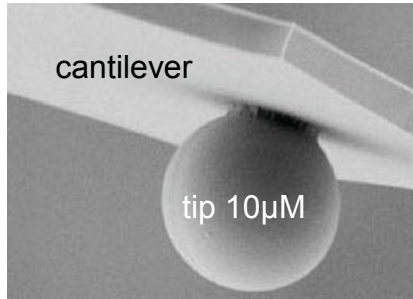


Abbildung 2: *cantilever* mit Kugelspitze. Das Bild zeigt die Spitze eines *cantilevers*. Daran befestigt ist eine Kugel mit einem Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$ , wie sie auch in den Experimenten für diese Arbeit verwendet wurde. Aus Kliche et al. 2011.

Ein Laserstrahl wird von der goldbeschichteten Rückseite des *cantilevers* reflektiert und trifft auf eine Photodiode, den *position sensitive detector (PSI)* (86). Die Probe, hier ein Deckglas mit konfluent gewachsenen Endothelzellen, ist auf einem Piezoelement befestigt und kann an den darüber liegenden *cantilever* gefahren und bis zu einer definierten Eindringtiefe dagegen gedrückt werden. Durch die Annäherung der Probe an den *cantilever* tritt dieser zunächst mit der Probe in Kontakt. Durch weiteres Herauffahren der Probe wird zum einen die Oberfläche der Probe deformiert, zum anderen verbiegt sich der *cantilever*, was zu einer Auslenkung des reflektierten Lasers auf dem PSI führt (siehe Abbildung 3). Die Flexibilität des *cantilevers* entscheidet

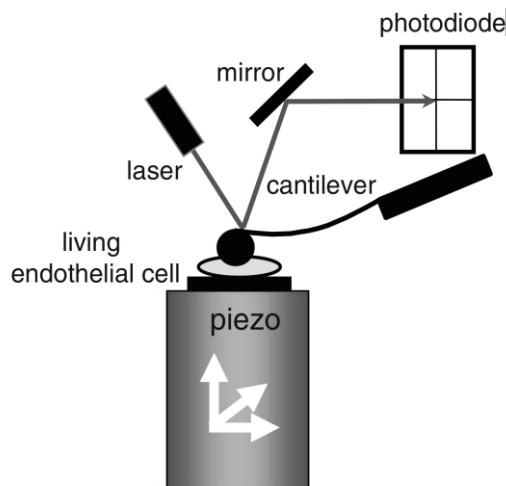


Abbildung 3: Funktionsprinzip des AFM. An einem *cantilever* ist eine Kugel befestigt, die eine Endothelzelle eindrückt. Dadurch wird die Zelle verformt und der Cantilever verbogen. Die Auslenkung des von der Rückseite des *cantilevers* reflektierten Laserstrahls wird von einer Photodiode erfasst (aus Kliche et al. 2011)

darüber, ab welcher Kraft eine solche Auslenkung erfolgen kann. Ein weicher *cantilever* lässt sich schon durch niedrige Kraft verbiegen, registriert also schon kleine Kräfte. Er hat allerdings auch eine größere Eigenschwingung. Genau umgekehrt ist es bei steiferen Modellen. Für unsere Versuche wurden weiche *cantilever* mit Federkonstanten von 0,01 und 0,017 N/m genutzt.

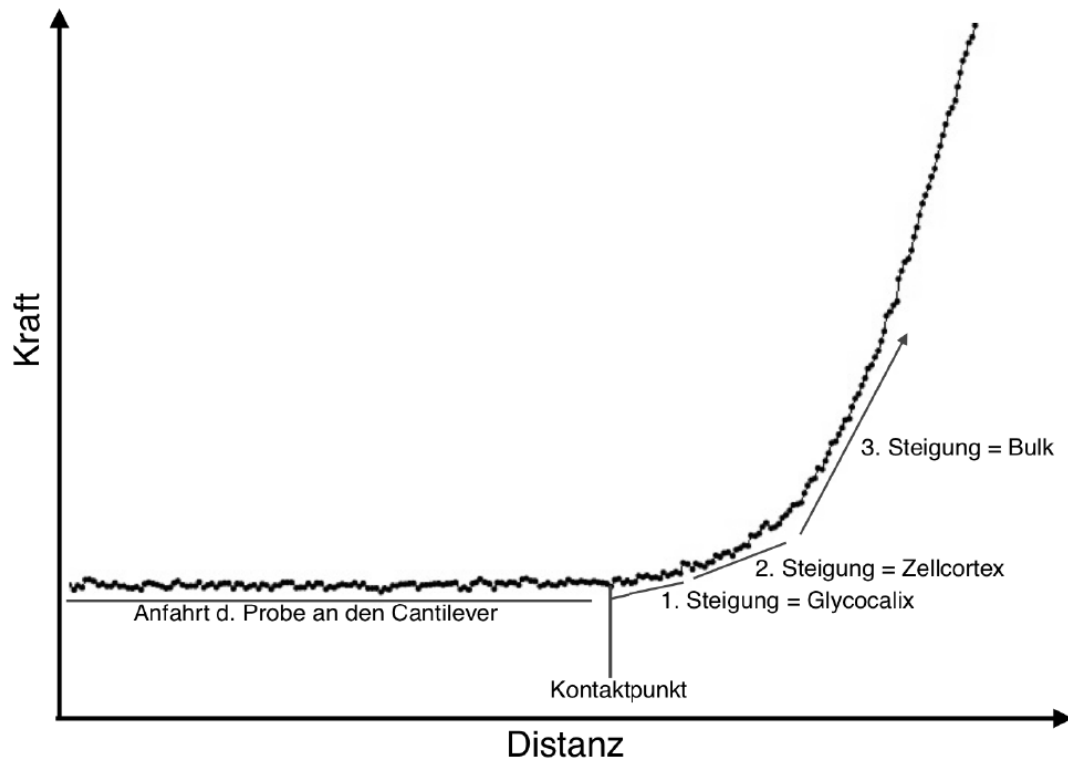


Abbildung 4: Kraftkurve. Es ist die zurückgelegte Distanz gegen die dafür benötigte Kraft aufgetragen. Die Kurve zeigt zunächst die Anfahrt der Probe an den *cantilever*. Am Kontaktpunkt findet der erste Kontakt zwischen der an der Spitze des *cantilever* befestigten Kugel und der Oberfläche der Zellen statt. Anschließend wird die Zelle eingedrückt. Die einzelnen Schichten der Zelle stellen sich dabei als Steigungen dar. Je steiler die Kurve ist, desto mehr Kraft wird benötigt, um die Zelle für eine definierte Distanz einzudrücken. Eine steilere Kurve bedeutet demnach eine erhöhte zelluläre Steifigkeit.

Durch dieses als *nano-indentation* bezeichnete Verfahren lässt sich feststellen, welche Kraft nötig ist, um eine vorgegebene Deformation der Probe zu erreichen (107). Diese Information wird als *force-versus-distance curve* (Kraft-Distanz-Kurve) (27), kurz Kraftkurve in pN/nm ausgegeben (siehe Abbildung 4), wobei die Steifigkeit der Probe anhand der Steigung der Kurve ermittelt werden kann. Diese lässt sich in drei Steigungen unterteilen: Die erste Steigung repräsentiert die Glykokalix, die zweite den Zellkortex und die dritte das Zellinnere (*bulk*) (64, 137). In den Versuchen dieser Arbeit lag das Hauptaugenmerk auf dem Zellkortex. Die Analyse der Kraftkurven wurde mit der *Protein-Unfolding and Nanoindentation-Analysis Software* Punias durchgeführt. Schon 1994 wurden die ersten AFM-Experimente auf lebenden Zellen durchgeführt (55). In unserem Fall, wurde die kortikale Steifigkeit von EA.hy 926 Zellen bestimmt. Die Zellen wurden für die Experimente in konstant 37°C warmen HEPES-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) überführt, um die pH-Stabilität während

des Experiments zu gewährleisten. Je nach Experiment wurden zusätzliche Substanzen hinzugegeben.

Tabelle 2: Zusammensetzung des HEPES-Puffers

Substanz	Konzentration
NaCl	140 mmol/L
KCl	5 mmol/L
MgCl <sub>2</sub> -6-hydrat	1 mmol/L
CaCl <sub>2</sub>	1 mmol/L
Glucose	5 mmol/L
HEPES	10 mmol/L

### 2.3 Experiment 1: Zeitreihe Zellsteifigkeit

Wie jüngst von Kusche-Vihrog et al. gezeigt, führt die Blockade des ENaC durch Amilorid zu einer Abnahme der Steifigkeit des endothelialen Zellkortex (61). Amilorid ist ein klassischer funktioneller ENaC-Blocker (7). Es bindet spezifisch von extrazellulär an die  $\alpha$ -UE des ENaC und blockiert die Pore des Kanals und inhibiert so den Na<sup>+</sup>-Einstrom in die Zelle (7, 78). Es führt im spätdistalen Tubulus und Sammelrohr der Niere zu einer Blockade des ENaC-abhängigen Na<sup>+</sup>-Einstromes und reduziert so die Na<sup>+</sup>-Retention. Dies resultiert in einem moderaten Anstieg (2-3%) der Na<sup>+</sup>- und Bicarbonatausscheidung (49), wohingegen die K<sup>+</sup>-Ausscheidung verringert wird (46). Therapeutisch wird es deshalb als K<sup>+</sup>-sparendes Diuretikum eingesetzt (21). Das Amilorid-Derivat Benzamil ist ebenfalls ein Blocker des ENaC (4), mit der ca. zehnfachen Potenz von Amilorid (10). Es wurde auch in zuvor publizierten Experimenten zur spezifischen Blockade des ENaC genutzt (73) und wurde in den Experimenten für diese Arbeit als weitere spezifische Blocker-Substanz verwendet.

Zunächst sollte unterschieden werden, ob die steifigkeitsreduzierende Wirkung der ENaC-Blockade auf einem eher langsamen (z.B. genomischen) oder schnellen (z.B. Restrukturierung des Kortex) Mechanismus beruht. Dazu wurde eine Zeitreihe entwickelt, bei der in einer gepaarten Messung die kortikale Steifigkeit einer einzelnen Endothelzelle, nach Applikation von Amilorid oder Benzamil, über einen definierten Zeitrahmen verfolgt wird. Für das Experiment wurde das Zellkulturmedium durch 37°C

warmen HEPES-Puffer (siehe Tabelle 2) ersetzt. Das mit Endothelzellen konfluent bewachsene Deckgläschen wurde in das AFM eingebaut. Nach einer Äquilibrierungsphase wurden zehn Kraftkurven auf einer Zelle aufgenommen. Aus diesen wurde durch Bildung des Mittelwertes ein Ausgangswert der kortikalen Steifigkeit der Zelle errechnet (*baseline*-Wert, BW). Nach fünf Minuten Messpause erfolgte ein Lösungswechsel auf 1  $\mu\text{M}$  Amilorid oder 0,1  $\mu\text{M}$  Benzamil, gelöst in HEPES-Puffer. Im Anschluss wurde direkt mit den Messungen begonnen. Sechs Kraftkurven wurden hintereinander durchgeführt, gefolgt von einer 30 sek. Messpause. Danach wurden erneut sechs Kurven durchgeführt. Dieser Zyklus wurde über 30 min wiederholt (vgl. Abbildung). Aus den jeweils sechs zu einem Zeitpunkt zugehörigen Messungen wurde der Mittelwert gebildet, der die kortikale Steifigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Blockade des EnNaC repräsentiert. Zur besseren Vergleichbarkeit der durchgeführten Messreihen wurde durch Bildung des Quotienten aus dem BW und den im Minutentakt gemessenen Werten die relative kortikale Steifigkeit der einzelnen Zeitpunkte errechnet. Dieses Messprotokoll machte es nötig, dass nach Bestimmung des BW ein Flüssigkeitswechsel von reinem HEPES-Puffer zu in Puffer gelöstem Amilorid oder Benzamil erfolgt. Die Messung direkt nach dem Flüssigkeitswechsel war aufgrund des geringen Temperaturunterschieds der Flüssigkeiten geprägt von Artefakten und wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt. Die ersten verwertbaren Messungen können eine Minute nach Flüssigkeitswechsel durchgeführt werden.

Als Kontrollmessung erfolgte statt Zugabe von Amilorid oder Benzamil ein Wechsel des HEPES-Puffers.

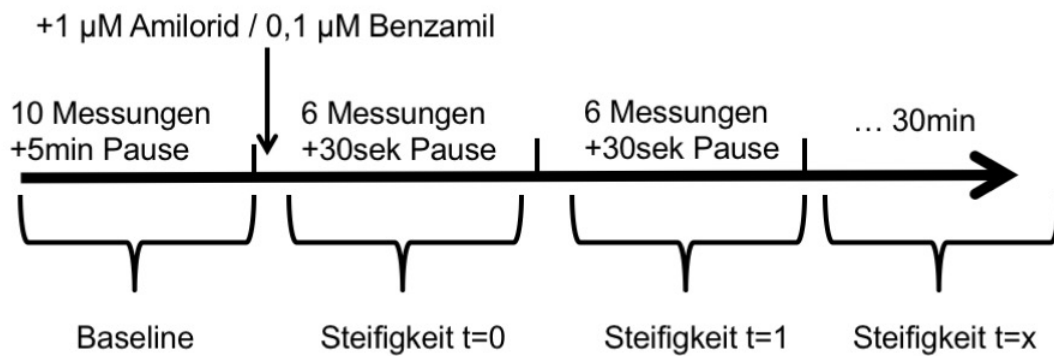


Abbildung 5: Messprotokoll Amilorid- und Benzamil-Zeitreihe. Zunächst wird die kortikale Steifigkeit gemessen und durch Mittelung der *baseline*-Wert gebildet. Nach fünf Minuten Pause wird 1  $\mu\text{M}$  Amilorid oder 0,1  $\mu\text{M}$  Benzamil hinzugegeben und direkt mit den Steifigkeitsmessungen begonnen. Es werden jeweils sechs Kraftkurven durchgeführt, gefolgt von 30 sek. Pause. Aus den Werten der kortikalen Steifigkeit von jeweils sechs zusammengehörenden Kurven wird der Mittelwert der kortikalen Steifigkeit für einen Zeitpunkt nach Zugabe von Amilorid/Benzamil gebildet. Aus diesem Wert und dem BW wird der Wert der relativen kortikalen Steifigkeit gebildet.

## 2.4 Experiment 2: Stabilisierung der Aktinfilamente

Da ein Zusammenhang zwischen  $\text{EnNaC}$ -abhängiger kortikaler Steifigkeit und dem kortikalen Aktin postuliert wird, wurde in einer ungepaarten Versuchsreihe durch Inkubation mit Jasplakinolide (JAS) die Fähigkeit des Aktins zu depolymerisieren gestoppt. Das 1988 zunächst als Fungizid beschriebene cyclische Peptid kommt natürlicherweise im Schwamm *Jaspis johnstoni* vor (119) und wirkt *in vitro* stabilisierend auf F-Aktin (19, 20).

Zunächst wurden die Endothelzellen, wie in 2.5 beschrieben, in HEPES-Puffer überführt und das Deckgläschen in das AFM eingebaut. Nach einer Äquilibrierungsphase wurden auf 20 verschiedenen Zellen jeweils sechs Kraftkurven hintereinander erstellt und daraus der Mittelwert der kortikalen Steifigkeit ermittelt, der den Ausgangswert (*baseline*-Wert) der Steifigkeit einer Zelle repräsentiert. Nachfolgend wurden die Zellen zunächst 15 min mit 0,5  $\mu\text{M}$  oder 1,0  $\mu\text{M}$  Jasplakinolide (JAS, in 0,1% Dimethylsulfoxid, DMSO gelöst und in HEPES-Puffer verdünnt) inkubiert, um die gewünschte Stabilisierung des Aktins zu erreichen. Danach wurde 1  $\mu\text{M}$  Amilorid (in Wasser gelöst und in HEPES-Puffer verdünnt) hinzugegeben und es wurden jeweils weitere sechs Kraftkurven auf 20 verschiedenen Zellen erstellt (siehe Abbildung). Die Steifigkeit wurde wie oben beschrieben analysiert. Der



Mittelwert der kortikalen Steifigkeit der Zellen, die nach Amiloridapplikation gemessen wurden, stellt die durchschnittliche kortikale Steifigkeit nach Behandlung mit JAS und Amilorid dar. Diese wurde in Relation zum Baselinewert gesetzt und als Relativwert in Prozent ausgedrückt. Um einen möglichen Effekt des DMSO auszuschließen wurde in den Kontrollversuchen ein HEPES-Puffer mit ebenfalls 0,1% DMSO verwendet.

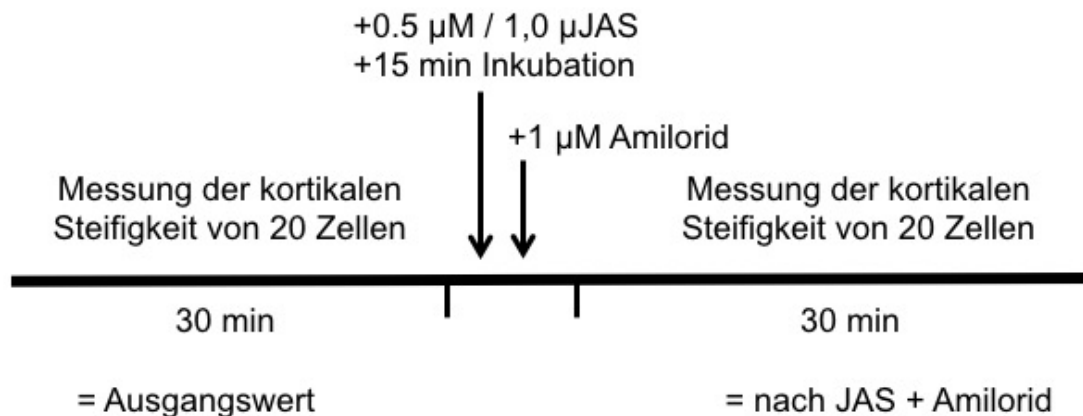


Abbildung 6: Messprotokoll Aktin-Experimente. Zunächst wurde die kortikale Steifigkeit von 20 verschiedenen Zellen gemessen. Danach wurde erst mit 0,5/1,0 µM JAS inkubiert und im Anschluss 1 µM Amilorid hinzugegeben. Nach Äquilibrierung der Temperatur wurde wieder die kortikale Steifigkeit von 20 verschiedenen Zellen gemessen.

## 2.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde die Software OriginPro 8 verwendet. Als graphische Darstellungsformen wurden *Boxplot*- und Liniendiagramme gewählt. Das *Boxplot*-Diagramm besteht aus einer Box, die von einer horizontalen Linie in zwei Datenmengen unterteilt wird. Diese Linie stellt den Median der Daten dar. Unteres und oberes Ende der Box beschreiben erstes und zweites Quartil und bilden so 50% der Daten ab. Weiter unterhalb liegt das 10te Perzentil und weiter oberhalb das 90te Perzentil, die über sog. *Whiskers* mit der Box verbunden sind. Es eignet sich besonders gut, um einen Überblick über die Daten und ihre Verteilung zu geben.

Das Liniendiagramm wurde zur Darstellung des Zeitverlaufs der relativen kortikalen Steifigkeit gewählt. Auf der Abszisse sind die einzelnen Zeitpunkte, beginnend beim BW aufgetragen. Die Ordinate zeigt die relative Steifigkeit der Zelle im Vergleich zum BW. Die einzelnen Zeitpunkte zeigen zusätzlich den Standardfehler (*standard error of the mean = SEM*).

Mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests wurde überprüft, ob es sich um eine Normalverteilung handelt. Bei gepaarten Experimenten wurden parametrisch verteilte Daten mittels des Paired-Students-T-Test und nicht-parametrisch verteilte Daten mittels des Wilcoxon-Tests auf signifikante Änderungen überprüft. Ungepaarte Experimente wurden durch Anwendung des Students-T-Test bei parametrischer Verteilung und des Mann-Whitney-Tests bei nicht-parametrischer Verteilung geprüft. In graphischen Abbildungen wurde die Signifikanz durch Angabe des p-Werts gezeigt, wobei \* für einen p-Wert von  $< 0,05$  steht. N bezieht sich auf die Anzahl der gemessenen Gläschen n bezieht sich auf die Anzahl der gemessenen Zellen.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Amilorid reduziert die kortikale Steifigkeit innerhalb von Minuten**

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Amilorid die Steifigkeit des endothelialen Kortex reduziert (71). Allerdings ist nicht bekannt, durch welchen zellulären Mechanismus diese Reaktion zustande kommt. Um einen Hinweis darauf zu erhalten und so z.B. einen schnellen nicht-genomischen, von einem langsamen genomischen Mechanismus zu unterscheiden, sollte in diesem gepaarten Experiment der Zeitpunkt nach Amiloridgabe bestimmt werden, ab dem eine signifikante Steifigkeitsänderung des Zellkortex auftritt. Die Ergebnisse werden als Zeitreihe der relativen kortikalen Steifigkeiten d.h. der Änderung im Vergleich zum BW aufgetragen.

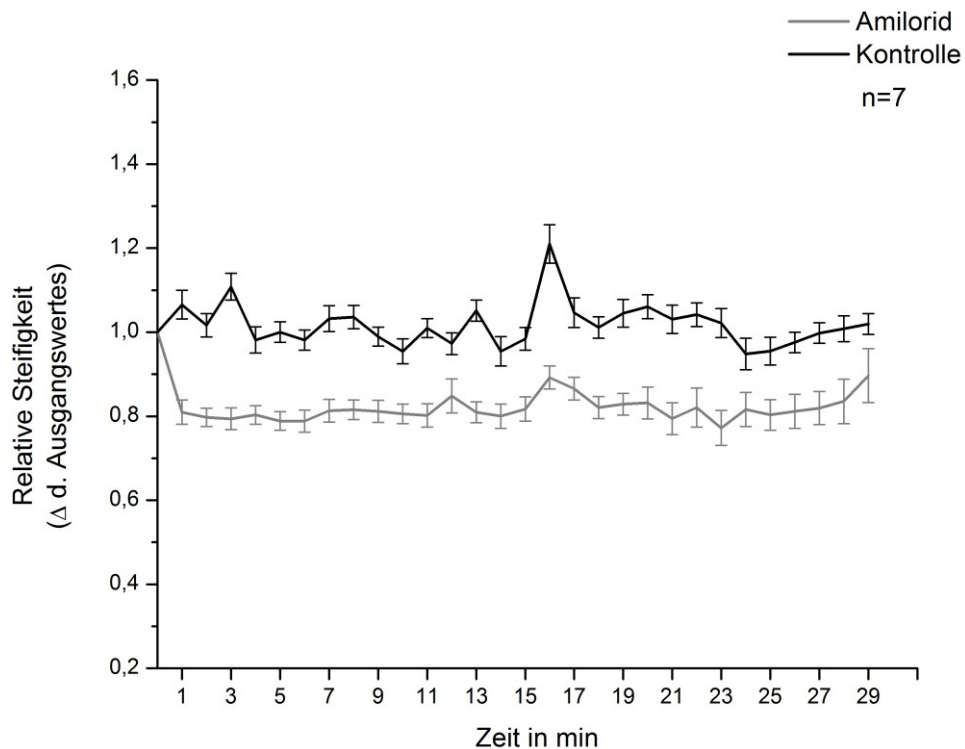


Abbildung 7: Zeitverlauf Amilorid und Kontrolle. Das Diagramm zeigt den Zeitverlauf der relativen kortikalen Steifigkeit der Endothelzellen nach Anwendung von Amilorid (grau) und nach Pufferwechsel (schwarz). Amilorid führt innerhalb der ersten Minute zu einer signifikanten Reduktion der kortikalen Steifigkeit um  $17,4 \pm 3\%$ . Dieses verringerte Steifigkeitsniveau bleibt über den Verlauf des Experiments bestehen. Für das Kontrollexperiment wird ein Pufferwechsel statt Zugabe von Amilorid durchgeführt. Dabei zeigt sich keine signifikante Änderung der Steifigkeit. (n = Anzahl gemessener Zellen)

Abbildung 7 zeigt den Zeitverlauf der relativen kortikalen Steifigkeit der Endothelzellen nach Behandlung mit  $1 \mu\text{M}$  Amilorid (rot) und nach Pufferwechsel beim Kontrollexperiment (schwarz). Es wurde mit sieben Zellen aus sieben unterschiedlichen Zellkulturschalen wiederholt (n = 7). Der Verlauf der Kurve des Kontrollexperimentes zeigt dabei einen leicht schwankenden, aber durchschnittlich auf Niveau des BW verbleibenden Verlauf. Nach Applikation von Amilorid, stellt sich eine sofortige signifikante Reduktion der kortikalen Steifigkeit um durchschnittlich  $17,4 \pm 3\%$  auf  $83,6\%$  des BW ( $p < 0,05$ ) ein. Dieses Niveau bleibt für den weiteren Verlauf des Experimentes ohne signifikante Abweichungen. Die Blockade des EnNaC durch Amilorid führt also bereits innerhalb der ersten Minute zu einer signifikanten Reduktion der kortikalen Steifigkeit.

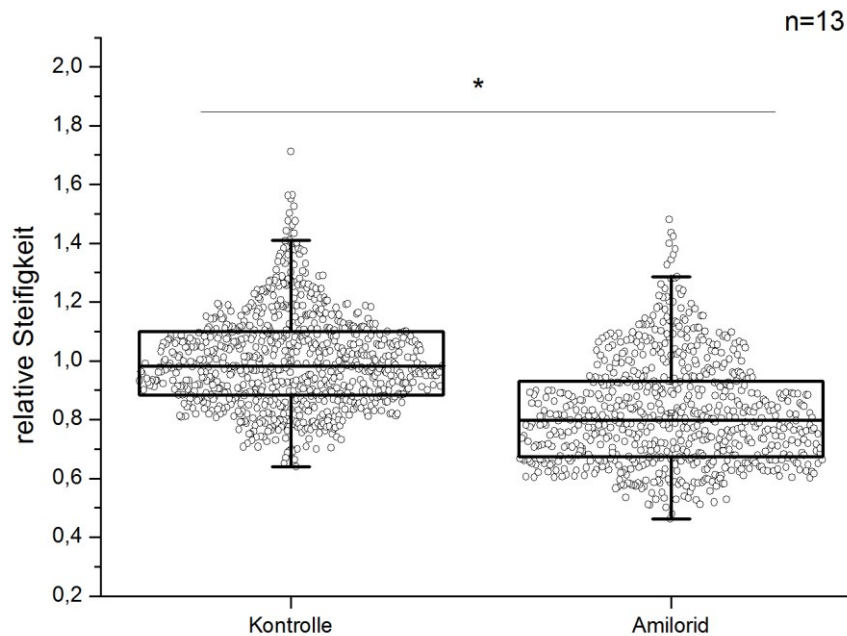


Abbildung 8: Amilorid-Zeitreihe, relative Steifigkeiten gesamt. Das Diagramm zeigt alle Werte der relativen kortikalen Steifigkeiten der Zeitverlauf-Experimente. Die Kontrollexperimente (links) zeigen insgesamt keine signifikante Veränderung der kortikalen Steifigkeit im Vergleich zu den BW. Zugabe von Amilorid (rechts) führt zu einer signifikanten Reduktion der Steifigkeit des endothelialen Kortex um  $17,8 \pm 0,5\%$  auf  $82,2\%$  der BW. (n = Anzahl der gemessenen Zellen; \* = signifikanter Unterschied Kontrollen/Amilorid ( $p < 0,05$ ))

Abbildung 8 zeigt alle gemessenen Werte der relativen kortikalen Steifigkeit der Amilorid- und Kontroll-Zeitreihen, unabhängig vom Zeitpunkt der Messung. Die Kontrollen zeigen, trotz der in der Abbildung sichtbaren Schwankungen um den BW, insgesamt keine signifikante Änderung der Steifigkeit des Kortex im Vergleich zum BW. Weder das Eindrücken der Zelle durch den *cantilever* des AFM noch der Pufferwechsel scheinen die kortikale Steifigkeit signifikant zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu reduziert sich die Steifigkeit des Zellkortex, der mit Amilorid behandelten Zellen, insgesamt signifikant um durchschnittlich  $17,8 \pm 0,5\%$  auf  $82,2\%$  des BW. Die initiale, rapide Reduktion der kortikalen Steifigkeit entspricht also der durchschnittlichen Änderung im Verlauf der gesamten Zeitreihe. Dieses Experiment zeigt, dass die Blockade des EnNaC durch Amilorid innerhalb der ersten Minute zu einer signifikanten Reduktion der kortikalen Steifigkeit führt und danach konstant bleibt.

### 3.2 Benzamil reduziert die kortikale Steifigkeit innerhalb von Minuten

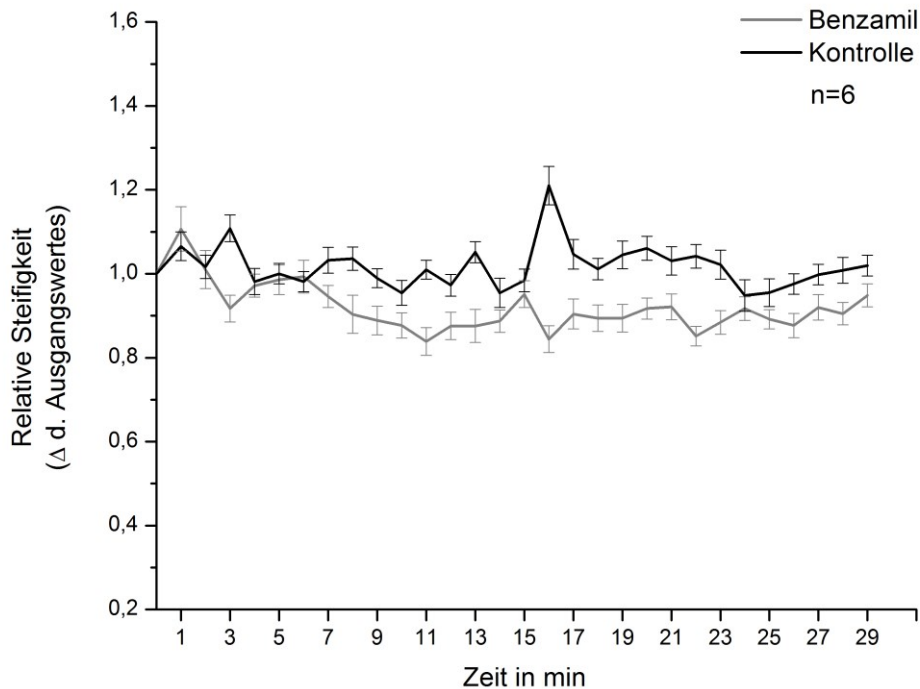


Abbildung 9: Benzamil-Zeitreihe, Zeitverlauf Benzamil und Kontrolle. Die Abbildung stellt den Zeitverlauf der kortikalen Steifigkeit der Endothelzellen nach Anwendung von Benzamil (grau) und der Kontrollexperimente (schwarz) dar. Dabei zeigt sich eine erste signifikante Änderung der kortikalen Steifigkeit drei Minuten nach Zugabe von Benzamil. Ab der sechsten Minute verringerte sich die Steifigkeit dauerhaft signifikant ( $p < 0,05$ )

Um einen EnNaC-unabhängigen Effekt des Amilorids auf die kortikale Steifigkeit der Endothelzelle auszuschließen, wurde das Experiment mit  $0,1 \mu\text{M}$  Benzamil, einem anderen, spezifischen EnNaC-Blocker, wiederholt. Es wurden Zeitreihen von sechs Zellen aus unterschiedlichen Zellkulturschalen gemessen ( $n = 6$ ). Die im Vergleich zu Amilorid niedrigere Konzentration des Benzamils wurde aufgrund seiner höheren Aktivität gewählt. Abbildung 9 zeigt den Zeitverlauf der relativen Steifigkeit des Kontrollexperimentes (schwarz) und nach Anwendung von Benzamil (rot) im Vergleich zum BW. Nach drei Minuten führt Benzamil zu einer ersten signifikanten Reduktion der kortikalen Steifigkeit. Ab der sechsten Minute verringert sich die relative kortikale Steifigkeit der Zellen des Benzamil-Experiments um ca. 10% und bleibt danach für

den weiteren Verlauf des Experiments auf diesem Niveau. Trotz des unterschiedlichen Verlaufs im Vergleich zu Amilorid, führt Benzamil ebenfalls zu einer rapiden signifikanten Reduktion der kortikalen Steifigkeit.

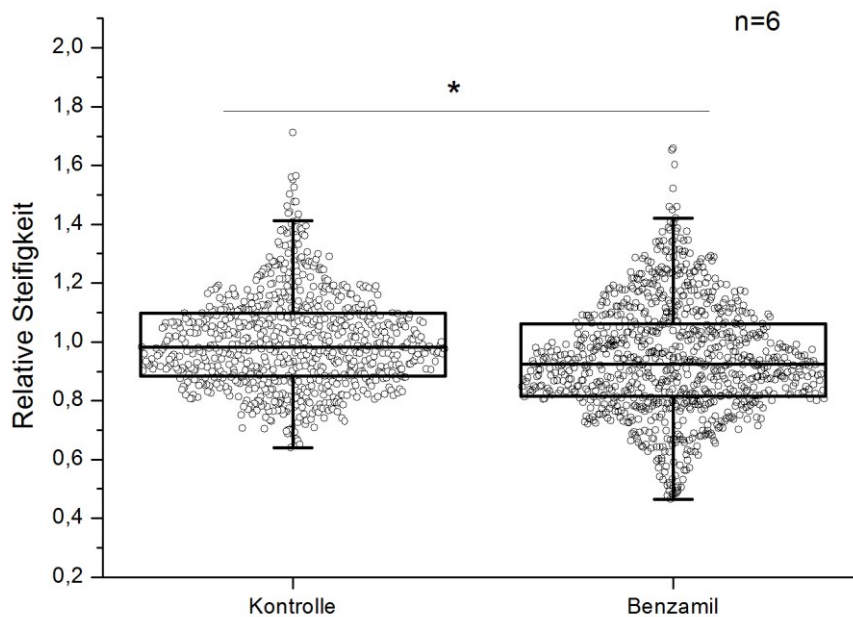


Abbildung 10: Benzamil-Zeitreihe, relative Steifigkeiten gesamt. Das Boxplot zeigt die gesamten Werte der relativen kortikalen Steifigkeiten der Kontrollexperimente und nach Zugabe von Benzamil. Durch Zugabe von Benzamil reduziert sich die kortikale Steifigkeit signifikant um  $6 \pm 0,6\%$  auf 94% des BW. (n = Anzahl der gemessenen Zellen; \* = signifikanter Unterschied Kontrollen/Benzamil ( $p < 0,05$ ))

Abbildung 10 zeigt alle Werte der relativen kortikalen Steifigkeit der Kontroll- und Benzamil-Zeitreihen. Die Ergebnisse des Kontrollexperimentes wurden bereits beschrieben. Die mit Benzamil behandelten Zellen zeigen insgesamt eine signifikante Reduktion der Steifigkeit des Zellkortex von durchschnittlich  $6 \pm 0,6\%$  auf 94% im Vergleich zum BW. Damit entspricht die initiale Änderung der kortikalen Steifigkeit, in den ersten Minuten nach Zugabe von Benzamil, der durchschnittlichen Änderung im Verlauf des Experiments.

### **3.3 EnNaC beeinflusst das kortikale Aktin**

Es konnte Verbindung zwischen ENaC und dem kortikalen Aktin-Zytoskelett gezeigt werden (25, 26, 59, 84, 85, 115). Da Aktinfilamente maßgeblich für die mechanischen Eigenschaften des Kortex verantwortlich sind, ist es möglich, dass der von EnNaC-Blockern ausgelösten schnellen Reduktion der kortikalen Steifigkeit eine Veränderung des kortikalen Aktins zugrunde liegt. Ziel dieses Experimentes war es, durch Blockade des EnNaC, dessen Einfluss auf die kortikalen Aktinfilamente und damit die Zellmechanik besser zu verstehen. Dazu wurden vier Experimente durchgeführt

1. Kontrollexperiment 1: HEPES + Amilorid
2. Kontrollexperiment 2: JAS + HEPES
3. Aktin-Stabilisierung 1: 0,5  $\mu$ M JAS + 1  $\mu$ M Amilorid
4. Aktin-Stabilisierung 2: 1  $\mu$ M JAS + 1  $\mu$ M Amilorid



### 3.3.1 Kontrollexperiment 1: HEPES + Amilorid

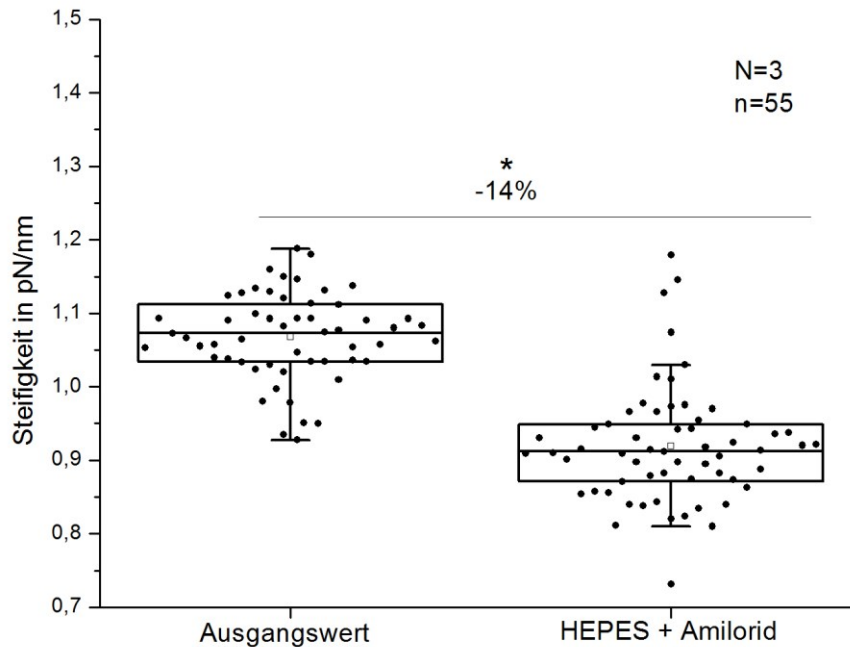


Abbildung 11: Kontrollexperiment 1. Dargestellt sind die Absolutwerte der kortikalen Steifigkeit der gemessenen Endothelzellen. Die linke Box zeigt die kortikale Steifigkeit zu Beginn des Experiments. Die rechte Box zeigt die kortikale Steifigkeit nach Inkubation mit HEPES-DMSO-Gemisch und Zugabe von Amilorid. Dabei reduzierte sich die Steifigkeit des Kortex signifikant um durchschnittlich 14% von 1,06 pN/nm auf 0,92 pN/nm. (N = Anzahl der Versuchsreihen; n = Anzahl der gemessenen Zellen; \* = signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ))

Abbildung 11 zeigt das Ergebnis des ersten Kontrollexperiments aus der Reihe der Aktin-Experimente. Hierbei wurde zunächst die kortikale Steifigkeit der Zellen zu Beginn des Experiments bestimmt (linke Box), um einen Ausgangswert zu erhalten. Im Anschluss wurde ein Lösungswechsel mit einem HEPES/0,1% DMSO-Puffer durchgeführt um so einen möglichen Einfluss des DMSO auf die Amiloridreaktion zu erkennen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde dieser durch 1  $\mu$ m Amilorid ersetzt. Die Auswertung der Daten zeigt eine Reduzierung der kortikalen Steifigkeit von initial 1,06 pN/nm ( $\pm 0,06$  pN/nm, linke Box) auf 0,92 pN/nm ( $\pm 0,07$  pN/nm, rechte Box) durch Gabe von Amilorid. Dies stellt eine signifikante Verminderung um durchschnittlich 14% dar. Diese Amilorid-abhängige Reduzierung der kortikalen Steifigkeit deckt sich mit zuvor publizierten Werten und zeigt, dass DMSO in der

verwendeten Konzentration von 0,1% keinen detektierbaren Einfluss auf die durch Amilorid verursachte Reduktion der kortikalen Steifigkeit hat.

### 3.3.2 Kontrollexperiment 2: JAS + HEPES

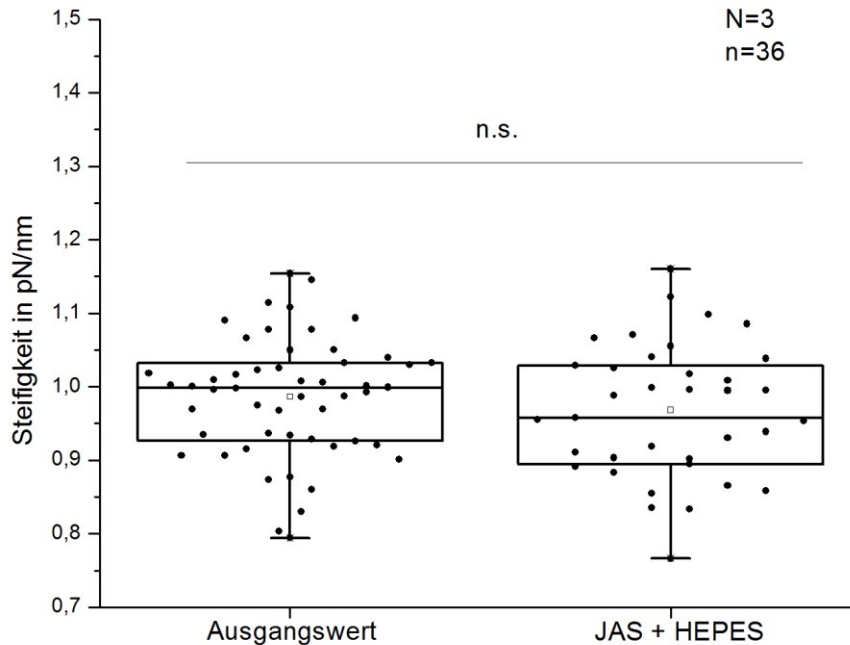


Abbildung 12: Aktin-Experiment 2, JAS + HEPES. Die linke Box zeigt den Ausgangswert der kortikalen Steifigkeit der Zellen. Die rechte Box zeigt die kortikalen Steifigkeiten nach Inkubation mit JAS. Dabei fand keine signifikante Änderung der kortikalen Steifigkeit statt. Sie betrug vor und nach Behandlung mit den Reagenzien 0,91 pN/nm. (N = Anzahl der Versuchsreihen; n = Anzahl der gemessenen Zellen;  $p < 0,05$ ; n.s. = nicht signifikanter Unterschied)

Im zweiten Kontrollexperiment sollte untersucht werden, ob die Stabilisierung des Aktins durch JAS per se die kortikale Steifigkeit beeinflusst. Die linke Box zeigt die Ausgangswerte der kortikalen Steifigkeiten der gemessenen Zellen. Dieser betrug im Durchschnitt 0,91 pN/nm ( $\pm 0,01$  pN/nm). Die rechte Box zeigt die gemessenen Steifigkeitswerte nach Inkubation mit JAS und Pufferwechsel. Diese lagen im Durchschnitt bei 0,91 pN/nm ( $\pm 0,01$  pN/nm) Es fand demnach keine signifikante Änderung der kortikalen Steifigkeit statt. Dieses Experiment zeigt, dass JAS, in der verwendeten Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$ , die kortikale Steifigkeit der Endothelzelle nicht signifikant beeinflusst.

### 3.3.3 Aktin-Stabilisierung 1: 0,5 $\mu\text{M}$ JAS + Amilorid

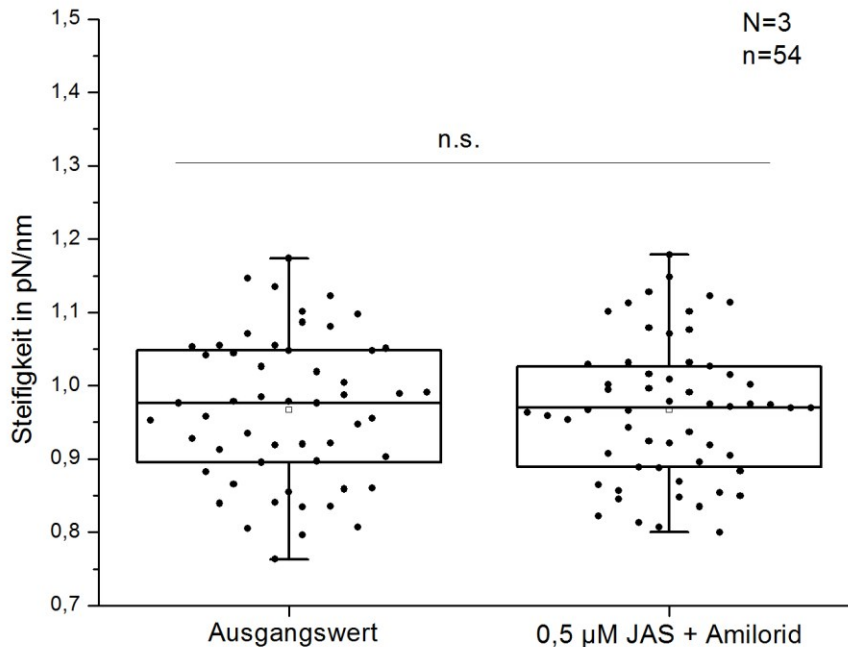


Abbildung 13: Aktin-Experiment 3, 0,5  $\mu\text{M}$  JAS + Amilorid. Dargestellt ist der Ausgangswert der kortikalen Steifigkeit der gemessenen Endothelzellen (links) und nach Blockade der Aktin-Depolymerisation und des EnNaC (rechts). Dabei zeigt sich keine signifikante Veränderung der kortikalen Steifigkeit. (N = Anzahl der Versuchsreihen; n = Anzahl der gemessenen Zellen; n.s. = nicht signifikanter Unterschied)

Im ersten Aktin-Stabilisierungsexperiment sollte untersucht werden, ob sich durch Blockade der Aktindepolymerisation durch JAS der steifigkeitsreduzierende Effekt von Amilorid verändert. Die linke Box zeigt den Ausgangswert der kortikalen Steifigkeit der Zellen. Diese betrug zu Beginn des Experiments 0,92 pN/nm ( $\pm 0,02$  pN/nm). Nach Inkubation mit JAS und Applikation von Amilorid (rechte Box) stellte sich keine signifikante Änderung der kortikalen Steifigkeit ein. Es zeigte sich lediglich eine Erhöhung der durchschnittlichen Steifigkeit des Kortex um +0,96% auf 0,96 pN/nm ( $\pm 0,02$  pN/nm). Durch die Inkubation mit JAS und die dadurch erreichte Blockade der Aktindepolymerisation wurde demnach die Wirkung des Amilorids auf die kortikale Steifigkeit aufgehoben.

### 3.3.4 Aktin-Stabilisierung 2: 1,0 $\mu\text{M}$ JAS + Amilorid

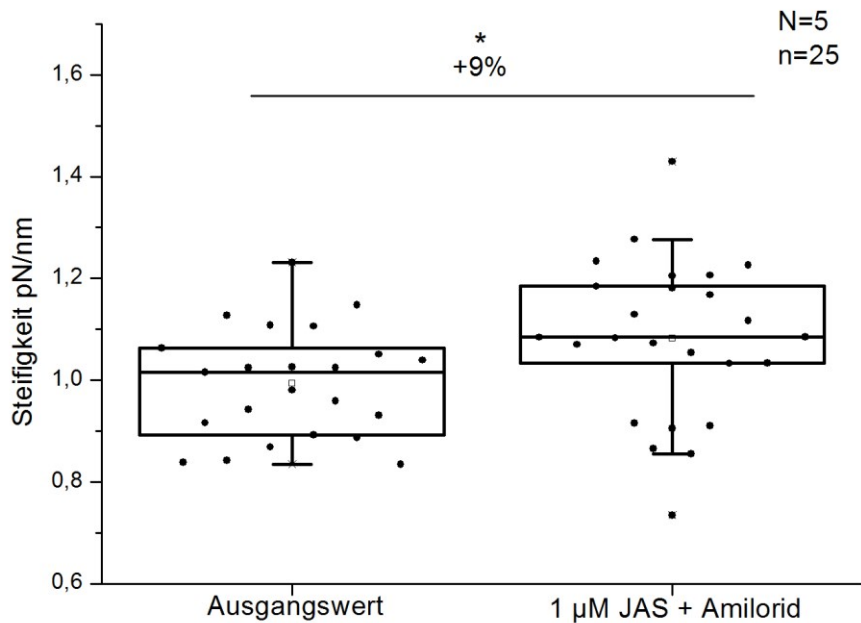


Abbildung 14: Aktin-Experiment 4, 1,0  $\mu\text{M}$  JAS + Amilorid. Die linke Box zeigt den Ausgangswert der kortikalen Steifigkeit der Zellen vor Zugabe der Reagenzien. Die rechte Box zeigt die Werte nach Inkubation mit 1,0  $\mu\text{M}$  JAS und Einbringen von Amilorid. Dabei zeigt sich eine signifikante Erhöhung der kortikalen Steifigkeit um 9% von 0,99 auf 1,08 pN/nm. (N = Anzahl der Versuchsreihen; n = Anzahl der gemessenen Zellen; \* = signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ))

In der Literatur ist die Dosis-abhängige Akkumulation von Aktinfilamenten nach Anwendung von JAS beschrieben (75). In diesem Experiment sollte überprüft werden, welchen Einfluss diese Akkumulation von Aktinfilamenten, durch Erhöhung der JAS-Konzentration auf 1,0  $\mu\text{M}$ , auf die Änderung der kortikalen Steifigkeit nach Blockade des EnNaC durch Amilorid hat. Die linke Box repräsentiert den Ausgangswert der kortikalen Steifigkeit. Dieser betrug durchschnittlich 0,99 pN/nm ( $\pm 0,02$  pN/nm). Die rechte Box zeigt die Werte der kortikalen Steifigkeit nach Inkubation mit JAS und Einbringen von Amilorid. Dabei zeigte sich, im Vergleich zum Ausgangswert, eine signifikante Erhöhung der Steifigkeit von 9% von auf 1,08 pN/nm ( $\pm 0,03$  pN/nm). Eine Erhöhung der JAS-Konzentration auf 1,0  $\mu\text{M}$  führte also nicht nur, wie im vorherigen Experiment, zu einer Aufhebung des

steifigkeitsreduzierenden Effekts vom Amilorid sondern erhöhte die kortikale Steifigkeit sogar signifikant.

### 3.3.5 Zusammenfassung Aktin-Experimente

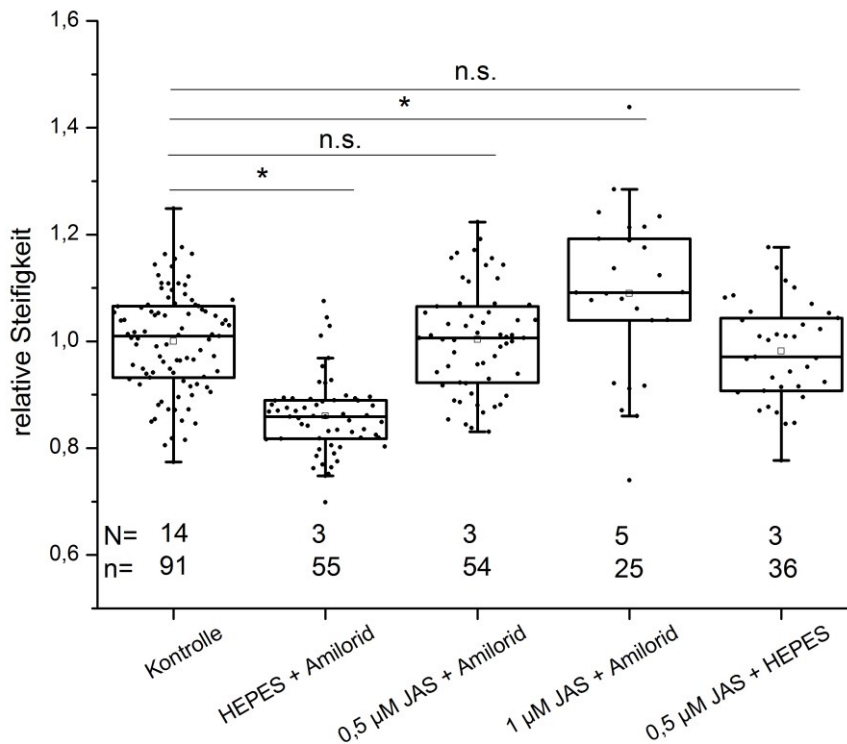


Abbildung 15: Zusammenfassung der Aktin-Experimente. Dargestellt sind die relativen kortikalen Steifigkeiten der einzelnen Aktin-Experimente. Amilorid reduziert die kortikale Steifigkeit signifikant. Dieser Effekt kann durch vorherige Inkubation mit 0,5 µM JAS aufgehoben werden. Inkubation mit 1,0 µM JAS erhöht die kortikale Steifigkeit trotz Amilorid.

Abbildung 15 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse der Aktin-Experimente. Es ist die relative kortikale Steifigkeit der Zellen, d.h. die Änderung im Vergleich zur Kontrolle aufgetragen. Dabei zeigt sich, dass Amilorid, auch nach vorheriger Inkubation mit HEPES+DMSO, die kortikale Steifigkeit, signifikant reduziert (1. Box v.l.). Dieser Effekt konnte durch vorherige Inkubation mit 0,5 µM JAS aufgehoben werden (2. Box v.l.). Wird die Konzentration des JAS auf 1 µM erhöht, hebt diese nicht nur die steifigkeitsreduzierende Amiloridreaktion auf, sie erhöht sogar signifikant die kortikale Steifigkeit der Endothelzelle. Die rechte Box zeigt, dass JAS in der Konzentration von 0,5 µM keinen signifikanten Einfluss auf die kortikale Steifigkeit der gemessenen Zellen hatte. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Wirkung des Amilorids auf die kortikale Steifigkeit der Endothelzellen durch Blockade der Aktin-Depolymerisation mit JAS aufheben lässt.

## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Interaktion des EnNaC mit dem kortikalen Zytoskelett der Endothelzellen und damit seinen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften von Endothelzellen besser zu verstehen. In vorherigen Publikationen wurde gezeigt, dass Aldosteron im Endothel die Anzahl der apikalen EnNaC-Moleküle erhöht (69). Diese Reaktion korreliert mit einer signifikanten Versteifung des Zellkortex (61). Der steifere Zellkortex kann durch den *shear-stress* des Blutstroms nicht ausreichend verformt werden. Dies resultiert in einer reduzierten NO-Synthese, dem Hauptmerkmal der endothelialen Dysfunktion (70). Diese Reaktion kann durch die EnNaC Blocker Amilorid und Benzamil verhindert werden, wobei sich die kortikale Steifigkeit der Zelle nach Blockade des EnNaC durch diese Substanzen sogar verringert (71). Des Weiteren konnten Kusche-Vihrog et al. zeigen, dass die Blockade des EnNaC durch Amilorid und Benzamil nicht nur mit einer verringerten kortikalen Steifigkeit einhergeht, sondern ebenfalls mit einer Reduktion der Anzahl der apikalen EnNaC-Moleküle assoziiert ist (71). Dieser Fund legt nahe, dass die Blockade der EnNaC-Funktion (dem  $\text{Na}^+$ -Einstrom), zusätzlich zu ihrem Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Zelle, ebenfalls in die Regulation des Kanals eingreift.

Es wurde mehrfach gezeigt, dass der EnNaC die mechanischen Eigenschaften der Endothelzelle und damit deren Funktion und Funktionstüchtigkeit entscheidend beeinflusst (61, 68, 70, 74, 135). Der zugrunde liegende Mechanismus der Interaktion ist bis dato unbekannt. Daher sollten die durchgeführten Experimente zu dessen Verständnis beitragen.

### 4.1 Amilorid reduziert die kortikale Steifigkeit innerhalb einer Minute

Zunächst sollten die in Frage kommenden Signalwege und Zeitverläufe der EnNaC-induzierten Reduzierung der kortikalen Steifigkeit eingegrenzt werden. Deshalb wurde zunächst der Zeitpunkt nach funktioneller Blockade des Kanals bestimmt, ab dem eine signifikante Abnahme der kortikalen Steifigkeit auftritt. Sollte die Verringerung der Steifigkeit des Kortex auf einer genomischen Reaktion beruhen, würde sie wahrscheinlich mehrere Minuten bis Stunden in Anspruch nehmen (14, 81). Eine schnelle Änderung der kortikalen Steifigkeit spräche für einen nicht-genomischen Prozess (13, 80, 81). In den Zeitreihe-Experimenten konnte dabei erstmalig gezeigt



werden, dass die Blockade des EnNaC durch Amilorid bereits innerhalb der ersten Minute zu einer signifikanten Reduktion der kortikalen Steifigkeit der Endothelzelle führt. Dieser Effekt war nach Anwendung von Benzamil ebenfalls messbar. Zwar stellte er sich etwa zwei Minuten später und weniger ausgeprägt ein, jedoch lässt sich dieser Unterschied durch Abweichungen der beiden verwendeten Blocker-Substanzen in Potenz und Spezifität erklären. Zwar ist für Benzamil eine ca. zehnfache Potenz im Vergleich zu Amilorid publiziert, allerdings bezieht sich dieser Wert auf den ENaC im Froschepithel (4, 34, 77), für den EnNaC im Endothel liegen keine vergleichenden Daten vor. Des Weiteren ist Benzamil zwar ein hochspezifischer ENaC Inhibitor, jedoch blockiert es ebenso den  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) (8, 63, 133). Die Benzamil-Konzentration von  $0,1 \mu\text{M}$ , welche in den Experimenten dieser Arbeit verwendet wurde, verringerte in publizierten Experimenten den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom um ca. 50% (44). Schneider et al. konnten in ihren Versuchen einen negativen Einfluss von Benzamil auf die NO-Produktion der Endothelzellen zeigen und postulieren einen Einfluss des NCX auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex (117, 118). Diese Interaktionen könnten die Zellmechanik zusätzlich zur Blockade des EnNaC beeinflussen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass Benzamil auch andere Proteine und dadurch die mechanischen Eigenschaften der Endothelzelle, unabhängig vom EnNaC, beeinflusst. Ungeachtet der Differenzen zwischen Amilorid und Benzamil in den Zeitverlauf Experimenten, führte sowohl die Blockade des EnNaC durch Benzamil als auch durch Amilorid zu einer rapiden signifikanten Verringerung der kortikalen Steifigkeit innerhalb der ersten Minute bzw. innerhalb der ersten Minuten. Die Reaktion des endothelialen Kortex auf die Blockade des EnNaC beruht dementsprechend auf einem schnellen und deshalb höchstwahrscheinlich nicht-genomischen Signalweg.

#### **4.2 Stabilisierung der Aktinfilamente verringert EnNaC-abhängige Reduktion der kortikalen Steifigkeit**

Durch die eindeutigen Ergebnisse der Zeitverlauf-Experimente wurde ersichtlich, dass die Blockade des EnNaC durch einen schnellen nicht-genomischen Signalweg die Steifigkeit des endothelialen Kortex verringert. Da die mechanischen Eigenschaften des Kortex unter anderem auf Aktinfilamenten beruhen, kann ein Einfluss der EnNaC-Blockade auf das kortikale Aktin-Zytoskelett postuliert werden. Des Weiteren ist bekannt, dass Veränderungen der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration, wie sie in den durchgeführten Experimenten durch Blockade des EnNaC erzeugt wurden, einen direkten Einfluss auf Stabilität und Umbau der Aktin-Filamente haben. Oda et al.

konnten zeigen, dass  $\text{Na}^+$  die Bindungen der Aktin-Monomere innerhalb der Filamente stabilisiert und so den filamentären Zustand des Aktins unterstützt (94). Eine Verringerung der  $\text{Na}^+$ -Konzentration würde dementsprechend zur Destabilisierung der Filamente führen. Diese würden vermehrt zu G-Aktin depolymerisieren und so die Steifigkeit der Zelle herabsetzen. Zusätzlich ist die Verbindung zwischen ENaC und Aktin-Zytoskelett mehrfach publiziert (26, 59, 85). Dabei kommt es, vermittelt durch ABP, zu regulatorischen Interaktionen des ENaC mit den kortikalen Aktinfilamenten (84). Diese Daten sind Indizien für eine Verbindung zwischen einer Inhibition der ENaC-Funktion und Veränderung der kortikalen Aktinfilamente. Zusammengefasst würde durch Blockade des ENaC der  $\text{Na}^+$ -Einstrom reduziert und so die kortikalen Aktinfilamente destabilisiert, was in einer reduzierten kortikalen Steifigkeit resultiert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Depolymerisation des Aktins durch Inkubation mit JAS gehemmt und anschließend der ENaC durch Amilorid blockiert. Sollte der reduzierte Einstrom von Na durch Destabilisierung und demnach Depolymerisierung der Aktinfilamente für die reduzierte Steifigkeit des Kortex verantwortlich sein, dürfte sich nach Anwendung von JAS kein derartiger Effekt zeigen. Abbildung 13 zeigt ebendiese Reaktion: Die kortikale Steifigkeit der Zellen bleibt nach Inkubation mit  $0,5 \mu\text{M}$  JAS und Zugabe von Amilorid unverändert. Es findet keine Steifigkeitsreduktion statt. Dieser Fund bestätigt zunächst die aufgestellte Hypothese, da der Einfluss von Amilorid auf die kortikale Steifigkeit der Endothelzellen durch Blockade der Aktindepolymerisation verhindert werden konnte.

Um einen Einfluss des DMSO, in dem JAS gelöst ist, auszuschließen, wurden mehrere Kontrollexperimente durchgeführt. Diese belegten, dass die Inkubation mit DMSO alleine keinen signifikanten Einfluss auf die Amiloridreaktion hat. Ebenso führt die Inkubation mit  $0,5 \mu\text{M}$  JAS per se nicht zu einer signifikanten Veränderung der kortikalen Steifigkeit. Dieses Ergebnis schien zunächst verwunderlich, da für JAS nicht nur eine Aktin-stabilisierende, sondern ebenfalls eine Induktion der Aktinpolymerisation publiziert ist (123). Diese würde zur Akkumulation der Aktinfilamente und damit zu einer erhöhten Zellsteifigkeit führen. Allerdings konnten Bubb et al. in früheren Experimenten die Dosis-Abhängigkeit von JAS zeigen (20). Demnach wirken JAS-Konzentrationen von  $0,5 \mu\text{M}$  und weniger nicht Polymerisations-induzierend, sondern stabilisierend auf Aktinfilamente (19, 75). Da diese Daten nicht an Endothelzellen erhoben wurden, sollte in einem weiteren Experiment die Konzentration des JAS auf  $1,0 \mu\text{M}$  erhöht werden. Anschließend wurde, wie in den vorhergegangenen Experimenten  $1 \mu\text{M}$  Amilorid hinzugegeben. Dabei zeigt sich eine signifikante

Zunahme der kortikalen Steifigkeit (siehe Abbildung 14) Dieses Ergebnis bestätigt zum einen die Hypothese der Dosis-Abhängigkeit von JAS und bekräftigt zusätzlich die postulierte Hypothese der Aktin-abhängigen Steifigkeitsreduktion durch Blockade des EnNaC. In den durchgeführten Experimenten konnte erstmals indirekt gezeigt werden, dass Amilorid und Benzamil durch rapide Induktion der Depolymerisation des kortikalen Aktins die Reduktion der kortikalen Steifigkeit herbeiführen. Dabei ist es wahrscheinlich, dass die schnelle Reaktion durch Veränderungen der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration zustande kommt.

#### **4.3 Das kortikale Aktin beeinflusst die Anzahl der apikalen EnNaC-Kanäle und damit die kortikale Steifigkeit**

Aktinfilamente sind jedoch nicht nur für die mechanischen Eigenschaften der Zelle verantwortlich. Sie beeinflussen auch die Funktion der Zelle. Als Anker für Membranproteine in der PM verbinden sie Kanäle mit dem kortikalen Zytoskelett und vermindern so deren Lateraldiffusion (82). In den Experimenten dieser Arbeit konnten indirekt Hinweise gefunden werden, wonach durch Blockade des EnNaC und den dadurch verringerten  $\text{Na}^+$ -Einstrom die kortikalen Aktin-Filamente destabilisiert werden und depolymerisieren. Somit würden Membranproteine, wie der EnNaC, ihre kortikale Verankerung verlieren und deshalb von der Zelle entfernt werden. Eine mögliche Reaktion wäre die für den epithelialen ENaC beschriebene Ubiquitinisierung des Kanals und der die Internalisierung des Kanals und der lysosomale Abbau oder Recycling durch Deubiquitinisierung folgt (3, 23, 111, 126, 127). Die Entfernung des Kanals aus der PM könnte zusätzlich die Reduktion der kortikalen Steifigkeit unterstützen. Betrachtet man den EnNaC nicht nur als funktionelles, sondern auch als strukturelles Protein innerhalb der PM, würde seine Anwesenheit die Steifigkeit der PM heraufsetzen. Dies wurde in Experimenten gezeigt, bei denen eine erhöhte Anzahl apikaler EnNaC-Moleküle mit einer Versteifung des Zellkortex einhergeht (65). Die Wirkung des Amilorids könnte dementsprechend auf zwei Mechanismen beruhen. Im ersten Schritt führt die rapide strukturelle Änderung des kortikalen Aktins, durch den fehlenden  $\text{Na}^+$ -Einstrom, zu einer ersten Reduktion der kortikalen Steifigkeit. Dadurch verlieren die EnNaC-Moleküle ihre Verankerung in der PM woraufhin sie internalisiert werden. Dieser zweite Schritt führt zu einem Verlust von Proteinen in der PM, wodurch zum einen ein strukturelles Element entfernt wird und dadurch die Steifigkeit verändert wird. Zum anderen würde der  $\text{Na}^+$ -Einstrom für einen längeren Zeitraum auf

niedrigerem Niveau verbleiben, wodurch eine langfristige Tendenz der Destabilisierung von F- zu G-Aktin und damit ein weicherer Kortex bestehen bliebe.

#### 4.4 Pathophysiologische Relevanz

Primäre (essenzielle) Hypertonie findet sich gehäuft in Gesellschaften, deren täglicher  $\text{Na}^+$ -Konsum 2 g überschreitet. Der überwiegende Anteil wird dabei als Kochsalz ( $\text{NaCl}$ ) aufgenommen. In Gesellschaften, in denen er nur 1,2 g oder weniger beträgt, sind die Fallzahlen deutlich geringer (2, 5, 41). Dieser Effekt scheint unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren zu sein und ist ein Indiz dafür, dass die Entwicklung der primären Hypertonie ein Mindestmaß an  $\text{Na}^+$ -Aufnahme benötigt. Die Menge des aufgenommenen  $\text{Na}^+$  korreliert dabei mit dem Blutdruck (124). Heutzutage reicht die durchschnittliche tägliche  $\text{Na}^+$ -Aufnahme in entwickelten Gesellschaften von ca. 4 g in den USA bis hin zu über 10 g in einigen Regionen Japans und Europa (18). Dabei konnte die INTERSALT-Studie zeigen, dass die tägliche  $\text{Na}^+$ -Aufnahme und der Blutdruck miteinander korrelieren (5) und daher sowohl akut als auch chronisch mit einer Erhöhung des Blutdrucks assoziiert ist (54, 124). Dieser Fund konnte von Oh et al. durch eine an 97000 Patienten durchgeführte Studie bestätigt werden (95). Durch Reduktion der täglichen  $\text{Na}^+$ -Aufnahme kann wiederum der Blutdruck gesenkt werden (52, 108). Dabei geht eine Reduktion der täglichen  $\text{Na}^+$ -Aufnahme (v.a. durch Reduktion der Kochsalzaufnahme) von 1,5 g mit einem um 3,6-5,6 mmHg / 1,9-3,2 mmHg (systolisch/diastolisch) bei hypertensiven Patienten und 1,8-3,5 mmHg / 0,8-1,8 mmHg bei normotensiven Patienten einher (53). Obwohl diese Änderungen des Blutdrucks nur gering erscheinen, können sie bei dauerhafter Einhaltung der  $\text{Na}^+$ -reduzierten Diät kardiovaskulären Ereignissen vorbeugen (31, 32). Dementsprechend ist die  $\text{Na}^+$ -arme Ernährung ein essenzieller Teil aller Behandlungsschemata der primären Hypertension (66).

Ihr positiver Effekt lässt sich auch durch den Einfluss des  $\text{Na}^+$  auf das kardiovaskuläre System erklären. Die erhöhte Aufnahme von  $\text{Na}^+$  unter anderem in der Form von Kochsalz führt zu einer Zunahme der Plasmanatriumkonzentration (pNA) (54). Oberleithner et al. konnten in mehreren Experimenten zeigen, dass die Erhöhung des pNA zu einer Versteifung der Endothelzellen und zu einer verringerten Synthese von NO und dadurch zu einer pathologischen Vasokonstriktion führt (91). Es bildet sich die Grundlage der endothelialen Dysfunktion. Der zugrunde liegende Mechanismus lässt sich u.a. durch die in dieser Arbeit vorgestellten Daten erklären.  $\text{Na}^+$  gelangt u.a. über den  $\text{ENaC}$  in die Endothelzellen und wirkt dort, wie oben beschrieben, stabilisierend auf die kortikalen Aktinfilamente, wodurch sich der Kortex der Endothelzelle versteift. Dadurch kann er nicht mehr adäquat durch den *shear-stress* des Blutstromes verformt werden. Die NO-Synthase wird nicht aktiviert und das Gefäß bleibt kontrahiert.

Zusätzlich dazu führt eine hohe  $\text{Na}^+$ -Konzentration über einen *feed-forward*-Mechanismus zu einer erhöhter Anzahl von EnNaC-Molekülen in der PM (65), was ebenfalls mit einer Versteifung des Kortex assoziiert ist. Ein weiterer in der Literatur diskutierter Mechanismus führt über den NCX. Das u.a. über den EnNaC in die Endothelzelle aufgenommene  $\text{Na}^+$  und die damit einhergehende erhöhte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration aktiviert den *Ca<sup>2+</sup>-entry-mode* des NCX. Dieser ist charakterisiert durch einen Antiport mit  $\text{Na}^+$ -Efflux und gleichzeitigem sekundär aktiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx (12). Somit erhöht sich, getrieben vom  $\text{Na}^+$ , die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, wodurch es zur Kontraktion der darunterliegenden glatten Muskelschicht und zur Vasokonstriktion kommt (60).

Eines der Hauptwerkzeuge der medikamentösen antihypertensiven Therapie sind Diuretika wie Amilorid und Hydrochlorthiazid. Diese Substanzen sind seit langer Zeit in vielen Ländern erste Wahl bei der Behandlung der essenziellen Hypertonie da ihre Anwendung mit einer verbesserten Lebenserwartung der Patienten einhergeht (89, 97). Dabei ist bekannt, dass der positive Effekt dieser Substanzen über deren diuretische Wirkung hinausgeht (62). Möglich wäre, dass durch die Blockade des EnNaC der  $\text{Na}^+$ -Einstrom in die Endothelzelle verringert wird. Somit wird die oben beschriebene Kaskade, die zu pathologischen Vasokonstriktion, endothelialer Dysfunktion und Hypertonie führen kann, frühzeitig unterbrochen. Somit bleibt funktionelle Plastizität des Endothels erhalten.

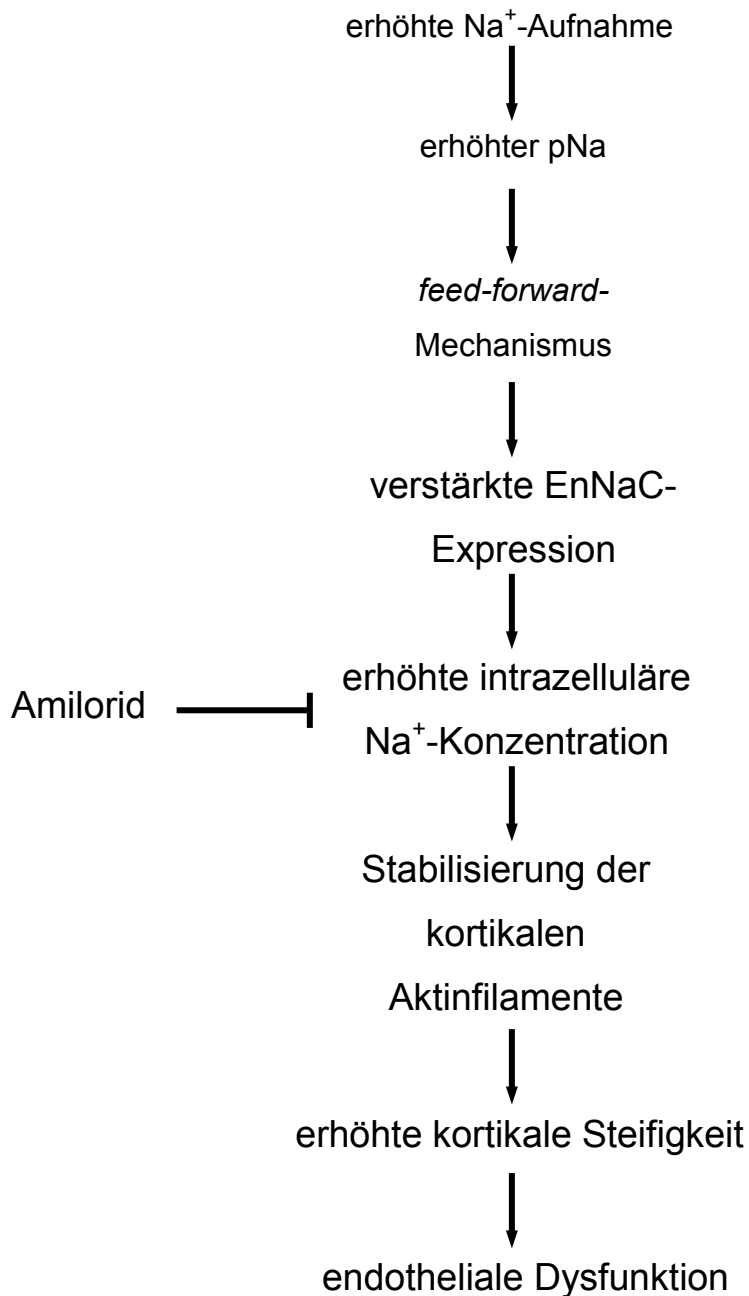


Abbildung 16: Pathophysiologische Relevanz. Die erhöhte  $\text{Na}^+$ -Aufnahme führt zu erhöhten  $\text{Na}^+$ -Plasmaspiegeln. Das  $\text{Na}^+$  wird über den ENaC in die Endothelzellen aufgenommen und stabilisiert dort die kortikalen Aktinfilamente, wodurch die kortikale Steifigkeit der Zelle erhöht wird. Des Weiteren führt der erhöhte  $\text{Na}^+$ -Spiegel zu einer *feed-forward*-Reaktion die mit einer erhöhten Anzahl von ENaC-Molekülen in der PM einhergeht. Dieser Prozess erhöht ebenfalls die kortikale Steifigkeit der Zelle. Durch die Versteifung des Kortex kann die Zelle nicht mehr adäquat verformt werden, die NO-Produktion bleibt verringert und das Gefäß kontrahiert. Dieser Status stellt kardiovaskuläres Risiko dar.

#### 4.5 Ausblick

Die in den Experimenten für diese Arbeit gesammelten Daten bilden einen weiteren Einblick in die EnNaC-Funktion und -regulation. Allerdings sollten in Zukunft weitere Experimente durchgeführt werden um den postulierten Mechanismus zu überprüfen, und das Verständnis für die ablaufenden Prozesse zu vertiefen. Zunächst könnte mittels Fluoreszenzmikroskopie die Veränderung der kortikalen Aktinfilamente nach Blockade des EnNaC betrachtet werden. Dabei würde sich die Durchführung einer Zeitreihe anbieten, um zu überprüfen, ob die Reduktion der kortikalen Steifigkeit mit einer sichtbaren Änderung der Aktinfilamente einhergeht. Des Weiteren könnte, ebenfalls in einer Zeitreihe, betrachtet werden, ab welchem Zeitpunkt nach seiner Blockade der EnNaC aus der PM verschwindet. Dadurch könnte überprüft werden, ob sich zunächst das Aktin-Skelett verändert und daraufhin der EnNaC aus der PM entfernt wird.

Um die Hypothese der Internalisierung zu prüfen, könnte über Inhibierung der Endozytose, die mögliche Internalisierung des EnNaCs gehemmt werden. Die Blockade des Kanals müsste dann zu einer geringer ausgeprägten Reduktion der kortikalen Steifigkeit führen.

Des weiteren könnten Endothelzellen mit siRNA transfiziert werden, welche die Expression von Proteinen des, für den ENaC bekannten, Internalisierungsprozesses (z.B. NEDD4-2 und SGK-1) unterdrücken, um so einen genaueren Einblick in die noch weites gehend unverstandene Regulation des EnNaC zu erhalten.



## 5 Quellenverzeichnis

1. Abriel H, Loffing J, Rebhun JF, Pratt JH, Schild L, Horisberger J-D, Rotin D, Staub O. (1999): Defective regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest* 103: 667–673
2. Adrogué HJ, Madias NE. (2007): Sodium and potassium in the pathogenesis of hypertension. *N Engl J Med* 356: 1966–1978
3. Alvarez de la Rosa D, Canessa CM, Fyfe GK, Zhang P. (2000): Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol* 62: 573–594
4. Barbry P, Frelin C, Vigne P, Cragoe EJ, Lazdunski M. (1986): 3H Phenamil, a radiolabelled diuretic for the analysis of the ENaC. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 135: 25–32
5. Beevers DG. (2002): The epidemiology of salt and hypertension. *Clin Auton Res* 12: 353–357
6. Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R. (2012): *Duale Reihe Physiologie*. 2nd ed. Georg Thieme Verlag
7. Benos DJ. (1982): Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol* 242: C131–45
8. Berra-Romani R, Raqeeb A, Guzman-Silva A, Torres-Jácome J, Tanzi F, Moccia F. (2010): Na<sup>+</sup>–Ca<sup>2+</sup> exchanger contributes to Ca<sup>2+</sup> extrusion in ATP-stimulated endothelium of intact rat aorta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 395: 126–130
9. Bhalla V, Hallows KR. (2008): Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. *J Am Soc Nephrol* 19: 1845–1854
10. Bindslev N, Cuthbert AW, Edwardson JM, Skadhauge E. (1982): Kinetics of amiloride action in the hen coprodaeum in vitro. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 392: 340–346
11. Binnig G, Quate CF, Gerber C. (1986): Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* 56: 930–933
12. Blaustein MP, Lederer WJ. (1999): Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological Reviews* 79: 763–854
13. Boldyreff B, Wehling M. (2003): Non-genomic actions of aldosterone: mechanisms and consequences in kidney cells. *Nephrol Dial Transplant* 18: 1693–1695
14. Boldyreff B, Wehling M. (2004): Aldosterone: refreshing a slow hormone by

- swift action. *News Physiol Sci* 19: 97–100
15. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. (2003): Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 168–175
  16. Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. (2002): ALDOSTERONE. *Advances in Physiology Education* 26: 8–20
  17. Botero-Velez M, Curtis JJ, Warnock DG. (1994): Liddle's Syndrome Revisited - A Disorder of Sodium Reabsorption in the Distal Tubule. *N Engl J Med* 330: 178–181
  18. Brown IJ, Tzoulaki I, Candeias V, Elliott P. (2009): Salt intakes around the world: implications for public health. *Int J Epidemiol* 38: 791–813
  19. Bubb MR, Senderowicz AMJ, Sausville EA, Duncan KKL, Korn ED. (1994): Jasplakinolide, a Cytotoxic Natural Product, Induces Actin Polymerization and Competitively Inhibits the Binding of Phalloidin to F-actin. *Journal of Biological Chemistry* 269: 14896–14871
  20. Bubb MR. (2000): Effects of Jasplakinolide on the Kinetics of Actin Polymerization. *Journal of Biological Chemistry* 275: 5163–5170
  21. BULL MB, LARAGH JH. (1968): Amiloride A Potassium-Sparing Natriuretic Agent. *Circulation* 37: 45–53
  22. Busse R, Mülsch A. (1990): Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett* 265: 133–136
  23. Butterworth MB, Edinger RS, Ovaa H, Burg D, Johnson JP, Frizzell RA. (2007): The deubiquitinating enzyme UCH-L3 regulates the apical membrane recycling of the epithelial sodium channel. *Journal of Biological Chemistry* 282: 37885–37893
  24. Caldwell RA, Boucher RC, Stutts MJ. (2004): Serine protease activation of near-silent epithelial Na<sup>+</sup> channels. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 286: C190–4
  25. Cantiello HF, Stow JL, Prat AG, Ausiello DA. (1991): Actin filaments regulate epithelial Na<sup>+</sup> channel activity. *Am J Physiol* 261: C882–8
  26. Cantiello HF. (1995): Role of the actin cytoskeleton on epithelial Na<sup>+</sup> channel regulation. *Kidney Int* 48: 970–984
  27. Cappella B, Dietler G. (1999): Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surface Science Reports* 34: 1–104
  28. Chraïbi A, Horisberger J-D. (2002): Na self inhibition of human epithelial Na channel: temperature dependence and effect of extracellular proteases. *J Gen Physiol* 120: 133–145
  29. Cleveland DW. (1982): Treadmilling of tubulin and actin. *Cell* 28: 689–691

30. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JAE. (2003): Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1541–1547
31. Cook NR, Cohen J, Hebert PR, Taylor JO, Hennekens CH. (1995): Implications of small reductions in diastolic blood pressure for primary prevention. *Arch Intern Med* 155: 701–709
32. Cook NR, Cutler JA, Obarzanek E, Buring JE, Rexrode KM, Kumanyika SK, Appel LJ, Whelton PK. (2007): Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP). *BMJ* 334: 885–888
33. Coutinho T, Rooke TW, Kullo IJ. (2011): Arterial dysfunction and functional performance in patients with peripheral artery disease: A review. *Vasc Med* 16: 203–211
34. Cuthbert AW, Edwardson JM. (2002): Benzamil Binding to Kidney Cell Membranes. *Biochemical Pharmacology* 30: 1175–1183
35. Diakov A, Korbmacher C. (2004): A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's alpha-subunit. *Journal of Biological Chemistry* 279: 38134–38142
36. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. (1999): Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601–605
37. Donato AJ, Morgan RG, Walker AE, Lesniewski LA. (2015): Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (February 2015). doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.021.
38. Drüppel V, Kusche-Vihrog K, Grossmann C, Gekle M, Kasprzak B, Brand E, Pavenstädt H, Oberleithner H, Kliche K. (2013): Long-term application of the aldosterone antagonist spironolactone prevents stiff endothelial cell syndrome. *FASEB J* 27: 3652–3659
39. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. (1983): Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *PNAS* 80: 3734–3737
40. Edwards DG, Farquhar WB. (2015): Vascular effects of dietary salt. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 24: 8–13
41. Elliott P, Stamler J, Nichols R, Dyer AR, Stamler R, Kesteloot H, Marmot M. (1996): Intersalt revisited: further analyses of 24 hour sodium excretion and blood pressure within and across populations. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ* 312: 1249–1253
42. Fels J, Jeggle P, Liashkovich I, Peters W, Oberleithner H. (2014): Nanomechanics of vascular endothelium. *Cell Tissue Res* 355: 727–737

43. Fels J, Oberleithner H, Kusche-Vihrog K. (2010): Ménage à trois: Aldosterone, sodium and nitric oxide in vascular endothelium. *BBA - Molecular Basis of Disease* 1802: 1193–1202
44. Fischer KG, Jonas N, Poschenrieder F, Cohen C, Kretzler M, Greiber S, Pavenstädt H. (2002): Characterization of a Na(+)-Ca(2+) exchanger in podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 17: 1742–1750
45. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. (1984): Endothelial Cells as Mediators of Vasodilation of Arteries. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 6: S336
46. Glitzer MS, Steelman SL. (1966): N-Amidino-3,5-diamino-6-chloropyrazine-carboxamide : an Active Diuretic in the Carboxamide Series. *Nature* 212: 191–193
47. Golestaneh N, Klein C, Valamanesh F, Suarez G, Agarwal MK, Mirshahi M. (2001): Mineralocorticoid receptor-mediated signaling regulates the ion gated sodium channel in vascular endothelial cells and requires an intact cytoskeleton. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280: 1300–1306
48. Goulet CC, Volk KA, Adams CM, Prince LS, Stokes JB, Snyder PM. (1998): Inhibition of the Epithelial Na<sup>+</sup> Channel by Interaction of Nedd4 with a PY Motif Deleted in Liddle's Syndrome. *Journal of Biological Chemistry* 273: 30012–30017
49. Graefe KH, Lutz W, Bönisch H.(2011): *Pharmakologie und Toxikologie*. 5 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
50. Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Husse B, Gekle M. (2008): EF domains are sufficient for nongenomic mineralocorticoid receptor actions. *Journal of Biological Chemistry* 283: 7109–7116
51. Haseroth K, Gerdes D, Berger S, Feuring M, Günther A, Herbst C, Christ M, Wehling M. (1999): Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266: 257–261
52. He FJ, Li J, MacGregor GA. (2013): Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev* 4: CD004937
53. He FJ, MacGregor GA. (2003): How far should salt intake be reduced? *Hypertension* 42: 1093–1099
54. He FJ, Markandu ND, Sagnella GA, de Wardener HE, MacGregor GA. (2005): Plasma sodium: ignored and underestimated. *Hypertension* 45: 98–102
55. Henderson E. (1994): Imaging of living cells by atomic force microscopy. *Progress in Surface Science* 46: 39–60
56. Higashi Y, Kihara Y, Noma K. (2012): Endothelial dysfunction and hypertension in aging. *Hypertension Research* 35: 1039–1047

57. Hirase T, Node K. (2012): Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 302: H499–H505
58. Ify Mordi NT. (2014): Is reversal of endothelial dysfunction still an attractive target in modern cardiology? *World Journal of Cardiology* 6: 824–835
59. Ilatovskaya DV, Pavlov TS, Levchenko V, Negulyaev YA, Staruschenko A. (2011): Cortical actin binding protein cortactin mediates ENaC activity via Arp2/3 complex. *The FASEB Journal* 25: 2688–2699
60. Iwamoto T, Kita S, Zhang J, Blaustein MP, Arai Y, Yoshida S, Wakimoto K, Komuro I, Katsuragi T. (2004): Salt-sensitive hypertension is triggered by Ca<sup>2+</sup> entry via Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger type-1 in vascular smooth muscle. *Nat Med* 10: 1193–1199
61. Jeggle P, Callies C, Tarjus A, Fassot C, Fels J, Oberleithner H, Jaisser F, Kusche-Vihrog K. (2013): Epithelial Sodium Channel Stiffens the Vascular Endothelium In Vitro and in Liddle Mice. *Hypertension* 61: 1053–1059
62. Keep RF, Si X, Shakui P, Ennis SR, Betz AL. (1999): Effect of amiloride analogs on DOCA-salt-induced hypertension in rats. *Am J Physiol* 276: H2215–20
63. Kleyman TR, Cragoe EJ. (1988): Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Brain Biol* 105: 1–21
64. Kliche K, Jeggle P, Pavenstädt H, Oberleithner H. (2011): Role of cellular mechanics in the function and life span of vascular endothelium. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 462: 209–217
65. Korte S, Strater AS, Druppel V, Oberleithner H, Jeggle P, Grossmann C, Fobker M, Nofer JR, Brand E, Kusche-Vihrog K. (2014): Feedforward activation of endothelial ENaC by high sodium. *The FASEB Journal* 28: 4015–4025
66. Kotchen TA, Cowley AW, Frohlich ED. (2013): Salt in health and disease--a delicate balance. *N Engl J Med* 368: 2531–2532
67. Kuchan MJ, Frangos JA. (1994): Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 266: C628–36
68. Kusche-Vihrog K, Callies C, Fels J, Oberleithner H. (2010): The epithelial sodium channel (ENaC): Mediator of the aldosterone response in the vascular endothelium? *Steroids* 75: 544–549
69. Kusche-Vihrog K, Jeggle P, Oberleithner H. (2013): The role of ENaC in vascular endothelium. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 466: 851–859
70. Kusche-Vihrog K, Schmitz B, Brand E. (2014): Salt controls endothelial and vascular phenotype. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 467: 499–512

71. Kusche-Vihrog K, Sobczak K, Bangel N, Wilhelmi M, Nechyporuk-Zloy V, Schwab A, Schillers H, Oberleithner H. (2007): Aldosterone and amiloride alter ENaC abundance in vascular endothelium. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 455: 849–857
72. Kusche-Vihrog K, Tarjus A, Fels J, Jaisser F. (2014): The epithelial Na<sup>+</sup> channel: a new player in the vasculature. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 23: 143–148
73. Kusche-Vihrog K, Urbanova K, Blanqué A, Wilhelmi M, Schillers H, Kliche K, Pavenstädt H, Brand E, Oberleithner H. (2011): C-reactive protein makes human endothelium stiff and tight. *Hypertension* 57: 231–237
74. Lang F. (2011): Stiff endothelial cell syndrome in vascular inflammation and mineralocorticoid excess. *Hypertension* 57: 146–147
75. Lee E, Shelden EA, Knecht DA. (1998): Formation of F-actin aggregates in cells treated with actin stabilizing drugs. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 39: 122–133
76. Li J, Hou B, Beech DJ. (2015): Endothelial Piezo1: Life depends on it. *Channels* 9: 1–2
77. Li JHY, Cragoe EJ Jr, Lindemann B. (1987): Structure-activity relationship of amiloride analogs as blockers of epithelial Na channels: II. Side-chain modifications. *J Membrin Biol* 95: 171–185
78. Li XJ, Xu RH, Guggino WB, Snyder SH. (1995): Alternatively spliced forms of the alpha subunit of the epithelial sodium channel: distinct sites for amiloride binding and channel pore. *Molecular Pharmacology* 47: 1133–1140
79. Lindemann B. (1996): Taste reception. *Physiological Reviews* 76: 719–766
80. Lösel R, Feuring M, Wehling M. (2002): Non-genomic aldosterone action: from the cell membrane to human physiology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83: 167–171
81. Lösel R, Schultz A, Wehling M. (2004): A quick glance at rapid aldosterone action. *Molecular and Cellular Endocrinology* 217: 137–141
82. Lüllmann-Rauch R. (2012): *Histologie*. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
83. Masaki T. (1989): The Discovery, the Present State, and the Future Prospects of Endothelin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 13: S1
84. Mazzochi C, Benos DJ, Smith PR. (2006): Interaction of epithelial ion channels with the actin-based cytoskeleton. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 291: F1113–F1122
85. Mazzochi C, Bubien JK, Smith PR, Benos DJ. (2006): The carboxyl terminus of the alpha-subunit of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel binds to F-actin. *Journal of Biological Chemistry* 281: 6528–6538

86. Meyer G, Amer NM. (1988): Novel optical approach to atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* 53: 1045–1047
87. Moncada S. (1982): Prostacyclin and arterial wall biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2: 193–207
88. Moore PB, Huxley HE, DeRosier DJ. (1970): Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments. *Journal of Molecular Biology* 50: 279–292
89. MRC Working Party (1992): Medical Research Council trial of treatment of hypertension in older adults: principal results. *BMJ* 304: 405–412
90. Oberleithner H, Riethmüller C, Ludwig T. (2006): Differential action of steroid hormones on human endothelium. *Journal of cell science* 19, 1926-1932
91. Oberleithner H, Riethmüller C, Schillers H, MacGregor GA, de Wardener HE, Hausberg M. (2007): Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *PNAS* 104: 16281–16286
92. Oberleithner H, Schneider SW, Albermann L, Hillebrand U, Ludwig T, Riethmüller C, Shahin V, Schäfer C, Schillers H. (2003): Endothelial Cell Swelling by Aldosterone. *J Membrin Biol* 196: 163–172
93. Oberleithner H. (2012): Two barriers for sodium in vascular endothelium? *Ann Med* 44 Suppl 1: S143–148
94. Oda T, Makino K, Yamashita I, Namba K, Maéda Y. (2001): Distinct structural changes detected by X-ray fiber diffraction in stabilization of F-actin by lowering pH and increasing ionic strength. *BJ* 80: 841–851
95. Oh SW, Baek SH, An JN, Goo HS, Kim S, Na KY, Chae DW, Kim S, Chin HJ. (2013): Small increases in plasma sodium are associated with higher risk of mortality in a healthy population. *J Korean Med Sci* 28: 1034–1040
96. Oh YS, Warnock DG. (2000): Disorders of the epithelial Na(+) channel in Liddle's syndrome and autosomal recessive pseudohypoaldosteronism type 1. *Exp Nephrol* 8: 320–325
97. Olde Engberink RHG, Frenkel WJ, van den Bogaard B, Brewster LM, Vogt L, van den Born B-JH. (2015): Effects of thiazide-type and thiazide-like diuretics on cardiovascular events and mortality: systematic review and meta-analysis. *Hypertension* 65: 1033–1040
98. Paar M, Pavenstadt H, Kusche-Vihrog K, Druppel V, Oberleithner H, Kliche K. (2014): Endothelial Sodium Channels Trigger Endothelial Salt Sensitivity With Aging. *Hypertension* 64: 391–396
99. Palmer BF MD, Alpern RJ MD. (1998): Liddle's Syndrome. *The American Journal of Medicine* 104: 301–309
100. Palmer LG. (1987): Ion selectivity of epithelial Na channels. *J Membrin Biol* 96: 97–106

101. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr., Epstein SE. (1990): Abnormal Endothelium-Dependent Vascular Relaxation in Patients with Essential Hypertension. *N Engl J Med* 323: 22–27
102. Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA. (1999): Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *The EMBO Journal* 18: 3024–3033
103. Patel AB, Yang L, Deng S, Palmer LG. (2014): Feedback inhibition of ENaC: acute and chronic mechanisms. *Channels (Austin)* 8: 444–451
104. Pesen D, Hoh JH. (2005): Micromechanical architecture of the endothelial cell cortex. *BJ* 88: 670–679
105. Pollard TD, Cooper JA. (2009): Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326: 1208–1212
106. Quinn S, Harvey BJ, Thomas W. (2014): Rapid aldosterone actions on epithelial sodium channel trafficking and cell proliferation. *Steroids* 81: 43–48
107. Radmacher M. (1997): Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE* 16: 47–57
108. Rees K, Dyakova M, Ward K, Thorogood M, Brunner E. (2013): Dietary advice for reducing cardiovascular risk. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD002128
109. Remedios Dos CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. (2003): Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological Reviews* 83: 433–473
110. Rossier BC, Baker ME, Studer RA. (2015): Epithelial Sodium Transport and Its Control by Aldosterone: The Story of Our Internal Environment Revisited. *Physiological Reviews* 95: 297–340
111. Rotin D. (2012): Nedd4-2 and the regulation of epithelial sodium transport. *Frontiers in Physiology* 3: 1–7
112. Saboor M, Moinuddin, Ajmal M, Ilyas S. (2014): Functional status of vascular endothelium in diabetes mellitus. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 26: 239–243
113. Salisbury D, Bronas U. (2015): Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Impact on Endothelial Dysfunction. *Nursing Research* 64: 53–66
114. Sanders PW. (2009): Vascular consequences of dietary salt intake. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 297: F237–F243
115. Sasaki S, Yui N, Noda Y. (2014): Actin directly interacts with different membrane channel proteins and influences channel activities: AQP2 as a model. *BBA - Biomembranes* 1838: 514–520
116. Schächinger V, Zeiher AM. (2000): Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction. *Z Kardiol* 89 Suppl 9: IX–70–4



117. Schneider J-C, Kebir El D, Chéreau C, Lanone S, Huang X-L, De Buys Roessingh AS, Mercier J-C, Dall'Ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT. (2003): Involvement of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 284: H2311–H2319
118. Schneider J-C, Kebir El D, Chéreau C, Mercier J-C, Dall'Ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT. (2002): Involvement of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 283: H837–H844
119. Scott VR, Boehme R, Matthews TR. (1988): New class of antifungal agents: jaspilakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32: 1154–1157
120. Seidel DT, Chak von D, Weber HH. (1967): Die absoluten affinitätskonstanten von G-actin und F-actin mit ATP, ITP, CTP, GTP, ADP und IDP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 140: 93–108
121. Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr., Ulick S, Milora RV, Findling JW, Canessa CM, Rossier BC, Lifton RP. (1994): Liddle's syndrome: Heritable human hypertension caused by mutations in the  $\beta$  subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 79: 407–414
122. Spaet TH, Gaynor E, Stemerman MB. (1974): Thrombosis, atherosclerosis, and endothelium. *American Heart Journal* 87: 661–668
123. Spector I, Braet F, Shochet NR, Bubb MR. (1999): New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microscopy Research and Technique* 47: 18–37
124. Stamler J. (1997): The INTERSALT Study: background, methods, findings, and implications. *Am J Clin Nutr* 65: 626S–642S
125. Stan RV, Tse D, Deharvengt SJ, Smits NC, Xu Y, Luciano MR, McGarry CL, Buitendijk M, Nemani KV, Elgueta R, Kobayashi T, Shipman SL, Moodie KL, Daghlian CP, Ernst PA, Lee H-K, Suriawinata AA, Schned AR, Longnecker DS, Fiering SN, Noelle RJ, Gimi B, Shworak NW, Carrière C. (2012): The diaphragms of fenestrated endothelia: gatekeepers of vascular permeability and blood composition. *Dev Cell* 23: 1203–1218
126. Staub O, Abriel H, Plant P, Ishikawa T, Kanelis V, Saleki R, Horisberger JD, Schild L, Rotin D. (2000): Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by Nedd4 and ubiquitination. *Kidney Int* 57: 809–815
127. Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, Breitschopf K, Ciechanover A, Schild L, Rotin D. (1997): Regulation of stability and function of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) by ubiquitination. *The EMBO Journal* 16: 6325–6336
128. Stockand JD. (2002): New ideas about aldosterone signaling in epithelia. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 282: F559–F576

129. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Lerman A. (2000): Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 101: 948–954
130. Thomas W, Harvey BJ. (2011): Mechanisms underlying rapid aldosterone effects in the kidney. *Annu Rev Physiol* 73: 335–357
131. Thomas W, McEneaney V, Harvey BJ. (2008): Aldosterone-induced signalling and cation transport in the distal nephron. *Steroids* 73: 979–984
132. Wang S, Meng F, Mohan S, Champaneri B, Gu Y. (2009): Functional ENaC Channels Expressed in Endothelial Cells: a New Candidate for Mediating Shear Force. *Microcirculation* 16: 276–287
133. Wang X, Takeya K, Aaronson PI, Loutzenhiser K, Loutzenhiser R. (2008): Effects of amiloride, benzamil, and alterations in extracellular Na<sup>+</sup> on the rat afferent arteriole and its myogenic response. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 295: F272–F282
134. Warnock DG, Kusche-Vihrog K, Tarjus A, Sheng S, Oberleithner H, Kleyman TR, Jaisser F. (2013): Blood pressure and amiloride-sensitive sodium channels in vascular and renal cells. *Nature Publishing Group* (January 14, 2014). doi: 10.1038/nrneph.2013.275.
135. Warnock DG. (2013): The amiloride-sensitive endothelial sodium channel and vascular tone. *Hypertension* 61: 952–954
136. Welsch U, Deller T. (2011): *Sobotta Lehrbuch Histologie* 3. Auflage, Elsevier, Urban&FischerVerlag, München/Jena
137. Wiesinger A, Peters W, Chappell D, Kentrup D, Reuter S, Pavenstädt H, Oberleithner H, Kümpers P. (2013): Nanomechanics of the Endothelial Glycocalyx in Experimental Sepsis. *PLoS ONE* 8: e80905
138. Wildling L, Hinterdorfer P, Kusche-Vihrog K, Treffner Y, Oberleithner H. (2009): Aldosterone receptor sites on plasma membrane of human vascular endothelium detected by a mechanical nanosensor. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 458: 223–230

## 6 Abkürzungen

SI-Einheiten und die dezimalen SI-Vorsätze wurden entsprechend der Norm verwendet und sind deshalb hier nicht aufgeführt.

<i>actin-binding-protein</i>	ABP
Adenosindiphosphat	ADP
<i>Atomic Force Microscopy</i>	AFM
Adenosintriphosphat	ATP
<i>baseline</i> -Wert	BW
Calcium Ion	Ca <sup>2+</sup>
zyklisches Guanosinmonophosphat	cGMP
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	DMEM
<i>Dimethylsulfoxid</i>	DMSO
<i>Ethyldiamintetraacetat</i>	EDTA
epithelialer Natrium-Kanal	ENaC
endothelialer Natrium-Kanal	EnNaC
endotheliale NO-Synthase	eNOS
Extrazellulärmatrix	EZM
filamentäres Aktin	F-Aktin
globuläres Aktin	G-Aktin
Guanosintriphosphat	GTP
<i>heat-shock-protein</i>	HSP
<i>human umbilical vein endothelial cells</i>	HUVEC
Jasplakinolide	JAS
Kalium Ion	K <sup>+</sup>
leichte Kette des Myosins	MLC

Myosin-leichte-Ketten-Kinase	MLCK
Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase	MLCP
Mineralkortikoidrezeptor	MR
<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure	mRNA
Natrium Ion	Na <sup>+</sup>
Kochsalz	NaCl
<i>neural precursor cells expressed developmentally down-regulated 4-2</i>	NEDD4-2
Stickstoffmonoxid	NO
<i>Phosphate Buffered Saline</i>	PBS
Proteinkinase G	PKG
Plasmamembran	PM
<i>Plasmanatrium Konzentration</i>	pNA
<i>Position Sensitive Detector</i>	PSI
Prolin-reiche Regionen	PY
<i>stiff endothelial cell syndrome</i>	SECS
<i>Standard Error of the Mean</i>	SEM
lösliche Guanylatzyklase	sGC
<i>serum-/glucocorticoid-regulated kinase 1</i>	SGK1
glatte Muskelzellen	SMC
Untereinheit	UE

## 7 Chemikalien

Amilorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampuwa Spüllösung	Fesenius Kabi AG, Bad Homburg
Benzamil-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Hohenbrunn
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Honeywell Burdick & Jackson ®, Seelze
Fetales Kälberserum Standard	PAA, USA
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
GsMTx-4	Peptides Institute INC, Japan
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Jasplakinolide	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Hohenbrunn
Kalziumchlorid	Merck, Hohenbrunn
Magnesiumchlorid-6-hydrat	Merck, Hohenbrunn
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Hohenbrunn
Penicillin G/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Phosphate Buffered Saline	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/EDTA	Biochrom AG, Berlin

## 8 Arbeitsmaterialien und Geräte

### 8.1 Arbeitsmaterialien

Deckgläser, Ø 15 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Einmalspritze BD Discardit	Becton Dickinson, USA
Millex sterile Filter	Merck Millipore, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Flaschensterilfilter, 500 ml	Corning Incorporated, USA
Zellkulturflasche Falcon T25	Becton Dickinson, USA
Zellkulturschale Falcon Easy Grip, Ø 35 mm	Becton Dickinson, USA
Zentrifugenröhrchen Falcon, 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson, USA

### 8.2 Geräte

Autoklav VX-12	Systec, Wettendorf
Brutschränke B6030	Heraeus Instruments, Düsseldorf
CB 150	Binder, Tuttlingen
HERA cell	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Gefrierschränke Economic-Super	Bosch, Gerlingen
GES 36420	Bosch, Gerlingen
Heißluftsterilisator SUT 6060	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Kamera XC-555P	Sony, Japan
Kühlschrank Economic Cooler	Bosch, Gerlingen
Magnetrührer mit Heizplatte VMS-A	VWR, USA
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskopheizung diTAC	Veeco, USA



## 9 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ZUSAMMENSETZUNG DES ZELLKULTURMEDIUMS .....	13
TABELLE 2: ZUSAMMENSETZUNG DES HEPES-PUFFERS .....	17



## 10 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: STRUKTUR DES ENAC DARGESTELLT ALS HETEROTRIMER.....	8
ABBILDUNG 2: <i>CANTILEVER</i> MIT KUGELSPITZE.....	15
ABBILDUNG 3: FUNKTIONSPRINZIP DES AFM .....	15
ABBILDUNG 4: KRAFTKURVE.....	16
ABBILDUNG 5: MESSPROTOKOLL AMILORID- UND BENZAMIL-ZEITREIHE.....	19
ABBILDUNG 6: MESSPROTOKOLL AKTIN-EXPERIMENTE .....	20
ABBILDUNG 7: ZEITVERLAUF AMILORID UND KONTROLLE.....	23
ABBILDUNG 8: AMILORID-ZEITREIHE, RELATIVE STEIFIGKEITEN GESAMT .....	24
ABBILDUNG 9: BENZAMIL-ZEITREIHE, ZEITVERLAUF BENZAMIL UND KONTROLLE .....	25
ABBILDUNG 10: BENZAMIL-ZEITREIHE, RELATIVE STEIFIGKEITEN GESAMT.....	26
ABBILDUNG 11: KONTROLLEXPERIMENT 1 .....	28
ABBILDUNG 12: AKTIN-EXPERIMENT 2, JAS + HEPES.....	30
ABBILDUNG 13: AKTIN-EXPERIMENT 3, 0,5 $\mu$ M JAS + AMILORID .....	31
ABBILDUNG 14: AKTIN-EXPERIMENT 4, 1,0 $\mu$ M JAS + AMILORID .....	32
ABBILDUNG 15: ZUSAMMENFASSUNG DER AKTIN-EXPERIMENTE .....	34
ABBILDUNG 16: PATHOPHYSIOLOGISCHE RELEVANZ .....	42

## 11 Lebenslauf



## 12 Danksagung

Ich danke meiner Doktormutter, Frau PD Kristina Kusche-Vihrog, für das Überlassen des Themas, die freundschaftliche Betreuung, die stets geöffnete Tür, ihre Offenheit für Vorschläge und Kritik und ihr Vertrauen in uns Doktoranden.

Ich danke dem gesamten Team der Physiologie II für ein Semester, an das ich mit Freude oft zurückdenke. Jeder, der mit euch zusammenarbeitet, darf sich überaus glücklich schätzen! Ich danke Herrn Prof. Hans Oberleithner dafür, dass er in mir die Begeisterung für die Physiologie geweckt hat. Ich danke Marianne Wilhelmi, Barbara Windoffer und Sergej Handel für ihre Geduld und Anleitung bei Arbeiten mit den Zellkulturen. Ich danke Martina Maase, Verena Hofschroer und Benedikt Fels für ihre vielseitige Unterstützung bei dieser Arbeit.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Herrn Prof. Giuliano Ciarimboli.

Ich danke der Deutschen Physiologischen Gesellschaft die mir die Präsentation meiner Ergebnissen auf ihrem Kongress ermöglichte.

Ich danke dem Medizinerkolleg der Medizinischen Fakultät für die exzellente Betreuung und die finanzielle Unterstützung.

Ich danke meiner Familie dafür, dass sie mich immer unterstützt hat. Ich danke meiner Freundin, die immer für mich da ist und auf deren Rückhalt ich mich jederzeit verlassen kann. Ich danke meinen Freunden. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.