

Aus der  
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin IV  
(Schwerpunkt: Diabetologie, Endokrinologie und  
Nephrologie)  
Sektion Nieren- und Hochdruckerkrankungen

**Untersuchung der Relevanz von Prostin für die  
Regulation des Natrium- und Wasserhaushalts in vivo**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Essigke, Daniel Raphael**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber

3. Berichterstatter: Professor Dr. C. Wagner

Tag der Disputation: 20.10.2022

*Meiner Familie*

# Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Der epitheliale Natriumkanal .....	1
1.1.1	Vorkommen .....	1
1.1.2	Aufbau .....	1
1.2	Regulationsmechanismen des ENaC.....	3
1.2.1	Regulation durch Veränderungen der Transkription und Translation .....	5
1.2.2	Regulation der Membranabundanz und Insertion .....	6
1.2.3	Regulation der Offenwahrscheinlichkeit des ENaC .....	7
1.2.4	Proteolytische Aktivierung des ENaC .....	8
1.3	Prostasin .....	11
1.3.1	Vorkommen .....	11
1.3.2	Aktivierung.....	12
1.3.3	Funktionen.....	13
1.3.4	Prostasin und ENaC .....	13
1.4	Das nephrotische Syndrom.....	14
1.4.1	Ursachen .....	14
1.4.2	Ödementstehung.....	15
1.5	Ziel der Arbeit.....	21
2	Material und Methoden .....	22
2.1	Material .....	22
2.2	Methoden .....	28
2.2.1	Das Mausmodell.....	28
2.2.2	Studiendesign.....	30
2.2.3	Auswertung von Blut und Urinproben .....	36

2.2.4	ELISA und EIA zur Bestimmung der Aldosteron-, Cystatin C- und Prostatinkonzentration.....	40
2.2.5	Gewebeanalysen.....	46
2.2.6	Statistische Auswertung.....	49
3	Ergebnisse.....	50
3.1	Prostasinexpression.....	50
3.2	Natriumkonservierung unter salzarmen Diäten.....	51
3.2.1	Proteolytische Prozessierung des $\gamma$ -ENaC unter natriumarmer Diät.....	56
3.3	Diuretika.....	57
3.3.1	Behandlung mit Furosemid und HCT.....	58
3.3.2	Behandlung mit Triamteren.....	62
3.3.3	Proteolytische Prozessierung des $\gamma$ -ENaC nach Triamterenbehandlung.....	67
3.3.4	Renale Expression von $\gamma$ -ENaC unter Triamterenbehandlung.....	68
3.3.5	Renale Expression von $\alpha$ - und $\beta$ -ENaC unter Triamterenbehandlung.....	69
3.3.6	Tubuläre Morphologie nach Triamterenbehandlung.....	70
3.4	Doxorubicin induziertes nephrotisches Syndrom.....	71
3.4.1	Futter und Trinken.....	71
3.4.2	Proteinurie.....	72
3.4.3	Natriuresis.....	73
3.4.4	Gewichtsverlauf.....	74
3.4.5	Plasmaparameter.....	75
3.4.6	Triamtereninjektion im nephrotischen Syndrom.....	77
3.4.7	Prostasinexkretion im Urin beim nephrotischem Syndrom.....	78

3.4.8	Proteolytische Prozessierung des $\gamma$ -ENaC beim experimentellen nephrotischen Syndrom.....	79
4	Diskussion .....	80
4.1	Ergebnisse unter Nidrigsalzdiät.....	80
4.2	Auswirkung der Behandlung mit Diuretika.....	81
4.3	Auswirkung der untersuchten Proctasin-Mutationen im Vergleich .....	83
4.4	Bedeutung von Proctasin beim experimentellen nephrotischen Syndrom .....	85
4.5	Rolle von Proctasin bei der Ödementstehung.....	86
4.6	Ausblick.....	88
5	Zusammenfassung .....	89
6	Literaturverzeichnis.....	90
7	Erklärung zum Eigenanteil .....	100
8	Veröffentlichungen.....	101

## Abbildungen

Abbildung 1-1	Der epitheliale Natriumkanal in der Zellmembran der Hauptzelle 2	
Abbildung 1-2	Übersicht verschiedener Signalwege der Regulation des ENaC. 4	
Abbildung 1-3	Expression und Abbau des ENaC .....	7
Abbildung 1-4	Mögliche Schnittstellen verschiedener Proteasen an der $\gamma$ -Untereinheit.....	9
Abbildung 1-5	Schematische Darstellung der Aktivierungskaskade von Proctasin .....	12
Abbildung 1-6	Integrativer Ansatz zur Erklärung der Ödementstehung.....	17
Abbildung 1-7	Modell der proteolytischen Aktivierung des ENaC beim NS.....	19
Abbildung 2-1	Phänotypische Unterschiede der Behaarung bei den verwendeten Mäuselinien .....	30
Abbildung 2-2	Score Sheet .....	31
Abbildung 2-3	Metabolischer Käfig und Schema des Ablaufs der Versuche ....	32

Abbildung 2-4 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.....	35
Abbildung 2-5 Schema der Funktion von Sandwich ELISA und kompetitivem ELISA .....	41
Abbildung 2-6 Standardkurven für den „Sandwich“-ELISA und den kompetitiven ELISA .....	42
Abbildung 3-1 Renale Prostatinexpression und -exkretion in den Urin (publiziert in [174]) .....	50
Abbildung 3-2 Gewichtsveränderung unter Diäten (publiziert in [174]).....	51
Abbildung 3-3 Einfuhr und Ausscheidungsparameter bei den Diäten (publiziert in [174]) .....	52
Abbildung 3-4 Plasma Kontroll- und Endwerte nach Diät (publiziert in [174]) ..	54
Abbildung 3-5 Natriumausscheidung im Stuhl (publiziert in [174]) .....	55
Abbildung 3-6 Western Blot der $\gamma$ -Untereinheit nach LS-Diät (publiziert in [175]) .....	56
Abbildung 3-7 Dosis der Diuretika (publiziert in [174]).....	57
Abbildung 3-8 Gewichtsveränderung in Prozent unter Diuretika Behandlung (publiziert in [174]).....	58
Abbildung 3-9 Einfuhr- und Ausscheidungsparameter unter Diuretika Behandlung (publiziert in [174]).....	59
Abbildung 3-10 Plasma Kontroll- und Endwerte nach Diuretika Behandlung (publiziert in [174]).....	61
Abbildung 3-11 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ Ratio nach Triamterenbolusgabe (publiziert in [174]) ..	62
Abbildung 3-12 Gewichtsveränderung unter Triamterenbehandlung (publiziert in [174]) .....	63
Abbildung 3-13 Fress- und Trinkmenge, so wie Urinausscheidung und Natrium/Kalium Ratio unter der Triamterenbehandlung (publiziert in [174]).....	64
Abbildung 3-14 Prostatinexpression unter der Triamterenbehandlung.....	66
Abbildung 3-15 Western Blot der $\gamma$ -Untereinheit nach Triamterengabe (publiziert in [174]) .....	67
Abbildung 3-16 Immunhistochemische Färbung auf $\gamma\text{ENaC}$ nach Triamterenbehandlung (publiziert in [174]).....	68

Abbildung 3-17 Immunhistochemische Färbung von Nieren auf die $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit des ENaC mit und ohne Triamterengabe (publiziert in [170]) .....	69
Abbildung 3-18 Tubulus Morphologie nach Triamterenbehandlung (publiziert in [174] ) .....	70
Abbildung 3-19 Verlauf der Futter und Trinkmenge (publiziert in [175]) .....	71
Abbildung 3-20 Verlauf Proteinurie (publiziert in [175]) .....	72
Abbildung 3-21 Verlauf der Natriumausscheidung im Urin (publiziert in [175])	73
Abbildung 3-22 Gewichtsveränderung nach Induktion (publiziert in [175]) .....	74
Abbildung 3-23 Aszitesentwicklung bei nephrotischen Mäusen .....	75
Abbildung 3-24 Harnstoff an Tag 10 (publiziert in [175]) .....	75
Abbildung 3-25 Lipidämie des Plasmas bei nephrotischen Mäusen.....	76
Abbildung 3-26 Natriumausscheidung und Anstieg der Natriurese nach Triamterenbolus (publiziert in [175]) .....	77
Abbildung 3-27 Prostinsekretion im Urin (publiziert in [175]) .....	78
Abbildung 3-28 Western Blot der $\gamma$ -Untereinheit gesunder und nephrotischer Mäuse (publiziert in [175]) .....	79
Abbildung 4-1 Schema der Gerüstfunktion publiziert in [174].....	84

## Tabellen

Tabelle 2-1 Verbrauchsmaterial .....	22
Tabelle 2-2 In der Tierhaltung verwendete Materialien .....	24
Tabelle 2-3 Geräte .....	24
Tabelle 2-4 Programme.....	26
Tabelle 2-5 Medikamente und Substanzen aus dem Tierversuch.....	26
Tabelle 2-6 Kits und Reagenzien .....	26
Tabelle 2-7 Antikörper und Western Blot.....	27
Tabelle 4-1 Blutwerte nach Triamterenbehandlung (publiziert in [174]) .....	65
Tabelle 4-2 Blutwerte nach Induktion des nephrotischen Syndroms (publiziert in [175]) .....	76



## Abkürzungen

..<..	kleiner als
..>..	größer als
Δ	Delta
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bzw.	Beziehungsweise
c [...]	Konzentration von [...]
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAP	channel activating protease
krea	Kreatinin
DF	Verdünnungsfaktor
DNA / DNS	Desoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
Doxo	Doxorubicin
E	Extinktion
EIA	Enzymgekoppelter Immun Assay
ELISA	enzyme-linked immunoabsorbent assay
ENaC	Epithelialer Natrium Kanal
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
Furo	Furosemid
g	Gramm
h	Stunden
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonat
HP	Hochkalium
HRP	Horseradish Peroxidase/ Meerrettichperoxidase
i.p.	intraperitoneal
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht

ki	Knock-in
ko	Knock-out
l	Liter
LS	Niedrigsalz
M	Molar (mmol/l)
m-	Milli- ( $10^{-3}$ )
$\mu$ -	Mikro- ( $10^{-6}$ )
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
min	Minute(n)
mod.	Modifiziert
n	Anzahl
n-	Nano- ( $10^{-9}$ )
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NCC	Natriumchloridkotransporter
NKCC	Natrium Kalium Chlorid Cotransporter
NS	Nephrotisches Syndrom
p-	Piko- ( $10^{-12}$ )
PBS	Phosphat buffered saline
PCSK9	Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9/ proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PFA	Paraformaldehyd
pKlk	Plasmakallikrein (murines Protein)
Plg	Plasminogen (murines Protein)
PRSS8	Prostasin (humanes Protein)
Prss8	Prostasin (murines Protein)
<i>PRSS8</i>	Prostasin (humanes Gen)
<i>Prss8</i>	Prostasin (murines Gen)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rcf	relative centrifugal force / relative Fliehkraft
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium Channel
rpm	Rounds per minute
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
SGK1	Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1/ Serin/Threonin Kinase 1

t	Time (Zeit)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TMB	Tetramethylbenzidin
TMPRSS	Transmembran protease serine
t-PA	Tissue-type plasminogen activator/ gewebespezifischer Plasminogenaktivator
Triam	Triamteren
uPA	Urokinase (murines Protein)
vs.	versus
wt	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Der epitheliale Natriumkanal

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) ist ein Ionenkanal aus der ENaC-Degenerin Kanalfamilie [1], der in verschiedenen Epithelien auf der luminalen Seite exprimiert wird und hochselektiv für Natrium ist [2]. In der Niere findet sich der ENaC in den Hauptzellen des distalen Tubulus und ermöglicht als konstitutiv aktiver Kanal, dass Natriumionen die apikale Zellmembran überwinden und so aus dem Harn rückresorbiert werden [3, 4]. Aufgrund seiner Expression im distalen Nephron bestimmt der ENaC die finale Natriumexkretion und beeinflusst daher den Natriumgehalt der extrazellulären Flüssigkeit entscheidend, was zur Blutdruckregulation beiträgt [5].

### 1.1.1 Vorkommen

Der epitheliale Natriumkanal spielt in verschiedenen Geweben eine relevante Rolle. Er kommt unter anderem in der Haut [6], in der Lunge, in Speicheldrüsen und im Colon auf der apikalen Membran der Epithelzellen vor [7, 8]. Auf der Zunge ist er für die Wahrnehmung des Salzgeschmacks verantwortlich [9]. In der Niere kommt der ENaC im spät-distalen Tubulus und Sammelrohr vor [10], einem Bereich, der sich im sogenannten Aldosteron empfindlichen distalen Nephron („aldosterone-sensitiv distal nephron“ (ASDN)) befindet [11].

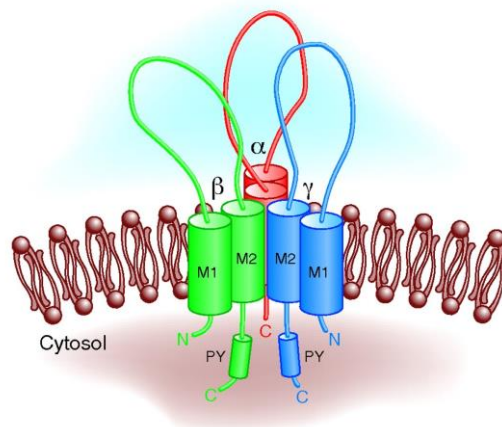
### 1.1.2 Aufbau

Der ENaC ist ein transmembraner Kanal, der sich aus drei homologen Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  zusammensetzt [4, 12, 13], die von den drei Genen SCNN1A, SCNN1B und SCNN1G kodiert werden. In einigen Geweben ist die  $\alpha$ -Untereinheit durch eine  $\delta$ -Untereinheit (SCNN1D) ersetzt [14]. In der Niere wird der  $\delta$ -ENaC allerdings nicht angetroffen [15, 16].

Die Kombination aller drei Untereinheiten sorgt dafür, dass sich der ENaC als ein heterotrimerer Kanal bildet [17, 18]. Jede Untereinheit besteht aus zwei Transmembrandomänen (TM1 und TM2) und bildet extrazellulär eine große Schleife. Sowohl der N- als auch C-Terminus liegen bei den Untereinheiten innerhalb der Zellmembran [1, 19]. N-terminale Domänen sind an der Regulation

der intrazellulären Kanalöffnung beteiligt, während C-terminal Abschnitte zur Interaktion mit regulatorischen Proteinen vorhanden sind [20]. Die extrazellulären Schleifen haben eine essenzielle Rolle für die Funktion des ENaC. Dabei ist noch unklar, wie sie in den Natriumeinstrom oder die Selektivität eingreifen [21]. Eine mögliche Erklärung könnte hierbei jedoch die Porengröße bieten, die nur Natrium oder kleinere Ionen passieren lässt [22]. Die transmembrane Pore des ENaC wird durch eine pseudosymmetrische Anlagerung von  $\alpha$ -Helices gebildet [18, 23, 24]. Eine der beiden Transmembrandomänen jeder der drei Untereinheiten des ENaC ist hieran beteiligt [25].

Jede dieser Untereinheiten ist für die Funktion des ENaC essenziell. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, bei denen die für die Aminosäuresequenzen der einzelnen Untereinheiten codierenden Gene verändert waren, kurz nach Geburt eine respiratorische Insuffizienz oder ein Nierenversagen entwickelten und innerhalb von etwa 50 Stunden verstarben [26]. Ein Defekt der  $\alpha$ -Untereinheit geht dabei vor allem mit einer neonatalen respiratorischen Insuffizienz einher, während bei Veränderungen der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten vor allem die Entwicklung einer letalen Hyperkaliämie im Vordergrund steht [26-29]. Auch postnatal zeigte sich ein letaler Effekt in induzierbaren knock-out Modellen der Untereinheiten [30, 31].



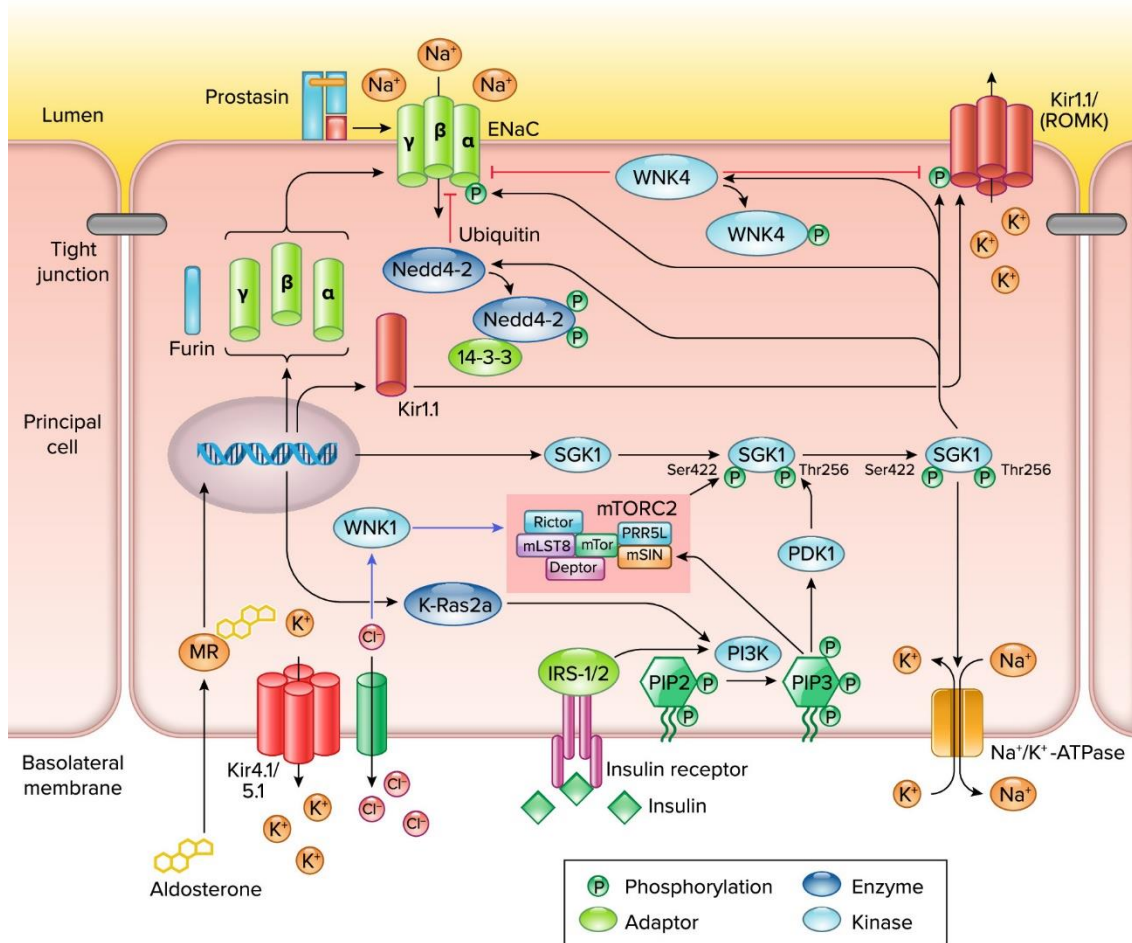
**Abbildung 1-1 Der epitheliale Natriumkanal in der Zellmembran der Hauptzelle**

Dargestellt ist der epitheliale Natriumkanal mit seinen drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Es ist zu erkennen, dass es sich beim ENaC um einen Transmembrankanal handelt und jede Untereinheit extrazellulär eine Schleife bildet, welche die Transmembrandomänen M1 und M2 miteinander verbindet. Aus [25].

## **1.2 Regulationsmechanismen des ENaC**

Der ENaC wird als finale Stellschraube der Urin-Natriumausscheidung von verschiedenen Regulationsmechanismen kontrolliert, die dafür sorgen, dass zwischen 0% und 100% des Natriums aus dem Harn rückresorbiert werden kann [32]. Ein wichtiger Regulator ist hierbei das Mineralokortikoidhormon Aldosteron [33]. Dieses ist Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) und wird in der Nebennierenrinde gebildet [34]. Die Synthese von Aldosteron über Angiotensin II wird vor allem durch Hypovolämie und Hyperkaliämie angeregt, während eine Hybernatriämie einen gegenteiligen Effekt hat [10].

Man kann mehrere Mechanismen voneinander unterscheiden, welche Einfluss auf die Funktion und Aktivität des ENaC haben. So kann bereits in die Proteinbiosynthese eingegriffen werden, oder im weiteren Verlauf in die Expression auf der Zelloberfläche, in den Abbau der Kanäle und in die Offenwahrscheinlichkeit [32, 35, 36].



**Abbildung 1-2 Übersicht verschiedener Signalwege der Regulation des ENaC**

Dieses Schaubild verdeutlicht einen Teil der komplexen Mechanismen und Signalwege, die einen regulatorischen Einfluss auf den ENaC in der Hauptzelle ausüben. So werden verschiedene Möglichkeiten gezeigt, die über die Biosynthese des Kanals, die Expression in der apikalen Zellmembran, die Offenwahrscheinlichkeit und die proteolytische Aktivierung Einfluss nehmen können und die Aktivität des Kanals darüber regulieren. Auch veranschaulicht es, dass eine enge Verknüpfung zwischen dem ENaC und dem renal outer medullary potassium channel (ROMK) besteht, der Einfluss auf die Reabsorption von Kalium nimmt. Insbesondere ist die Stellung von Prostin in örtlicher Nähe zum ENaC gezeigt.

MR (Mineralokortikoidrezeptor), IRS1/2 (insulin receptor substrate), mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2), PI3K (phosphoinositide-3 kinase), PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate), PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate), P (Phosphat), WNK (sensitive with-no-lysine kinase 1 and 4), SGK1 (serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1) Rictor (rapamycin insensitive companion of mTOR), Nedd (neural precursor dell expressed developmentally down regulated protein), Deptor (domain-containing mTOR-interacting protein), mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8) mSIN1 (mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein), PRR5L (proline rich protein 5 like), Kir (einwärts gleichrichtender Kaliumkanal). Aus [37, 38].

### 1.2.1 Regulation durch Veränderungen der Transkription und Translation

Ein Eingriff in die Proteinbiosynthese ermöglicht es, die ENaC-Expression über einen längeren Zeitraum zu modulieren. Dies ist vor allem relevant, wenn die Rahmenbedingungen sich längerfristig ändern, so dass eine Anpassung der Expression und Aktivität des ENaC über eine längere Zeitspanne erforderlich ist. Hierbei bestehen Unterschiede zwischen den verschiedenen ENaC-exprimierenden Organen. So unterscheidet sich der Einfluss des regulierenden Hormons Aldosteron in der Niere vom Effekt den Aldosteron beispielsweise auf die Transkription des ENaC im Colon hat [39].

Aldosteron stimuliert in der Niere die Transkription des Gens der  $\alpha$ -Untereinheit, während die Transkription der Gene der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten weniger bis gar nicht beeinflusst wird [40]. Aufgrund der heterotrimeren Struktur des ENaC ist es für die Funktion und Anzahl der Kanäle erforderlich, dass alle Untereinheiten in gleichem Maß exprimiert werden. Dies wird dadurch erreicht, dass die  $\alpha$ -Untereinheit physiologischer Weise ohne die Einwirkung von Aldosteron seltener transkribiert wird [39, 41, 42]. Nach Bindung von Aldosteron an den Mineralokortikoidrezeptor interagiert dieser aktivierte Komplex direkt mit einem hormonresponsiven Element in der 5'-Region des Gens, das für die  $\alpha$ -Untereinheit kodiert und stimuliert dessen Transkription [43]. Daneben kann die Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1 (SGK1), die ebenfalls durch Aldosteron aktiviert wird, durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Af9 zusätzlich die Transkription der  $\alpha$ -Untereinheit steigern [44]. Auch post-transkriptionell wirkt Aldosteron stimulierend auf die Translation, dabei scheint es weniger Spezifität für die  $\alpha$ -Untereinheit zu geben [45].

Ein weiteres Hormon mit Einfluss auf die ENaC-Transkription und Translation ist das antidiuretische Hormon (ADH), auch Vasopressin genannt [45, 46]. Dieses hypothalamische Peptidhormon wird bei Hypovolämie ausgeschüttet und wirkt primär über den gesteigerten Einbau von Aquaporinen in das Sammelrohr, wodurch es zur vermehrten Reabsorption von Wasser kommt [10]. Vasopressin



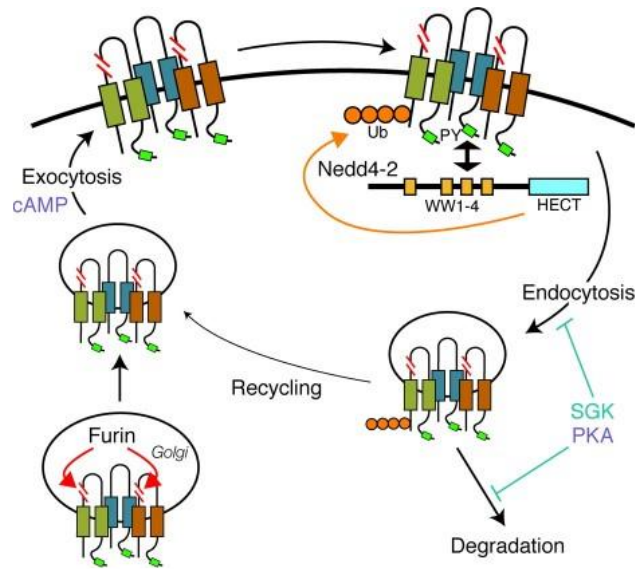
sorgt, im Gegensatz zu Aldosteron experimentell vor allem für einen deutlichen Anstieg der Synthese der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten [47-49].

Ein Hormon, das die Transkription der  $\alpha$ -Untereinheit und damit die Expression des gesamten ENaC herunter reguliert, ist der Wachstumsfaktor Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) [50]. Sein Einfluss wird vor allem mit pathologischen Veränderungen in Zusammenhang gebracht, wie sie bei der diabetischen Nephropathie vorkommen [51]. Es ist Gegenstand von Diskussionen, ob TGF- $\beta$  auch Einfluss auf die Offenwahrscheinlichkeit des ENaC hat [52].

### **1.2.2 Regulation der Membranabundanz und Insertion**

Eine weitere Möglichkeit die Natriumresorption durch den ENaC zu beeinflussen, ist die Regulation der Abundanz des ENaC in der Plasmamembran. Zum einen kann der Einbau des ENaC in die apikale Zellmembran (Exozytose) gefördert werden, wobei die genauen Mechanismen noch unbekannt sind. Es gibt Hinweise darauf, dass Aldosteron auch in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt und dafür sorgt, dass der ENaC an die Zelloberfläche gelangt und in die Membran eingebaut wird [53-55]. Daneben bewirkt Vasopressin über V2-Rezeptoren, über einen cAMP Signalweg, eine Steigerung der ENaC-Membraninsertion [56].

Unter physiologischen Bedingungen hat der ENaC eine kurze Halbwertszeit von unter einer Stunde in der apikalen Zellmembran [57-60], bevor er durch Endozytose wieder in die Zelle aufgenommen wird und die Untereinheiten entweder abgebaut oder recycelt werden. Der Stellenwert der Endozytose für die Membranabundanz von ENaC ist etabliert und besser erforscht. Dabei wird die Endozytose durch Ubiquitylierung der Untereinheiten durch die Ubiquitinligase Nedd4-2 eingeleitet [61-63], die am C-terminalen Ende an die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten bindet und die  $\alpha$ - und die  $\gamma$ -Untereinheiten an ihren N-terminalen Lysin-Enden ubiquityliert [39, 61].



**Abbildung 1-3 Expression und Abbau des ENaC**

Dieses Schaubild stellt vereinfacht die komplexen Schritte des Einbaus des ENaC in die Zellmembran, die nachfolgende Ubiquitinylierung und den Abbau respektive das Recycling dar. HECT-Domäne (Zur E6-AP Carboxylterminus homologe Domäne (homologous to the E6-AP carboxyl terminus)), cAMP (cyclisches Adenosin Monophosphat), PKA (Proteinkinase A), SGK (Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase). Aus [39]

Aldosteron kann über die Aktivierung SGK1 den Abbau des ENaC reduzieren. SGK1 phosphoryliert Nedd4-2, dadurch können andere Proteine, zum Beispiel Protein 14-3-3, an Nedd4-2 binden [64-66], so dass die Interaktion von Nedd4-2 mit dem ENaC gehemmt wird und die Ubiquitinylierung des ENaC reduziert wird. Des Weiteren kann Vasopressin über den cAMP-Signalweg zur Inaktivierung von Nedd4-2 führen. Nedd4-2 wird hierbei jedoch nicht durch SGK1, sondern durch die Proteinkinase A phosphoryliert [67, 68].

### 1.2.3 Regulation der Offenwahrscheinlichkeit des ENaC

Die Offenwahrscheinlichkeit des ENaC fluktuiert, und kann zwischen geschlossenen und vollständig offen, verschiedene graduelle Öffnungszustände annehmen. Hierbei können zahlreiche Faktoren Einfluss nehmen. So können sowohl die intra- als auch extrazelluläre Natriumkonzentration [35, 69], wie auch die Hormone Aldosteron über eine Aktivierung der SGK1 [70] und ADH über eine Aktivierung der Proteinkinase A [71] die Offenwahrscheinlichkeit beeinflussen.

Durch seine Lage auf der luminalen Zelloberfläche ist der ENaC einer sich stetig verändernden intratubulären Flüssigkeitsbewegung und damit einhergehend,

variablen Scherkräften ausgesetzt. Durch die laminaren Scherbewegungen kommt es auch mechanisch zu einer Veränderung der Offenwahrscheinlichkeit des ENaC [72, 73].

Eine Besonderheit der Regulation der Offenwahrscheinlichkeit des ENaC stellt die Möglichkeit der proteolytischen Aktivierung sowohl intra- als auch extrazellulär dar [35, 74-77].

## **1.2.4 Proteolytische Aktivierung des ENaC**

### **1.2.4.1 Intrazellulär**

In der Aminosäurekette der  $\alpha$ -Untereinheit und in der Aminosäurekette der  $\gamma$ -Untereinheit kommen im Gegensatz zur  $\beta$ -Untereinheit inhibitorische Sequenzen vor, die die Aktivität des ENaC reduzieren und damit eine Regulation über Proteasen ermöglichen [74, 78-81].

Furin ist eine Proproteinkonvertase, die den ENaC posttranslational modifiziert und aktiviert [76]. Furin kommt unter anderem im trans-Golgi vor und hydrolysiert die  $\alpha$ -Untereinheit des ENaC enzymatisch an zwei Stellen, im proximalen Bereich der späteren extrazellulären Domäne (an den Aminosäuren Arg 205 und Arg 231). Dadurch wird der inhibitorische Teil der Aminosäurekette herausgeschnitten und der ENaC teilweise aktiviert [76, 82]. Wird die  $\alpha$ -Untereinheit nur an einer Stelle durch Furin gespalten, zeigt sich, dass der ENaC nur stark verringert aktiv ist. Wenn die Untereinheit gar nicht gespalten wird, fluktuiert die Kanalaktivität stark, da der nicht vollständig entfernte 26 Aminosäuren umfassende inhibitorische Anteil der Aminosäurekette die aktive Form des ENaC destabilisiert [82].

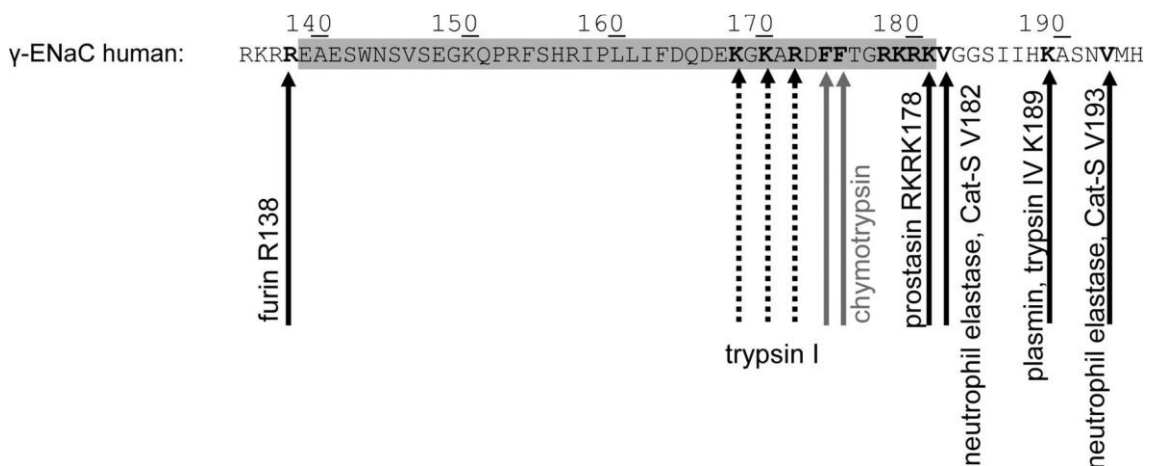
Die  $\gamma$ -Untereinheit wird zunächst an der Aminosäure Arg 143 von Furin gespalten, wodurch eine mittlere Aktivität erreicht wird [76]. Zur vollständigen Kanalaktivierung ist zusätzlich eine weitere Spaltung an einer distal gelegenen Stelle der Aminosäurekette notwendig, die erst extrazellulär erfolgt [79].

Einfluss auf die Prozessierung der Untereinheiten hat auch die intrazelluläre Natriumkonzentration. So konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg über eine Veränderung der N-Glykosylierung an den Untereinheiten dazu führen kann,

dass diese nicht mehr von Proteasen prozessiert und somit aktiviert werden. Dies verhindert, dass mehr Natrium resorbiert wird, als die Zelle tolerieren kann [83].

### 1.2.4.2 Die extrazelluläre proteolytische Aktivierung

Um die maximale Aktivierung entsprechend der maximalen Offenwahrscheinlichkeit zu erreichen, muss die  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC nach der ersten intrazellulären Spaltung durch Furin extrazellulär ein zweites Mal enzymatisch hydrolysiert werden [84-86]. Der Grund hierfür ist, dass hier ein inhibitorischer Anteil von mindestens 43 Aminosäuren Länge vorliegt [75, 87, 88], welcher eine relevante Bedeutung für das Erreichen der maximalen Offenwahrscheinlichkeit hat [89]. Diese kann den Wert von 1% oder 100% erreichen [90, 91]. Hierfür kommen verschiedene Proteasen in Frage (vgl. Abbildung 1-4). Durch die Hemmbarkeit mit Aprotinin konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Proteasen um Serinproteasen handelt. Serinproteasen sind proteolytische Enzyme, welche die Aminosäure Serin im katalytischen Zentrum enthalten, und sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch die Regulation verschiedener Prozesse beeinflussen. Häufig werden diese Proteasen dabei durch eine Kaskade aktiviert und reguliert.



**Abbildung 1-4 Mögliche Schnittstellen verschiedener Proteasen an der  $\gamma$ -Untereinheit**

Die Grafik zeigt die verschiedenen Proteaseschnittstellen der humanen  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC. Links im Bild ist die Furinschnittstelle an Position 138 der Aminosäurekette zu erkennen. Rechts im Bild sind die Schnittstellen von verschiedenen Proteasen zu erkennen. Die kürzesten Fragmente sind bei Trypsin zu finden, während Prosta<sup>178</sup>sin die RKRK Sequenz beginnend an Position 178 schneidet. Die Schnittstellen sind fett gedruckt und mit Pfeilen markiert. Die Aminosäuresequenz stammt aus der UniProt Database (UniProt Nummer P51170). Aus [88]

Für einige in Frage kommende Proteasen konnte experimentell gezeigt werden, dass sie die  $\gamma$ -Untereinheit distal (in Richtung des C-Terminus) der Furinschnittstelle proteolytisch schneiden. Diese sind unter anderem die löslichen Proteasen Kallikrein [92], Chymotrypsin [93], Trypsin [88, 94], Plasmin [90, 93], neutrophilen Elastase (ELA-2) [95, 96], Cathepsin B und S [97, 98]. Aber auch die membrangebundenen Proteasen „Channel-Activating Protease 1“ (CAP1, Prostasin) [87, 99], „CAP2“ (Transmembrane protease serine 4 (TMPRSS4)) [100, 101] und „CAP3“ (Matriptase) [102, 103] sind hierbei zu nennen. Wichtig ist es hier zwischen Proteasen zu unterscheiden, die wie Prostasin und Gewebekallikrein physiologisch im Lumen des distalen Tubulus vorkommen und Proteasen wie Plasmakallikrein oder Plasmin die nur bei geschädigter Filtrationsbarriere und damit einhergehender Proteinurie, wie es zum Beispiel beim nephrotischen Syndrom der Fall ist, in den Harn gelangen [104]. Eine dritte Gruppe sind experimentell verwendete Proteasen, wie zum Beispiel Trypsin oder Chymotrypsin, die *in vivo* keine Rolle bei der Aktivierung des ENaC spielen, da sie nie im Urin erscheinen.

#### **1.2.4.3 Regulation durch Kallikreine**

Kallikreine sind Serinproteasen und können in die Gruppe der Gewebs- und Plasmakallikreine eingeteilt werden [105]. Das Gewebekallikrein oder Urin-Kallikrein (35 kDa) wird vor allem in Kolon und Niere gebildet. Es spielt bei verschiedenen Prozessen wie der Regulation von Schmerzempfindung, der Entzündungskaskade und der Gerinnungskaskade eine Rolle, indem es die inaktiven Vorstufen der Gewebshormone in aktive Kinine umwandelt. Nach Sekretion im renalen Verbindungstubulus bewirkt es durch Spaltung der extrazellulären  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC eine erhöhte Natriumresorption im distalen Tubulus und hat daher auch Einfluss auf die Blutdruckregulation [92, 106]. Eine laborchemische Verwendung hat Gewebekallikrein zudem als Tumormarker [107].

Plasmakallikrein ist größer und schwerer (88 kDa) als Gewebekallikrein. Somit ist es zu groß, um physiologisch in den Urin gelangen. Es entsteht aus der Vorstufe Plasma-Präkallikrein, das in der Leber gebildet wird. Nach der Aktivierung zu Plasmakallikrein nimmt es, unter anderem über die Spaltung von

Plasminogen zur Plasmin, Einfluss auf die Gerinnung. Physiologisch kommen Plasmakallikrein und seine Vorstufe nicht im Urin vor. Es ist jedoch bei Patienten mit nephrotischem Syndrom im Urin in aktiviertem Zustand nachweisbar [108], wobei es bisher unklar ist, wie und durch welche Protease Plasma-Präkallikrein im Tubuluslumen aktiviert werden kann [108].

#### **1.2.4.4 Regulation durch Plasminogen und Plasmin**

Die Serinprotease Plasminogen wird in der Leber gebildet und wird proteolytisch durch den endothelialen gewebespezifischen Plasminogenaktivator (tissue-type plasminogen activator, t-PA) zu Plasmin aktiviert. Plasmin ist vor allem für seine Rolle bei der Fibrinolyse des Blutes bekannt.

Ähnlich wie Plasmakallikrein sind Plasminogen und Plasmin zu groß und zu schwer (Plasminogen 92 kDa und Plasmin 83 kDa), um physiologisch in den Urin zu gelangen. Beide Proteine können jedoch im Urin von nephrotischen Patienten nachgewiesen werden [104]. Eine Möglichkeit der Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin im Tubuluslumen besteht über die membranständige Urokinase (urokinase-type plasminogen activator, uPA) [32]. Auch bei Plasmin konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es die  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC schneidet und somit theoretisch zu einer erhöhten Natriumrückresorption führt [109, 110].

### **1.3 Prostasin**

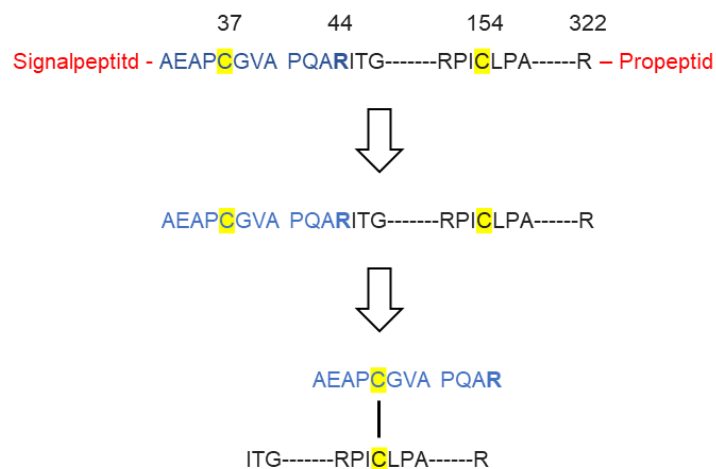
#### **1.3.1 Vorkommen**

Prostasin, auch channel activating protease 1 (CAP1) oder PRSS8/Prss8 genannt, ist eine extrazelluläre Serinprotease der Trypsinfamilie, die erstmals 1994 von Yu *et al.* in Prostatasekret entdeckt und beschrieben wurde [111, 112]. Es wurde gezeigt, dass Prostasin auch in anderen Geweben wie der Haut, den Speicheldrüsen, dem Pankreas, der Leber, der Lunge, dem Colon und auch in der Niere vorkommt [111]. Eine Besonderheit von Prostasin ist, dass es eine membranständige Serinprotease ist, die über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an die Zellmembran gebunden ist [113].

So wird Prostasin auch in der gesunden Niere im distalen Tubulussystem exprimiert und gelangt nicht erst bei einer glomerulären Schädigung in das Tubulussystem.

### 1.3.2 Aktivierung

In der Maus kodiert das *Prss8*-Gen ein aus 342 Aminosäuren bestehendes Protein, bei dem am N-terminus bereits posttranslational ein Signalpeptid abgespalten wird [112]. Dieses Zymogen wird in der Folge an Position R44 erneut hydrolysiert [114], wodurch es zu zwei über Disulfidbrücken verbundenen Ketten kommt, einer leichten und einer schweren Kette. Wie diese Aktivierung *in vivo* geschieht, ist aktuell nicht abschließend geklärt. Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass die Aktivierung über eine proteolytische Kaskade abläuft, und Prostasin von der Serinprotease Matriptase aktiviert wird. So ähneln die epidermalen Defekte bei Matriptase knock-out Mäusen stark den Defekten bei Prostasin knock-out Mäusen [115, 116], und es scheint kein aktiviertes Prostasin in der Haut von Matriptase knock-out Mäusen vorzukommen [117].



**Abbildung 1-5 Schematische Darstellung der Aktivierungskaskade von Prostasin**

Anhand der humanen Aminosäuresequenz ist die Aktivierungskaskade von Prostasin schematisch dargestellt. Diese beginnt mit einer langen Sequenz, welche ein Signalpeptid sowie ein Propeptid aufweist. Durch posttranslationale Modifikationen entsteht hieraus das Zymogen von Prostasin. Durch Spaltung der Aminosäurekette an Position R44 wird das Zymogen aktiviert. Aus der Bildung einer Disulfidbrücke zwischen C37 und C154 resultiert eine Verbindung beider Ketten. Die leichte Kette ist blau dargestellt, die schwere Kette ist gekürzt und schwarz. Die Disulfidbrücke ist schematisch als Verbindung zwischen den gelb markierten Cysteinen gezeigt. Signalpeptid und Propeptid sind in Rot dargestellt. Die Aminosäuresequenz stammt aus der UniProt Database (UniProt Nummer Q16651)

Dass diese Hypothese für alle Gewebe gleichsam zutrifft, ist unwahrscheinlich, denn beispielsweise wird in der Plazenta von Mäusen ein gegenteiliger Ablauf beschrieben. Dort wird Protsasin für die Aktivierung von Matriptase benötigt [118]. Deshalb wird diskutiert, ob die in einigen Publikationen beschriebene Autoaktivierung von Matriptase den experimentellen Rahmenbedingungen geschuldet ist [119]. Dies führt dazu, dass der genaue Mechanismus der Aktivierung von Protsasin, welche Proteasen in einer angenommenen Aktivierungskaskade oberhalb und unterhalb stehen, aktuell weiter unklar ist.

### **1.3.3 Funktionen**

Eine wichtige Rolle spielt Protsasin, neben seiner Funktion in der epidermalen und plazentaren Entwicklung [116, 120, 121], vor allem im Bereich der Aktivierung des ENaC [99, 122], wobei neben der Niere vor allem die Lunge Gegenstand der Forschung ist [123, 124].

Eine Deletion von Protsasin ist im Mausmodell nicht möglich, da diese Protsasin knock-out Mäuse bereits an einer Plazentainsuffizienz [120] oder kurz nach Geburt durch Dehydrierung versterben, da ihre Epidermis nicht vollständig funktionstüchtig entwickelt ist [116]. Es ist jedoch möglich, Protsasin gezielt zu mutieren und dennoch lebensfähige knock-in Mäuse zu erhalten. Beschrieben wurde eine Protsasin-Mutante (Prss8-S238A), die keine proteolytische Funktion hat [125] und eine mit fehlender Aktivierbarkeit (Protsasin nur Zymogen, Prss8-R44Q) [126].

### **1.3.4 Protsasin und ENaC**

Bereits 1997 wurde beschrieben, dass CAP1 in *Xenopus laevis* Oozyten *in vitro* einen Einfluss auf die durch den ENaC vermittelten Ionen-Ströme zu haben scheint [99, 122]. Ebenfalls konnte ein Einfluss auf die proteolytische ENaC-Aktivierung in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Zellen gezeigt werden [87]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass bei Verwendung von Protsasin siRNA eine deutliche Reduktion der ENaC Ströme zu verzeichnen war [127]. Auch im menschlichen Urin konnte bei verringerter Natriumausscheidung eine erhöhte Ausscheidung von Protsasin gezeigt werden [128], ebenso wie es auch bei der



diabetischen Nephropathie [129] und beim primären Hyperaldosteronismus der Fall war [130].

Dass Prostasin *in vitro* den ENaC proteolytisch spalten kann, konnte bereits gezeigt werden [131], auch konnte mit der Aminosäuresequenz RKRK der  $\gamma$ -Untereinheit eine prostasinspezifische Schnittstelle detektiert werden [87]. Wobei hier einzuschränken ist, dass unter anderem auch pKlk und Plasmin an dieser Schnittstelle spalten können [93, 108, 132].

Svenningsen *et al.* stellten 2009 basierend auf ihren *in vitro* Untersuchungen die Hypothese auf, dass Prostasin bei geringer Plasminkonzentration die ENaC Aktivität beeinflusst [127]. Es konnte im Urin nephrotischer Patienten immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass hier  $\gamma$ -Untereinheiten des ENaC vorkommen, die an der für Prostasin spezifischen Stelle geschnitten wurden [133].

## **1.4 Das nephrotische Syndrom**

Das nephrotische Syndrom bezeichnet einen Komplex aus einer Proteinurie, die größer als 3,5 g/24h ist, ausgeprägten Ödemen und einer Hypoalbuminämie von unter 3 g/dl [134-137]. Darüber hinaus kann häufig eine Hyperlipoproteinämie beobachtet werden [138, 139], da es zu einer reduzierten Plasma-Clearance von Lipoproteinen kommt [138]. Eine weitere Annahme ist, dass hierfür auch eine Erhöhung der Expression der Proproteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (PCSK9) in der Niere für die reduzierte Lipid-Clearance mitverantwortlich sein könnte [139, 140]. Daneben kann es durch die übermäßige Filtration von Gerinnungsfaktoren aufgrund des Verlustes von Antithrombin zu einer Hyperkoagulabilität kommen, die das Risiko für die Entstehung von thromboembolischen Ereignissen erhöht. Daneben kommt es durch den Verlust von  $\gamma$ -Globulinen zu einem Anstieg des Infektionsrisikos [137].

### **1.4.1 Ursachen**

Die häufigste Ursache für die Ausbildung eines nephrotischen Syndroms sind primär glomeruläre Erkrankungen. Die Minimal-Change Glomerulopathie, die vor allem im Kindesalter auftritt oder die membranöse Glomerulonephritis, welche die

häufigste Ursache für ein nephrotisches Syndrom im Erwachsenenalter darstellt. Daneben die Fokal Segmentale Glomerulosklerose (FSGS) und die Membranoproliferative Glomerulonephritis [137, 141]. Darüber hinaus kommen auch sekundäre und seltenere Ursachen wie eine Nierenbeteiligung bei Kollagenosen, Nierenvenenstauungen oder eine akute interstitielle Nephritis in Frage [137].

Gemein ist allen Ursachen, dass sie zu einer Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere führen, wodurch es zu einer aberranten Filtration von hochmolekularen Proteinen ( $> 60$  kDa) kommt, für die der glomeruläre Filter aufgrund seines ultrastrukturellen Aufbaus physiologischerweise unpassierbar ist [141, 142].

Aktuell stehen zur Behandlung des nephrotischen Syndroms neben der Behandlung der auslösenden Erkrankungen, beispielsweise mit Steroiden, Rituximab oder Cyclophosphamid, vor allem supportive Therapien, wie etwa der Einsatz von Schleifendiuretika zur Ödemausschwemmung oder Angiotensin-Converting-Enzyme- (ACE) Hemmer für die Reduktion der Proteinurie zur Verfügung [142].

#### **1.4.2 Ödementstehung**

Ein charakteristisches und klinisch führendes Symptom ist die Ödembildung. Ödeme definiert als tastbare Schwellungen resultierend aus einer interstitiellen Flüssigkeitsansammlung treten beim Nephrotischen Syndrom, generalisiert auf, die sogenannte Anasarka. Die Ödemmenge kann hierbei bis zu 30% des Körpergewichts ausmachen [143]. Die Ödembildung beruht auf einer renalen Natriumretention in Kombination mit einer Veränderung des intravasalen onkotischen Drucks durch den Verlust an Albumin. Pro Kilogramm Gewichtszunahme ist somit von einer isotonen Retention von 9 g NaCl auszugehen. Insbesondere die bereits dargelegte proteolytische Aktivierbarkeit des ENaC ist für das Krankheitsbild des nephrotischen Syndroms relevant, da es durch die Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere zu einer Proteinurie und damit einhergehend zu einer erhöhten Exposition des ENaC gegenüber Proteasen aus dem Plasma kommt [77].

Zur Entstehung der Ödeme beim nephrotischen Syndrom werden zwei Haupttheorien diskutiert.

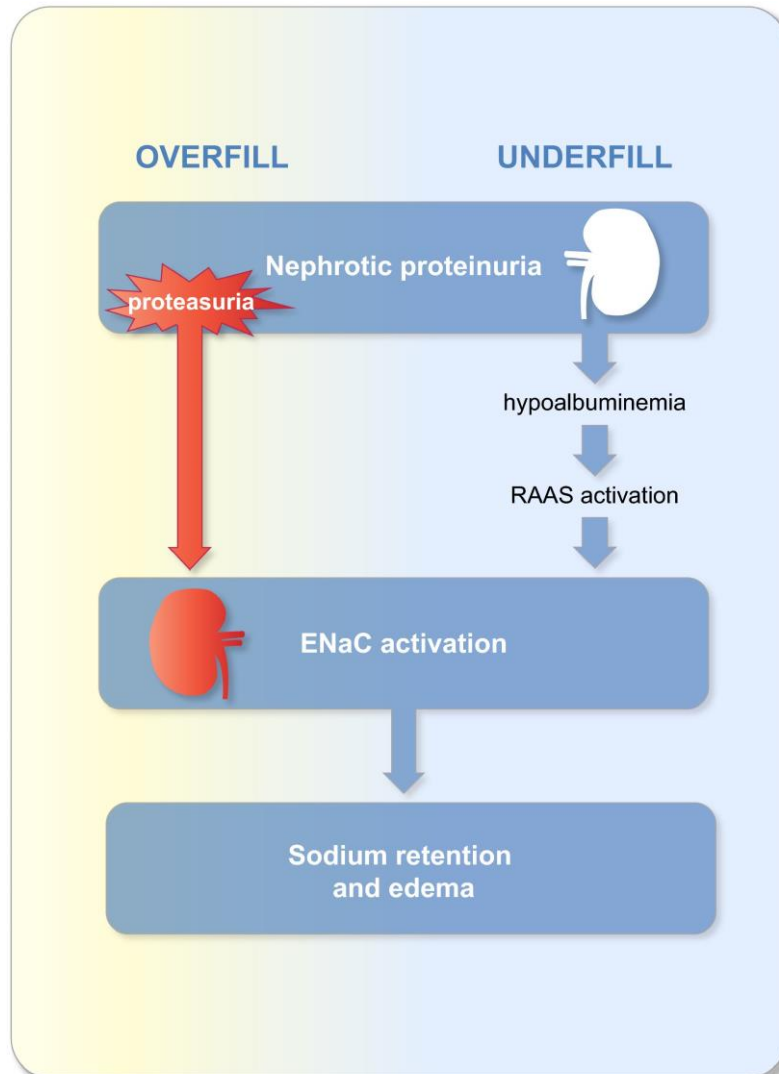
#### **1.4.2.1 Underfill Theorie**

Die *Underfill*-Theorie, formuliert von Epstein 1917 [144], geht davon aus, dass der im Rahmen der Hypoalbuminämie sinkende onkotische Druck zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) führt, da durch den Übertritt von Flüssigkeit ins Interstitium ein intravasaler Volumenmangel entsteht [145, 146]. Der Anstieg von Aldosteron führt in der Folge zu einer erhöhten Expression und Aktivierung des ENaC. Hierdurch kommt es zu einer Reduktion der Natriuresis und damit bedingt zu einer Wasserretention. In Kombination mit dem verringerten onkotischen Druck sorgt dies für die Bildung von interstitiellen Ödemen [147].

#### **1.4.2.2 Overfill Theorie**

Die *Overfill* Theorie geht davon aus, dass die erkrankte Niere primär für die Natriumretention verantwortlich ist. Svenningsen schlug 2009 vor, dass in den Urin aberrant filtrierte Plasmin eine proteolytische ENaC-Aktivierung bewirken könnte [109]. Über die extrazelluläre zweite proteolytische Spaltung der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC wird die Offenwahrscheinlichkeit wie bereits beschrieben erhöht. Durch den aktiven ENaC kommt es zunächst zu einer Steigerung der Natriumretention, die sekundär eine Wasserretention aus dem Tubulus zurück ins Blut bedingt [77, 148]. Dies führt in Kombination mit dem reduzierten onkotischen Druck zur Ödembildung. Obwohl sich die entscheidende Rolle von Plasmin oder einer anderen Protease bislang nicht beweisen ließ [149, 150], kann dennoch davon ausgegangen werden, dass es zu einer ENaC-Aktivierung im Rahmen der Proteasurie kommt [77].

Beide Theorien schließen sich gegenseitig nicht aus. So können sich die Effekte der RAAS Aktivierung und der Proteasurie gegenseitig unterstützen und enden in der gemeinsamen Endstrecke der ENaC-Aktivierung, der Natriumresorption und der Ödementstehung [77, 151].



**Abbildung 1-6 Integrativer Ansatz zur Erklärung der Ödementstehung**

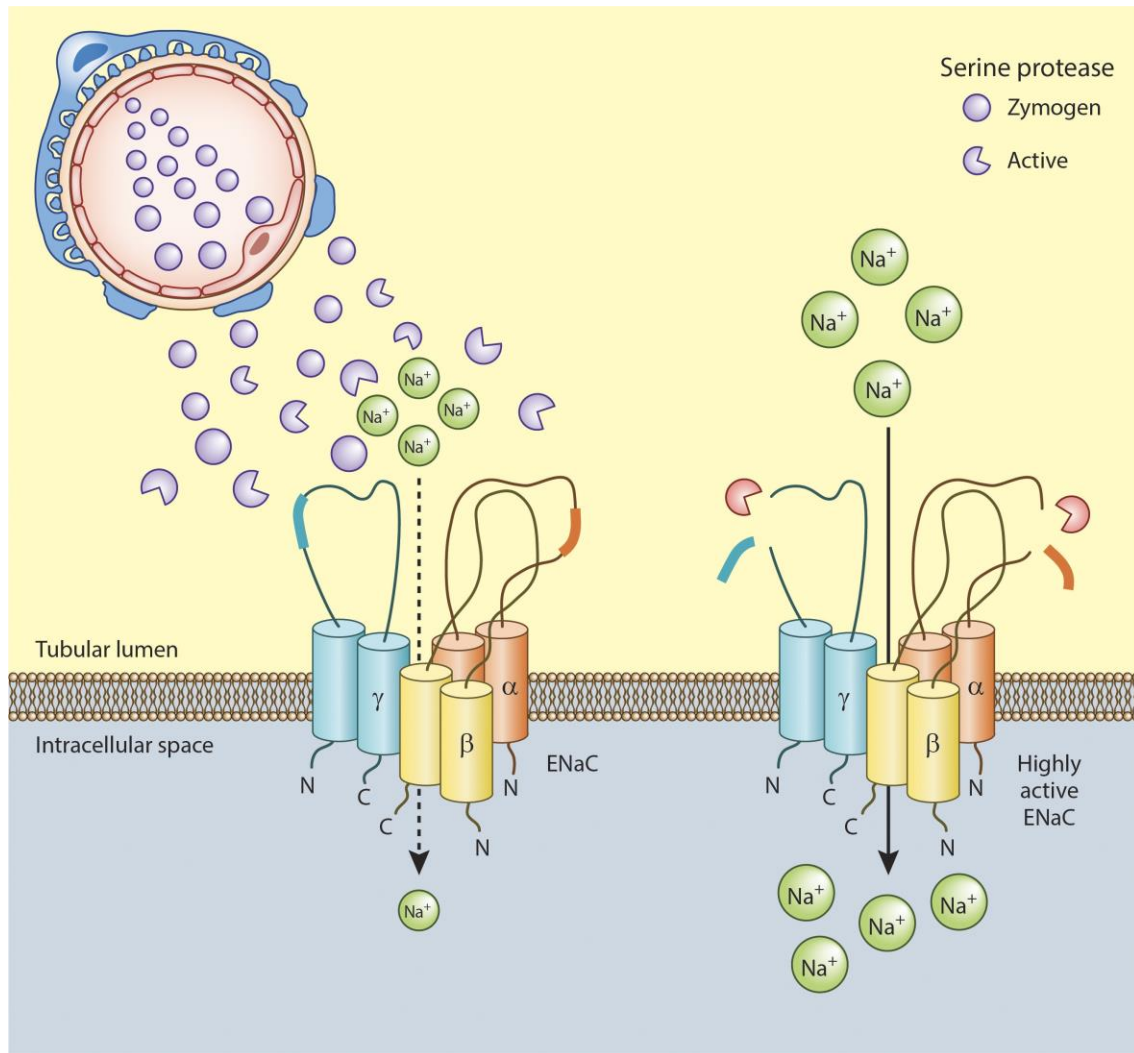
Das Schema veranschaulicht die beiden diskutierten Theorien zur Ödementstehung im nephrotischen Syndrom und die Möglichkeit, dass sie sich gegenseitig unterstützen. Aus [77].

### 1.4.2.3 Proteasurie

Im nephrotischen Urin kommen, aufgrund der geschädigten Filtrationsbarriere verschiedenste Proteasen vor, wobei Serinproteasen quantitativ den höchsten Anteil haben [104]. Wie in 1.2.4.2 beschrieben ist aus *in vitro* Studien bekannt, dass verschiedene Serinproteasen die  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC extrazellulär spalten können und hierdurch die Offenwahrscheinlichkeit erhöhen.

Dass es sich bei der relevanten Protease um eine Serinprotease handelt wird durch Befunde aus Experimenten mit dem Serinproteaseinhibitors Aprotinin unterstützt [152]. Bei *in vivo* Studien konnte unter der Verwendung von Aprotinin

die Aktivität von Serinproteasen im Urin supprimiert und eine Ödembildung, im experimentellen nephrotischen Syndrom reduziert bzw. verhindert werden [151]. Auch Befunde aus Western Blot Untersuchungen von Proteinen aus Nieren nephrotischer Mäuse legen nahe, dass die zweite Spaltung der  $\gamma$ -Untereinheit verantwortlich für die Natriumresorption und Ödementstehung ist. So konnte gezeigt werden, dass die Bande der vollständig geschnittenen ENaC  $\gamma$ -Untereinheit in nephrotischen Mäusenieren signifikant häufiger vorliegt als in gesunden Kontrolltieren [153]. Unter Verwendung von Aprotinin kommt es dagegen nicht zu einem relevanten Anstieg der Intensität dieser Bande im Western Blot, während Canrenoat als Mineralokortikoidrezeptorblocker keinen Einfluss auf das Vorkommen der vollständig geschnittenen Bande im Western Blot von Proben nephrotischer Mäuse hat [153]. Die aktuellen Befunde der Western Blot Untersuchungen legen darüber hinaus nahe, dass auch die  $\alpha$ -Untereinheit im Falle eines nephrotischen Syndrom nochmals gespalten wird [153].



**Abbildung 1-7 Modell der proteolytischen Aktivierung des ENaC beim NS**

Schematische Darstellung der ENaC-Aktivierung im nephrotischen Syndrom. Oben links ist die geschädigte Filtrationsbarriere dargestellt. In der Folge kommt es zur abnormen Filtration von Serinproteasen (sowohl als Zymogen, als auch als aktive Proteasen) welche die α-Untereinheit, und in relevanterem Umfang die γ-Untereinheit des ENaC spalten, hierdurch die inhibitorischen Anteile der Aminosäurekette entfernen und damit die Offenwahrscheinlichkeit erhöhen. Aus [153].

Es ist Gegenstand intensiver Forschung, die daran beteiligten essenziellen Serinproteasen zu identifizieren, durch welche die Aktivierung des ENaC verursacht wird. Hierzu konnten in den letzten Jahren verschiedene Kandidatenproteasen gefunden werden [77, 104]

Für einige Proteasen konnte eine Relevanz *in vivo* bereits ausgeschlossen werden. So konnte für Plasmakallikrein anhand eines knock-out Mausmodells bereits gezeigt werden, dass es nicht essenziell für die Volumenretention im nephrotischen Syndrom ist. Zudem zeigte sich bei der ENaC-Aktivierung kein

signifikanter Unterschied zu Wildtyp-Kontrollmäusen [108]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Plasminogen im experimentellen knock-out Mausmodell nicht vor der Ödementstehung im nephrotischen Syndrom schützt. Auch hier ist ebenso wie in einem Mausmodell mit einem urokinase-type plasminogen activator knock-out die ENaC-Aktivierung im nephrotischen Syndrom im Vergleich zu Wildtyp Kontrollmäusen nicht reduziert [149, 150]. Auch die mögliche Beteiligung der Faktor VII aktivierenden Protease (Habp2) konnte nicht bestätigt werden [132].

Im Rahmen, der *in vitro* Untersuchungen war in der Vergangenheit eine mögliche Rolle von Protsasin bei der ENaC Aktivierung diskutiert worden, so dass diese Serinprotease als möglicher Kandidat weiterhin im Raum stand [127]. Aufgrund des letalen Phänotyps einer Protsasin knock-out Maus [116, 120, 125], gab es jedoch keine *in vivo* Ergebnisse.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die Studie untersuchte zwei Fragestellungen in Bezug auf die Rolle von Prostin.

Zunächst sollten die bislang bekannten Ergebnisse von *in vitro* Studien über Prostin und die physiologische Rolle dieser Protease in der Niere im Hinblick auf den Natrium - und Wasserhaushalt in einem tierexperimentellen Modell *in vivo* überprüft werden. Dabei sollte die Auswirkung von Punktmutationen von Prostin im aktiven Zentrum oder der Aktivierungsstelle im Mausmodell untersucht werden. Zu den verwendeten Tiermodellen mit mutiertem Prostin knock-in gab es aktuell nur Studien zur Auswirkung des knock-in auf die epidermale Entwicklung. In dieser Arbeit wurden die physiologischen Auswirkungen der fehlenden Aktivierbarkeit und der fehlenden enzymatischen Funktion auf die Niere überprüft, um hierdurch einen eventuell vorhandenen Phänotyp nachzuweisen.

Als zweite Fragestellung galt es zu überprüfen, ob Prostin unter der pathophysiologischen Bedingung des experimentellen nephrotischen Syndroms der Maus bei der Aktivierung des epithelialen Natriumkanals eine Rolle spielt und hierdurch für die Natriumretention und Ödembildung mitverantwortlich ist. Sollte dies zutreffen, könnte hierdurch ein neuer therapeutischer Ansatz für die Behandlung von Patienten mit einem nephrotischen Syndrom abgeleitet werden. Dies würde das bislang schmale Therapiespektrum in der antiödematösen Behandlung beim nephrotischen Syndrom erweitern oder zielgerichtete Therapien ermöglichen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Tabelle 2-1 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Acetylgas	Westfalen AG
Ampuwa, 100 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Aprotinin (1600 µg/ml)	Loxo
Aqua dest.	UKT Tübingen
BD Micro-Fine™ Insulinspritzen U40 0,5 ml 0,3x8mm	Seidel Medipool GmbH
Blutgas-Kapillaren Na-hep 180 µl	Hirschmann
BRANDplates® Strip Plate 12xF8 puregrade	Brand
Cellstar® Tubes 15 ml	greiner bio-one
Cellstar® Tubes 50 ml	greiner bio-one
Chloroform reinst, 200 ml	Merck KGaA
Combur9 Test	Cobos
cOplete™, Mini, Proteasehemmer- Cocktail EDTA-frei	Roche
Criterion Leer Kassetten	BioRad
CryoTube Vials 1,8ml	ThermoFischerScientific
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), 500 ml	Sigma-Aldrich®
Eppendorf Combitips® plus 12,5 ml	Eppendorf
epT.I.P.S.® Standard 20-300µl	Eppendorf
Ethanol 70 %	Universitätsapotheke UKT
Falcon® 10 ml Serological Pipet	Corning Incorporated
Falcon® 25 ml Serological Pipet	Corning Incorporated
Falcon® 5 ml Serological Pipet	Corning Incorporated
Flüssigstickstoff	Westfalen AG
Hämatokrit-Kapillaren Na-hep 75 µl	Hirschmann
Kapillar-Adapter	Werfen

Lithium Stammlösung 500 mmol/l	biorapid GmbH
minicaps® Einmal-Kapillarpipetten Nah- hep 10 µl	Hirschmann
Nitrile puderfreie Untersuchungshandschuhe Classic, Gr. L	Abenda
Nitrozellulosemembranen 0,2µm	Amersham GE HealthCare
Pipettenspitzen (1000 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (200 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen Standard (10 µl)	Sarstedt
PNGaseF	NEB, Ipswich, USA
Probengefäß 1,3ml LH	Sarstedt
Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5 ml	greiner bio-one
Reaktionsgefäße 2,0 ml	greiner bio-one
Reiniger D	biorapid GmbH
Revert Total Protein Stain	Licor, Lincoln, USA
Salpetersäure (HNO <sub>3</sub> ) 1N	PanReac AppliChem
Sauerstoffgas	Linde AG
SDS-Polyacrylamid Gel	Eigene Herstellung
sensiva® skin care wash lotion	Schülke
Serum-Standard	biorapid GmbH
Softasept® N	Braun
Sterillium® classic pure 500 ml	BODE Chemie GmbH
Sucrose Lyse Puffer (250 mmol/l Sucrose, 10 mmol/l Triethanolamin, 1,6 mmol/l Ethanolamin, 0,5 mmol/l EDTA)	Eigene Herstellung, Chemikalien von Sigma-Aldrich®
System-Leerwertlösung	biorapid GmbH
Urin-Standard (Na <sup>+</sup> 143,5 mmol/l, K <sup>+</sup> 100 mmol/l, Ca <sup>2+</sup> 5,00 mmol/l ).	biorapid GmbH

UV-Küvetten 70 µl mikro, Zentrumshöhe 8,5 mm, Schichtdicke 1 cm	Brand
-----------------------------------------------------------------------	-------

**Tabelle 2-2 In der Tierhaltung verwendete Materialien**

Material	Hersteller
C1000 – Kontrolldiät (Natriumgehalt: 2488 mg/kg $\approx$ 108,22 µmol/g)	Altromin International
C1036 – Na <sup>+</sup> - und Cl <sup>-</sup> -arme Diät (Natriumgehalt: 130 mg/kg $\approx$ 5,64 µmol/g)	Altromin International
Häuschen (rot)	
Holzröhre	
Käfige Typ II und Käfige Typ II Lang	EHRET GmbH Life Science Solutions
Leitungswasser	Stadtwerke Tübingen
Metabolische Käfige 3600 M 009	TECNIPLAST
OSAFE Einstreu	JRS (J. Rettenmeier & Söhne)
Paraffin-Öl	Merck KGaA
ssniff V1534-703, Standarddiät (Natriumgehalt: 0,24% $\approx$ 104 µmol/g)	ssniff Spezialdiäten GmbH
Zellstoff	

**Tabelle 2-3 Geräte**

Gerät	Hersteller
ALT 100-4M Analysenwaage	Kern
Biomate 3S Spectrophotometer	Thermo Scientific
Centrifuge+Vortex	Neolab
Criterion™	BioRad
Dräger Vapor® 2000 - Isoflurane	Dräger
Dual-Timer C5080	TFA
EFUX 5057 Flammenphotometer	Eppendorf
ELx800 Absorptionsreader für Mikrotiterplatten	BioTek
Eppendorf Multipette	Eppendorf

Eppendorf Research® (0,1 µl – 2,5 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® (2 µl – 20 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® (20 µl – 200 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (0,5 µl – 10 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (10 µl – 100 µl) Pipette	Eppendorf
Eppendorf Research® plus (100 µl – 1000 µl) Pipette	Eppendorf
Gefrierschrank -20°C	
Gefrierschrank -80°C	
GEM® Premier 3000	Instrumentation Laboratory
GeneQuant pro Spectrophotometer	Pharmacia
Homogenisator Dounce	
Hybridisation Oven/Shaker	Amersham Biosciences
Kühlschrank 2-8°C	
Megafuge 2.0R	Unity Lab Service
MR 3001 Heizplatte	Heidolph
Odyssey Fluoreszenzscanner	LI-COR Biosciences - GmbH
PCB 350-3 Analysewaage	Kern
pH211 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments
Plattenschüttler	
Powerpette Plus	VWR
Secuflow-Niedrigraum-Abzug	mc6® Das Laborsystem
VX100 Vortexmischer, ABiMED	Labnet

**Tabelle 2-4 Programme**

Programm	Hersteller
EMPIRIA Studio 2.0	LI-COR Biosciences - GmbH
Gen5	BioTek
GraphPad Prism 9	GraphPad Software Inc.
Image Studio Lite Version 5.2	LI-COR Biosciences - GmbH
Microsoft Office Excel 2010 / 365	Microsoft
Microsoft Office Word 2010 / 365	Microsoft

**Tabelle 2-5 Medikamente und Substanzen aus dem Tierversuch**

Medikament/Substanz	Hersteller
Dimethylsulfoxid (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>S</sub> ) 99%-ige Lösung	Sigma Aldrich
DOXO-cell® 10 mg Injektionslösung	cellpharm GmbH
Furosemid Lasix 250mg Ampullen	Sanofi
Hydrochlorothiazid	Sigma Aldrich
Isofluran CP® 1ml/ml	cp-pharma
Kalinorbrausetabletten (1,56g Kalium)	Desma GmbH
Natronlauge (NaOH) 1N	Merck
Salzsäure (HCl) 1N	Merck
Triamteren	Sigma Life Science
Doxorubicin 2mg/ml Injektionslösung	STADApHarm

**Tabelle 2-6 Kits und Reagenzien**

Kit/Reagenz	Hersteller
Bio-Rad Protein Assay (5000006)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Cystatin C ELISA (MSCTC0)	R&D Systems Inc.
IBL Aldosterone ELISA (RE52301)	IBL International GmbH /TECAN
LT-SYS® Creatinin, mod. nach Jaffé, kinetisch, ohne Enteiweißung (LT-CR 0121)	Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
LT-SYS® Harnstoff, UV, kinetisch (LT-UR 0010)	Labor + Technik EBERHARD LEHMANN GmbH
Prostasin ELISA (ab213884)	Abcam plc.

**Tabelle 2-7 Antikörper und Western Blot**

Antikörper	Hersteller
Rabbit anti mouse $\alpha$ -ENaC - AK	Pineda, Berlin, Deutschland
Rabbit anti mouse $\beta$ -ENaC - AK	Pineda, Berlin, Deutschland
Rabbit anti mouse $\gamma$ -ENaC - AK (SPC-405)	Stressmarq, Viktoria, Canada
Rabbit anti mouse Proxasin - AK (15527-1-AP)	Proteintech Group, Inc
Donkey anti rabbit IRDye 800CW AK	LI-COR Biosciences - GmbH
Revert 700 Total Protein Stain	LI-COR Biosciences – GmbH
Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder	LI-COR Biosciences – GmbH

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Das Mausmodell**

Die Experimente wurden vom Regierungspräsidium Tübingen unter der Antragsnummer M6/17 genehmigt, eine Ausnahmegenehmigung zur Durchführung der Experimente lag für meine Person vor.

Die Studien wurden an Prss8-wt, Prss8-R44Q knock-in und Prss8-S238A knock-in Mäusen aus eigener Zucht durchgeführt. Die Mäuse wurden in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus bei 22-24°C Raumtemperatur und einer Luftfeuchtigkeit zwischen 45-55 % gehalten, wobei sie einige Tage vor Versuchsbeginn zur Akklimatisierung in das Labor überführt wurden. Vor Beginn der Versuche stand den Mäusen Futter (SNIFF) und Trinken (Leitungswasser) *ad libitum* zur Verfügung.

Bei genetisch veränderten Mäusen kann zwischen knock-out und knock-in unterschieden werden. Beim knock-out handelt es sich um eine Methode bei der ein Gen gezielt inaktiviert wird, wobei man vom knock-out des Gens spricht [154]. Beim knock-in handelt es sich dagegen um eine Veränderung des Gens, ohne, dass es dadurch zu einem teilweisen oder vollständigen Fehlen kommt. Ein Beispiel dafür sind die hier verwendeten Prostatin knock-in Mäuse, die beide ein strukturell verändertes Prostatin exprimieren, welches infolgedessen eine veränderte Funktionalität aufweist [125, 126].

#### **2.2.1.1 Die Prss8-wt Maus**

In den Experimenten wurden Mäuse des Stammes 129S1/SvImJ genutzt. Diese Mäuselinie ist für das durch Doxorubicin induzierte experimentelle nephrotische Syndrom empfänglich [155, 156].

Die bei der Rückkreuzung der Prss8 knock-in Linien auf diesen Stamm resultierenden Prss8-wt Wurfgeschwister konnten in den Experimenten als Kontrollgruppe genutzt werden.

#### **2.2.1.2 Die Prss8-R44Q Maus**

Die Prss8-R44Q Maus (FVB;C57;NIHBL-Prss8<sup>tm2.1Bug (Prss8-R44Q)</sup>) wurde in der Arbeitsgruppe von Thomas H. Bugge (Proteases and Tissue Remodeling

Section, Oral and Pharyngeal Cancer Branch, NIH NIDCR, Bethesda, MD, USA) entwickelt und zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine Linie, in der das Prss8-Gen so verändert wurde, dass in der Aminosäurekette Arginin (R) durch Glutamin (Q) ersetzt ist. Dadurch kann die Aminosäurekette nicht mehr an Stelle 44 gespalten, und somit Prostasin nicht mehr aktiviert werden. Es gibt zu diesem knock-in Arbeiten, welche die epidermale Entwicklung untersuchen [126]. Jedoch gab es bislang keine Untersuchungen zu den hieraus resultierenden Konsequenzen für die Nierenfunktion.

Um diesen knock-in auch für Experimente mit dem durch Doxorubicin induzierten experimentellen nephrotischen Syndrom zu verwenden, wurde der knock-in bis mindestens zur Generation F5 auf den 129S1/SvImJ Mäusestamm zurückgekreuzt.

Phänotypisch lässt sich die Prss8-R44Q Maus mit bloßem Auge von den Prss8-wt Mäusen unterscheiden (vgl. Abbildung 2-1), da sie neben kürzerem und nur vereinzelt wachsendem Fell auch weniger, kürzere und gekräuselte, teils auch komplett fehlende Vibrissen hat.

### **2.2.1.3 Die Prss8-S238A Maus**

Auch die Prss8-S238A Maus (FVB;C57;NIHBL-*Prss8*<sup>tm1.1Bug (Prss8-S238A)</sup>) wurde ebenfalls durch die Arbeitsgruppe von Thomas H. Bugge entwickelt und zur Verfügung gestellt. Bei dieser Mäuselinie wurde das Prss8-Gen so manipuliert, dass anstatt des Serins (S) mit seiner Hydroxy-Gruppe im Aminosäurerest Arginin (A) ins katalytische Zentrum der Protease eingebaut ist. Dies führt zu einem Funktionsverlust des katalytischen Zentrums. Die Aktivierung und damit einhergehende strukturelle Veränderungen sind im Gegensatz zum Prostasin bei Prss8-R44Q noch möglich. Wie auch bei der Prss8-R44Q Maus gibt es auch zur Prss8-S238A Maus Voruntersuchungen zum Effekt der Genveränderung auf die epidermale Entwicklung, nicht jedoch auf die Funktion der Nieren in dieser Mäuselinie [125].

Da auch die Prss8-S238A Maus in einem, nicht für das Doxorubicin Modell sensiblen Mäusestamm generiert wurde, ist auch sie bis mindestens F5 auf den 129S1/SvImJ-Mäusestamm zurückgekreuzt worden.



Der Phänotyp lässt auch bei der Prss8-S238A Maus eine Unterscheidung vom Wildtyp und der heterozygoten Maus makroskopisch zu, da sie ähnlich wie die Prss8-R44Q Maus weniger Fell und kürzere krause Vibrissen hat. Im Vergleich aller drei Genotypen liegt die Prss8-S238A Maus vom Erscheinungsbild zwischen der Prss8-R44Q und der Prss8-wt Maus, da die Veränderungen des Fells bei dieser Maus weniger stark ausgeprägt sind als bei den Prss8-R44Q Mäusen.



**Abbildung 2-1 Phänotypische Unterschiede der Behaarung bei den verwendeten Mäuselinien**

Deutlich zu erkennen sind die unterschiedlichen Ausprägungen des Fells und der Schnurrhaare der verschiedenen Genotypen

### 2.2.2 Studiendesign

Die Studie gliederte sich in zwei Teile. Zum einen wurde die Auswirkung der Prss8-Mutationen beider Mäusestämme (Prss8-S238A und Prss8-R44Q) mit der des Prss8-wt unter physiologischen Bedingungen verglichen, zum anderen der Einfluss des knock-in beim durch Doxorubicin induzierten experimentellen nephrotischen Syndrom untersucht. In beiden Versuchen wurden die Mäuse während der Experimente täglich anhand eines Score Sheets (vgl. Abbildung 2-2) kontrolliert. Beim Erreichen von 4 Punkten von maximal 8 Punkten wurde die Maus zweimal täglich begutachtet und beim Erreichen von 6 Punkten musste die Maus aus dem Versuch genommen und euthanasiert werden.

Parameter	Veränderung	Punkte
Änderungen Körpergewicht	keine Veränderung	0
	Gewichtsverlust 5 – 10 % verglichen zum Ausgangsgewichts innerhalb des Versuchszeitraums	1
	Gewichtsverlust 11 – 20 % verglichen zum Ausgangsgewichts innerhalb des Versuchszeitraums	2
	Gewichtsverlust >20 % verglichen zum Ausgangsgewichts innerhalb des Versuchszeitraums	*
Lokomotion	normal	0
	verlangsamt	1
	apathisch	2
	moribund	*
Fellqualität	normal, glänzend	0
	struppig	1
	eingekotet / Diarrhö	2
Atmungstyp	normal	0
	flach	1
	bauchschlägig	*
Körperhaltung	normal	0
	leicht gekrümmt	1
	stark gekrümmt	*
* sofortige Beendigung des Versuchs und Euthanasie		

**Abbildung 2-2 Score Sheet**

Anhand des abgebildeten Score Sheets wurde der Gesundheitszustand der Mäuse während der Versuche überwacht.

### **2.2.2.1 Probengenerierung**

Der täglich entweder als Spontan- oder Sammelurin gesammelte Mäuseurin wurde bei -20°C gelagert. Die Messungen erfolgten im Anschluss, nach Protokollvorgabe in der jeweiligen Verdünnung. Der in einigen Versuchen gesammelte Kot wurde bei -20°C gelagert und vor Verwendung getrocknet. Vor der Bestimmung der Elektrolyte wurde er in 5 ml 1 N Salpetersäure über mehrere Tage aufgelöst. Das unter Isofluran-Narkose retrobulbär gewonnene Blut wurde durch Lithium-Heparin an der Koagulation gehindert und zentrifugiert, um das Plasma abzutrennen. Dieses Plasma wurde bei -20°C für die verschiedenen Messungen aufbewahrt. Alternativ wurde aus dem frisch abgenommenen Blut direkt eine venöse Blutgasanalyse durchgeführt. Nieren, die nach Versuchsende entnommen wurden, wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Nieren für die histologische Aufarbeitung wurden mit Formalin perfundiert, fixiert und dann in Formalin bis zur weiteren Verwendung konserviert.

### 2.2.2.2 Untersuchungen im Metabolischen Käfig

Die Untersuchung der physiologischen Nierenfunktion der beiden Prss8 knock-in Linien erfolgte unter Verwendung metabolischer Käfige [157]. Hierbei handelt es sich um Einzelkäfige aus Hartplastik, in denen die Mäuse einzeln über einen begrenzten Zeitraum beobachtet wurden. Um den Stress der Mäuse zu reduzieren, wurde jedem Tier ein rotes Häuschen im Käfig zur Verfügung gestellt. Nach Ende der Behandlung wurden die Mäuse zur Regeneration wieder in ihre ursprünglichen Käfige gesetzt.



<b>Gewichtserfassung</b>								
<b>24h Sammelurin</b>								
<b>Blutentnahme</b>								
<b>Behandlungsstart</b>								
	-14	-1	0	1	2	3	4	5

**Abbildung 2-3 Metabolischer Käfig und Schema des Ablaufs der Versuche**

Beispiel eines Metabolischen Käfigs der Firma TECNIPLAST, in welchem die Mäuse für die Dauer des Versuchs in Einzelhaltung gehalten wurden (rechts) und der schematische Ablaufplan der Experimente in diesen Käfigen

In den Versuchen wurde täglich der Futterverbrauch, die Trinkmenge, das ausgeschiedene Urinvolumen, die Kotmenge und das Körpergewicht der Maus bestimmt, der Urin gesammelt und am Ende der Behandlung unter Isofluran-Narkose retrobulbär Blut zur weiteren Analyse gewonnen.

Während der Kontrolltage wurden den Mäusen spezielle Futterpellets (Altromin C1000® 110 µmol/g Natrium und 178 µmol/g Kalium) verfüttert. Zu trinken bekamen die Mäuse Leitungswasser (Na 1 mM), beziehungsweise vor den Behandlungen mit Hydrochlorothiazid (HCT) (pH 4,5) und Triamteren (pH 3,0-3,25) zur Gewöhnung angesäuertes Leitungswasser.

Bei der Behandlung ließen sich zwei Ansätze unterscheiden: Zum einen diätetische Behandlungen, welche die renale Natriumkonservierung prüfen [158, 159], zum anderen die Behandlungen mit Diuretika, die einzelne Ionenkanäle in der Niere direkt blockieren [160]. Sowohl die Diäten als auch die Diuretika wurden

während des Experiments konstant über die Nahrung bzw. das Trinken verabreicht, so dass auf eine wiederholte Bolusgabe der einzelnen Substanzen verzichtet werden konnte.

Während der diätetischen Behandlung in Form einer Niedrigsalzdiät (Low Sodium / Normal Potassium ((LS/NP)) wurde das Kontrollfutter durch natriumchloridarmes Futter (Altromin C1036<sup>®</sup> 10 µmol/g Natrium/ 178 µmol/g Kalium) ersetzt, bei der natriumarmen und kaliumreichen Diät (Low Sodium/ High Potassium (LS/HP)) wurde zusätzlich das Leitungswasser durch mit Kalinorbrausetabletten<sup>®</sup> (1565,66 mg Kalium-Ionen pro Tablette) versetztem Wasser mit dann 3,9 g/l Kalium ersetzt.

Die diuretischen Behandlungen wurden durch einen Zusatz des jeweiligen Diuretikums im Trinkwasser (bei HCT und Triamteren pH adaptiert zur Verbesserung der Löslichkeit) erreicht. Als Diuretika wurden HCT (400 mg/l), Furosemid (125 mg/l) und Triamteren (200 mg/l) verwendet. Für die Entscheidung, welche Dosis verwendet werden sollte, wurde auf eine Vorarbeit zurückgegriffen, in der die Versuchstiere diese Dosen gut tolerierten [160].

Furosemid ist ein sogenanntes Schleifendiuretikum, das im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife über eine Hemmung des Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 2 (NKCC2) zu einer starken Diurese führt.

HCT ist ein Diuretikum der Thiazid-Gruppe, das reversibel den Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC) im frühdistalen Tubulus der Niere hemmt, wodurch es zu einer vermehrten Wasser- und NaCl-Ausscheidung kommt.

Das kaliumsparende Diuretikum Triamteren wirkt durch die Blockade des ENaC und verhindert somit die Natriumretention im spätdistalen Tubulus. Eine relevante Nebenwirkung von Triamteren ist die Hyperkaliämie. Triamteren ist ein gelbes, kristallines Pulver, das bei einem normalen pH-Wert von Leitungswasser fast unlöslich ist, sich im angesäuerten Wasser (pH 3) jedoch lösen lässt.

Neben dem Körpergewicht und der Futter-, Trink- und Urinmenge der Mäuse, wurden aus dem Urin die Natrium-, Kalium- und Kalziumkonzentration und die Kreatininmenge zur Überprüfung der Urinkonzentration bestimmt. Unter der

Triamterenbehandlung wurde zusätzlich die Prostatinkonzentration im Urin vor und nach Behandlung bestimmt. Weiterhin wurde bei der LS/NP-Diät die im Kot enthaltene Natriummenge bestimmt.

Aus dem Blut, das einige Tage vor Behandlung und bei Behandlungsende abgenommen wurde, konnten im Plasma die Harnstoff-, die Aldosteron- und die Cystatin C-Konzentration bestimmt werden. Zusätzlich wurde eine venöse Blutgasanalyse durchgeführt.

### **Triamteren-Bolus-Versuch**

Um die Wirkung von Triamteren als Bolus zu untersuchen, wurde gesunden Mäusen aller drei Genotypen 5 µl/g Ampuwa® oder eine Triamterenlösung einer Dosis von 10 µg/g KG i.p. injiziert. Zunächst erfolgte die Injektion von Ampuwa® um einen Ausgangs- bzw. Kontrollwert zu erhalten. Nach ausreichender Regeneration wurde am Folgetag Triamteren verabreicht.

Nachdem die Blase durch eine Blasenmassage entleert und der Urin verworfen wurde, erfolgte die i.p. Gabe des Bolus von Vehikel oder Triamteren. Im Anschluss wurden die Mäuse über sechs Stunden in Einzelkäfigen gehalten und beobachtet. Der in dieser Zeit ausgeschiedene Urin wurde gesammelt. Nach sechs Stunden erfolgte eine erneute Gewichtsbestimmung der Mäuse, nachdem der noch in der Blase vorhandene Urin durch eine erneute Blasenmassage gewonnen wurde. Zusammen mit dem, schon während der sechs Stunden ausgeschiedenen Urin, entstand ein 6 h-Sammelurin, aus dem die Elektrolytkonzentrationen bestimmt werden konnte.

Die Injektionslösung wurde nach folgendem Procedere hergestellt:

1. Stammlösung: 40 mg Triamteren in 1000 µl DMSO lösen
2. Injektionslösung (pH 5 / 2 µg/µl Triamteren): 40 µl HCl (um die Löslichkeit von Triamteren zu verbessern), 4,71 ml Ampuwa® und 250 µl Stammlösung

### 2.2.2.3 Das experimentelle nephrotische Syndrom

Die Untersuchungen zum experimentellen nephrotischen Syndrom erfolgten in Normalkäfigen. Futter (Ssniff 9988) und Trinkwasser (Leitungswasser) stand den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung. Zwei Tage vor Induktion wurde begonnen, die tägliche Futter- und Trinkmenge sowie das Körpergewicht zu bestimmen. Ab diesem Zeitpunkt wurde zudem täglich durch Blasenmassage Spontanurin gewonnen.

Zur Induktion des experimentellen nephrotischen Syndroms wurde die einmalige Injektion einer Doxorubicindosis von 14,6 µg/g KG Männchen bzw. 13,8 µg/g KG Weibchen in den retrobulbären Venenplexus unter einer tiefen Isoflurannarkose gewählt. Während derselben Narkose konnte Kontrollblut gewonnen werden [64, 161, 162]. Nach Injektion wurden die Mäuse für zehn Tage beobachtet und täglich das Körpergewicht, die Futter- und Trinkmenge notiert so wie Proteinurie, Elektrolytexkretion und Kreatininmenge im täglichen Spontanurin bestimmt. Am Tag 10 erfolgte die Opferung durch zervikale Dislokation und Ausbluten.

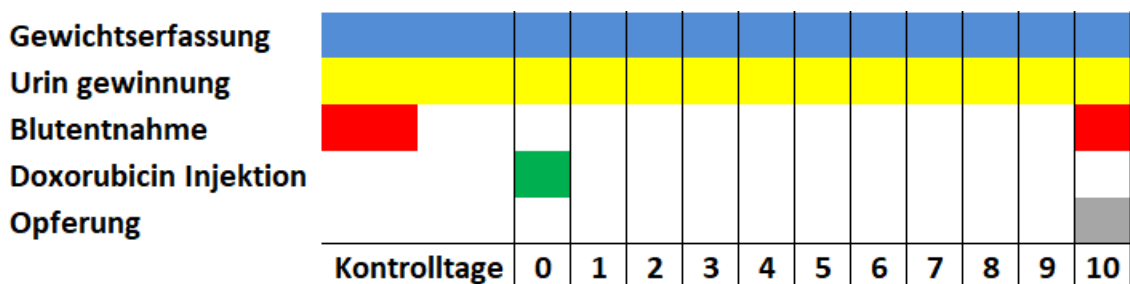


Abbildung 2-4 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

Um zu testen, inwieweit sich die Aktivierung des ENaC in nephrotischen Mäusen supprimieren lässt, wurde in einem Teilversuch analog zur Bolusinjektion in den gesunden Mäusen auch bei nephrotischen Mäusen eine Woche vor Induktion und bei bestehendem nephrotischen Syndrom Vehikel und Triamteren im Abstand von einem Tag gespritzt, der Urin für 6 Stunden gesammelt und die Natriurese verglichen.

## 2.2.3 Auswertung von Blut und Urinproben

### 2.2.3.1 Blutgasanalyse

Aus einem Teil des Kontrollbluts und des am Serienende gewonnenen Blutes wurde einer Blutgasanalyse (BGA) durchgeführt, hierfür wurde eine Natrium-Heparin-Kapillare mit 135  $\mu$ l Blut benötigt. Der Analyseautomaten IL GEM® Premier 3000 (Instrumentation Laboratory GmbH) ermittelte hieraus vollautomatisch:

- pH,
- $p\text{CO}_2$  [mmHg] und  $p\text{O}_2$  [mmHg]
- $\text{Na}^+$  [mmol/l],  $\text{K}^+$  [mmol/l] und  $\text{Ca}^{2+}$  [mmol/l],
- Hämatokrit [%]

und berechnete:

- $\text{Ca}^{2+}$  (pH 7,4) [mmol/l]
- $\text{HCO}_3^-$  [mmol/l], Standard- $\text{HCO}_3^-$  [mmol/l] und Base Excess [mmol/l]
- $\text{SO}_2\text{c}$  (kalkulierte Sauerstoffsättigung) [%]
- $\text{cHbc}$  (kalkulierte Hämoglobinkonzentration) [g/dl].

### 2.2.3.2 Elektrolytbestimmung im Urin

Die Elektrolytbestimmung im Urin erfolgte flammenphotometrisch mithilfe des Flammenphotometers EFUX 5057 (Eppendorf AG). Hierbei werden die Alkali- ( $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ ) sowie Erdalkalimetalle ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in einer Acetylenflamme verbrannt. Dabei wird Licht einer spezifischen Wellenlänge emittiert, dessen Intensität, beziehungsweise die Farbänderung bezogen auf die Flammenfarbe der Lithiumstandard-Lösung (500 mmol/l), mittels Farbfilter von einer Optik selektiv gemessen wird [163, 164]. Die Probe (20  $\mu$ l) wurde mit 1 ml Lithiumstandard-Lösung vermischt, durch Pressluft vernebelt und dem Acetylenbrenner zugeführt. Die Referenzbereiche des EFUX 5057 liegen bei  $\text{Na}^+$  10,0 - 300,0 mmol/l,  $\text{K}^+$  5,0 - 200,0 mmol/l,  $\text{Ca}^{2+}$  0,5 - 20,0 mmol/l. Sollte nicht genügend Probe vorhanden sein oder die gemessenen Werte außerhalb der Referenzbereiche liegen, so wurde die zu messende Probe in geringerer Menge manuell in einem Milliliter der Lithium-ml Lösung vermischt und diese Mischung manuell zur Messung in das

Flammenphotometer pipettiert. Der gemessene Wert musste anschließend mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Als geeignet hatten sich hierbei 4 µl oder 5 µl Probe erwiesen.

Zur Qualitätssicherung bestimmte das Gerät vor jeder Messreihe mehrere Leerwerte und Urin-Standardwerte (Na<sup>+</sup> 143,5mmol/l, K<sup>+</sup> 100mmol/l, Ca<sup>2+</sup> 5,00 mmol/l).

Um eine Vergleichbarkeit, zwischen den Ergebnissen zu erreichen wurde der gemessene Elektrolytwert auf den jeweiligen Kreatinin Wert normiert:

$$c_{(Elektrolyt)} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg Kreatinin}} \right] = \frac{c_{(Elektrolyt)} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right]}{c_{(Kreatinin)} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right]} * 100$$

### **2.2.3.3 Proteinbestimmung im Urin**

Die Konzentration von Protein im Urin wurde durch ein Bio-Rad Protein Assay nach der von Marion M. Bradford entwickelten Methode bestimmt [165]. Hierbei reagiert Coomassie-Brilliant-Blue G-250, ein rotbrauner Farbstoff, der in der vorgefertigten Lösung vorhanden ist, in saurer Lösung mit den kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen. Dadurch bildet sich ein Komplex und die Lösung schlägt in eine bläuliche Färbung um, wobei sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm verschiebt. Über eine photometrische Messung der Extinktion kann anhand einer Standardkurve die Proteinkonzentration bestimmt werden, die sich proportional zur Farbintensität des Farbumschlags verhält [165]. Ein Nachteil dieser Methode, ist dass die Farbreaktion je nach Protein variiert, so dass eine regelmäßige Kalibrierung und die richtige Wahl eines Standardproteins (z.B. Albumin) notwendig ist [166].

#### **Material:**

- Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate
- Destilliertes Wasser (z.B. Ampuwa®)



#### Durchführung der Messung:

Das Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate wurde 1:5 mit Ampuwa® verdünnt, um eine Arbeitslösung herzustellen.

Für die photometrische Messung wurden 2 µl der Probe/ Ampuwa® mit 1000 µl der Arbeitslösung in einer 1 cm Küvette zur Reaktion gebracht, gemischt und nach 10 min Inkubation (Raumtemperatur) bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gemessen. Die Konzentration berechnete das Photometer anhand einer auf Rinderserumalbumin (BSA) basierenden Standardkurve automatisch. Bei Werten größer als 10 g/l musste die Probe verdünnt nachgemessen werden, da diese Werte dann außerhalb des Referenzbereichs lagen. Die untere Nachweisgrenze dieses Tests lag dagegen bei 0,2g/l. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurde auch hierbei, wie auch bei den Elektrolyten, eine Normierung auf das Urin Kreatinin gewählt.

#### **2.2.3.4 Kreatinin Bestimmung**

Die Kreatinin Bestimmung erfolgte mit dem Kreatinin-Kit (LT-CR 0121) von LT-SYS® (Eberhard Lehmann GmbH) nach der Jaffé Methode in modifizierter Form ohne Enteiweißung [167]. Hierbei handelt es sich um eine kinetische Farbreaktion, bei der Kreatinin im alkalischen Milieu mit Pikrinsäure einen tiefgelben Komplex bildet, dessen Farbintensität von der Kreatininkonzentration abhängt. Durch die Bestimmung der Extinktion ist es möglich, die Kreatininkonzentration zu ermitteln, da sie sich proportional zum Anstieg der Extinktion bezogen auf den Ausgangswert verhält.

#### Material:

- Inhalt des Kits:
  - Natronlauge (NaOH) (400 mmol/l)
  - Pikrinsäure (55 mmol/l)
  - Standard (Kreatinin 2,0 mg/dl)
- Nicht im Kit:
  - Destilliertes Wasser (z.B. Ampuwa®)

#### Durchführung der Messung:

Durch Mischen von Natronlauge, Ampuwa® und Pikrinsäure im Verhältnis 4:3:1 wurde die Arbeitslösung vorbereitet.

Bei der Messung wurde 10 µl der Probe/Standard/ Ampuwa® mit 200 µl der Arbeitslösung in einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Reaktion gebracht, gemischt und sofort bei einer Wellenlänge von 492 nm automatisiert durch einen Mikroplattenleser gemessen. Nach 8 min Inkubationszeit erfolgte die zweite Messung. Bei jeder Messreihe wurden je zwei Standardwerte und zwei Leerwerte mitbestimmt.

Die Kreatininkonzentration wurde durch die jeweiligen Extinktionsdifferenzen wie folgt berechnet:

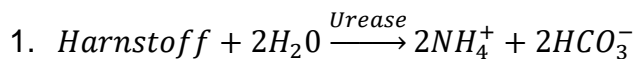
$$\Delta_{Absorption} = Absorption_{(t=8min)} - Absorption_{(t=0min)}$$

$$C_{Kreatinin} \left[ \frac{mg}{dl} \right] = \frac{(\Delta_{Probe} - \Delta_{Nullwert})}{(\Delta_{Standard} - \Delta_{Nullwert})} * C_{Standard} * Verdünnungsfaktor$$

Da der verwendete Test nur einen Referenzbereich bis zu einer Konzentration von 300 mg/dl hatte, mussten höhere Konzentrationen mit Ampuwa® verdünnt und der Verdünnungsfaktor in die Berechnung mit einbezogen werden. Laut Protokoll lag die untere Nachweisgrenze bei 0,03 mg/dl. Aufgrund von Erfahrungswerten schlug der Hersteller für Urinproben eine Verdünnung von 1:20 mit entionisiertem oder destilliertem Wasser vor. In den vorliegenden Versuchen wurde daher üblicherweise diese Verdünnung gewählt. Nur bei sehr geringen Konzentrationen von Kreatinin im Urin (ab einem  $\Delta_{Absorption} \leq 0,18$ ) wurde hierbei auf eine 1:10 Verdünnung ausgewichen und die Messung mit dieser Verdünnung wiederholt.

### 2.2.3.5 Bestimmung der Plasma-Harnstoff-Konzentration

Die Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Plasma erfolgte durch das Messkit (LT-UR0010) von LT-SYS® (Eberhard Lehmans GmbH), welches es ermöglichte die Harnstoffkonzentrationen über eine vollenzymatische UV-Methode in geringen Probenvolumina zu bestimmen [168]. Die enzymatische Umwandlung von Harnstoff durch Urease und Glutamat Dehydrogenase (GLDH) erfolgte in 2 Schritten.



Die abnehmende NADH Konzentration wurde photometrisch durch die Extinktion bei 340 nm bestimmt. Die Harnstoffkonzentration kann hiervon abgeleitet werden, da sie sich proportional zur NADH Konzentration verhält.

## Material

- Inhalt des Kits:
  - Enzym (Urease  $\geq 4000$  U/l und Glutamat Dehydrogenase  $\geq 9000$  U/l)
  - Puffer (TRIS-Puffer pH 7,8 100 mmol/l, Ketoglutarat 6 mmol/l, NADH 0,2 mmol/l, ADP 2 mmol/l, EDTA 4 mmol/l, Stabilisatoren)
  - Standard (Harnstoff 40 mg/dl)
- Nicht im Kit:
  - Destilliertes Wasser (z.B. Ampuwa®)

## Durchführung der Messung

Durch das Lösen des Enzyms durch den Puffer (16 ml Puffer zum Enzym geben) entstand die Arbeitslösung.

Plasma konnte unverdünnt gemessen werden.

Für die manuelle photometrische Messung wurden 3  $\mu$ l Probe/Standard/Ampuwa® mit 300  $\mu$ l Arbeitslösung in einer 1 cm Küvette zur Reaktion gebracht, gemischt und sofort bei 340nm gemessen, nach 8 min Inkubationszeit erfolgte die zweite Messung. Bei jeder Messreihe erfolgte die Messung von zwei Standardwerten und zwei Leerwerten.

Die Harnstoffkonzentration berechnete sich wie folgt:

$$\Delta_{Absorption} = Absorption_{(t=0min)} - Absorption_{(t=8min)}$$

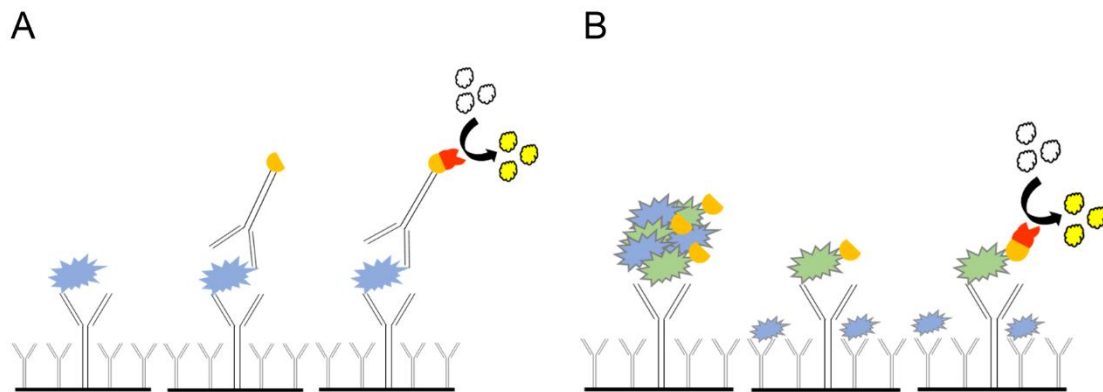
(Die Absorption sank bei diesem Test)

$$C_{Harnstoff} \left[ \frac{mg}{dl} \right] = \frac{(\Delta_{Probe} - \Delta_{Nullwert})}{(\Delta_{Standard} - \Delta_{Nullwert})} * C_{Standard} * Verdünnungsfaktor$$

Der Test war auf Harnstoffkonzentrationen zwischen 2 und 300 mg/dl ausgelegt, höhere Konzentrationen mussten verdünnt gemessen werden, wobei der Verdünnungsfaktor mit in die Berechnung einbezogen werden musste.

### 2.2.4 ELISA und EIA zur Bestimmung der Aldosteron-, Cystatin C- und Prostatinkonzentration

Für die Bestimmung der Prostatinkonzentration aus dem Urin und den Plasmakonzentrationen von Aldosteron und Cystatin C wurde das antikörperbasierte Verfahren des Enzyme linked immunoabsorbend Assay (ELISA) verwendet, das es ermöglicht die Konzentration in der Probe über eine enzymatische Farbreaktion zu bestimmen [169]. Hierbei wurde für Prostatin und Cystatin C ein sogenannter „Sandwich-“ ELISA verwendet, während die Aldosteronkonzentration über einen kompetitiven ELISA bestimmt wurde.



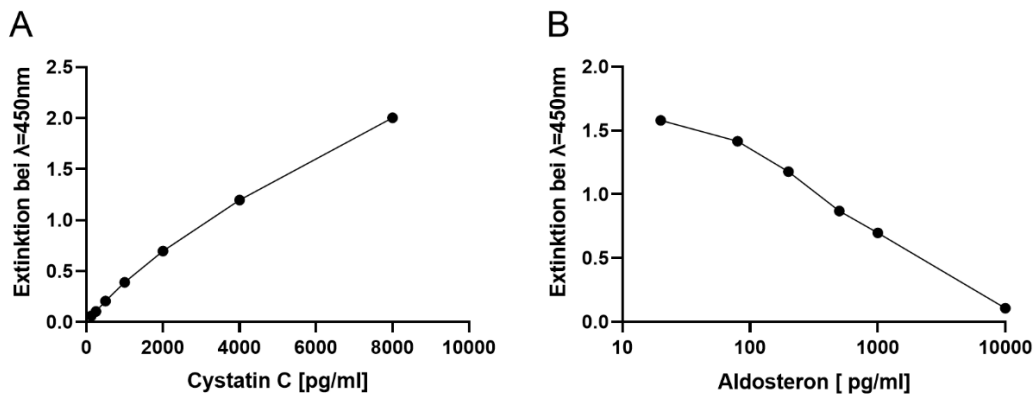
**Abbildung 2-5 Schema der Funktion von Sandwich ELISA und kompetitivem ELISA**

Funktion eines Sandwich-ELISA (A), von links nach rechts sieht man zunächst die Bindung des Analyten (blau) an den „capture“-Antikörper, mit dem die Mikrotiterplatte beschichtet ist. Im zweiten Schritt wird der „detection“ Antikörper hinzugegeben, der ebenfalls an das Antigen bindet. Im dritten Schritt ist die (rot) Horseradish Peroxidase (HRP) an den Antikörper gebunden und wandelt das Tetramethylbenzidin-(TMB) Substrat um, das zu einem Farbumschlag führt, schematisch dargestellt durch die Änderung von farblos zu gelb.

Daneben wird die Funktion des kompetitivem ELISA (B) gezeigt. Hier wird ein Gemisch aus Analyt (blau) und markiertem Antigen (grün) einer bekannten Konzentration auf die mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Im zweiten Schritt wird nicht gebundenes Antigen entfernt. Im dritten Schritt wird TMB hinzugegeben, das durch die über Avidin Biotin-markierte Antigene gekoppelte HRP (rot) umgewandelt wird, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt.

Bei einem „Sandwich“-ELISA, wird eine Mikrotiterplatte mit einer „capture“-Antikörper-Beschichtung verwendet, die das Antigen aus der Probe binden kann. Nach Waschschrinen, die das überschüssige, nichtgebundene Antigen entfernen, wird ein zweiter, an ein Enzym (bspw. Horseradish Peroxidase „HRP“) gekoppelter Antikörper hinzugegeben. Dieser „detection“-Antikörper bindet an ein weiteres Epitop des Antigens, während nichtgebundene Antikörper erneut durch Waschschrine entfernt werden. Hiernach wird ein Substrat (meist Tetramethylbenzidin „TMB“) hinzugegeben, das durch das mit dem Antikörper konjugierte Enzym umgesetzt wird und dadurch die Farbe ändert. Nach Beenden der Enzymreaktion durch Zugabe einer Stopplösung (z.B. HCl oder H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kommt es erneut zu einem Farbumschlag. Über die photometrisch bestimmte Extinktion kann anhand einer mitbestimmten Standardkurve die Konzentration der zu analysierenden Substanz bestimmt werden, die direkt proportional zur Höhe der Extinktion ist. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass das Antigen nicht aufgereinigt werden muss und der Test sehr spezifisch ist. Allerdings muss das Antigen zwei Epitope besitzen, an dem beide Antikörper spezifisch binden

können. Nachteilig ist weiterhin, dass für die Durchführung zwei Antikörper benötigt werden, die generiert und aufgereinigt werden müssen und der ELISA aufgrund der Anzahl von Schritten zeitintensiv ist.



**Abbildung 2-6 Standardkurven für den „Sandwich“-ELISA und den kompetitiven ELISA**

Eigene Standardkurven eines „Sandwich“ (Cystatin C) (A) und eines kompetitiven Aldosteron ELISA (B), die x-Achse des kompetitiven ELISA ist hierbei logarithmisch dargestellt

Mit dem kompetitiven ELISA bzw. dem Enzymgekoppelten Immun Assay (EIA) (hier das Aldosteron-Kit) misst man die Konzentration des Antigens durch die kompetitive Bindung der zu testenden Substanz gegen ein enzymmarkiertes Antigen einer bekannten Konzentration. Auch hier wird eine mit „capture“-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte verwendet, auf welche die Probe, vermischt mit einer bekannten Menge eines enzymmarkierten Antigens, gegeben wird. Nichtgebundenes Antigen wird, wie beim Sandwich-ELISA, durch Waschschriffe entfernt und anschließend Enzymsubstrat hinzugegeben, so dass es zu einem Farbumschlag kommt. Diese Farbe verändert sich noch einmal beim Hinzugeben der Stopplösung, durch das Beenden der Reaktion. Anschließend kann die Extinktion photometrisch gemessen werden. Beim kompetitiven ELISA ist diese umgekehrt proportional zur Konzentration in der Probe. Berechnet wird die Konzentration über eine mitgemessene Standardkurve. Auch beim kompetitiven ELISA kann ein Antigen verwendet werden, das nicht zuerst aufgereinigt werden muss. Aufgrund der umgekehrt proportionalen Signalstärke, ist es hierbei der Vorteil, dass auch bei geringen Antigenmengen in einer Mischung verschiedener Antigene, noch ein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden kann

### 2.2.4.1 Bestimmung der Plasma-Aldosteron -Konzentration

#### Material:

- Inhalt des Kits:
  - Mikrotiterplatte beschichtet mit Antikörper gegen Aldosteron
  - Enzymkonjugat (Aldosteron-HRP Konjugat, in Protein-Puffer)
  - Standardproben A bis F lyophilisiert (c=0; 20; 80; 200; 500; 1000 pg/ml)
  - Positivkontrolle lyophilisiert
  - Negativkontrolle lyophilisiert
  - Substratlösung Tetramethylbenzidin (TMB).
  - TMB Stopplösung (0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
  - Waschpuffer, Konzentrat (40x)

#### Durchführung:

Für den kompetitiven Aldosteron-ELISA wurden zunächst 25 µl der Proben, der 6 Standardlösungen und der zwei Kontrolllösungen mit jeweils 100 µl des im Test-Kit enthaltenen Enzymkonjugats vermischt. Dieses Gemisch wurde anschließend in die mit polyklonalen Aldosteronantikörpern beschichteten Wells pipettiert und nach Versiegelung für 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünfmal mit der Waschpufferlösung gewaschen und auf einem Zellstofftuch ausgeklopft. Nach Hinzugabe der TMB-Substratlösung (200 µl je Well) wurde die Platte erneut versiegelt und ein weiteres Mal für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von 100 µl der TMB-Stopplösung unterbrochen und die Platte innerhalb von 10 Minuten bei 450 nm im Photometer gemessen. Aus den Standardwerten berechnete sich eine Standardkurve, an der die Konzentrationen der Proben direkt abgelesen werden konnten. Zum Erstellen der Standardkurve wurden hierfür die logarithmierten Konzentrationen verwendet und die Konzentrationen der Proben in pg/ml angegeben.

### 2.2.4.2 Bestimmung der Urin-Prostasin -Konzentration

#### Material:

- Inhalt des Kits:
  - Anti-Maus Prostasin Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte
  - Lyophilisierter rekombinanter Maus Prostasin Standard (50ng)
  - Biotinylierter Anti-Maus-Prostasin-Antikörper
  - Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (ABC)
  - Verdünnungspuffer für Proben
  - Verdünnungspuffer für Antikörper
  - Verdünnungspuffer für ABC
  - Substratlösung Tetramethylbenzidin (TMB)
  - TMB Stopplösung
  - Verschlussfolien
- Nicht im Kit:
  - Waschpuffer (0,01M Tris-buffered saline „TBS“)

#### Durchführung:

Im ersten Schritt wurden die Standards (25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,125 ng/ml, 1,5625 ng/ml, 0,78125 ng/ml und 0 ng/ml) aus der 50 ng/ml Standardlösung unter Verwendung des im Kit enthaltenen Verdünnungspuffers für Proben hergestellt. Die Proben wurden, davon ausgehend, dass nur eine geringe Konzentration an Prostasin vorlag, im Verhältnis 1:10 auf 100 µl Gesamtvolumen mit dem Verdünnungspuffer für Proben verdünnt. Die Verdünnung wurde gewählt, um ein Messergebnis möglichst zentral im linearen Bereich zu erhalten. 100 µl der Standard- und Testproben wurden im nächsten Schritt in die mit Anti-Maus-Prostasin beschichteten Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde versiegelt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Platte verworfen, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Platte zu keinem Zeitpunkt austrocknete. Es wurden 100 µl des 1:100 mit dem Antikörperpuffer verdünnten biotinylierten anti-Maus-Prostasin Antikörpers in die Wells pipettiert, die Platte erneut versiegelt und bei 37°C für 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit 0,01M TBS gewaschen, wobei bei jedem Waschschrift das TBS etwa eine Minute in den Wells zu verbleiben hatte. Anschließend wurde die Platte auf Zellstofftüchern ausgeklopft und 100 µl des mit Puffer auf 1:100 verdünnten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes hinzugegeben. Die Platte wurde ein weiteres Mal versiegelt und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Auf die Inkubation folgte erneut ein fünfmaliges Waschen der Platte mit TBS. 90 µl TMB-Substratlösung wurden hinzugegeben und die Platte versiegelt für 25-30 min bei 37°C inkubiert, wobei die Platte durch Aluminiumfolie vor Licht geschützt wurde. Im letzten Schritt wurden 100 µl TMB-Stopplösung hinzu pipettiert und innerhalb von 30 min die Absorption bei 450 nm bestimmt.

Abschließend wurde aus den Standardproben eine Standardkurve erstellt, die zur Bestimmung der Probenkonzentration verwendet wurde. Die Konzentration der Proben wurde in ng/ml angegeben. Proben mit Konzentrationen oberhalb des höchsten oder unterhalb des geringsten Standards wurden erneut mit einem anderen Faktor verdünnt und nachgemessen.

### 2.2.4.3 Bestimmung der Plasma-Cystatin C-Konzentration

#### Material:

- Inhalt des Kits:
  - Mikrotiterplatte mit polyklonalem Antikörper spezifisch für Mäuse/Ratten-Cystatin C
  - Cystatin C-Konjugat mit HRP-konjugiertem-polyklonalem Mäuse/Ratten-spezifischem-Cystatin C-Antikörper
  - Rekombinanter Maus/Ratten Cystatin C-Standard
  - Rekombinante Maus/Ratten Cystatin C-Kontrolle
  - Verdünnungspuffer
  - Kalibrierungspuffer RD5-26 Konzentrat
  - Waschpuffer Konzentrat (25x)
  - Farbreagenz A (stabilisiertes Wasserstoffperoxid)
  - Farbreagenz B Tetramethylbenzidin (TMB)
  - Stopplösung (Salzsäure HCl)
  - Verschlussfolien

#### Durchführung:

Im ersten Schritt wurden die Standards (4000 pg/ml, 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml) aus der 8000 pg/ml Standardlösung unter Verwendung des im Kit enthaltenen Puffers (Kalibrierungspuffer RD5-26 Konzentrat wurde 1:4 mit Ampuwa® verdünnt) für Proben hergestellt.

Die zu messenden Proben wurden, wie vom Hersteller empfohlen, im Verhältnis 1:200 unter Verwendung des Puffers verdünnt. Die Kontrollprobe wurde in Ampuwa® aufgelöst und dann unverdünnt verwendet.

Nach Durchführung dieser Vorbereitungen wurden 50 µl des Verdünnungspuffers und 50 µl der Standards/Proben/Kontrolle in die mit Cystatin-C-Antikörper beschichteten Wells der Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurde die versiegelte Platte bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Platte mit Waschpuffer fünfmal gewaschen und auf Zellstofftüchern ausgeklopft. 100µl des konjugierten Antikörpers wurden in die Platte pipettiert und die Platte erneut versiegelt und für zwei Stunden inkubiert.

Auf die Inkubation folgte erneut ein fünfmaliges Waschen der Platte unter Verwendung des Waschpuffers. Aus Farbreagenz A und Farbreagenz B wurde die Substratlösung hergestellt und davon jedem Well 100 µl hinzugegeben.

Unter Lichtschutz durch eine Aluminiumfolie inkubierte die Platte ein weiteres Mal für 30 min. Die Reaktion wurde durch 100 µl Stopplösung beendet und die Platte innerhalb von 30 min im Photometer gemessen. Hierbei wurde die Absorption bei 540 oder alternativ bei 570 nm gemessen.

Aus den Standardwerten wurde eine Standardkurve gebildet, von der die Konzentrationen der Proben in pg/ml abgelesen werden konnten.



## **2.2.5 Gewebeanalysen**

### **2.2.5.1 Histologie**

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Mäuse aller drei Genotypen in zwei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe bekam für zwei Tage dem Trinkwasser Triamteren (200 mg/l) zugesetzt, die andere Gruppe diente als Kontrollgruppe. Die Nieren der Versuchsmäuse wurden nach der Opfierung entnommen und in einer vierprozentigen Formalinlösung aufbewahrt. Die nephropathologische Abteilung des Pathologischen Instituts am Universitätsklinikum Erlangen untersuchte die Nieren anschließend. Die Nieren wurden histologisch aufgearbeitet und immunhistochemisch auf die  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Untereinheiten des ENaC angefärbt. Im Anschluss konnten so die Expression und die Verteilung der Untereinheiten verglichen werden.

### **2.2.5.2 Western Blot**

Beim Western Blot handelt es sich um ein Nachweisverfahren für Proteine [170, 171], hierbei wird die Probe in verschiedenen Schritten aufbereitet und das Proteingemisch der Probe aufgetrennt, bevor das gesuchte Protein immunologisch nachgewiesen wird. Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch eine Gelelektrophorese, bei der ein gerichtetes elektrisches Feld an das mit den Proteinen beladene SDS-Polyacrylamid Gel angelegt wird. Die negativ geladenen Proteine wandern hierdurch in Richtung der Anode, und werden so ihrer Masse nach aufgetrennt. Anschließend erfolgt ein Transfer auf eine Nitrocellulosemembran [172], das so genannte Blotten. Das durch die Gelelektrophorese erhaltene Muster der Proteinverteilung innerhalb der Membran bleibt beim Blotten vorhanden, so dass verschiedene Untereinheiten eines Proteins nachgewiesen werden können. Auch ist es durch eine Leiter aus normierten Proteingrößen möglich, die Masse der einzelnen Banden zu bestimmen. Nach dem Blotten müssen mögliche freie Proteinbindungsstellen mit einem Protein abgesättigt werden, so dass nach Inkubation mit einem spezifischen Antikörper nur die gesuchten Proteine markiert werden. Nach Inkubation mit einem für das Protein spezifischen Primärantikörper erfolgt eine erneute Inkubation mit einem Sekundärantikörper. Dieser ist mit einer Markierung versehen, die beispielsweise in einem Nahinfrarotspektroskopiescanner

gemessen werden kann. Das Bild dieses Scans kann dann sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet werden [173].

## **Isolation der Membranproteine**

### **Material:**

- cOmplete™, Mini, Proteasehemmer-Cocktail EDTA-frei
- Sucrose Lyse Puffer (250 mmol/l Sucrose, 10 mmol/l Triethanolamin, 1,6 mmol/l Ethanolamin, 0,5 mmol/l EDTA)
- Aprotinin (40 µg/ml)
- Homogenisator Dounce
- Skalpell
- Pinzette

### **Durchführung:**

Im ersten Schritt wurden die gefrorenen Nieren halbiert und der Cortex abpräpariert. Dieser wurde zusammen mit 1 ml Sucrose Lyse Puffer, cOmplete™ und Aprotinin in einen Glaspotter überführt und dort für 2 min homogenisiert. Das Homogenisat wurde in einem Eppendorfcup für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für weitere 15 min bei 1000 rcf zentrifugiert, wobei die Beschleunigungs- und Abbremszeiten ausgedehnt wurden.

Der Überstand wurde abpipettiert und erneut für 30 min, gekühlt mit 20800 rcf zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 75-100 µl eiskaltem Sucrose Lyse Puffer überführt und resuspendiert.

Das Produkt konnte dann entweder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren oder sofort verwendet werden

## **Probenaufbereitung**

Zunächst erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge analog zur Proteinbestimmung aus dem Urin. Im Anschluss erfolgte je nach Protokoll die Denaturierung und ggf. die Deglycosylierung mit PNGaseF. Hierbei war es wichtig genügend Probe aufzubereiten, um eine Lademenge von 25 µg Protein pro Ladetasche zu gewährleisten, in der Folge beispielsweise 3 µg/µl.

### Denaturierung und Deglycosylierung mit PNGaseF:

10 µl Lysat wurden mit 1,5 µl GDB 10x und 3,5 µl H<sub>2</sub>O vermischt. Dadurch entstand ein Gemisch mit einer Konzentration von 2 µg/µl Protein. Dieses wurde in der Folge für 10min bei 70°C mit 800 rpm denaturiert. Ein Volumen von 14 µl dieses Lysats wurde dann mit 2,5 µl GlycoBuffer (10x), 2,5µl NP40 10% und 4,6 µl H<sub>2</sub>O für eine Stunde bei 37°C und 800rpm inkubiert um sie zu deglycosylieren. Die fertige Probe konnte anschließend für die Elektrophorese verwendet werden. Bei Verwendung von 22,3 µl wurden so 25 µg Protein geladen.

### Denaturierung ohne PNGaseF Behandlung:

10 µl Lysat wurden hierbei mit 2,5 µl Laemmli Puffer 5x vermischt. Dadurch entstand eine Konzentration von 25 µg/ 10,4 µl Protein. Das Gemisch wurde in der Folge für 10 min bei 70°C mit 800 rpm denaturiert und konnte dann für die Elektrophorese verwendet werden.

### **Gelelektrophorese und Blotting**

Für die Elektrophorese wurde ein SDS-Polyacrylamid Gel verwendet. Die gewählte Konzentration des Gels wurde hierbei je nach Protein und Proteingemisch individuell gewählt. Nach dem Befüllen der Ladetaschen mit Proben und Leiter wurde eine Spannung zwischen 80 und 200 Volt angelegt, wodurch die Proteine dem elektrischen Gradienten folgend durch das Gel wandern. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Protein vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet.

### **Färbung und Antikörper**

Zunächst wurde hierbei eine Gesamtproteinfärbung (Revert Total Protein Stain) durchgeführt. Dadurch war eine Vergleichbarkeit der Proteinmenge zwischen den Proben auf dem Blot möglich. Im Anschluss wurde der Blot zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit einer Blockierungslösung (bspw. LI-COR blocking buffer) inkubiert.

Zur Markierung der gesuchten Proteine wurde die Membran nach dem Blocken über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert.

Ein infrarotmarkierter Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet wurde im nächsten Schritt mit der Membran inkubiert, dadurch konnte in einem Nahinfrarotspektroskopiescanner die Proteinbande sichtbar gemacht und ein Bild gespeichert werden.

### **Auswertung**

Die Auswertung wurde mit den Programmen Image Studio und Empiria der Firma Licor durchgeführt. Die Banden händisch oder mittels eines Algorithmus markiert und die Signalintensität im Vergleich zum Hintergrund bestimmt. Anhand einer Messung der Gesamtproteinmenge wurden sowohl die einzelnen Banden als

auch die geblottete Gesamtproteinmenge der jeweiligen Spur normiert und konnten somit untereinander und zwischen den einzelnen Spuren verglichen werden. Die Masse der jeweiligen Proteine in den Banden wurde anhand einer normierten Leiter gemessen und in kDa angegeben.

### **2.2.5.3 Genotypisierung**

Die Genotypisierung der Mäuse auf den Prss8-R44Q und den Prss8-S238A knock-in erfolgte mit dem Gewebe, dass bei der Markierung der Mäuse durch Ohrlöcher gewonnen wurde. Für die Genotypisierung wurde zunächst die g-DNA aus dem Gewebe extrahiert und anschließend mit den zugehörigen Primern eine PCR durchgeführt. Das Produkt der PCR wurde dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA angefärbt, so dass die Banden ausgewertet werden konnten. Je nach Bandenmuster konnte so zwischen wildtyp, heterozygoten und knock-in Mäusen unterschieden werden.

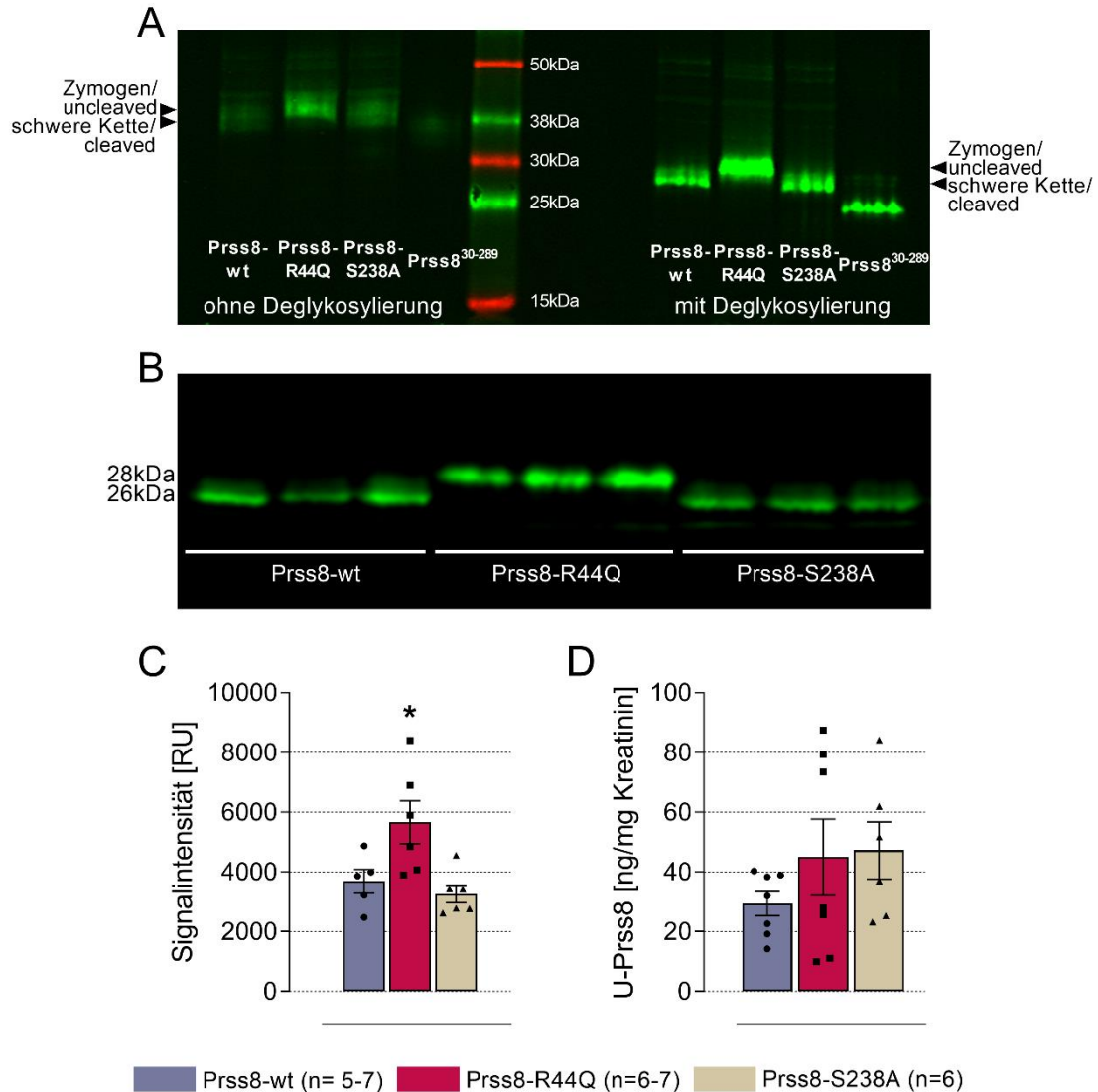
### **2.2.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte unter der Verwendung von Microsoft Office Excel 2010 / 365 und der Statistiksoftware GraphPad Prism 9. Wenn nicht darauf verwiesen wird, handelt es sich bei den angegebenen Werten um den Mittelwert und den Standardfehler (SEM). Die Anzahl der einzelnen Mäuse wird als „n“ angegeben.

Zur Überprüfung der Normalverteilung wurden folgende Tests verwendet: Anderson-Darling Test, D'Agostino & Pearson normality test, Shapiro-Wilk Test und Kolmogorov-Smirnov Test. Sobald ein Test eine zu kleine Stichprobe oder keine Normalverteilung anzeigte, wurden die Daten als nicht-normalverteilt behandelt. Zur Varianzanalyse wurde bei Normalverteilung der One-way ANOVA und bei nicht normalverteilten Werten der Kruskal-Wallis Test gewählt. Eine Signifikanzanalyse erfolgte über den Dunnett's test Posttest und den gepaartem oder den ungepaartem Student's t-test wenn es sich um normalverteilte Werte handelte. Im Falle von nicht normalverteilten Werten wurde der Dunn's Posttest oder der Mann-Whitney U-test verwendet. Die Signifikanztestung der Kaplan-Maier Kurven erfolgte durch den Log rank (Mantel Cox) Test. Ein p-Wert von <0,05 wurde als signifikant gewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Prostasinexpression



**Abbildung 3-1 Renale Prostasinexpression und -exkretion in den Urin (publiziert in [174])**

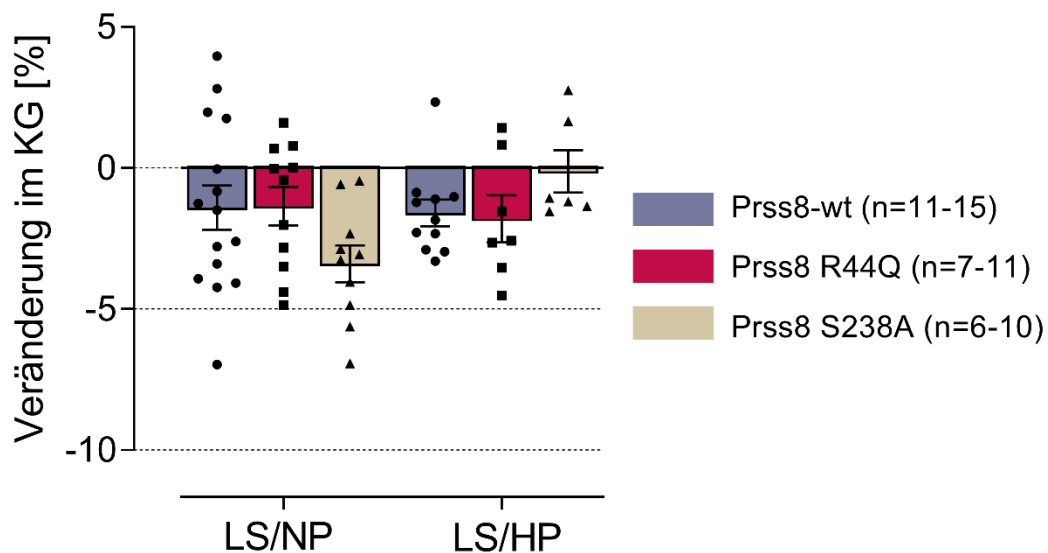
Es werden (A) die verschiedenen Prostasinmutanten in gesunden Nieren im Vergleich zu einem rekombinanten Prostasin (Prss8<sup>30-289</sup>) gezeigt, links im Bild ohne Deglykolisierung mit PNGaseF rechts im Bild nach PNGaseF Behandlung. Weiterhin wird die Prostasinexpression in der Niere zwischen den Genotypen verglichen (B) und die densitometrische Auswertung gezeigt (C). Die Ausscheidung von Prostasin über den Urin ist in ng/ mg Kreatinin dargestellt (D).

Die Untersuchung von gesunden Nieren aller drei Gruppen im Vergleich zu einem rekombinanten Prostasin (Prss8<sup>30-239</sup>), zeigte an unbehandelten Proben eine breite Bande über mehrere kDa (Prss8-wt ca. 39 kDa, Prss8-R44Q ca. 41 kDa, Prss8-S238A ca. 39 kDa und Prss8<sup>30-239</sup> ca. 37 kDa). Nach einer

Deglycosylierung mit PNGaseF zeigten sich dagegen klare Banden welche 12-13 kDa kleiner als zuvor waren (Prss8-wt und Prss8-S238A 26kDa, Prss8-R44Q 28 kDa und Prss8<sup>30-239</sup> ca. 25 kDa). Auffallend war hierbei vor allem, dass Prss8-R44Q größer war als Prss8-wt und Prss8-S238A. Im Vergleich der Expression von Prostatin im Nierengewebe zeigte diese sich bei Prss8-R44Q signifikant erhöht. Die Prostatinsekretion über den Urin war dagegen in allen Genotypen ähnlich.

### 3.2 Natriumkonservierung unter salzarmen Diäten

Alle drei Genotypen tolerierten sowohl die Natriumsalz- (LS/NP) als auch die Natriumsalz/Hochkalium- (LS/HP) Diät.

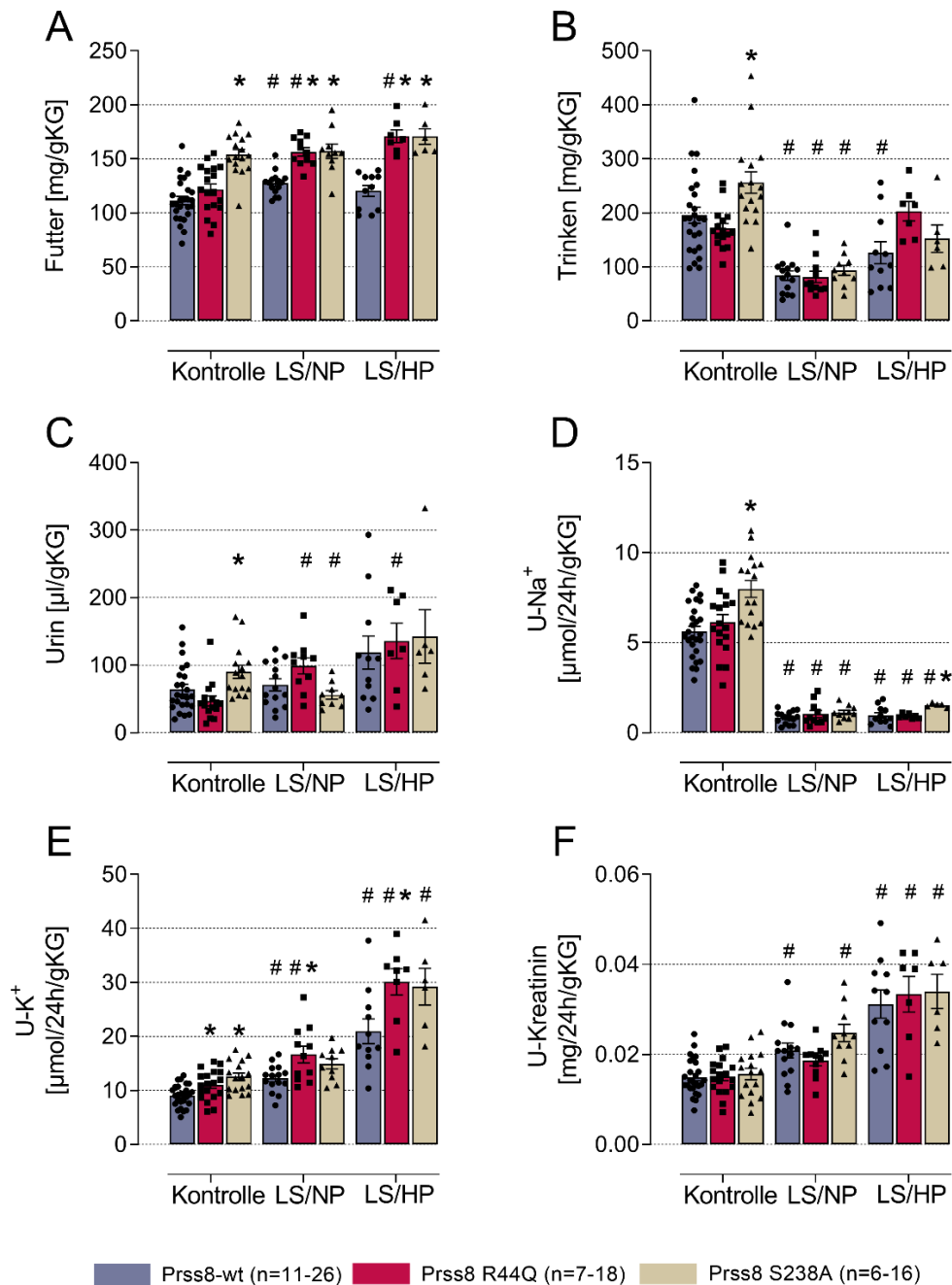


**Abbildung 3-2 Gewichtsveränderung unter Diäten (publiziert in [174])**

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM der Gewichtsveränderung unter LS/NP- und LS/HP-Diät in Prozent im Vergleich zur Kontrolle.

Es zeigte sich, dass Prss8-S238A und Prss8-R44Q Mäuse im Vergleich zu Prss8-wt Mäusen, unter LS/NP- wie auch unter LS/HP-Diät in ähnlichem Ausmaß an Gewicht verloren. Die durchschnittliche Gewichtsabnahme im Vergleich zur Kontrolle unter LS/NP-Diät betrug bei Prss8-wt  $-1,4 \pm 0,8$  %, bei Prss8-R44Q  $-1,4 \pm 0,7$  % und bei Prss8-S238A  $-3,4 \pm 0,7$  % ( $p=0,13$ ). Unter LS/HP-Diät betrug die durchschnittliche Gewichtsabnahme bei Prss8-wt  $-1,6 \pm 0,5$  %, bei Prss8-

R44Q  $-1,8 \pm 0,8 \%$  und bei Prss8-S238A  $-0,1 \pm 0,8 \%$  ( $p=0,16$ ). Damit blieb die Gewichtsabnahme bei allen Gruppen unter  $5 \%$  im Vergleich zum Ausgangsgewicht.



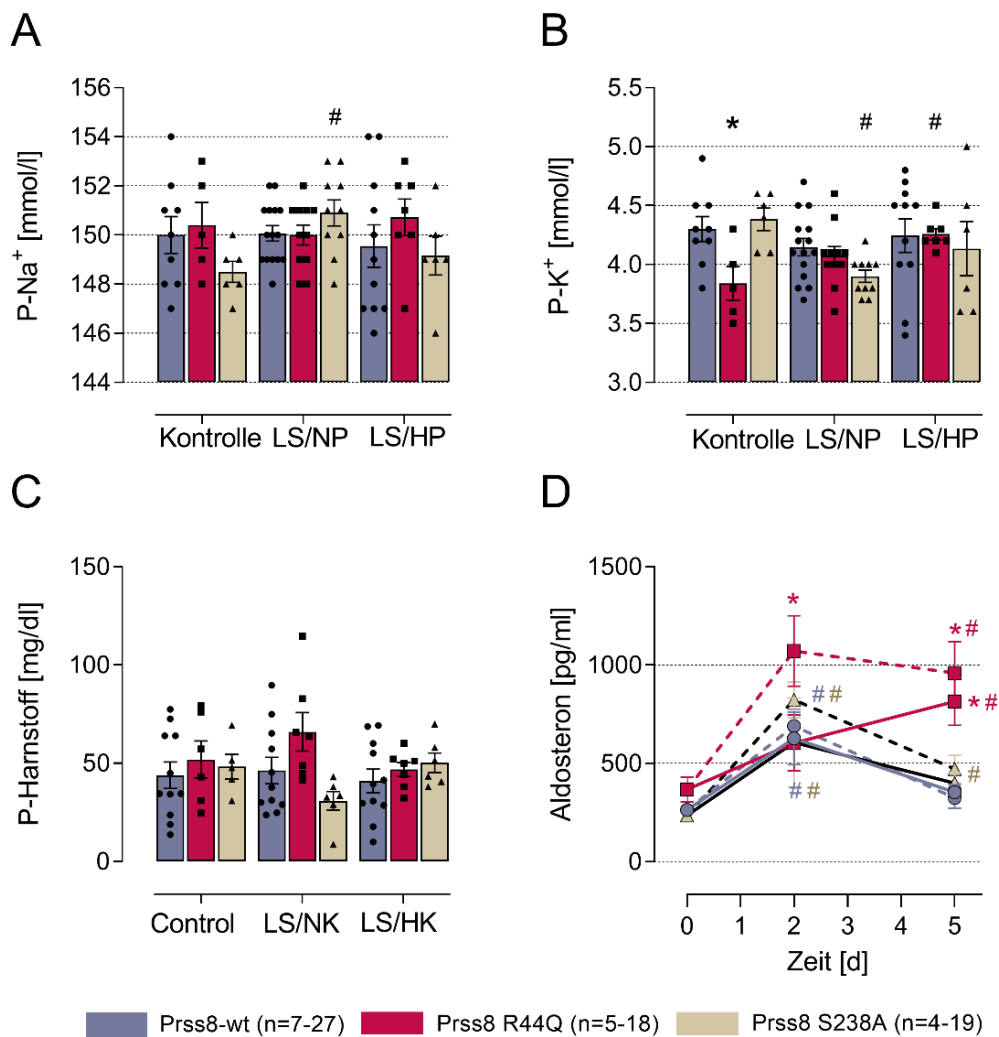
**Abbildung 3-3 Einfuhr und Ausscheidungsparameter bei den Diäten (publiziert in [174])**

Es werden die Futter- (A) und Trinkmengen (B) in mg/g KG, die Urinmengen (C) in  $\mu$ l/g KG der Genotypen unter Kontrollbedingungen und unter den Diäten, sowie die Ausscheidungsparameter Urin-Natrium (D), de Urin- Kalium (E) in  $\mu$ mol/24h/gKG und die im Urin enthaltene Kreatininmenge (F) in mg/24h/g KG gezeigt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM \*:  $p < 0,05$  bezogen auf Prss8-wt #:  $p < 0,05$  bezogen auf die jeweiligen Kontrollwerte

Schon unter Kontrollbedingungen konnte ein Unterschied in der Trink- und Futtermenge gemittelt auf das Körpergewicht der Mäuse zwischen den Genotypen beobachtet werden. So zeigte sich eine höhere Fress- und Trinkmenge bei Prss8-S238A Mäusen. Die höhere Fressmenge blieb auch unter LS-Diät (Prss8-wt  $127 \pm 3$  mg/gKG, Prss8-R44Q  $157 \pm 4$  mg/gKG, Prss8-S238A  $157 \pm 6$  mg/gKG) und unter LS/HP-Diät (Prss8-wt  $120 \pm 5$  mg/gKG, Prss8-R44Q  $171 \pm 6$  mg/gKG, Prss8-S238A  $171 \pm 7$  mg/gKG) erhalten. Auch die Prss8-R44Q Mäuse hatten bei den Diäten eine höhere Fressmenge als die Prss8-wt Mäuse. Die Trinkmenge glich sich unter den Diäten an, wobei die Mäuse aller Genotypen unter der LS/HP-Diät im Vergleich zur Kontrolle mehr tranken.

Unter Kontrollbedingungen kam es zu einer höheren 24 Stunden-Natrium- und Kalium-Ausscheidung, bei den Prss8-S238A Mäusen, während die Prss8-R44Q Mäuse eine im Vergleich zu den Prss8-wt Mäusen höhere Kaliumausscheidung zeigten. Die Natriumausscheidung sank unter LS/NP auf Prss8-wt  $0,8 \pm 0,1$   $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$ , Prss8-R44Q  $1,0 \pm 0,2$   $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$ , Prss8-S238A  $1,1 \pm 0,1$   $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$ , was eine Abnahme im Vergleich zu den Kontrollbedingungen darstellte. Ebenso war die Natriumausscheidung bei LS/HP erniedrigt. Unter LS/HP-Diät kam es zu einer, im Vergleich zu den Kontrollbedingungen, erhöhten Kaliumausscheidung im Urin bei Prss8-wt  $21 \pm 2$   $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$ , Prss8-R44Q  $30 \pm 3$   $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$  und bei Prss8-S238A  $29 \pm 3$   $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$ . Bei Prss8-R44Q zeigte sich hierbei eine höhere Kaliumausscheidung als bei Prss8-wt. Alle Genotypen verzeichneten bei LS/HP-Diät eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhten Kreatininausscheidung.



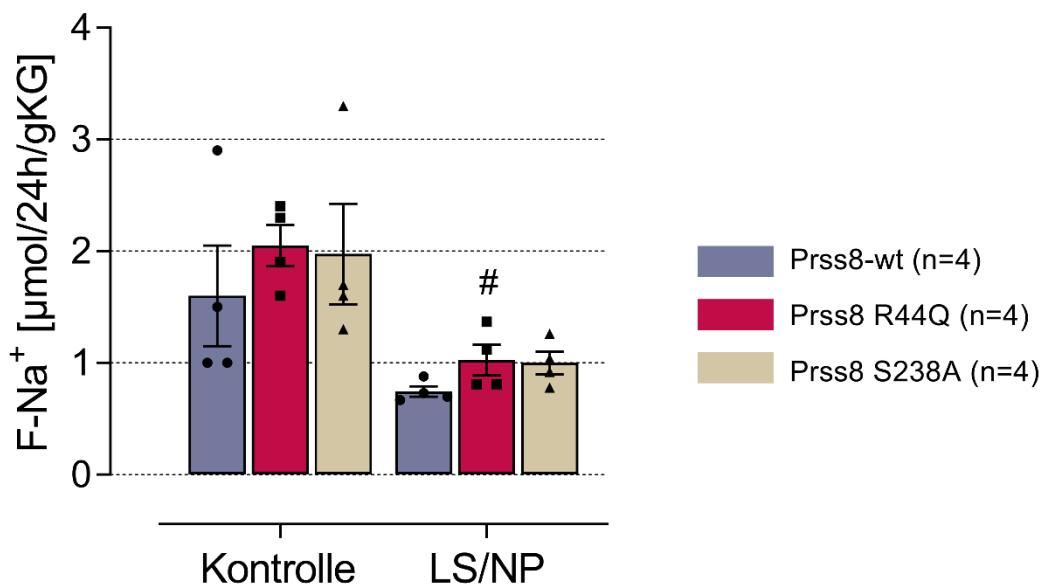


**Abbildung 3-4 Plasma Kontroll- und Endwerte nach Diät (publiziert in [174])**

Dargestellt sind jeweils Mittelwert  $\pm$  SEM der Plasmakonzentrationen von Natrium (A) und Kalium (B) in mmol/l, sowie der Plasma Harnstoffkonzentration (C) in mg/dl unter Kontrollbedingungen und nach 5 Tagen LS/NP- oder LS/HP- Diät. Die Aldosteronkonzentration (D) in pg/ml ist als Verlauf mit Werten für 0, 2 und 5 Tage angegeben. Die durchgezogene Linie entspricht der NS-Diät, die gestrichelte Linie der NS/HP-Diät. \*:  $p < 0,05$  vs. Prss8-wt #:  $p < 0,05$  vs. Kontrollbedingung

Die Plasmakonzentrationen von Natrium und Kalium unter der Diät unterschieden sich nicht zwischen Prss8-S238A und Prss8-wt Mäusen. Prss8-R44Q Mäuse zeigten niedrigere Konzentration an Kalium bereits unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu den Prss8-wt Mäusen, die sich unter den Diäten anglich und bei der LS/HP Diät signifikant von den Kontrollbedingungen unterschied. Demgegenüber blieb die Plasma-Natriumkonzentration konstant. Die Plasma-Harnstoff-Konzentration zeigte sich in allen drei Genotypen sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter den Diäten vergleichbar.

Unter Kontrollbedingungen bestand kein Unterschied in der Plasmakonzentrationen von Aldosteron. Die Plasmakonzentrationen bei Prss8-S238A und Prss8-wt stieg unter den Diäten an Tag 2 um das 2,4 fache (Prss8-wt) bzw. das 2,6 fache (Prss8-S238A) im Vergleich zu den Kontrollwerten an. Bis Tag 5 sank sie wieder annähernd auf die Ausgangswerte ab. Demgegenüber erhöhte sich bei Prss8-R44Q die Aldosteronkonzentration unter LS/HP-Diät im Vergleich zu Prss8-wt an Tag 2. Die hohen Aldosteronwerte persistierten auch an Tag 5, und waren dann unter beiden Diäten höher als zum Zeitpunkt der Kontrollwerte und mit  $815 \pm 121$  pg/ml (LS) bzw.  $959 \pm 159$  pg/ml (LS/HP) ebenfalls höher als bei Prss8-wt ( $353 \pm 38$  pg/ml (LS) und  $324 \pm 53$  pg/ml (LS/HP))



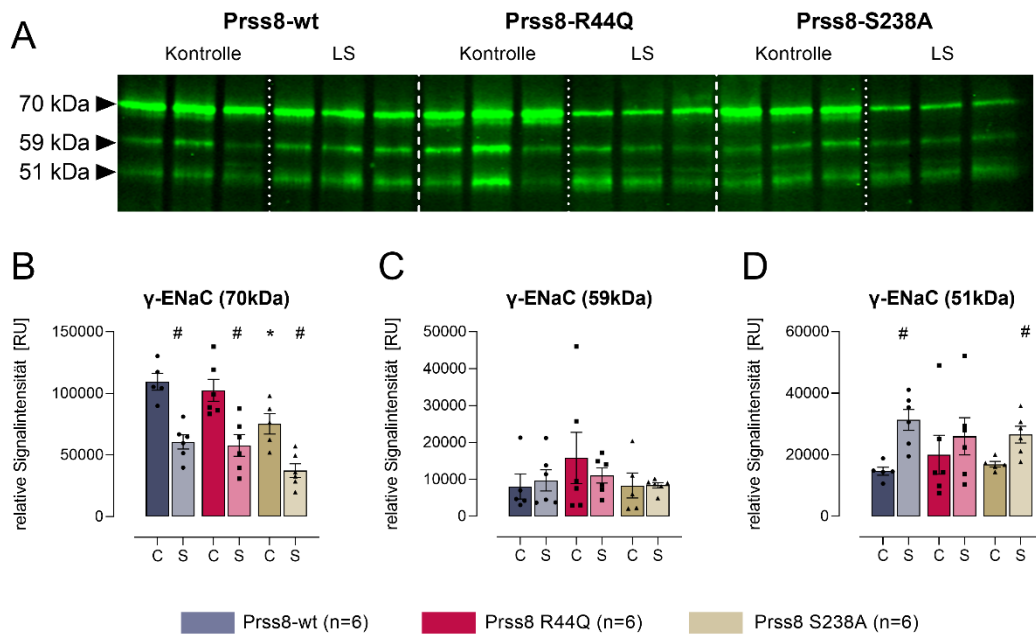
**Abbildung 3-5 Natriumausscheidung im Stuhl (publiziert in [174])**

Der Mittelwert  $\pm$  SEM der Natriumausscheidung im Stuhl unter Kontroll- und unter Natriumsalzbedingungen in der Einheit  $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$  ist dargestellt \*:  $p < 0,05$  vs. Prss8-wt #:  $p < 0,05$  vs. Kontrollbedingung

Die durchschnittliche Natriumausscheidung im Stuhl zeigte unter Kontrollbedingungen keinen relevanten Unterschied zwischen den Genotypen, diese lag bei Prss8-wt bei  $1,6 \pm 0,9$   $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$ , bei Prss8-R44Q bei  $2,1 \pm 0,4$   $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$  und bei Prss8-S238A bei  $2,0 \pm 0,9$   $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$ . Unter

Niedrigsalz-Diät sank die durchschnittliche Natriumausscheidung bei allen Genotypen vergleichbar ab, so erreichte sie  $0,8 \pm 0,1 \mu\text{mol}/24\text{h/gKG}$  bei Prss8-wt,  $1,0 \pm 0,3 \mu\text{mol}/24\text{h/gKG}$  bei Prss8-R44Q und  $1,0 \pm 0,2 \mu\text{mol}/24\text{h/gKG}$  bei Prss8-S238A.

### 3.2.1 Proteolytische Prozessierung des $\gamma$ -ENaC unter natriumarmer Diät



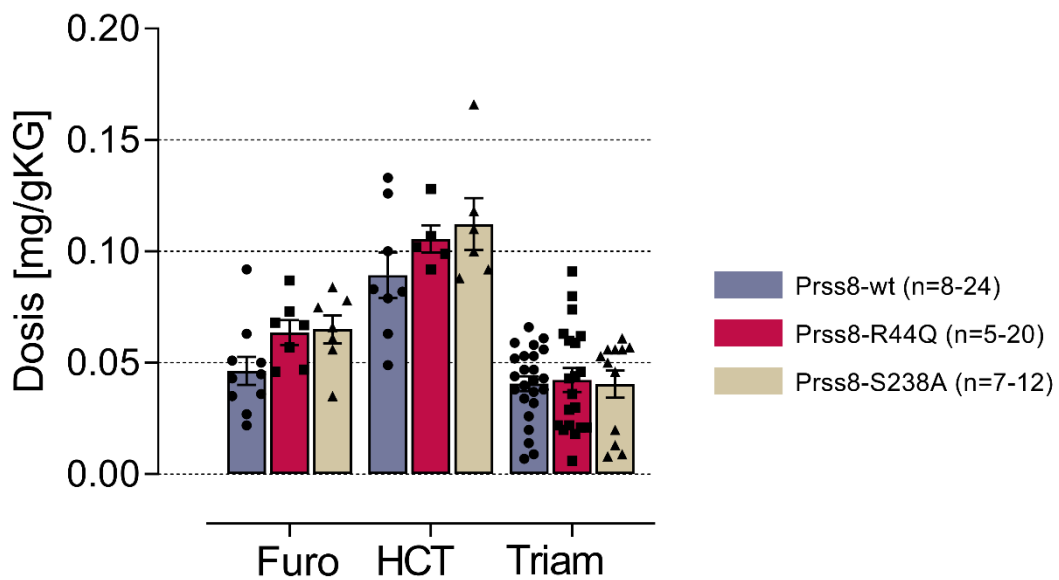
**Abbildung 3-6** Western Blot der  $\gamma$ -Untereinheit nach LS-Diät (publiziert in [175])

In A ist ein Western Blot für die Untersuchung der  $\gamma$ -Untereinheit gezeigt. Unterschieden werden die Genotypen und der Zeitpunkt vor und nach der Niedrigsalzdiät. B, C und D zeigen die Densitometrien der drei Banden. Jeweils Mittelwert  $\pm$  SEM \*:  $p < 0,05$  vs. Prss8-wt #:  $p < 0,05$  vs. Kontrollbedingung

Deutlich zu sehen war die Abnahme des Signals der nicht geschnittenen  $\gamma$ -Untereinheit (70 kDa) bei allen drei Genotypen unter der Niedrigsalzdiät. Korrespondierend kam es bei Prss8-wt und Prss8-S238A zu einem Anstieg der relativen Signalintensität der an zwei Stellen geschnittenen  $\gamma$ -Untereinheit (51 kDa). Bei Prss8-R44Q war dies nicht der Fall, hier kam es zu einem geringeren Anstieg. Die nur durch Furin einmal geschnittene  $\gamma$ -Untereinheit (59 kDa) zeigte bei keinem Genotyp eine relevante Veränderung. Unterschiede zwischen den Genotypen fanden sich nicht.

### 3.3 Diuretika

Um Unterschiede zwischen den Genotypen in verschiedenen Abschnitten des Tubulussystems der Niere zu untersuchen, wurden Behandlungen mit dem Schleifendiuretikum Furosemid, dem Thiaziddiuretikum HCT und dem ENaC-blockierenden Diuretikum Triamteren gewählt. Die Behandlung erfolgte über das Trinkwasser.

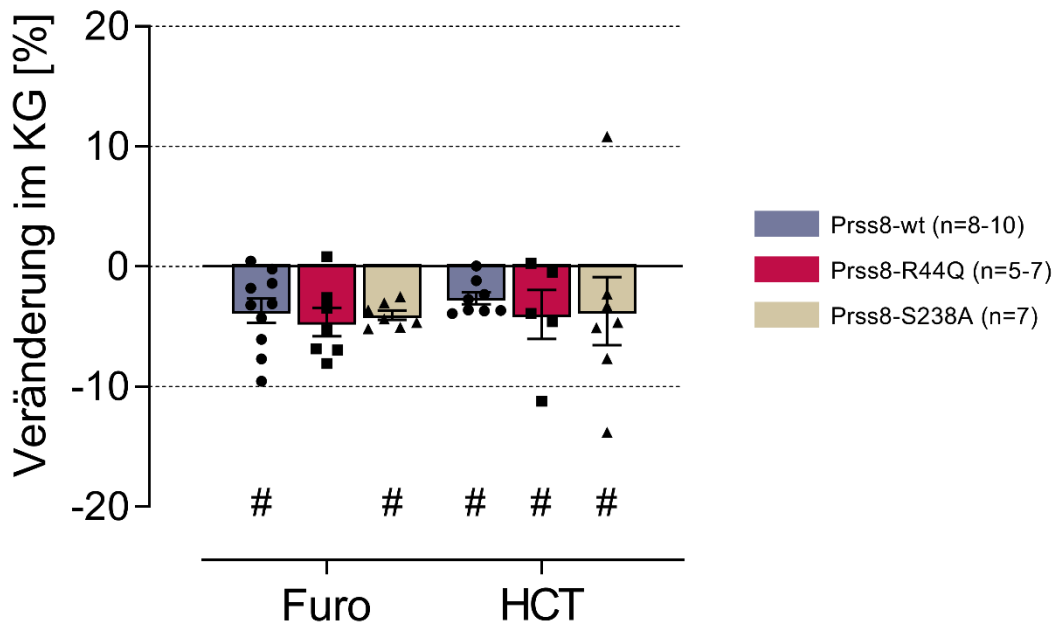


**Abbildung 3-7 Dosis der Diuretika (publiziert in [174])**

Gezeigt wird die durchschnittliche Dosis  $\pm$  SEM in mg/gKG, die die einzelnen Genotypen unter Behandlung mit Furosemid, HCT und Triamteren tatsächlich erhalten haben.

Die eingenommene Dosis der einzelnen Diuretika war zwischen den Genotypen vergleichbar.

### 3.3.1 Behandlung mit Furosemid und HCT

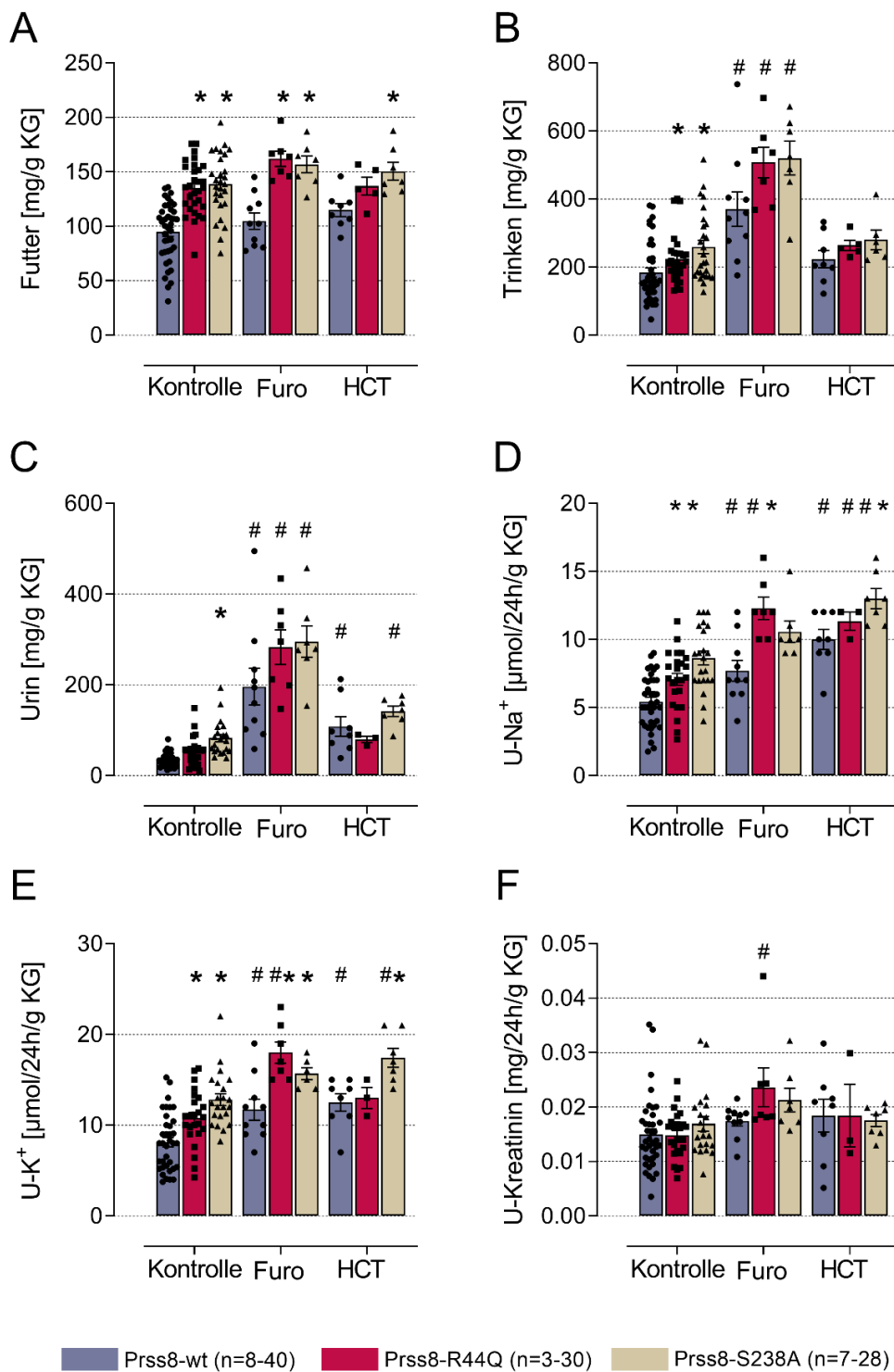


**Abbildung 3-8 Gewichtsveränderung in Prozent unter Diuretika Behandlung (publiziert in [174])**

Dargestellt werden die durchschnittlichen Gewichtsveränderungen  $\pm$  SEM im Vergleich zum letzten Kontrolltag unter Furosemid- und HCT-Behandlung in Prozent.

\*:  $p < 0,05$  vs. Prss8-wt #:  $p < 0,05$  vs. Kontrollbedingung

Unter den Behandlungen mit Furosemid und HCT war kein Unterschied in der Gewichtsabnahme zwischen den drei Genotypen nachweisbar. Die durchschnittliche prozentuale Gewichtsabnahme unter Furosemid betrug bei Prss8-wt  $3,7 \pm 1,0$  %, bei Prss8-R44Q  $4,6 \pm 1,2$  % und bei Prss8-S238A  $4,1 \pm 0,4$  %. Unter HCT betrug sie bei Prss8-wt  $2,6 \pm 0,5$  %, bei Prss8-R44Q  $4,0 \pm 2,0$  % und bei Prss8-S238A  $3,7 \pm 2,8$  % im Vergleich zum letzten Kontrolltag. Eine signifikante Gewichtsabnahme im Vergleich zwischen den Genotypen bestand nicht. Im Vergleich der absoluten Gewichtsabnahme zeigte sich kein signifikanter Unterschied zum Ausgangsgewicht, dagegen zeigten alle bis auf Prss8-R44Q bei der HCT Behandlung eine signifikante relative Gewichtsabnahme im Vergleich zum Ausgangsgewicht. Keine Maus musste aufgrund eines Gewichtsverlusts entsprechend den definierten Versuchsabbruchkriterien aus dem Versuch genommen werden.



**Abbildung 3-9 Einfuhr- und Ausscheidungsparameter unter Diuretika Behandlung (publiziert in [174])**

Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM der Futter-(A) und Trinkmengen (B) in mg/gKG, der Urinmengen (C) in  $\mu$ l/gKG, der Urin-Natriumausscheidung (D) in  $\mu$ mol/24h/gKG und der Urin-Kaliumausscheidung (E) in  $\mu$ mol/24h/gKG sowie der im Urin enthaltene Kreatinin Menge (F) in mg/24h/gKG. \*:  $p < 0,05$  bezogen auf Prss8-wt #:  $p < 0,05$  bezogen auf die Kontrollwerte

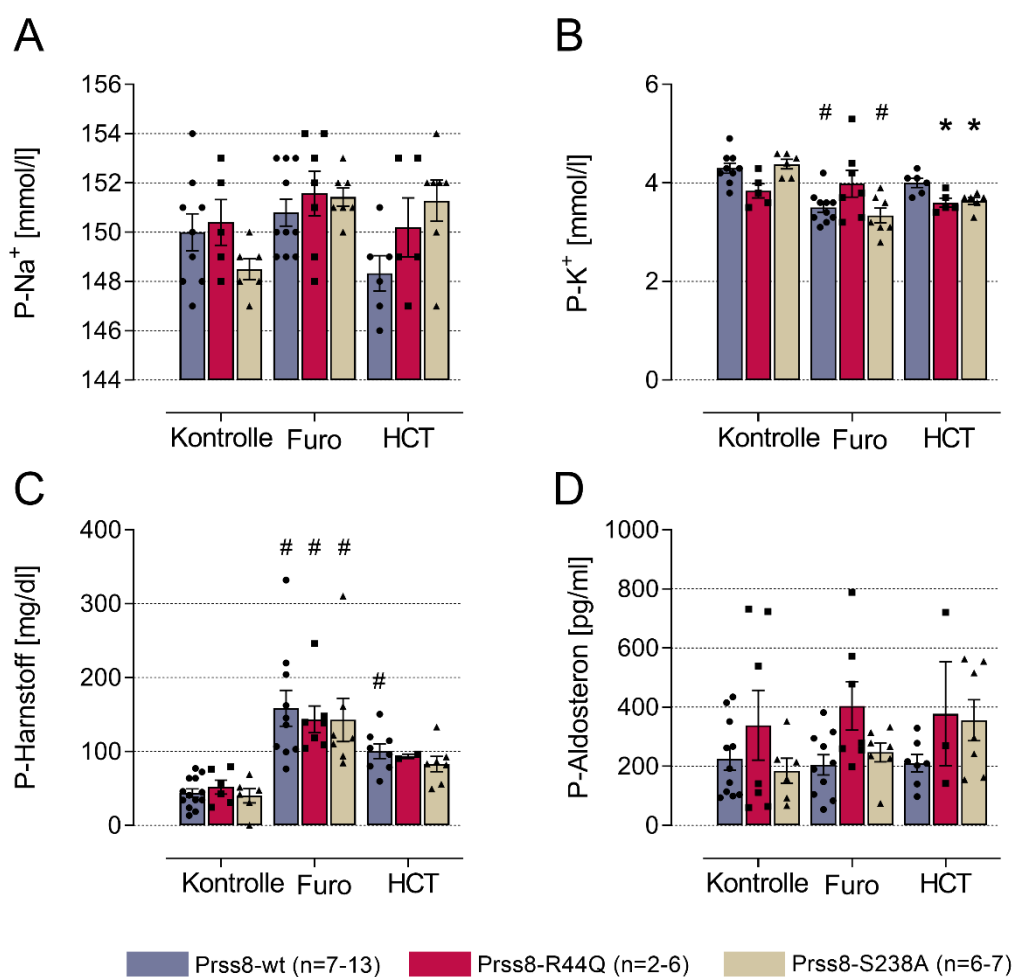
Unter Kontrollbedingungen und der Behandlung mit Furosemid zeigten, verglichen mit den Prss8-wt Mäusen, die Prss8-R44Q und Prss8-S238A Mäuse eine höhere Futtermenge, die sich für Prss8-S238A auch bei der HCT-Behandlung fortsetzte. Bezogen auf die Kontrollbedingungen blieb die Futtermenge der jeweiligen Genotypen vergleichbar.

Unter Kontrollbedingungen fand sich bei den knock-in Mäusen ebenfalls eine erhöhte Trinkmenge, die sich unter den diuretischen Behandlungen Prss8-wt anglich. Unter Furosemidbehandlung stieg die Trinkmenge im Vergleich zur Kontrollbedingung bei allen Genotypen signifikant an, während sie bei der Behandlung mit HCT zu den Kontrollbedingungen vergleichbar blieb. Auch die Urinmenge stieg unter Furosemid bei allen Genotypen im Vergleich zu den Kontrollwerten an, ohne sich jedoch zwischen den Genotypen deutlich zu unterscheiden, während es bei HCT zu einem geringeren Anstieg der Urinmenge kam.

Unterschiede zeigten sich ebenfalls bei der Natriumausscheidung im Urin. Unter Behandlung mit Furosemid kam es zu einem signifikanten Anstieg der Natriumausscheidung bei Prss8-wt und Prss8-R44Q nicht jedoch bei Prss8-S238A. Dagegen wiesen alle Gruppen einen Anstieg der Natriumausscheidung unter HCT Behandlung auf.

Die Kaliumausscheidung war bei Prss8-S238A und Prss8-R44Q unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu Prss8-wt erhöht. Unter Behandlung mit Furosemid betrug die Kaliumausscheidung bei Prss8-S238A  $17,2 \pm 1,7$   $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$  und bei Prss8-R44Q  $17,9 \pm 1,2$   $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$  und war damit höher als bei Prss8-wt mit  $11,7 \pm 1,1$   $\mu\text{mol}/24\text{h}/\text{gKG}$ . Alle drei Genotypen zeigten ein im Vergleich zu Kontrollbedingungen erhöhte Kaliumausscheidung. Dagegen war bei der HCT-Behandlung nur für Prss8-S238A eine erhöhte Kaliumausscheidung zu verzeichnen.

Die Kreatininausscheidung zeigte nur für Prss8-R44Q unter der Furosemidbehandlung einen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Die weiteren Kreatininwerte waren sowohl zu den Kontrollwerten als auch untereinander vergleichbar.



**Abbildung 3-10 Plasma Kontroll- und Endwerte nach Diuretika Behandlung (publiziert in [174])**

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Plasma-Natrium (A)- und Kalium-Konzentration (B) in mmol/l), sowie der Plasma-Harnstoff-Konzentration (C) in mg/dl und der Plasma-Aldosteronkonzentration (D) in pg/ml unter Kontrollbedingungen und nach Diuretikabehandlung. \*:  $p < 0,05$  vs. Prss8-wt #:  $p < 0,05$  vs. Kontrollbedingung

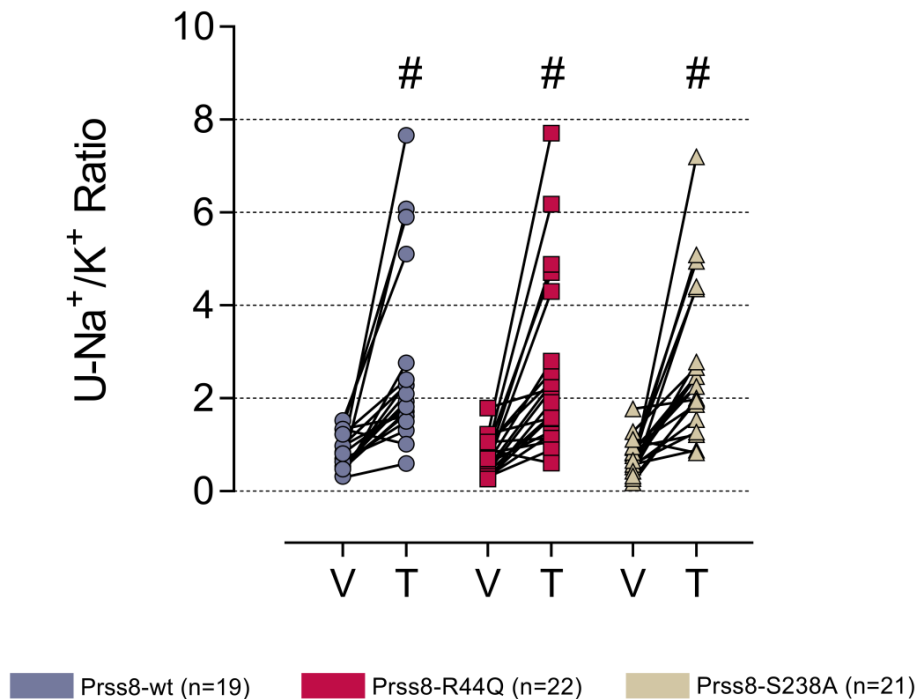
Im Plasmanatriumwert war kein Unterschied bei beiden Diuretikabehandlungen im Vergleich zu den Kontrollwerten sichtbar. Unter Furosemid-Behandlung kam es bei der Plasmakaliumkonzentration zu einem Abfall auf  $3,5 \pm 0,1$  mmol/l bei Prss8-wt und  $3,3 \pm 0,2$  mmol/l bei Prss8-S238A im Vergleich zu den Kontrollwerten. Unter HCT-Behandlung war die Plasmakonzentration von Kalium bei den knock-in Mäusen geringer als beim Prss8-wt. Während der Plasmaharnstoff unter Furosemidbehandlung in allen Genotypen im Vergleich zur Kontrollmessung auf  $159 \pm 24$  mg/dl bei Prss8-wt, bei Prss8-R44Q  $143 \pm 18$  mg/dl und auf  $143 \pm 29$  mg/dl bei Prss8-S238A anstieg. Die Konzentration von



Aldosteron im Plasma zeigte keine Unterschiede zwischen den Genotypen und den Behandlungen, wobei Prss8-R44Q Mäuse tendenziell höhere Aldosteronwerte hatten.

### 3.3.2 Behandlung mit Triamteren

#### 3.3.2.1 Bolusgabe von Triamteren



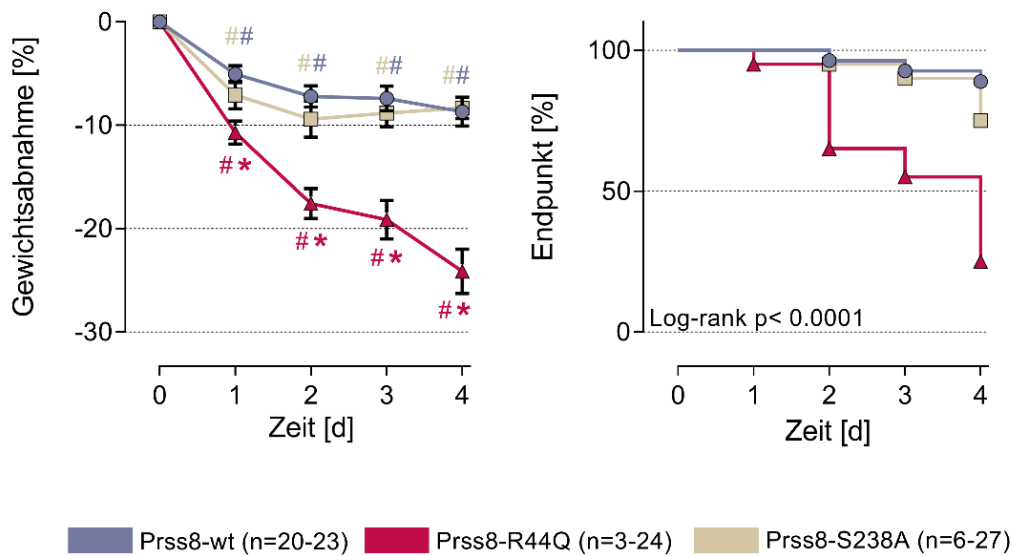
**Abbildung 3-11 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Ratio nach Triamterenbolusgabe (publiziert in [174])**

Es wird die Natrium/Kalium Ratio bei Vehikel (V) und Triamteren (T) Injektion nach Genotypen sortiert dargestellt

#:  $p < 0,05$  in Bezug auf die Kontrolle \*.  $p < 0,05$  im Vergleich zu Prss8-wt

Nach Injektion des Vehikels zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Natrium/Kalium Verhältnis als Surrogat der basalen ENaC-Funktion. Alle Genotypen zeigten ein ähnliches Ansteigen nach Injektion eines Triamterenbolus auf eine Natrium/Kalium Ratio von  $2,7 \pm 2$  bei Prss8-wt,  $2,6 \pm 2$  bei Prss8-R44Q und  $2,7 \pm 2$  bei Prss8-S238A. Alle Genotypen zeigten damit eine signifikant höhere Natriurese im Sinne einer ENaC-Blockade. Ein genotypspezifischer Unterschied bestand nicht. Auffällig war jedoch, dass in jeder Gruppe einige Tiere ein deutlich stärkeres Ansprechen auf den Triamterenbolus zeigten.

### 3.3.2.2 Dauergabe von Triamteren

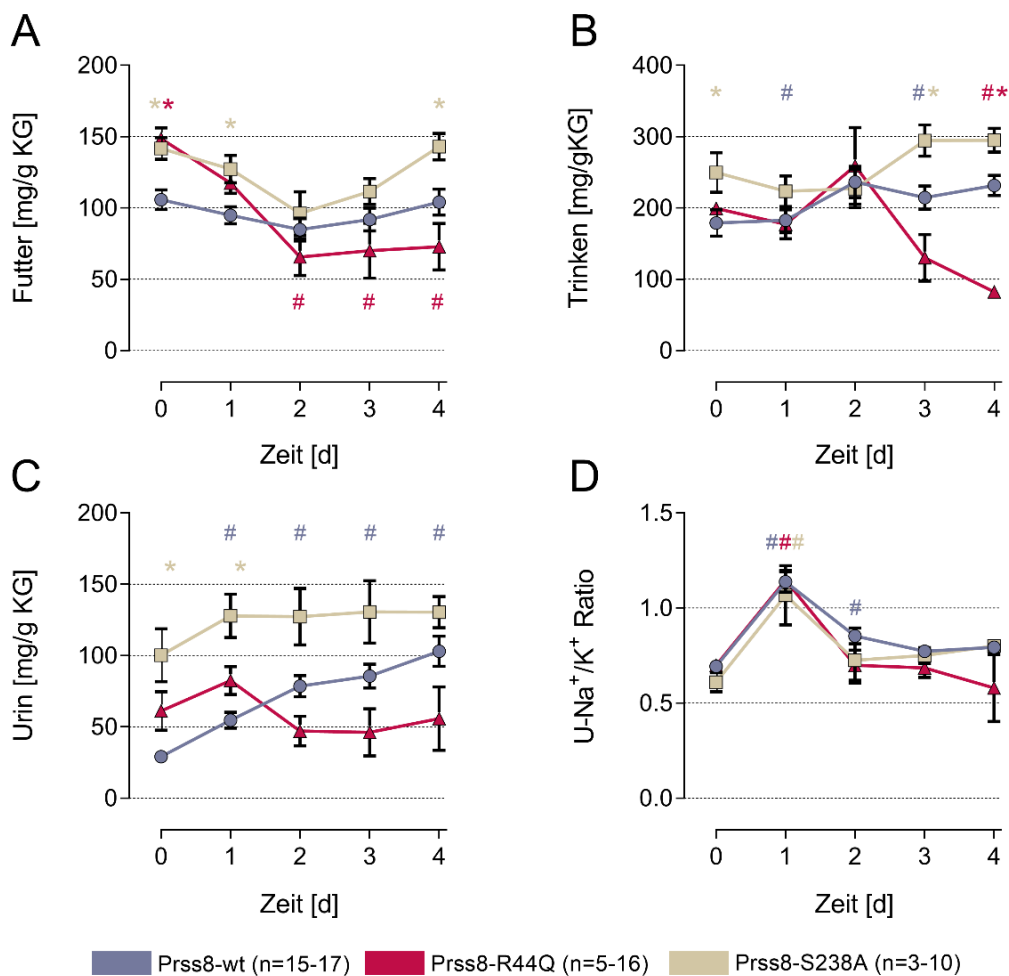


**Abbildung 3-12 Gewichtsveränderung unter Triamterenbehandlung (publiziert in [174])**

Dargestellt ist links die mittlere Gewichtsabnahme  $\pm$  SEM der jeweiligen Tiere in Prozent bezogen auf den letzten Kontrolltag, rechts zeigt die Kaplan-Meier-Kurve, die das Ausscheiden der Tiere aus dem Versuch zeigt

#: p < 0,05 in Bezug auf die Kontrolle \*. p < 0,05 im Vergleich zu Prss8-wt

Unter der Behandlung mit Triamteren zeigte sich bei Prss8-wt und Prss8-S238A nach einem anfänglichen Abfall des Körpergewichts eine Stabilisierung auf niedrigerem Niveau von 8 % bis 9 % des Ausgangsgewichts. Demgegenüber war bei Prss8-R44Q eine kontinuierliche Gewichtsabnahme festzustellen, die sich bereits am ersten Behandlungstag signifikant von Prss8-wt unterschied und an Tag 4 in einer Gewichtsabnahme von  $-24,1 \pm 2\%$  im Vergleich zum Startgewicht resultierte. Eine signifikant höhere Zahl (Log-rank p < 0,0001) von Prss8-R44Q Mäuse (75%) musste vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Aufgrund dieser bereits in den ersten Versuchen gemachten Beobachtung wurden die Dauer und die Auswertung des Versuchs von 5 auf 4 Tage reduziert.



**Abbildung 3-13 Fress- und Trinkmenge, so wie Urinausscheidung und Natrium/Kalium Ratio unter der Triamterenbehandlung (publiziert in [174])**

Dargestellt sind oben links die Fress- (A) und Trinkmenge (B) in mg/gKG. Unten sind links die Urinausscheidung (C) in mg/gKG und die Natrium/Kalium Ratio (D) abgebildet, jeweils als Mittelwert  $\pm$  SEM.

#:  $p < 0,05$  in Bezug auf die Kontrolle \*.  $p < 0,05$  im Vergleich zu Prss8-wt

Beim Start des Experiments zeigte sich eine erhöhte Fressmenge der knock-in Mäuse (vgl. Abbildung 3-3 Einfuhr und Ausscheidungsparameter bei den Diäten (publiziert in [174]) und Abbildung 3-9 Einfuhr- und Ausscheidungsparameter unter Diuretika Behandlung (publiziert in [174])) die im Fall von Prss8-R44Q ab Tag 2 der Behandlung signifikant abfiel. Auch die Trinkmenge fiel nach einem passageren Anstieg an Tag 2 bei Prss8-R44Q kontinuierlich ab, während sie bei den anderen Gruppen konstant blieb, beziehungsweise tendenziell anstieg. Die Urinmenge war bei Prss8-S238A zunächst höher als bei Prss8-wt, dies glich sich durch einen Anstieg der Urinmenge bei Prss8-wt im Verlauf aus. Die Urinmenge bei Prss8-R44Q zeigte

sich tendenziell niedriger als bei den anderen Gruppen. Die Natrium/Kalium Ratio als Surrogatmarker für die ENaC-Blockade stieg bei allen Genotypen an Tag 1 der Behandlung mit Triamteren auf über 1 an und pendelte sich dann etwa auf Ausgangsniveau ein.

**Tabelle 3-1 Blutwerte nach Triamterenbehandlung (publiziert in [174])**

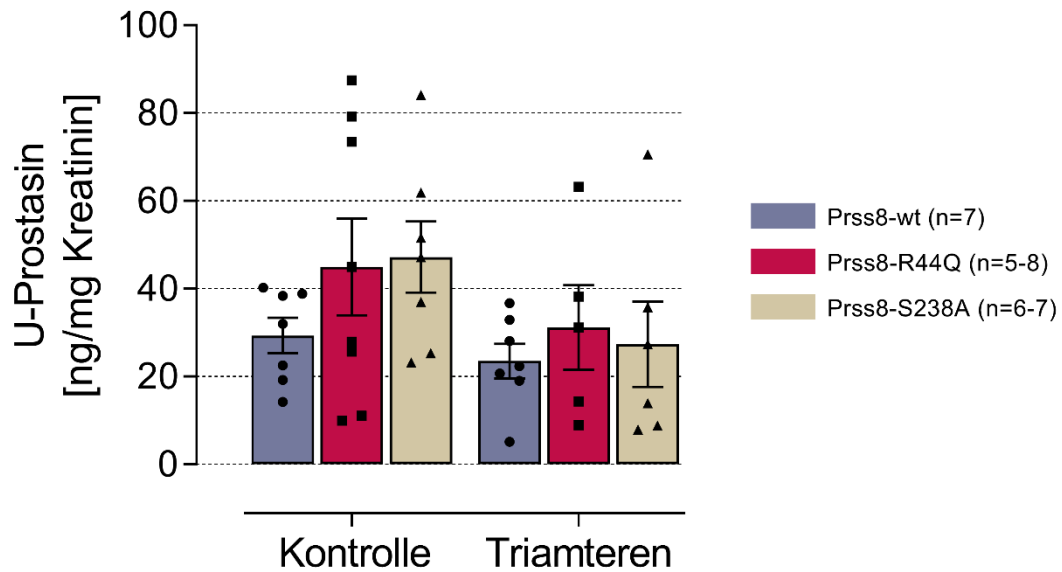
	Kontrolle			Nach Triamterenbehandlung		
	Prss8-wt	Prss8 R44Q	Prss8 S238A	Prss8-wt	Prss8-R44Q	Prss8-S238A
Anzahl	9-13	5-7	6	21-24	12-16	12-14
Na <sup>+</sup> [mmol/l]	150 ± 1	150 ± 1	149 ± 0,4	149 ± 1	156 ± 3 *	148 ± 2
K <sup>+</sup> [mmol/l]	4,3 ± 0,1	3,8 ± 0,1*	4,4 ± 0,1	5,5 ± 0,3 #	6,6 ± 0,5 #	5,6 ± 0,4 #
pH	7,29 ± 0,01	7,21 ± 0,02 *	7,29 ± 0,01	7,17 ± 0,02 #	7,01 ± 0,03 #*	7,20 ± 0,03
pCO <sub>2</sub> [mmHg]	45 ± 2	56 ± 3 *	46 ± 2	52 ± 2 #	66 ± 3 *	52 ± 1 #
std HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mmol/l]	20 ± 0,5	21 ± 1	21 ± 0,5	16 ± 1 #	12 ± 1 #*	18 ± 1
Hämatokrit [%]	46 ± 1	45 ± 1	47 ± 1	56 ± 1 #	57 ± 1 #*	52 ± 1 * #
Harnstoff [mg/dl]	44 ± 6	52 ± 9	40 ± 10	96 ± 14 #	199 ± 26 #*	111 ± 18 #
Aldosteron [pg/ml]	225 ± 39	339 ± 118	185 ± 42	1673 ± 263 #	3767 ± 852 #*	1597 ± 344 #

#: p < 0,05 in Bezug auf die Kontrolle \*. p < 0,05 im Vergleich zu Prss8-wt

Die Tabelle zeigt die Plasmawerte unter Kontrollbedingungen und am Ende der Triamterenbehandlung. Aufgrund des schlechten Zustands und damit verbundenen Ausscheidens der Prss8-R44Q Mäuse aus dem Versuch wurden hier auch Plasmaproben bei vorgezogenem Versuchsende miteingeschlossen.

Auffällig ist die Azidose bei Prss8-R44Q, so wie der alle Genotypen betreffende Anstieg von Aldosteron, Kalium und Hämatokrit, wobei Prss8-R44Q in allen Punkten höhere Werte als Prss8-wt zeigte.

### 3.3.2.3 Prostasinexkretion im Urin

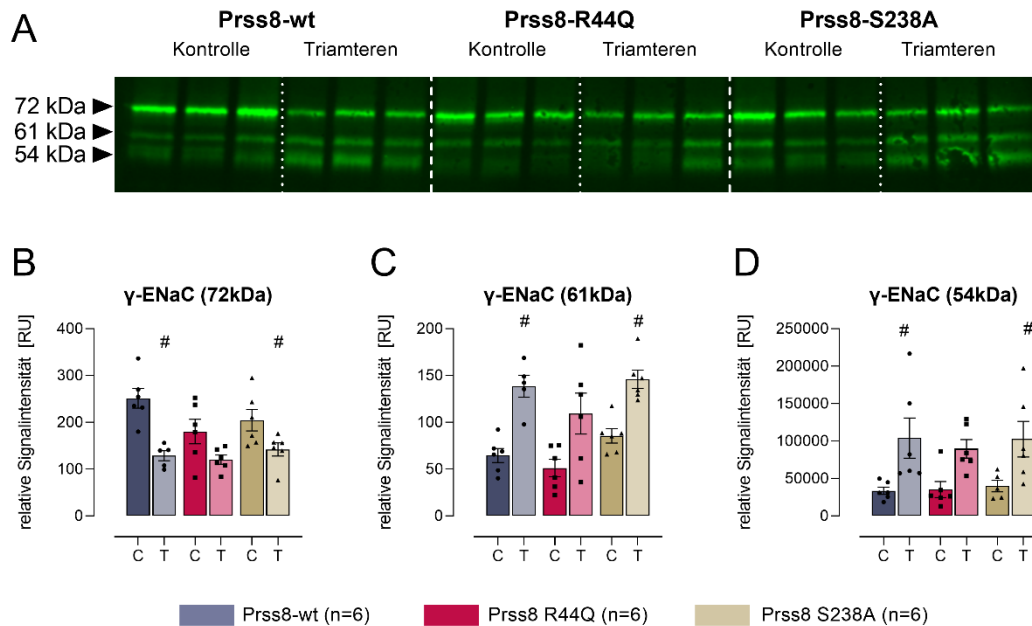


**Abbildung 3-14 Prostasinexpression unter der Triamterenbehandlung**

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und SEM der Urin-Prostasin-Konzentration in ng/mg Kreatinin unter Kontrollbedingungen und unter der Triamterenbehandlung.

Für die im Urin ausgeschiedene Menge an Prostasin fand sich im ELISA kein Unterschied zwischen den Genotypen. So lag sie bei Prss8-wt bei  $29 \pm 11$  ng/mg Kreatinin, bei Prss8-R44Q bei  $45 \pm 31$  ng/mg Kreatinin und bei Prss8-S238A bei  $47 \pm 21$  ng/mg Kreatinin. Auch unter Triamterenbehandlung war die Ausscheidung von Prostasin vergleichbar.

### 3.3.3 Proteolytische Prozessierung des $\gamma$ -ENaC nach Triamterenbehandlung

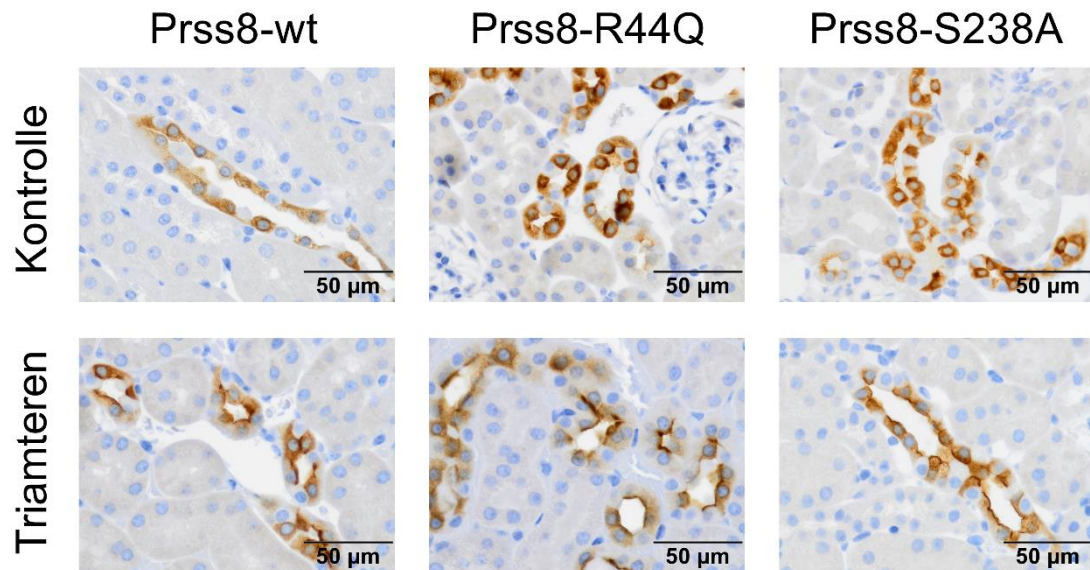


**Abbildung 3-15 Western Blot der  $\gamma$ -Untereinheit nach Triamterengabe (publiziert in [174])**

In A ist ein Western Blot für die Untersuchung der  $\gamma$ -Untereinheit gezeigt. Unterschieden werden die Genotypen und der Zeitpunkt vor und nach der Triamterengabe. B, C und D zeigen die Densitometrien der drei Banden. Jeweils Mittelwert  $\pm$  SEM \*:  $p < 0,05$  vs. Prss8-wt #:  $p < 0,05$  vs. Kontrollbedingung

Deutlich zu sehen war die Abnahme des Signals der nicht geschnittenen  $\gamma$ -Untereinheit (70 kDa) bei Prss8-wt und Prss8-S238A nach der Behandlung mit Triamteren im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Auch zeigten beide Genotypen einen deutlichen Anstieg sowohl der durch Furin geschnittenen als auch der doppelt geschnittenen  $\gamma$ -Untereinheit (59 und 51 kDa). Bei Prss8-R44Q zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der einfach und doppelt geschnittenen  $\gamma$ -Untereinheit, dieser war jedoch weniger ausgeprägt als bei den anderen beiden Genotypen und erreichte nicht das Signifikanzniveau.

### 3.3.4 Renale Expression von $\gamma$ -ENaC unter Triamterenbehandlung

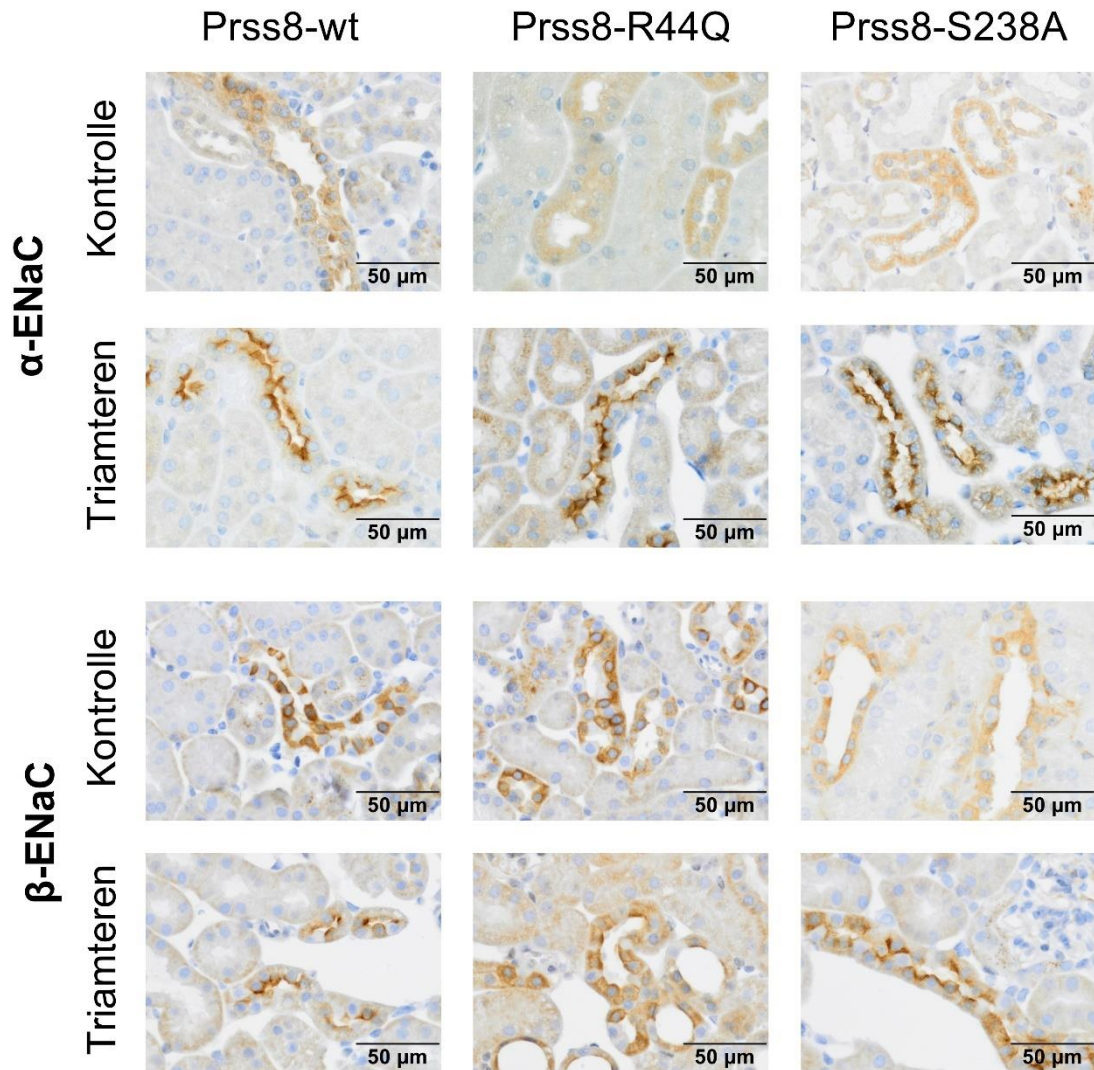


**Abbildung 3-16 Immunhistochemische Färbung auf  $\gamma$ ENaC nach Triamterenbehandlung (publiziert in [174])**

Dargestellt sind die immunhistologischen Färbungen auf die  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC in Niere von Mäusen ohne und nach Triamterenbehandlung

In den histologischen Nierenpräparaten war nach immunhistochemischer Anfärbung der  $\gamma$ -Untereinheit eine deutliche Verschiebung der  $\gamma$ -Untereinheit hin zur apikalen, luminalen Membranseite nach Triamterenbehandlung zu erkennen. Dies war in allen drei Genotypen gleichermaßen der Fall.

### 3.3.5 Renale Expression von $\alpha$ - und $\beta$ -ENaC unter Triamterenbehandlung



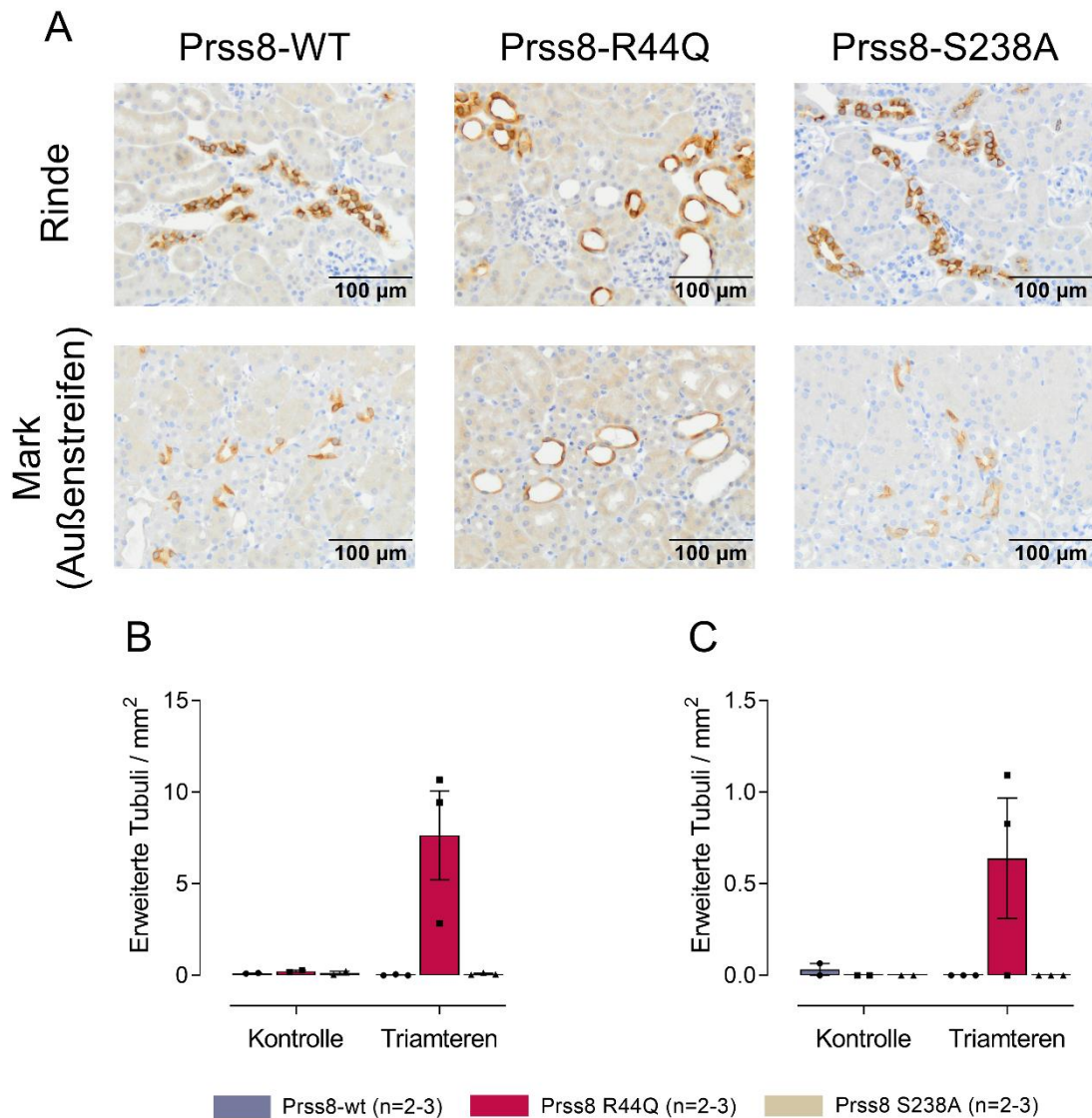
**Abbildung 3-17 Immunhistochemische Färbung von Nieren auf die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheit des ENaC mit und ohne Triamterengabe (publiziert in [170])**

Gezeigt wird oben die Färbung auf die  $\alpha$ -Untereinheit bei Kontrolltieren und nach Triamterenbehandlung. Im unteren Teil der Abbildung ist dies für die  $\beta$ -Untereinheit gezeigt.

Bei der immunhistochemischen Färbung der Nieren zeigte sich bei mit Triamteren behandelten Tieren eine stärkere Expression der Untereinheiten an der apikalen Membranseite der Tubuluszellen. Bei der  $\alpha$ -Untereinheit war zudem eine generell stärkere Färbung der Zellen nach Triamterenbehandlung zu erkennen. Ein Unterschied zwischen den Genotypen bestand nicht.



### 3.3.6 Tubuläre Morphologie nach Triamterenbehandlung



**Abbildung 3-18 Tubulus Morphologie nach Triamterenbehandlung (publiziert in [174] )**

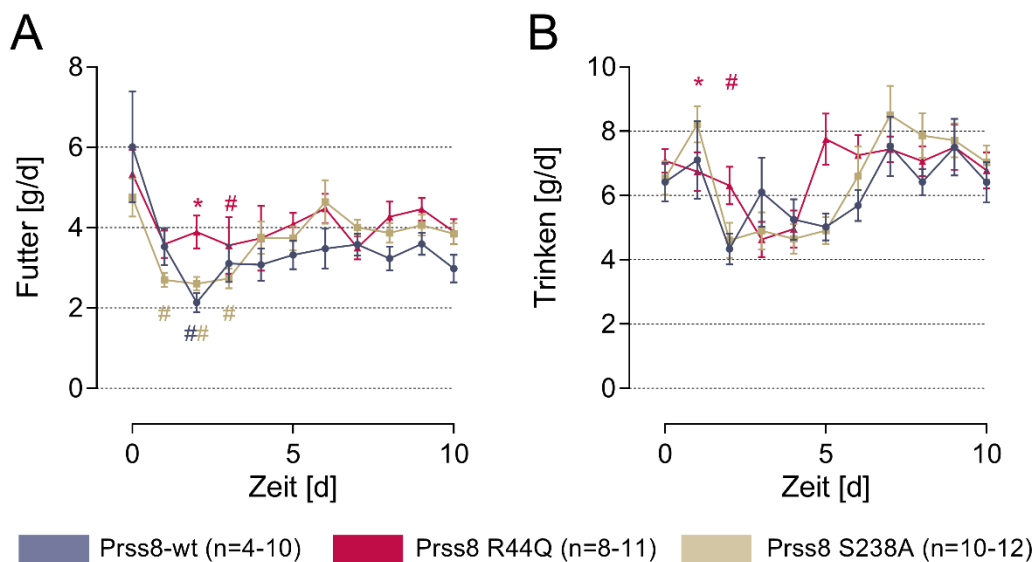
Gezeigt werden in A histologische Schnitte der Rinde und des Außenstreifens des äußeren Marks nach zwei Tagen Behandlung mit Triamteren. Dargestellt sind in B die Anzahl der erweiterten Tubuli pro Quadratmillimeter unter den in der  $\gamma$ -ENaC Färbung positiven Tubuli. In C werden die erweiterten Tubuli pro Quadratmillimeter gezählt die in der  $\gamma$ -ENaC Färbung nicht angefärbt wurden.

Nach Triamterenbehandlung zeigte sich vor allem bei Prss8-R44Q Mäusen eine Erweiterung des Tubuluslumens, was als histologisches Zeichen einer akuten Tubulusschädigung gewertet werden kann und insbesondere bei Prss8-R44Q Mäusen auftrat. Dies betraf auch Tubuli mit positiver Färbung auf  $\gamma$ -ENaC im Sinne einer Schädigung des distalen Tubulus.

### 3.4 Doxorubicin induziertes nephrotisches Syndrom

Durch die einmalige Injektion von Doxorubicin in den retrobulbären Gefäßplexus wurde ein glomerulärer Schaden ausgelöst, der zu einer Proteinurie und einem daraus resultierenden nephrotischen Syndrom führte [64, 161, 162]. Die tatsächliche Dosis der Responder Mäuse betrug bei Prss8-wt Männchen  $14,44 \pm 0,15 \mu\text{g/g KG}$ , bei Prss8-R44Q  $14,63 \pm 0,15 \mu\text{g/g KG}$  und bei Prss8-S238A  $14,92 \pm 0,21 \mu\text{g/g KG}$ . Die effektive Dosis bei Weibchen betrug für Prss8-wt  $13,60 \pm 0,04 \mu\text{g/g KG}$ , Prss8-R44Q  $13,97 \pm 0,01 \mu\text{g/g KG}$  und Prss8-S238A  $13,92 \pm 0,40 \mu\text{g/g KG}$ . Die Dosis unterschied sich nicht signifikant zwischen den Genotypen. Unterschieden wurde zwischen „nicht-nephrotisch“ (Nonresponder) und „nephrotisch“ (Responder), diese Entscheidung wurde über die auf Kreatinin normierte Urinproteinkonzentration getroffen. Um in die Gruppe der Responder eingeschlossen und damit ausgewertet zu werden, musste die Proteinurie an mindestens zwei Tagen zwischen den Tagen 7 und 10 oberhalb einer Schwelle von 100 mg/mg Kreatinin liegen.

#### 3.4.1 Futter und Trinken



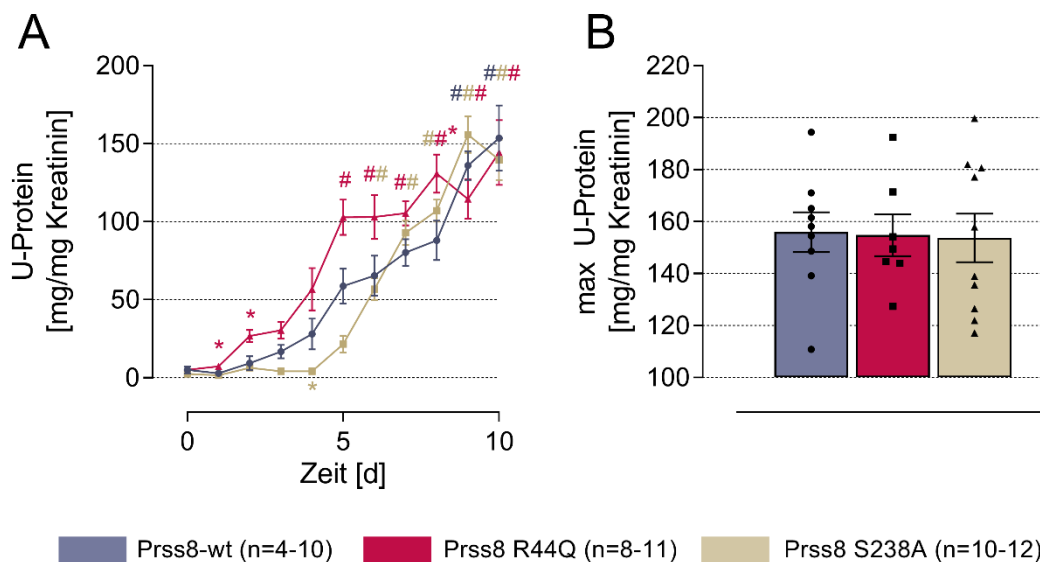
**Abbildung 3-19 Verlauf der Futter und Trinkmenge (publiziert in [175])**

Gezeigt werden die Futtermenge pro Tag in Gramm (A) und die Trinkmenge pro Tag in Gramm (B) für jeden Genotyp während der Beobachtungszeit von 10 Tagen. #:  $p < 0,05$  in Bezug auf die Kontrolle \*.  $P < 0,05$  im Vergleich zu Prss8-wt.

Nach der Injektion von Doxorubicin kam es zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme bei allen Tieren. Prss8-wt und Prss8-S238A erreichten ein Minimum an Tag zwei nach Induktion, während sich bei Prss8-R44Q eine weniger stark ausgeprägte Fressmenge zeigte und eher ein Plateau zwischen Tag eins und drei entstand. Im Verlauf kam es bei allen Genotypen wieder zu einer Zunahme der Nahrungsaufnahme. Die Futtermenge zum Zeitpunkt der Induktion wurde in den zehn Tagen der Verlaufsbeobachtung jedoch nicht mehr erreicht.

Der Verlauf der Trinkmenge zeigte ebenfalls eine passagere Abnahme im Bereich der ersten 5 Tage. Im Gegensatz zum Futterverbrauch wurde hier das Ausgangsniveau wieder erreicht und teilweise auch übertroffen. Die Streubreite innerhalb der Gruppen war jedoch größer als bei der Nahrungsaufnahme. Mit Ausnahme von Abweichungen in den ersten zwei Tagen nach Induktion zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen den Gruppen.

### 3.4.2 Proteinurie



**Abbildung 3-20 Verlauf Proteinurie (publiziert in [175])**

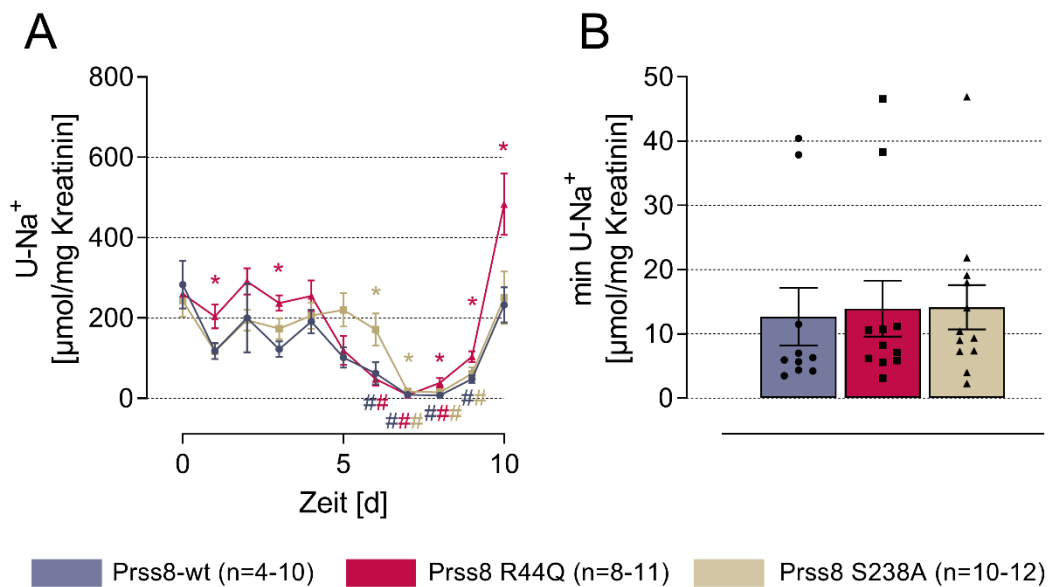
Der Verlauf ab dem Tag der Induktion für 10 Tage (A) und die maximale Proteinurie (B) werden als Mittelwert  $\pm$  SEM der Genotypen in mg/mg Kreatinin gezeigt

#:  $p < 0,05$  in Bezug auf die Kontrolle \*.  $P < 0,05$  im Vergleich zu Prss8-wt

Der früheste Beginn der Proteinurie war bei Prss8-R44Q Mäusen zu beobachten, diese hatten bereits am Tag nach der Induktion einen leichten Anstieg zu

verzeichnen. Bei Prss8-wt und Prss8-S238A stieg die Proteinurie erst zwischen Tag 3 und 5 an, dies war ebenfalls der Zeitraum, in dem das Gewicht der Mäuse wieder zu steigen begann. Ab Tag 6 nach der Induktion war die Proteinausscheidung bei allen Genotypen höher als im Kontrollurin vor der Induktion. Bei allen Gruppen kam es zu einem annähernd kontinuierlichen Anstieg. Die maximale Proteinurie betrug  $156 \pm 8$  mg/mg Kreatinin bei Prss8-wt,  $155 \pm 8$  mg/mg Kreatinin bei Prss8-R44Q und  $154 \pm 9$  mg/mg Kreatinin bei Prss8-S238A und unterschied sich damit nicht zwischen Prss8-wt und den knock-in Mäusen.

### 3.4.3 Natriurese



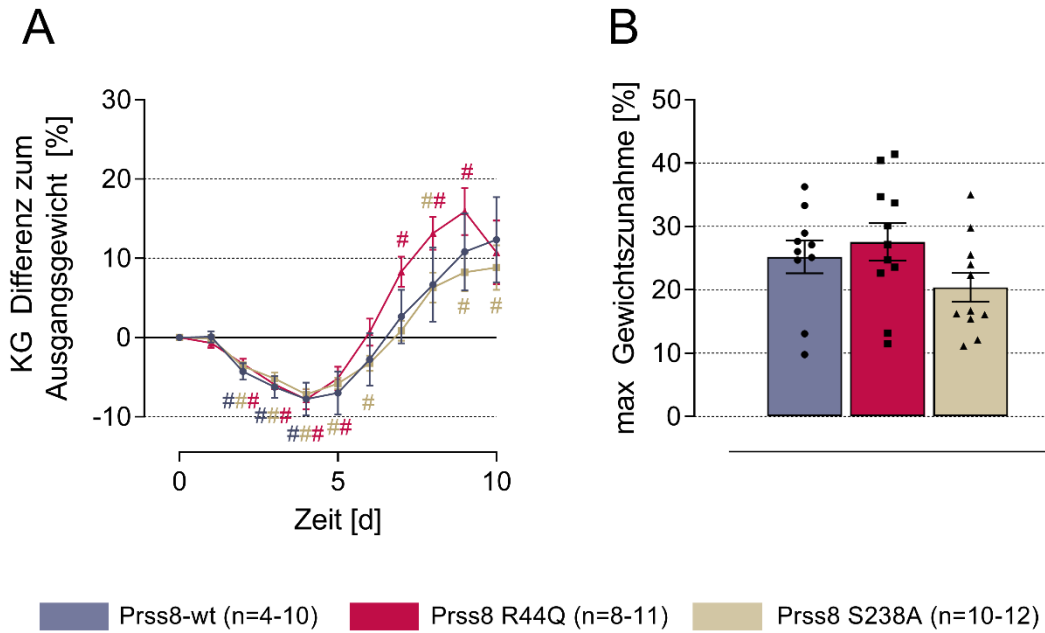
**Abbildung 3-21 Verlauf der Natriumausscheidung im Urin (publiziert in [175])**

Der Verlauf ab dem Tag der Induktion für 10 Tage (A) und die minimale Natriumausscheidung (B) werden als Mittelwert  $\pm$  SEM der Genotypen in  $\mu\text{mol/mg}$  Kreatinin gezeigt

#:  $p < 0,05$  in Bezug auf die Kontrolle \*.  $P < 0,05$  im Vergleich zu Prss8-wt

Im Verlauf der Natriumausscheidung kam es ab Tag 6 bei Prss8-wt und Prss8-R44Q bzw. bei Prss8-S238A ab Tag 7 bis Tag 9 zu einer restriktiven Phase mit einer minimalen Natriumausscheidung von  $13 \pm 4$   $\mu\text{mol/mg}$  Kreatinin bei Prss8-wt  $14 \pm 4$   $\mu\text{mol/mg}$  Kreatinin bei Prss8-R44Q und  $14 \pm 3$   $\mu\text{mol/mg}$  Kreatinin bei Prss8-S238A. Zum Ende der Beobachtungszeit kam es bei allen Gruppen wieder zu einem Anstieg der Natriumausscheidung.

### 3.4.4 Gewichtsverlauf



**Abbildung 3-22 Gewichtsveränderung nach Induktion (publiziert in [175])**

Der Verlauf des Körpergewichts in % im Vergleich zum Induktionsgewicht ab dem Tag der Induktion für 10 Tage (A) und die maximale Gewichtszunahme (B) im Vergleich zum Minimalgewicht in Prozent werden als Mittelwert  $\pm$  SEM der Genotypen in  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Kreatinin gezeigt

#:  $p < 0,05$  in Bezug auf die Kontrolle \*.  $P < 0,05$  im Vergleich zu Prss8-wt

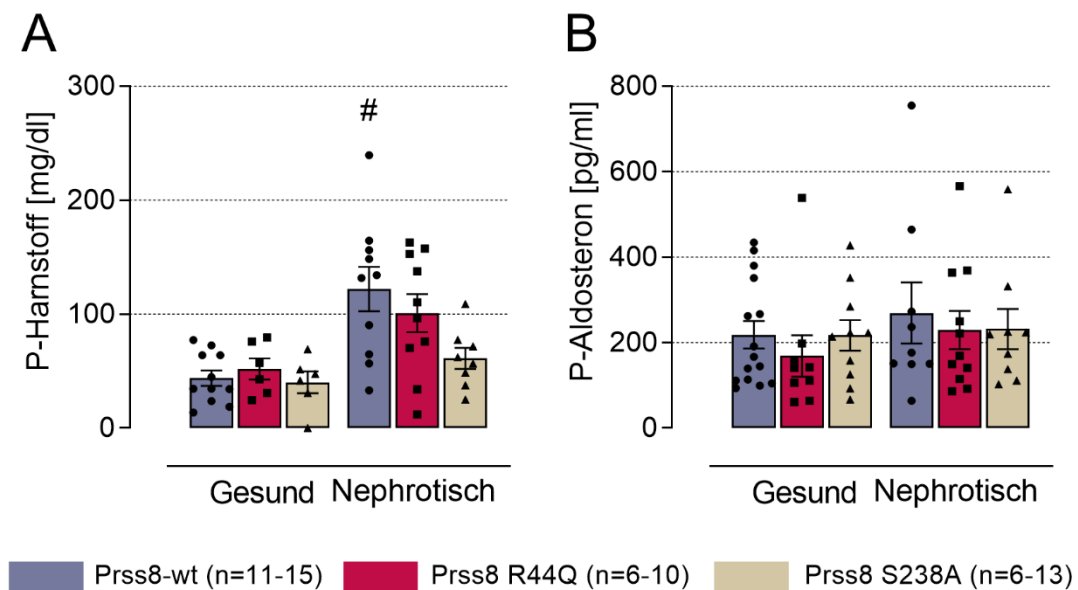
Das Induktionsgewicht der Gruppen unterschied sich mit  $25 \pm 3$  g bei Prss8-wt,  $26 \pm 3$  g bei Prss8-R44Q und  $26 \pm 3$  g bei Prss8-S238A nicht voneinander. Nach der Doxorubicin-Injektion kam es bis Tag 4 zu einer Gewichtsabnahme um  $8 \pm 2$  % bei Prss8-wt,  $8 \pm 1$  % bei Prss8-R44Q und  $7 \pm 1$  % bei Prss8-S238A, ab Tag 5 stieg das Gewicht kontinuierlich an und erreichte bis Tag 7 wieder das Ausgangsgewicht. Im Verlauf kam es zu einem weiteren Anstieg des Gewichts bis zu einer Gewichts Differenz von  $25 \pm 3$  % bei Prss8-wt,  $28 \pm 3$  % bei Prss8-R44Q und  $20 \pm 3$  % bei Prss8-S238A.



**Abbildung 3-23 Aszitesentwicklung bei nephrotischen Mäusen**

Dargestellt ist links eine gesunde Prss8-wt Maus, in der Mitte eine nephrotische Prss8-wt Maus mit Aszites an Tag 8 nach Induktion sowie rechts eine nephrotische Prss8-S238A Maus. Beide nephrotische Mäuse imponieren durch die im Vergleich zur gesunden Maus, deutliche abdominelle Volumenzunahme aufgrund von Aszites.

### 3.4.5 Plasmaparameter



**Abbildung 3-24 Harnstoff an Tag 10 (publiziert in [175])**

Gezeigt wird der Mittelwert  $\pm$  SEM der Harnstoffkonzentration in mg/dl aller drei Genotypen unter Kontrollbedingungen und an Tag 10 nach Induktion (A) und die Aldosteronkonzentration der Genotypen unter Kontrollbedingungen und an Tag 10 nach Induktion in pg/ml (B). #:  $p < 0,05$  in Bezug auf die Kontrolle \*.  $p < 0,05$  im Vergleich zu Prss8-wt

Die Harnstoffkonzentration erreichte bei Prss8-wt  $119 \pm 30$  mg/dl, bei Prss8-R44Q  $101 \pm 17$  mg/dl und bei Prss8-S238A  $65 \pm 7$  mg/dl und war bei Prss8-S238A tendenziell niedriger als bei Prss8-wt. Im Vergleich zu Kontrolle war bei allen Gruppen ein Anstieg zu verzeichnen, der nur bei Prss8-wt eine Signifikanz erreichte. Dagegen zeigte sich bei der Aldosteronkonzentration mit einer starken Streuung kein auffälliger Befund.



**Abbildung 3-25 Lipidämie des Plasmas bei nephrotischen Mäusen**

Abgebildet ist die deutliche milchig-weiße Trübung des linken Plasmas einer nephrotischen Maus im Vergleich zum rechten durchsichtigen Plasma einer gesunden Maus. Die rückseitige Beschriftung des Röhrchens ist beim rechten Röhrchen klar zu erkennen.

Das Plasma der nephrotischen Mäuse imponierte durch eine milchig weiße Trübung aufgrund der ausgeprägten Lipidämie.

**Tabelle 3-2 Blutwerte nach Induktion des nephrotischen Syndroms (publiziert in [175])**

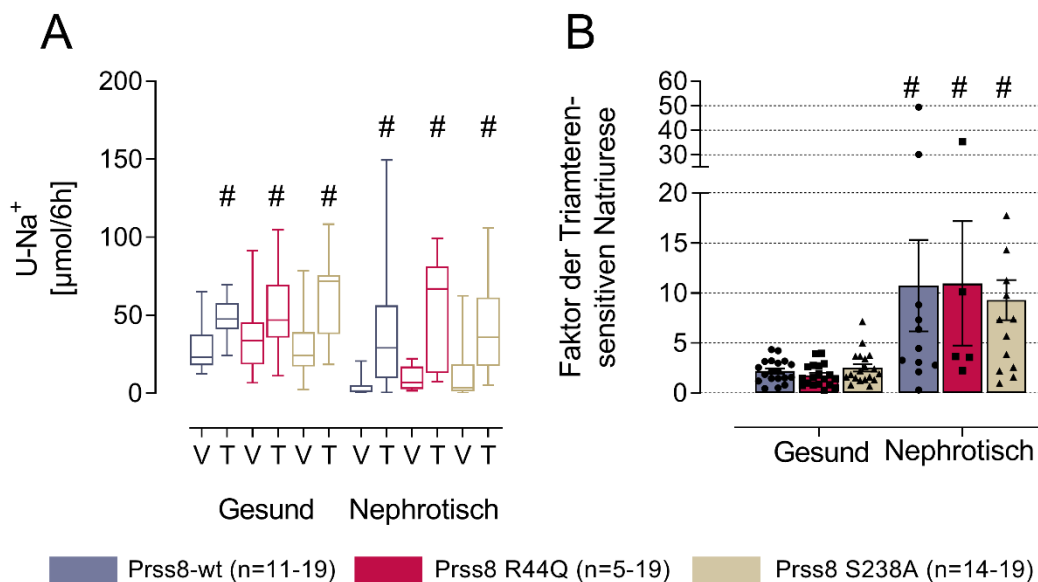
	Kontrolle			nephrotische Tiere		
	Prss8-wt	Prss8 R44Q	Prss8 S238A	Prss8-wt	Prss8-R44Q	Prss8-S238A
Anzahl	9	6	6	8	10	8-10
Na <sup>+</sup> [mmol/l]	$150 \pm 1$	$150 \pm 1$	$149 \pm 0,4$	$142 \pm 1$ #	$147 \pm 2$ #	$145 \pm 1$ #
K <sup>+</sup> [mmol/l]	$4,3 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,5$ #	$5,0 \pm 0,4$ #	$4,5 \pm 0,2$
pH	$7,27 \pm 0,01$	$7,29 \pm 0,01$	$7,29 \pm 0,01$	$7,30 \pm 0,01$	$7,31 \pm 0,01$	$7,29 \pm 0,01$
pCO <sub>2</sub> [mmHg]	$47 \pm 2$	$46 \pm 3$	$46 \pm 2$	$54 \pm 2$	$60 \pm 2$ #	$55 \pm 2$ #
std HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mmol/l]	$20 \pm 0,5$	$21 \pm 1$	$21 \pm 0,5$	$24 \pm 1$ #	$26 \pm 1$ #	$23 \pm 1$
Hämatokrit [%]	$46 \pm 1$	$46 \pm 1$	$47 \pm 1$	$41 \pm 3$	$38 \pm 4$ #	$41 \pm 4$

#:  $p < 0,05$  in Bezug auf die Kontrolle \*.  $p < 0,05$  im Vergleich zu Prss8-wt

In der Blutgasanalyse konnte bei den nephrotischen Tieren eine Abnahme der Plasmanatriumkonzentration gezeigt werden, das sich signifikant von der Kontrollgruppe unterschied. Auch kam es bei Prss8-wt und Prss8-R44Q zu einem Anstieg der Kaliumkonzentration im Plasma, dies war bei Prss8-S238A nicht zu verzeichnen.

Alle Gruppen zeigten einen deutlichen, aber mit Ausnahme von Prss8-R44Q nicht signifikanten Abfall des Hämatokrit um 5 % (Prss8-wt), 8 % (Prss8-R44Q) oder 6 % (Prss8-S238A).

### 3.4.6 Triamtereninjektion im nephrotischen Syndrom



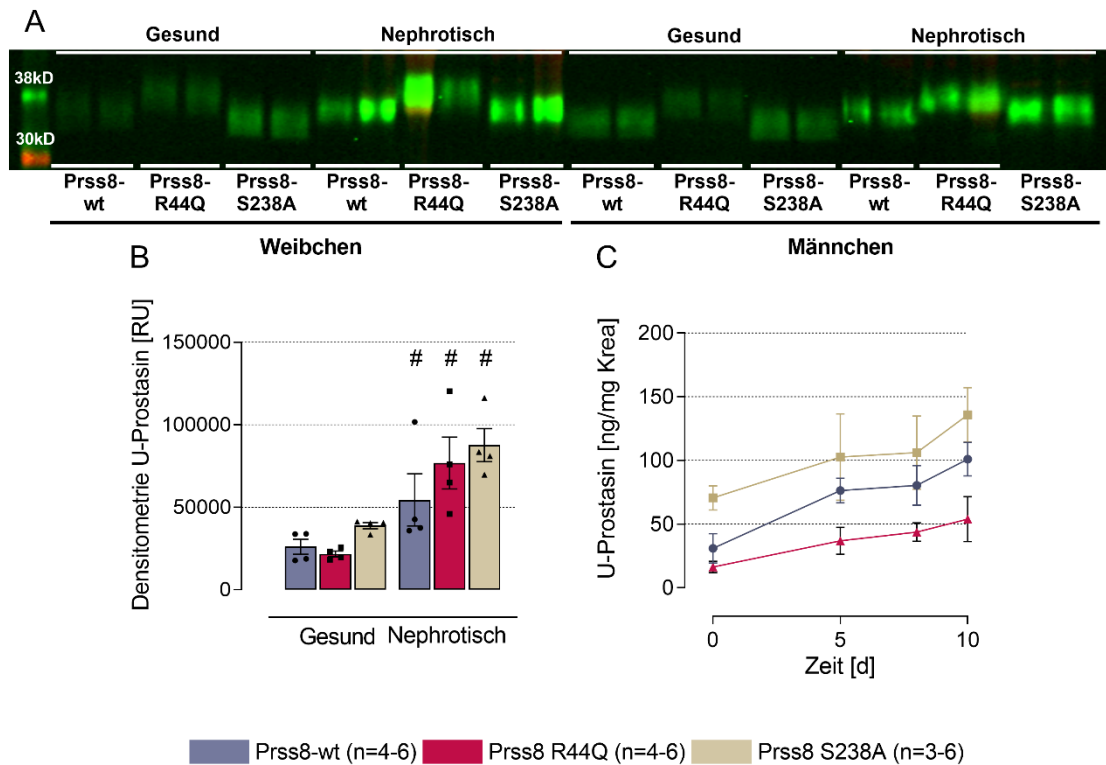
**Abbildung 3-26 Natriumausscheidung und Anstieg der Natriurese nach Triamterenbolus (publiziert in [175])**

Gezeigt wird die Natriumausscheidung im 6 Stunden Sammelurin nach Vehikel oder Triamterengabe in µmol/6h, sowohl für Gesunde als auch für nephrotische Mäuse (A). Der Faktor der triamterensensitiven Natriurese ist ebenfalls für gesunde und nephrotische Mäuse gezeigt (B). #: p < 0,05 in Bezug auf die Kontrolle \*. p<0,05 im Vergleich zu Prss8-wt.

Nach Gabe eines Bolus von Ampuwa® als Vehikel oder Triamterenmenge kam es in den folgenden 6 Stunden zu einer zwischen den Genotypen vergleichbaren Natriumausscheidung. Diese war bei allen Genotypen nach Triamterengabe höher als nach Injektion von Ampuwa®. Die triamterensensitive Natriurese war bei nephrotischen Mäusen aller Genotypen erhöht und unterschied sich von der triamterensensitiven Natriurese der gesunden Mäuse.



### 3.4.7 Prostinsekretion im Urin beim nephrotischem Syndrom



**Abbildung 3-27 Prostinsekretion im Urin (publiziert in [175])**

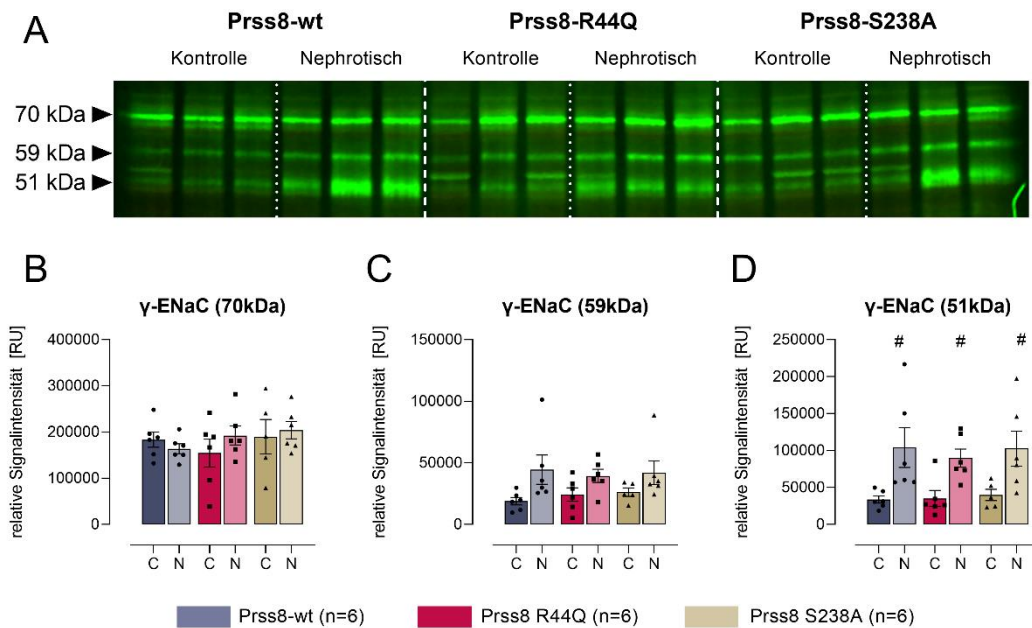
Es wird ein Western Blot auf Prostin im Urin bei gesunden und nephrotischen Mäusen gezeigt (A). Es wurde zwischen Weibchen und Männchen unterschieden. Aufgrund der in der Densitometrie vergleichbaren Intensität (B), wurde im weiteren Verlauf auf eine geschlechtergetrennte Auswertung verzichtet. Verlauf der Prostinsekretion nach Induktion des nephrotischen Syndroms an den Tagen null, fünf, acht und zehn nach Induktion gezeigt (C). Es werden die Mittelwerte und der SEM gezeigt.  
#:  $p < 0,05$  in Bezug auf die Kontrolle \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu Prss8-wt

Im Western Blot zeigte sich eine signifikant stärkere Prostinsekretion bei Urinen von nephrotischen Mäusen, ein Unterschied zwischen den Geschlechtern zeigte sich nicht. Dieser visuelle Eindruck bestätigte sich in der Densitometrie, in der alle Genotypen einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu gesunden Urinen der gleichen Mäuse zeigten. Zwischen den Genotypen oder den Geschlechtern zeigte sich kein Unterschied. Deutlich zu sehen sind die unterschiedlichen Wanderungsbewegungen von Prostin im SDS Gel, verursacht durch die fehlende Spaltung bei Prss8-R44Q.

Die Prostinsekretion im Urin, auf Kreatinin normiert, stieg im Verlauf des nephrotischen Syndroms bei allen drei Gruppen an. Dieser Anstieg verfehlte jedoch das Signifikanzniveau im Vergleich zur Prostinsekretion unter

Kontrollbedingungen. Auch zeigte sich, dass trotz der unterschiedlich gemessenen Konzentration im Urin der Mäuse kein Unterschied zwischen den knock-in Mäusen und den Prss8-wt Mäusen bestand.

### 3.4.8 Proteolytische Prozessierung des $\gamma$ -ENaC beim experimentellen nephrotischen Syndrom



**Abbildung 3-28 Western Blot der  $\gamma$ -Untereinheit gesunder und nephrotischer Mäuse (publiziert in [175])**

In A ist ein Western Blot für die Untersuchung der  $\gamma$ -Untereinheit gezeigt. Unterschieden werden die Genotypen und der Zeitpunkt gesund bzw. nephrotisch. B, C und D zeigen die Densitometrien der drei Banden. Jeweils Mittelwert  $\pm$  SEM \*:  $p < 0,05$  vs. Prss8-wt #:  $p < 0,05$  vs. Kontrollbedingung

Es kam im nephrotischen Syndrom zu einer Zunahme des Signals der für die Furin- und proteolytisch geschnittenen  $\gamma$ -Untereinheit stehenden Bande bei 51 kDa bei den nephrotischen Mäusen aller Genotypen. Die beiden anderen Banden unterschieden sich dagegen nicht wesentlich voneinander. Ein Unterschied zwischen den knock-in Mäusen und Prss8-wt Mäusen fand sich nicht.

## 4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung der Serinprotease Prostasin auf den Natriumhaushalt und auf die Aktivität des ENaC mit Hilfe der knock-in Mauslinien Prss8-S238A und Prss8-R44Q unter verschiedenen Bedingungen wie eine Niedrigsalzdiät, Diuretikagabe und beim nephrotischen Syndrom zu untersuchen.

### 4.1 Ergebnisse unter Niedrigsalzdiät

Die Ergebnisse zeigten, dass unter Kontrollbedingungen abseits des eindrücklichen Fellphänotyps kein relevanter Unterschied zwischen den Genotypen bezogen auf das Wachstum und die Nierenfunktion bestand [125, 126]. Die Mäuse aller Genotypen erreichten ein untereinander vergleichbares Gewicht. Futtermenge und Trinkmenge zeigten sich bei den knock-in Linien erhöht, was mit der geringeren Behaarung und dem damit höheren Energieaufwand zur Temperaturregulation erklärt werden kann.

Unter Kontrollbedingungen fanden sich keine Unterschiede bei den Elektrolyten im Plasma und im Urin. Das ähnliche Ansprechen auf Triamteren weist dabei auf eine ähnliche basale ENaC-Funktion hin. Auch unter dem Aspekt des Stress betrachtet, den die Haltung im metabolischen Käfig verursachte, fand sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Dies unterstützt die Einschätzung, dass die knock-in Linien unter Kontrollbedingungen den Mangel an Prostasin kompensieren können.

Bei den Versuchen unter Verwendung der Niedrigsalz und Niedrigsalz/Hochkalium Diäten kam es bei allen Genotypen zu einer Anpassung an die veränderten Bedingungen in Form einer verringerten Natriumausscheidung. Auffällig war hier die Ausbildung eines Hyperaldosteronismus bei den Prss8-R44Q Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass die Natriumrückresorption aus dem Urin bei Natriummangel nur unter stärkerer Gegenregulation über Aldosteron als bei Prss8-wt und Prss8-S238A erfolgen kann. Im Western Blot fand sich bei Prss8-R44Q-Mäusen ein abgeschwächter Anstieg der Expression von vollständig prozessierten  $\gamma$ -ENaC unter Niedrigsalzdiät verglichen mit den beiden anderen Genotypen [vgl. Abbildung 3-6]. Da gerade die vollständige proteolytische Spaltung eine

maximale ENaC Aktivierung bewirkt, lässt dies auf eine geringere Aktivität des ENaC bei Prss8-R44Q Mäusen schließen [84-86], was wiederum über den ausgebildeten Hyperaldosteronismus kompensiert wird. Da keine Daten zur Membranexpression vorlagen kann nicht ausgesagt werden, ob Prss8-R44Q-Mäuse eine kompensatorisch höhere ENaC-Membranabundanz unter Nidrigsalzdiät aufweisen.

## **4.2 Auswirkung der Behandlung mit Diuretika**

Die Behandlung mit den Diuretika Furosemid und HCT wurde von allen Mäusen toleriert, Furosemid führte zu einer starken Diurese mit begleitender Polydipsie der Mäuse. Dieser Befund kann als Zeichen dafür gewertet werden, dass Prostin, respektive die Aktivierbarkeit und die proteolytische Funktion für Gegenregulationsmechanismen bei Blockade des NCC und des NKCC2 keine entscheidende Rolle spielen.

Die einmalige Bolusgabe von Triamteren führte bei allen Genotypen zu einer erhöhten Natriurese und einer verminderten Kaliurese. In der Dauergabe von Triamteren zeigten alle Mäuse einen Gewichtsverlust, wobei dieser sich bei Prss8-wt und bei Prss8-S238A nach anfänglich Abfall stabilisierte. Demgegenüber zeigte sich bei Prss8-R44Q Mäusen ein progredienter Gewichtsverlust, der bei 75% der Tiere zu einem Abbruch des Experiments führte [vgl. Abbildung 3-12]. Alle Genotypen entwickelten einen Hyperaldosteronismus, Prss8-R44Q Mäuse erreichten hierbei signifikant höhere Werte. Diese waren etwa doppelt so hoch wie die Werte der anderen Genotypen. Zudem entwickelte sich bei Prss8-R44Q Mäusen eine ausgeprägte Azidose und eine Hyperkaliämie. Während eine Adaptation bei diätetischer Behandlung noch möglich ist, zeigt sich die Relevanz der Prostinaktivierung deutlich unter Triamterenbehandlung. Diese erforderte eine konsequentere Gegenregulation durch vermehrte Expression und Hochregulierung der Offenwahrscheinlichkeit des ENaC. Ein ähnliches Bild hatte sich bereits in Studien über die SGK1 knock-out Maus und in Studien zur mTORC2 knock-out Maus gezeigt [160, 176], welche unter Triamterenbehandlung einen ausgeprägten Salzverlust mit begleitender Hyperkaliämie entwickelten. Daher hat sich Triamteren-Modell als geeignet

erwiesen, auch eine subtile Kompromittierung der ENaC-Aktivierung aufzudecken, welche unter Nidrigsalz- und Nidrigsalz/Hochkalium- Diäten noch maskiert ist.

Prss8-R44Q-Mäuse entwickelten mit der Azidose, der Hyperkaliämie und dem Wasserverlust einen Symptomkomplex, der an eine erworbene Form des renalen Pseudo-Hypoaldosteronismus (PHA) Typ 1 erinnert [177]. Die kompensatorisch erhöhte Aldosteron-Konzentration weist auf eine Resistenz der Aldosteron-Wirkung bei Prss8-R44Q-Mäusen hin. Ein ähnlicher Effekt konnte bereits mit Mäusen gezeigt werden, welche eine induzierbare Deletion der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC im distalen Tubulus tragen [30]. Bereits 24 Stunden bis 48 Stunden nach Induktion verschlechterte sich der Gesundheitszustand dieser Mäuse rapide. Sie entwickelten, ähnlich wie auch die Prss8-R44Q in dieser Studie, eine ausgeprägte Azidose und Hyperkaliämie bei reduzierter Futter- und Trinkmenge [30].

Bei Prss8-S238A-Mäusen blieben diese Effekte dagegen aus, was für eine erhaltene Gegenregulation bei ENaC Blockade spricht. Dies weist darauf hin, dass der kompensatorische Effekt nicht von der proteolytischen Prostasinaktivität abhängt [174]. Hierfür spricht auch, dass bei der Untersuchung der Nieren bei Prss8-wt und Prss8-S238A ein vergleichbarer Anstieg der proteolytischen Spaltprodukte der  $\gamma$ -Untereinheit zu verzeichnen war [vgl. Abbildung 3-15] [174]. Dies war bei Prss8-R44Q nicht in vergleichbarem Maße der Fall. Ein ähnlicher Befund fand sich bereits unter Nidrigsalzdiät ohne jedoch die gleiche Konsequenz für den Gesundheitszustand der Mäuse zu erlangen [vgl. Abbildung 3-6] [175]. Immunhistochemisch konnte daneben gezeigt werden, dass die Expression aller ENaC Untereinheiten bei allen Genotypen unter Triamteren anstieg und eine Verschiebung der ENaC Konzentration hin zur apikalen, dem Tubulus zugewandten, Zellmembran zeigte. Dagegen fand sich bei der Behandlung mit HCT und Furosemid kein Unterschied zwischen den Linien, so dass davon auszugehen ist, dass Prostasin hier keine relevante Rolle bei der Gegenregulation einer medikamentösen NCC und NKCC2 Blockade spielt. Dies passt zu Befunden, dass Prostasin zwar im gesamten Tubulussystem vorkommt, vor allem aber in Zellen des distalen Tubulus und des Sammelrohrs gemeinsam

mit dem ENaC exprimiert wird und insbesondere für dessen Funktion von Relevanz ist [178-180].

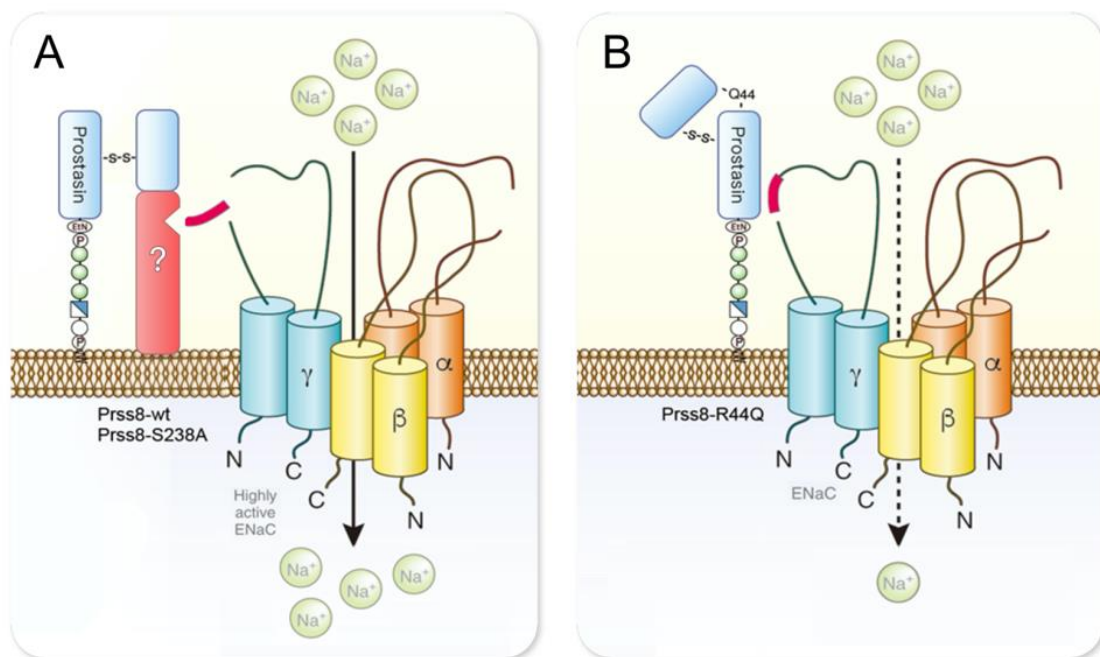
Ergebnisse einer älteren Studie berichteten davon, dass Aldosteron auf die Prostinexpression Einfluss nehmen kann [130]. Dies konnte hier, wie auch in einer anderen aktuelleren Studie [181], nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine konstante Prostin-Exkretion im Urin sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter einer fast zehnfach erhöhten Aldosteronkonzentration nach Triamterenbehandlung [vgl. Abbildung 3-14] [174]. Dies spricht somit gegen die formulierte Hypothese, dass die Aldosteronkonzentration einen Einfluss auf Prostin hat [130].

#### **4.3 Auswirkung der untersuchten Prostin-Mutationen im Vergleich**

Diese Ergebnisse bestätigen Befunde aus *in vitro* Studien [112, 182], die bereits zeigen konnten, dass eine proteolytische Funktion von Prostin nicht immer notwendig ist, um einen Effekt durch Prostin zu erzielen [126]. Oozyten, auf welchen Prss8-S238A oder Prss8-R44Q exprimiert wurde, zeigten bei Verwendung eines prostin-spezifischen Substrats [183] im Gegensatz zu Oozyten mit Prss8-wt keine prostin-spezifische proteolytische Aktivierung an der Zelloberfläche. Dagegen kam es unter Verwendung eines allgemeineren Substrats für Trypsin-artige Proteasen [114, 184] zu einer proteolytischen Aktivierung bei Prss8-S238A und bei Prss8-wt, während dieser Effekt bei Prss8-R44Q ausblieb [174]. Bei Oozyten bei denen der ENaC coexprimiert wurde, zeigte sich bei Prss8-R44Q ein geringerer, wenn auch vorhandener, elektrischer Strom als bei Prss8-wt und Prss8-S238A. Sowohl Prss8-wt als auch Prss8-S238A konnten also eine vollständige proteolytische ENaC-Aktivierung in den Oozyten generieren, ohne dass Prss8-S238A jedoch eine eigene proteolytische Aktivität besitzt [174].

Die Befunde für Prss8-R44Q und Prss8-S238A weisen darauf hin, dass hierfür die intrazelluläre Aktivierung von Prostin an der Stelle R44 von entscheidenderer Bedeutung ist, als die proteolytische Funktion von Prostin. So kommt das ungeschnittene Prostin als Einzelkette vor, bevor es durch

proteolytische Aktivierung in eine Doppelkette geschnitten wird [vgl. Abbildung 3-1 Renale Prostatinexpression und -exkretion in den Urin (publiziert in [174][114]. Hierdurch kommt es zu einer Veränderung der tertiären Struktur von Prostatin. Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine noch unbekannte weitere Serinprotease diese Strukturveränderung benötigt, um an Prostatin zu binden und nachfolgend den ENaC proteolytisch zu schneiden, um ihn zu aktivieren.



**Abbildung 4-1 Schema der Gerüstfunktion publiziert in [174]**

Dargestellt ist ein Modell der Koexpression von Prostatin und ENaC auf der apikalen Zellmembran. In Abbildung A ist Prostatin bereits intrazellulär an R44 gespalten worden und hat hierdurch die Tertiärstruktur geändert, wodurch eine noch nicht bekannte Protease an Prostatin binden und es als Gerüst nutzen kann. Diese Protease proteolytisch dann die  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC und aktiviert ihn dadurch. Dies ist bei dem ENaC in Abbildung B nicht möglich. Da hier aufgrund des knock-ins die Spaltung nicht geschehen kann und es somit zu keiner Veränderung der Tertiärstruktur und zu keiner Bindung einer weiteren Protease kommt, wird der ENaC nicht vollständig aktiviert.

Für weitergehende Untersuchungen zur Rolle von Prostatin auf die ENaC Aktivität in der Niere, beispielsweise ob die kompromittierte Gerüstfunktion von Prss8-R44Q nicht doch einen geringen, aber relevanten Einfluss auf die proteolytische Aktivierung des ENaC hat, würde eine Prostatin knock-out Maus benötigt. Dieses Modell müsste aufgrund der letalen Auswirkungen jedoch ein nierenspezifisch-induzierbares sein [120]. Ein induzierbares Modell hätte zudem

den Vorteil, dass eventuelle Adaptationen an die Veränderungen nicht bereits in der Entwicklung der Mäuse geschehen könnten, sondern zu einem definierten Zeitpunkt erfolgen müssten. Ein solches Modell war zum Zeitpunkt des Studienbeginns jedoch noch nicht verfügbar, so dass auf die knock-in Modelle zurückgegriffen werden musste.

#### **4.4 Bedeutung von Prostin beim experimentellen nephrotischen Syndrom**

Nach ausreichender Rückkreuzung der Linien auf den doxorubicin-empfindlichen 129 S1/SvImJ-Stamm konnten bei Prss8-wt, Prss8-R44Q und bei Prss8-S238A durch die Injektion von Doxorubicin ein experimentelles nephrotisches Syndrom ausgelöst werden. Nach Induktion durch Injektion entwickelten alle Genotypen eine Proteinurie [vgl. Abbildung 3-20]. Es zeigte sich, dass eine Proteinurie von über 100 mg/mg Kreatinin über mindestens zwei Tage ausreichte, damit die Mäuse ein nephrotisches Syndrom entwickelten. Die Proteinurie unterschied sich nicht maßgeblich zwischen den Genotypen.

Nach Induktion eines experimentellen nephrotischen Syndroms kam es bei Prss8-R44Q und Prss8-S238A-Mäusen zu einer den Wildtypen entsprechenden Natriumretention im Urin, welche für wenige Tage anhielt und für einen fast natriumfreien Urin sorgte [vgl. Abbildung 3-21]. Mit der verminderten Natriumausscheidung einhergehend, war bei allen Mäusen eine vergleichbare Gewichtszunahme, entsprechend einer Ödembildung, in Form von Aszites, zu beobachten [vgl. Abbildung 3-22]. Eine anfängliche Gewichtsabnahme nach Induktion war am ehesten auf die verminderte Nahrungsaufnahme, bedingt durch die Inappetenz nach der Doxorubicininjektion zurückzuführen. Dies war ein Befund, der bereits aus Vorherigen Experimenten mit diesem Modell bekannt war [64, 108, 150]. Damit entsprach der Verlauf bei allen Genotypen dem bei diesem Modell zu erwartenden experimentellen nephrotischen Syndrom.

Die triamterensensitive Natriurese zeigte sich ebenfalls bei allen Genotypen erhöht und kann als Korrelat für eine stärkere Aktivierung des ENaC gesehen werden. Dazu passt, dass alle Genotypen bei der Auswertung von Western Blot Ergebnissen nephrotischer Nieren, einen vergleichbaren Anstieg der doppelt



geschnittenen  $\gamma$ -ENaC Untereinheit zeigten. Dies kann als weiterer Hinweis gesehen werden, dass die beiden untersuchten und mittels knock-in generierten Prostasinmutationen keinen Einfluss auf die proteolytische ENaC Aktivierung haben. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil der an der Furinschnittstelle und der zweiten proteolytischen Schnittstelle geschnittenen Bande bei Mäusen, die mit Aprotinin behandelt wurden, und kein Ödem ausbildeten, nicht erhöht war [153].

Sowohl im Western Blot als auch im ELISA gegen Prostasin aus dem Urin zeigte sich eine Zunahme der Prostasinausscheidung bei nephrotischen Mäusen. Aufgrund der Expression von Prostasin in der Prostata männlicher Mäuse wurde die Untersuchung auf Prostasin im Urin zunächst geschlechtergetrennt durchgeführt, es zeigte sich allerdings kein Unterschied zwischen den Geschlechtern. Es ist zu vermuten, dass die höhere Menge an Prostasin auf die insgesamt erhöhte Protein- und Proteasemenge im Urin zurückzuführen ist [175]. Insbesondere ist es möglich, dass eine aberrant in den Urin gelangende Protease den GPI-Anker von Prostasin schneidet und Prostasin so von der Zellmembran gelöst wird. Alternativ kann ein erhöhter Prostasinumsatz in der Niere diskutiert werden.

Die Ergebnisse zeigten somit, dass die Expression von Prostasin sich nicht zwischen den Genotypen unterscheidet, wohl aber, dass sie im Verlauf des nephrotischen Syndroms anstieg.

#### **4.5 Rolle von Prostasin bei der Ödementstehung**

Der vergleichbare Gewichtsanstieg der Tiere mit nephrotischem Syndrom zeigte deutlich, dass die beiden knock-in Linien nicht vor der Ödementstehung geschützt sind. So hat die bei Prss8-S238A unterbundene proteolytische Aktivität von Prostasin keinen Einfluss auf die Überaktivierung des ENaC. Dieser Befund ist konsistent mit den Befunden der physiologischen Untersuchungen, welche bereits zeigten, dass Prostasin keine proteolytische Funktion benötigt, um Einfluss auf die ENaC Regulation zu nehmen [174].

Insbesondere aufgrund der aus den Untersuchungen mit Nidrigsalzdiät und Triamterenbehandlung berichteten Ergebnissen ist diese Erkenntnis

dahingehend bemerkenswert, dass auch Prss8-R44Q keinen Unterschied bei der proteolytischen Prozessierung des  $\gamma$ -ENaC zeigte [vgl. Abbildung 3-28] [175]. Die Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen hätten darauf hindeuten können, dass zwar nicht die eigenständige proteolytische Funktion von Proxasin für die proteolytische ENaC Spaltung im nephrotischen Syndrom verantwortlich ist, aber die Konfigurationsänderung durch die Aktivierung von Proxasin eine Rolle hierbei spielen kann. Diese mögliche Gerüstfunktion scheint aber zumindest im pathophysiologischen Kontext der Proteasurie keine Relevanz zu haben. Ob ein kompletter Proxasin knock-out in der Niere zu einer relevanten Veränderung der Ödementstehung führen könnte, kann in diesem Modell mit diesen Mutanten nicht abschließend geklärt werden. Naheliegend ist diese Vermutung aufgrund der hier dargelegten Befunde jedoch nicht. Damit widersprechen die Ergebnisse dieser Studie den Hinweisen aus *in vitro* Experimenten zu Proxasin, die nahelegten, dass Proxasin eine entscheidende Rolle bei der proteolytischen ENaC Aktivierung im nephrotischen Syndrom spielen könnte [127]. Es zeigte sich vielmehr, dass weder Prss8-R44Q noch Prss8-S238A die proteolytische ENaC Aktivierung im nephrotischen Syndrom supprimieren oder verhindern können.

Damit reiht sich Proxasin in die aprotininsensitiven Proteasen ein [108, 132, 149, 150], die zwar *in vitro* eine proteolytische ENaC Aktivierung vermitteln [131], *in vivo* unter den pathophysiologischen Bedingungen des nephrotischen Syndroms singulär jedoch nicht für Natriumrestriktion und Ödementstehung verantwortlich sind.

Welche Protease genau den ENaC während der Proteasurie im nephrotischen Syndrom proteolytisch überaktiviert, bleibt daher zum jetzigen Zeitpunkt weiter ungeklärt [77, 151]. Neben den bislang untersuchten Proteasen sind hier insbesondere Serinproteasen von Interesse, die physiologisch im Plasma vorkommen, im nephrotischen Syndrom aberrant in das Tubulussystem gelangen und durch Aprotinin hemmbar sind. Hierbei sind primär die Proteasen des Gerinnungssystems und des Komplementsystems zu nennen [185]. Eine theoretische pharmakologische Inhibition von Proxasin als Therapieansatz zum Schutz vor der Ödementstehung im nephrotischen Syndrom scheidet aufgrund

der hier dargelegten Ergebnisse aus. Alternativ ist zu diskutieren, ob die proteolytische Aktivierung des ENaC auch über ein redundantes System verschiedener Proteasen erfolgen könnte. Die Untersuchungen mit Aprotinin lassen, aufgrund der unspezifischen Inhibition von einer Vielzahl an Serinproteasen durch Aprotinin, diese Möglichkeit offen [152, 185].

#### **4.6 Ausblick**

Die hier dargelegte Studie konnte neue Betrachtungsmöglichkeiten für die Interaktion von Proxalasin mit dem ENaC zeigen. Gerade in Bezug auf die Rolle von Proxalasin als Serinprotease im Kontext der proteolytischen ENaC Aktivierung konnten neue Aspekte aufgezeigt und die Relevanz der Aktivierung von Proxalasin gezeigt werden.

Viele Fragen zur physiologischen ENaC- Aktivierung bleiben zu diesem Zeitpunkt jedoch unbeantwortet. So ist nicht klar, wie genau Proxalasin im distalen Tubulus aktiviert wird. Matriptase ist hier eine Kandidatenprotease, für die in anderen Geweben ein Einfluss auf die Aktivierung von Proxalasin gezeigt werden konnte; eine Erkenntnis, die jedoch nicht auf jedes Organsystem zutrifft [117, 174, 186, 187]. Somit ist die Regulation und Aktivierung von Proxalasin sicherlich ein Feld, auf dem in Zukunft neue Erkenntnisse zu erwarten sind.

Zudem ist Proxalasin nur eine von vielen Proteasen, die direkt oder indirekt proteolytisch auf die komplexe Regulation des ENaC Einfluss nehmen können. Es bleibt abzuwarten, welche neuen *in vitro* und *in vivo* Erkenntnisse, die Forschung in den nächsten Jahren hierzu beitragen wird.

Offen bleibt auch, welche Protease die für die Überaktivierung erforderliche proteolytische Spaltung übernimmt, oder ob alternativ ein redundantes System von Proteasen hierfür in Frage kommt. Der Fokus in den nächsten Jahren liegt hierbei insbesondere auf den durch Wörn *et al.* 2020 [104] identifizierten und aktuell noch nicht ausgeschlossenen Proteasen, welche experimentell durch knock-out Mäuse untersucht werden müssen.

## 5 Zusammenfassung

Trotz verschiedener *in vitro* Studien war die Relevanz der membranständigen Serinprotease Prostasin bei der Aktivierung des epithelialen Natriumkanals ENaC *in vivo* bisher noch unbekannt. Auf Grund der Letalität von Prostasin knock-out Mäusen, musste auf knock-in Mäuse ausgewichen werden. An Mauslinien mit nicht aktivierbarem Prostasin (Prss8-R44Q), proteolytisch inaktivem Prostasin (Prss8-S238A) und Wildtypprostasin (Prss8-wt) wurde die Rolle von Prostasin unter Nidrigsalzdiäten und unter diuretischen Behandlungen untersucht. Anhand des Modells eines Doxorubicin-induzierten nephrotisches Syndroms wurde dessen Verlauf im Vergleich der drei Genotypen untersucht.

Prss8-S238A Mäuse zeigten unter Nidrigsalzdiäten und den Diuretika keinen Unterschied zum Wildtyp. Prss8-R44Q Mäuse entwickelten unter Nidrigsalzdiät einem kompensatorischen Hyperaldosteronismus und unter ENaC Blockade mit Triamteren ein dem renalen Pseudo-Hypoaldosteronismus (PHA) Typ 1 ähnliches Krankheitsbild. Bei allen Genotypen kam es nach Doxorubicin Injektion zu einem nephrotischen Syndrom mit renaler Natriumretention und Ödementstehung.

Dies spricht dafür, dass die proteolytische Aktivität von Prostasin unter physiologischen Bedingungen keine Relevanz für die Aktivierung des ENaC hat und zeigt, dass die durch die Aktivierung an R44 ausgelöste Konfigurationsänderung von Prostasin *in vivo* relevant für die proteolytische Aktivierung von ENaC ist. Es ist davon auszugehen, dass Prostasin durch seine Membranbindung als Gerüst für eine noch nicht näher bekannte (Serin-)Protease dient, die den ENaC proteolytisch aktiviert, ohne ihn jedoch unter physiologischen Bedingungen selbst zu aktivieren.

Abschließend zeigen die Daten, dass weder die proteolytische Aktivität noch die Tertiärstruktur von Prostasin *in vivo* eine Rolle bei der durch die proteolytischen Aktivierung des ENaC bedingten Natriumretention und der damit einhergehenden Ödembildung im experimentellen nephrotischen Syndrom spielen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Alvarez de la Rosa D, Canessa CM, Fyfe GK, Zhang P. Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol.* 2000;62(1):573-94. doi:10.1146/annurev.physiol.62.1.573
2. Palmer LG. Ion selectivity of epithelial Na channels. *J Membr Biol.* 1987;06/01 1987;96(2):97-106. doi:10.1007/BF01869236
3. Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev.* Apr 1997;77(2):359-96. doi:10.1152/physrev.1997.77.2.359
4. Kashlan OB, Kleyman TR. ENaC structure and function in the wake of a resolved structure of a family member. *Am J Physiol Renal Physiol.* Oct 2011;301(4):F684-96. doi:10.1152/ajprenal.00259.2011
5. Rossier BC. Epithelial sodium channel (ENaC) and the control of blood pressure. *Curr Opin Pharmacol.* Apr 2014;15:33-46. doi:10.1016/j.coph.2013.11.010
6. Hanukoglu I, Boggula VR, Vaknine H, Sharma S, Kleyman T, Hanukoglu A. Expression of epithelial sodium channel (ENaC) and CFTR in the human epidermis and epidermal appendages. *Histochem Cell Biol.* Jun 2017;147(6):733-748. doi:10.1007/s00418-016-1535-3
7. Renard S, Voilley N, Bassilana F, Lazdunski M, Barbry P. Localization and regulation by steroids of the alpha, beta and gamma subunits of the amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel in colon, lung and kidney. *Pflugers Arch.* Jul 1995;430(3):299-307. doi:10.1007/BF00373903
8. Rotin D, Staub O. Function and Regulation of the Epithelial Na<sup>+</sup> Channel ENaC. *Comprehensive Physiology.* 2017-2045.
9. Lindemann B. Taste reception. *Physiol Rev.* Jul 1996;76(3):719-66. doi:10.1152/physrev.1996.76.3.719
10. Schmidt RF, Florian L, Manfred H. *Physiologie des Menschen.* 31 ed. Springer-Lehrbuch. 2011.
11. Nesterov V, Dahlmann A, Krueger B, Bertog M, Loffing J, Korbmacher C. Aldosterone-dependent and -independent regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) in mouse distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol.* Nov 1 2012;303(9):F1289-99. doi:10.1152/ajprenal.00247.2012
12. Canessa CM, Schild L, Buell G, et al. Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature.* Feb 3 1994;367(6462):463-7. doi:10.1038/367463a0
13. Staruschenko A, Adams E, Booth RE, Stockand JD. Epithelial Na<sup>+</sup> Channel Subunit Stoichiometry. *Biophysical Journal.* 2005/06/01/ 2005;88(6):3966-3975. doi:<https://doi.org/10.1529/biophysj.104.056804>
14. Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Voilley N, Lazdunski M. Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem.* Nov 17 1995;270(46):27411-4. doi:10.1074/jbc.270.46.27411
15. Yamamura H, Ugawa S, Ueda T, Nagao M, Shimada S. Protons activate the delta-subunit of the epithelial Na<sup>+</sup> channel in humans. *J Biol Chem.* Mar 26 2004;279(13):12529-34. doi:10.1074/jbc.M400274200
16. Giraldez T, Rojas P, Jou J, Flores C, Alvarez de la Rosa D. The epithelial sodium channel delta-subunit: new notes for an old song. *Am J Physiol Renal Physiol.* Aug 1 2012;303(3):F328-38. doi:10.1152/ajprenal.00116.2012
17. Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature.* Sep 20 2007;449(7160):316-23. doi:10.1038/nature06163
18. Noreng S, Bharadwaj A, Posert R, Yoshioka C, Bacongus I. Structure of the human epithelial sodium channel by cryo-electron microscopy. *Elife.* Sep 25 2018;7:e39340. doi:10.7554/eLife.39340
19. Canessa CM, Merillat AM, Rossier BC. Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells. *Am J Physiol.* Dec 1994;267(6 Pt 1):C1682-90. doi:10.1152/ajpcell.1994.267.6.C1682

20. Grunder S, Firsov D, Chang SS, et al. A mutation causing pseudohypoaldosteronism type 1 identifies a conserved glycine that is involved in the gating of the epithelial sodium channel. *EMBO J*. Mar 3 1997;16(5):899-907. doi:10.1093/emboj/16.5.899
21. Schild L. The epithelial sodium channel and the control of sodium balance. *Biochim Biophys Acta*. Dec 2010;1802(12):1159-65. doi:10.1016/j.bbadis.2010.06.014
22. Yang L, Palmer LG. Determinants of selective ion permeation in the epithelial Na(+) channel. *J Gen Physiol*. Oct 1 2018;150(10):1397-1407. doi:10.1085/jgp.201812164
23. Schild L, Schneeberger E, Gautschi I, Firsov D. Identification of amino acid residues in the alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation. *J Gen Physiol*. Jan 1997;109(1):15-26. doi:10.1085/jgp.109.1.15
24. Vallee C, Howlin B, Lewis R. Ion Selectivity in the ENaC/DEG Family: A Systematic Review with Supporting Analysis. *Int J Mol Sci*. Oct 12 2021;22(20):10998. doi:10.3390/ijms222010998
25. Bhalla V, Hallows KR. Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. *J Am Soc Nephrol*. Oct 2008;19(10):1845-54. doi:10.1681/ASN.2008020225
26. Hummler E, Barker P, Gatzky J, et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet*. Mar 1996;12(3):325-8. doi:10.1038/ng0396-325
27. Barker PM, Nguyen MS, Gatzky JT, et al. Role of gammaENaC subunit in lung liquid clearance and electrolyte balance in newborn mice. Insights into perinatal adaptation and pseudohypoaldosteronism. *J Clin Invest*. Oct 15 1998;102(8):1634-40. doi:10.1172/JCI3971
28. Bonny O, Hummler E. Dysfunction of epithelial sodium transport: from human to mouse. *Kidney Int*. Apr 2000;57(4):1313-8. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00968.x
29. McDonald FJ, Yang B, Hrstka RF, et al. Disruption of the beta subunit of the epithelial Na<sup>+</sup> channel in mice: hyperkalemia and neonatal death associated with a pseudohypoaldosteronism phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 16 1999;96(4):1727-31. doi:10.1073/pnas.96.4.1727
30. Boscardin E, Perrier R, Sergi C, et al. Plasma Potassium Determines NCC Abundance in Adult Kidney-Specific gammaENaC Knockout. *J Am Soc Nephrol*. Mar 2018;29(3):977-990. doi:10.1681/ASN.2017030345
31. Perrier R, Boscardin E, Malsure S, et al. Severe Salt-Losing Syndrome and Hyperkalemia Induced by Adult Nephron-Specific Knockout of the Epithelial Sodium Channel alpha-Subunit. *J Am Soc Nephrol*. Aug 2016;27(8):2309-18. doi:10.1681/ASN.2015020154
32. Palmer LG, Patel A, Frindt G. Regulation and dysregulation of epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Clin Exp Nephrol*. Feb 2012;16(1):35-43. doi:10.1007/s10157-011-0496-z
33. Crabbe J. Stimulation of active sodium transport by the isolated toad bladder with aldosterone in vitro. *J Clin Invest*. Nov 1961;40(11):2103-10. doi:10.1172/JCI104436
34. Rainey WE, White P. Functional adrenal zonation and regulation of aldosterone biosynthesis. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 1998;5(3):175-182.
35. Kashlan OB, Kleyman TR. Epithelial Na(+) channel regulation by cytoplasmic and extracellular factors. *Exp Cell Res*. May 15 2012;318(9):1011-9. doi:10.1016/j.yexcr.2012.02.024
36. Kleyman TR, Eaton DC. Regulating ENaC's gate. *Am J Physiol Cell Physiol*. Jan 1 2020;318(1):C150-C162. doi:10.1152/ajpcell.00418.2019
37. Grahammer F, Huber TB, Artunc F. Role of mTOR Signaling for Tubular Function and Disease. *Physiology (Bethesda)*. Nov 1 2021;36(6):350-358. doi:10.1152/physiol.00021.2021
38. Artunc F, Schleicher E, Weigert C, Fritsche A, Stefan N, Haring HU. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature. *Nat Rev Nephrol*. Dec 2016;12(12):721-737. doi:10.1038/nrneph.2016.145
39. Snyder PM. Minireview: regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channel trafficking. *Endocrinology*. Dec 2005;146(12):5079-85. doi:10.1210/en.2005-0894
40. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest*. Oct 1999;104(7):R19-23. doi:10.1172/JCI7840

41. Stokes JB, Sigmund RD. Regulation of rENaC mRNA by dietary NaCl and steroids: organ, tissue, and steroid heterogeneity. *Am J Physiol*. Jun 1998;274(6):C1699-707. doi:10.1152/ajpcell.1998.274.6.C1699
42. Asher C, Wald H, Rossier BC, Garty H. Aldosterone-induced increase in the abundance of Na<sup>+</sup> channel subunits. *Am J Physiol*. Aug 1996;271(2 Pt 1):C605-11. doi:10.1152/ajpcell.1996.271.2.C605
43. Sayegh R, Auerbach SD, Li X, et al. Glucocorticoid induction of epithelial sodium channel expression in lung and renal epithelia occurs via trans-activation of a hormone response element in the 5'-flanking region of the human epithelial sodium channel alpha subunit gene. *J Biol Chem*. Apr 30 1999;274(18):12431-7. doi:10.1074/jbc.274.18.12431
44. Zhang W, Xia X, Reisenauer MR, et al. Aldosterone-induced Sgk1 relieves Dot1a-Af9-mediated transcriptional repression of epithelial Na<sup>+</sup> channel alpha. *J Clin Invest*. Mar 2007;117(3):773-83. doi:10.1172/JCI29850
45. Perlewitz A, Nafz B, Skalweit A, Fahling M, Persson PB, Thiele BJ. Aldosterone and vasopressin affect {alpha}- and {gamma}-ENaC mRNA translation. *Nucleic Acids Res*. Sep 2010;38(17):5746-60. doi:10.1093/nar/gkq267
46. Djelidi S, Fay M, Cluzeaud F, et al. Transcriptional regulation of sodium transport by vasopressin in renal cells. *J Biol Chem*. Dec 26 1997;272(52):32919-24. doi:10.1074/jbc.272.52.32919
47. Nicco C, Wittner M, DiStefano A, Jounier S, Bankir L, Bouby N. Chronic exposure to vasopressin upregulates ENaC and sodium transport in the rat renal collecting duct and lung. *Hypertension*. Nov 2001;38(5):1143-9. doi:10.1161/hy1001.092641
48. Ecelbarger CA, Kim GH, Terris J, et al. Vasopressin-mediated regulation of epithelial sodium channel abundance in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jul 2000;279(1):F46-53. doi:10.1152/ajprenal.2000.279.1.F46
49. Schafer JA. Abnormal regulation of ENaC: syndromes of salt retention and salt wasting by the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*. Aug 2002;283(2):F221-35. doi:10.1152/ajprenal.00068.2002
50. Chang CT, Hung CC, Chen YC, et al. Transforming growth factor-beta1 decreases epithelial sodium channel functionality in renal collecting duct cells via a Smad4-dependent pathway. *Nephrol Dial Transplant*. Apr 2008;23(4):1126-34. doi:10.1093/ndt/gfm786
51. Chang AS, Hathaway CK, Smithies O, Kakoki M. Transforming growth factor-beta1 and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. Apr 15 2016;310(8):F689-F696. doi:10.1152/ajprenal.00502.2015
52. Husted RF, Sigmund RD, Stokes JB. Mechanisms of inactivation of the action of aldosterone on collecting duct by TGF-beta. *Am J Physiol Renal Physiol*. Mar 2000;278(3):F425-33. doi:10.1152/ajprenal.2000.278.3.F425
53. Frindt G, Gravotta D, Palmer LG. Regulation of ENaC trafficking in rat kidney. *J Gen Physiol*. Mar 2016;147(3):217-27. doi:10.1085/jgp.201511533
54. Frindt G, Bertog M, Korbmacher C, Palmer LG. Ubiquitination of renal ENaC subunits in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol*. May 1 2020;318(5):F1113-F1121. doi:10.1152/ajprenal.00609.2019
55. Liang X, Butterworth MB, Peters KW, Frizzell RA. AS160 modulates aldosterone-stimulated epithelial sodium channel forward trafficking. *Mol Biol Cell*. Jun 15 2010;21(12):2024-33. doi:10.1091/mbc.E10-01-0042
56. Soares AG, Contreras J, Archer CR, et al. Stimulation of the Epithelial Na(+) Channel in Renal Principal Cells by Gs-Coupled Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs. Original Research. *Front Physiol*. 2021-August-25 2021;12:725782. doi:10.3389/fphys.2021.725782
57. Staub O, Gautschi I, Ishikawa T, et al. Regulation of stability and function of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO J*. Nov 3 1997;16(21):6325-36. doi:10.1093/emboj/16.21.6325
58. Eaton DC, Malik B, Bao HF, Yu L, Jain L. Regulation of epithelial sodium channel trafficking by ubiquitination. *Proc Am Thorac Soc*. Feb 2010;7(1):54-64. doi:10.1513/pats.200909-096JS

59. Lu C, Pribanic S, Debonneville A, Jiang C, Rotin D. The PY motif of ENaC, mutated in Liddle syndrome, regulates channel internalization, sorting and mobilization from subapical pool. *Traffic*. Sep 2007;8(9):1246-64. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00602.x
60. Alvarez de la Rosa D, Li H, Canessa CM. Effects of aldosterone on biosynthesis, traffic, and functional expression of epithelial sodium channels in A6 cells. *J Gen Physiol*. May 2002;119(5):427-42. doi:10.1085/jgp.20028559
61. Zhou R, Patel SV, Snyder PM. Nedd4-2 catalyzes ubiquitination and degradation of cell surface ENaC. *J Biol Chem*. Jul 13 2007;282(28):20207-12. doi:10.1074/jbc.M611329200
62. Abriel H, Loffing J, Rebhun JF, et al. Defective regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest*. Mar 1999;103(5):667-73. doi:10.1172/JCI5713
63. Kamynina E, Debonneville C, Bens M, Vandewalle A, Staub O. A novel mouse Nedd4 protein suppresses the activity of the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *FASEB J*. Jan 2001;15(1):204-214. doi:10.1096/fj.00-0191com
64. Artunc F, Nasir O, Amann K, et al. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 in doxorubicin-induced nephrotic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*. Dec 2008;295(6):F1624-34. doi:10.1152/ajprenal.00032.2008
65. Ware AW, Cheung TT, Rasulov S, Burstein E, McDonald FJ. Epithelial Na(+) Channel: Reciprocal Control by COMMD10 and Nedd4-2. Original Research. *Front Physiol*. 2018-June-26 2018;9(793):793. doi:10.3389/fphys.2018.00793
66. Snyder PM, Olson DR, Thomas BC. Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem*. Jan 4 2002;277(1):5-8. doi:10.1074/jbc.C100623200
67. Kortenoeven ML, Pedersen NB, Rosenbaek LL, Fenton RA. Vasopressin regulation of sodium transport in the distal nephron and collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*. Aug 15 2015;309(4):F280-99. doi:10.1152/ajprenal.00093.2015
68. Snyder PM, Olson DR, Kabra R, Zhou R, Steines JC. cAMP and serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) regulate the epithelial Na(+) channel through convergent phosphorylation of Nedd4-2. *J Biol Chem*. Oct 29 2004;279(44):45753-8. doi:10.1074/jbc.M407858200
69. Sheng S, Carattino MD, Bruns JB, Hughey RP, Kleyman TR. Furin cleavage activates the epithelial Na<sup>+</sup> channel by relieving Na<sup>+</sup> self-inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jun 2006;290(6):F1488-96. doi:10.1152/ajprenal.00439.2005
70. Diakov A, Korbmacher C. 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. *J Biol Chem*. Sep 10 2004;279(37):38134-42. doi:10.1074/jbc.M403260200
71. Bugaj V, Pochynyuk O, Stockand JD. Activation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel in the collecting duct by vasopressin contributes to water reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol*. Nov 2009;297(5):F1411-8. doi:10.1152/ajprenal.00371.2009
72. Carattino MD, Sheng S, Kleyman TR. Epithelial Na<sup>+</sup> channels are activated by laminar shear stress. *J Biol Chem*. Feb 6 2004;279(6):4120-6. doi:10.1074/jbc.M311783200
73. Carattino MD, Sheng S, Kleyman TR. Mutations in the pore region modify epithelial sodium channel gating by shear stress. *J Biol Chem*. Feb 11 2005;280(6):4393-401. doi:10.1074/jbc.M413123200
74. Kleyman TR, Kashlan OB, Hughey RP. Epithelial Na(+) Channel Regulation by Extracellular and Intracellular Factors. *Annu Rev Physiol*. Feb 10 2018;80(1):263-281. doi:10.1146/annurev-physiol-021317-121143
75. Kleyman TR, Carattino MD, Hughey RP. ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases. *J Biol Chem*. Jul 31 2009;284(31):20447-51. doi:10.1074/jbc.R800083200
76. Hughey RP, Bruns JB, Kinlough CL, et al. Epithelial sodium channels are activated by furin-dependent proteolysis. *J Biol Chem*. Apr 30 2004;279(18):18111-4. doi:10.1074/jbc.C400080200
77. Artunc F, Worn M, Schork A, Bohnert BN. Proteasuria-The impact of active urinary proteases on sodium retention in nephrotic syndrome. *Acta physiologica (Oxford, England)*. Apr 2019;225(4):e13249. doi:10.1111/apha.13249



78. Hanukoglu I, Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*. Apr 1 2016;579(2):95-132. doi:10.1016/j.gene.2015.12.061
79. Althaus M, Lawong RY. Proteolytic ENaC activation in health and disease-a complicated puzzle. *Pflugers Arch*. Nov 20 2021;doi:10.1007/s00424-021-02644-w
80. Rotin D, Staub O. Function and Regulation of the Epithelial Na<sup>+</sup> Channel ENaC. In: Prakash Y, ed. *Comprehensive Physiology*. 2021:2017-2045.
81. Rossier BC, Stutts MJ. Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases. *Annu Rev Physiol*. 2009/03/01 2009;71(1):361-79. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163108
82. Carattino MD, Sheng S, Bruns JB, Pilewski JM, Hughey RP, Kleyman TR. The epithelial Na<sup>+</sup> channel is inhibited by a peptide derived from proteolytic processing of its alpha subunit. *J Biol Chem*. Jul 7 2006;281(27):18901-7. doi:10.1074/jbc.M604109200
83. Heidrich E, Carattino MD, Hughey RP, Pilewski JM, Kleyman TR, Myerburg MM. Intracellular Na<sup>+</sup> regulates epithelial Na<sup>+</sup> channel maturation. *J Biol Chem*. May 1 2015;290(18):11569-77. doi:10.1074/jbc.M115.640763
84. Kashlan OB, Blobner BM, Zuzek Z, Carattino MD, Kleyman TR. Inhibitory tract traps the epithelial Na<sup>+</sup> channel in a low activity conformation. *J Biol Chem*. Jun 8 2012;287(24):20720-6. doi:10.1074/jbc.M112.358218
85. Diakov A, Bera K, Mokrushina M, Krueger B, Korbmacher C. Cleavage in the {gamma}-subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) plays an important role in the proteolytic activation of near-silent channels. *J Physiol*. Oct 1 2008;586(19):4587-608. doi:10.1113/jphysiol.2008.154435
86. Caldwell RA, Boucher RC, Stutts MJ. Serine protease activation of near-silent epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. Jan 2004;286(1):C190-4. doi:10.1152/ajpcell.00342.2003
87. B Bruns J, Carattino M, Sheng S, et al. *Epithelial Na<sup>+</sup> Channels Are Fully Activated by Furin- and Prostaticin-dependent Release of an Inhibitory Peptide from the  $\gamma$ -Subunit*. vol 282. 2007:6153-60.
88. Haerteis S, Krappitz A, Krappitz M, et al. Proteolytic activation of the human epithelial sodium channel by trypsin IV and trypsin I involves distinct cleavage sites. *J Biol Chem*. Jul 4 2014;289(27):19067-78. doi:10.1074/jbc.M113.538470
89. Carattino MD, Hughey RP, Kleyman TR. Proteolytic processing of the epithelial sodium channel gamma subunit has a dominant role in channel activation. *J Biol Chem*. Sep 12 2008;283(37):25290-25295. doi:10.1074/jbc.M803931200
90. Passero CJ, Hughey RP, Kleyman TR. New role for plasmin in sodium homeostasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Jan 2010;19(1):13-9. doi:10.1097/MNH.0b013e3283330fb2
91. Passero CJ, Mueller GM, Rondon-Berrios H, Tofovic SP, Hughey RP, Kleyman TR. Plasmin activates epithelial Na<sup>+</sup> channels by cleaving the gamma subunit. *J Biol Chem*. Dec 26 2008;283(52):36586-91. doi:10.1074/jbc.M805676200
92. Patel AB, Chao J, Palmer LG. Tissue kallikrein activation of the epithelial Na channel. *Am J Physiol Renal Physiol*. Aug 15 2012;303(4):F540-50. doi:10.1152/ajprenal.00133.2012
93. Haerteis S, Krappitz M, Diakov A, Krappitz A, Rauh R, Korbmacher C. Plasmin and chymotrypsin have distinct preferences for channel activating cleavage sites in the gamma subunit of the human epithelial sodium channel. *J Gen Physiol*. Oct 2012;140(4):375-89. doi:10.1085/jgp.201110763
94. Chraïbi A, Vallet V, Firsov D, Hess SK, Horisberger JD. Protease modulation of the activity of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol*. Jan 1998;111(1):127-38. doi:10.1085/jgp.111.1.127
95. Harris M, Firsov D, Vuagniaux G, Stutts MJ, Rossier BC. A novel neutrophil elastase inhibitor prevents elastase activation and surface cleavage of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*. Jan 5 2007;282(1):58-64. doi:10.1074/jbc.M605125200
96. Adebamiro A, Cheng Y, Rao US, Danahay H, Bridges RJ. A segment of gamma ENaC mediates elastase activation of Na<sup>+</sup> transport. *J Gen Physiol*. Dec 2007;130(6):611-29. doi:10.1085/jgp.200709781

97. Haerteis S, Krappitz M, Bertog M, et al. Proteolytic activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by the cysteine protease cathepsin-S. *Pflugers Arch*. Oct 2012;464(4):353-65. doi:10.1007/s00424-012-1138-3
98. Larionov A, Dahlke E, Kunke M, et al. Cathepsin B increases ENaC activity leading to hypertension early in nephrotic syndrome. *J Cell Mol Med*. Oct 2019;23(10):6543-6553. doi:10.1111/jcmm.14387
99. Vuagniaux G, Vallet V, Jaeger NF, et al. Activation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel by the serine protease mCAP1 expressed in a mouse cortical collecting duct cell line. *J Am Soc Nephrol*. May 2000;11(5):828-834. doi:10.1681/ASN.V115828
100. Passero CJ, Mueller GM, Myerburg MM, Carattino MD, Hughey RP, Kleyman TR. TMPRSS4-dependent activation of the epithelial sodium channel requires cleavage of the gamma-subunit distal to the furin cleavage site. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jan 1 2012;302(1):F1-8. doi:10.1152/ajprenal.00330.2011
101. Garcia-Caballero A, Dang Y, He H, Stutts MJ. ENaC proteolytic regulation by channel-activating protease 2. *J Gen Physiol*. Nov 2008;132(5):521-35. doi:10.1085/jgp.200810030
102. Vuagniaux G, Vallet V, Jaeger NF, Hummler E, Rossier BC. Synergistic activation of ENaC by three membrane-bound channel-activating serine proteases (mCAP1, mCAP2, and mCAP3) and serum- and glucocorticoid-regulated kinase (Sgk1) in *Xenopus* Oocytes. *J Gen Physiol*. Aug 2002;120(2):191-201. doi:10.1085/jgp.20028598
103. Rossier BC. The epithelial sodium channel: activation by membrane-bound serine proteases. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(1):4-9. doi:10.1513/pats.2306007
104. Worn M, Bohnert BN, Alenazi F, et al. Proteasuria in nephrotic syndrome-quantification and proteomic profiling. *J Proteomics*. Jan 6 2021;230:103981. doi:10.1016/j.jprot.2020.103981
105. Campbell DJ. The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Dec 2001;28(12):1060-5. doi:10.1046/j.1440-1681.2001.03564.x
106. Bönner G, Thieven B, Rütten H, Chrosch R, Krone W. Renal kallikrein is a determinant of salt sensitivity. *Journal of Hypertension*. 1993;11:S210-S211.
107. Yousef GM, Diamandis EP. An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumour markers. *Clin Biochem*. Sep 2003;36(6):443-52. doi:10.1016/s0009-9120(03)00055-9
108. Haerteis S, Schork A, Dorffel T, et al. Plasma kallikrein activates the epithelial sodium channel in vitro but is not essential for volume retention in nephrotic mice. *Acta physiologica (Oxford, England)*. Sep 2018;224(1):e13060. doi:10.1111/apha.13060
109. Svenningsen P, Bistrup C, Friis UG, et al. Plasmin in nephrotic urine activates the epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol*. Feb 2009;20(2):299-310. doi:10.1681/ASN.2008040364
110. Chen JL, Wang L, Yao XM, et al. Association of Urinary Plasminogen-Plasmin with Edema and Epithelial Sodium Channel Activation in Patients with Nephrotic Syndrome. *Am J Nephrol*. 2019;50(2):92-104. doi:10.1159/000501059
111. Yu JX, Chao L, Chao J. Prostasin Is a Novel Human Serine Proteinase from Seminal Fluid - Purification, Tissue Distribution, and Localization in Prostate-Gland. *Journal of Biological Chemistry*. Jul 22 1994;269(29):18843-18848.
112. Yu JX, Chao L, Chao J. Molecular cloning, tissue-specific expression, and cellular localization of human prostasin mRNA. *J Biol Chem*. Jun 2 1995;270(22):13483-9. doi:10.1074/jbc.270.22.13483
113. Chen LM, Skinner ML, Kauffman SW, et al. Prostasin is a glycosylphosphatidylinositol-anchored active serine protease. *J Biol Chem*. Jun 15 2001;276(24):21434-42. doi:10.1074/jbc.M011423200
114. Shipway A, Danahay H, Williams JA, Tully DC, Backes BJ, Harris JL. Biochemical characterization of prostasin, a channel activating protease. *Biochem Biophys Res Commun*. Nov 12 2004;324(2):953-63. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.123
115. List K, Haudenschild CC, Szabo R, et al. Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis. *Oncogene*. May 23 2002;21(23):3765-79. doi:10.1038/sj.onc.1205502

116. Leyvraz C, Charles RP, Rubera I, et al. The epidermal barrier function is dependent on the serine protease CAP1/Prss8. *J Cell Biol.* Aug 1 2005;170(3):487-96. doi:10.1083/jcb.200501038
117. Netzel-Arnett S, Currie BM, Szabo R, et al. Evidence for a matriptase-prostasin proteolytic cascade regulating terminal epidermal differentiation. *J Biol Chem.* Nov 3 2006;281(44):32941-5. doi:10.1074/jbc.C600208200
118. Szabo R, Uzzun Sales K, Kosa P, et al. Reduced prostasin (CAP1/PRSS8) activity eliminates HAI-1 and HAI-2 deficiency-associated developmental defects by preventing matriptase activation. *PLoS Genet.* 2012// 2012;8(8):e1002937. doi:10.1371/journal.pgen.1002937
119. Su HC, Liang YA, Lai YJ, et al. Natural Endogenous Human Matriptase and Prostasin Undergo Zymogen Activation via Independent Mechanisms in an Uncoupled Manner. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167894. doi:10.1371/journal.pone.0167894
120. Hummler E, Dousse A, Rieder A, et al. The channel-activating protease CAP1/Prss8 is required for placental labyrinth maturation. *PLoS One.* 2013;8(2):e55796. doi:10.1371/journal.pone.0055796
121. Frateschi S, Keppner A, Malsure S, et al. Mutations of the serine protease CAP1/Prss8 lead to reduced embryonic viability, skin defects, and decreased ENaC activity. *Am J Pathol.* Aug 2012;181(2):605-15. doi:10.1016/j.ajpath.2012.05.007
122. Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature.* Oct 9 1997;389(6651):607-10. doi:10.1038/39329
123. Planes C, Randrianarison NH, Charles RP, et al. ENaC-mediated alveolar fluid clearance and lung fluid balance depend on the channel-activating protease 1. *EMBO Mol Med.* Jan 2010;2(1):26-37. doi:10.1002/emmm.200900050
124. Nimishakavi S, Besprozvannaya M, Raymond WW, Craik CS, Gruenert DC, Caughey GH. Activity and inhibition of prostasin and matriptase on apical and basolateral surfaces of human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Jul 2012;303(2):L97-106. doi:10.1152/ajplung.00303.2011
125. Peters DE, Szabo R, Friis S, et al. The membrane-anchored serine protease prostasin (CAP1/PRSS8) supports epidermal development and postnatal homeostasis independent of its enzymatic activity. *J Biol Chem.* May 23 2014;289(21):14740-9. doi:10.1074/jbc.M113.541318
126. Friis S, Madsen DH, Bugge TH. Distinct Developmental Functions of Prostasin (CAP1/PRSS8) Zymogen and Activated Prostasin. *J Biol Chem.* Feb 5 2016;291(6):2577-82. doi:10.1074/jbc.C115.706721
127. Svenningsen P, Uhrenholt TR, Palarasah Y, Skjodt K, Jensen BL, Skott O. Prostasin-dependent activation of epithelial Na<sup>+</sup> channels by low plasmin concentrations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Dec 2009;297(6):R1733-41. doi:10.1152/ajpregu.00321.2009
128. Zachar R, Jensen BL, Svenningsen P. Dietary Na(+) intake in healthy humans changes the urine extracellular vesicle prostasin abundance while the vesicle excretion rate, NCC, and ENaC are not altered. *Am J Physiol Renal Physiol.* Dec 1 2019;317(6):F1612-F1622. doi:10.1152/ajprenal.00258.2019
129. Andersen H, Friis UG, Hansen PB, Svenningsen P, Henriksen JE, Jensen BL. Diabetic nephropathy is associated with increased urine excretion of proteases plasmin, prostasin and urokinase and activation of amiloride-sensitive current in collecting duct cells. *Nephrol Dial Transplant.* May 2015;30(5):781-9. doi:10.1093/ndt/gfu402
130. Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M, et al. Regulation of prostasin by aldosterone in the kidney. *J Clin Invest.* Feb 2002;109(3):401-8. doi:10.1172/JCI13229
131. ADACHI M, KITAMURA K, MIYOSHI T, et al. Activation of Epithelial Sodium Channels by Prostasin in *Xenopus* Oocytes. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2001;12(6):1114-1121.
132. Artunc F, Bohnert BN, Schneider JC, et al. Proteolytic activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by factor VII activating protease (FSAP) and its relevance for sodium retention in nephrotic mice. *Pflugers Arch.* Dec 6 2021;doi:10.1007/s00424-021-02639-7

133. Zachar RM, Skjodt K, Marcussen N, et al. The epithelial sodium channel gamma-subunit is processed proteolytically in human kidney. *J Am Soc Nephrol.* Jan 2015;26(1):95-106. doi:10.1681/ASN.2013111173
134. Kaysen GA, Gambertoglio J, Jimenez I, Jones H, Hutchison FN. Effect of dietary protein intake on albumin homeostasis in nephrotic patients. *Kidney Int.* Feb 1986;29(2):572-7. doi:10.1038/ki.1986.36
135. Kaysen GA, Kirkpatrick WG, Couser WG. Albumin homeostasis in the nephrotic rat: nutritional considerations. *Am J Physiol.* Jul 1984;247(1 Pt 2):F192-202. doi:10.1152/ajprenal.1984.247.1.F192
136. Orth SR, Ritz E. The Nephrotic Syndrome. *New England Journal of Medicine.* 1998;338(17):1202-1211. doi:10.1056/nejm199804233381707
137. Herold G. *Innere Medizin 2018 : eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis.* Herold G. Gerd Herold; 2018:1002 Seiten.
138. Agrawal S, Zaritsky JJ, Fornoni A, Smoyer WE. Dyslipidaemia in nephrotic syndrome: mechanisms and treatment. *Nat Rev Nephrol.* Jan 2018;14(1):57-70. doi:10.1038/nrneph.2017.155
139. Molina-Jijon E, Gambut S, Mace C, Avila-Casado C, Clement LC. Secretion of the epithelial sodium channel chaperone PCSK9 from the cortical collecting duct links sodium retention with hypercholesterolemia in nephrotic syndrome. *Kidney Int.* Dec 2020;98(6):1449-1460. doi:10.1016/j.kint.2020.06.045
140. Artunc F. Kidney-derived PCSK9-a new driver of hyperlipidemia in nephrotic syndrome? *Kidney Int.* Dec 2020;98(6):1393-1395. doi:10.1016/j.kint.2020.07.027
141. Kopp JB, Anders HJ, Susztak K, et al. Podocytopathies. *Nat Rev Dis Primers.* Aug 13 2020;6(1):68. doi:10.1038/s41572-020-0196-7
142. Hull RP, Goldsmith DJ. Nephrotic syndrome in adults. *BMJ.* May 24 2008;336(7654):1185-9. doi:10.1136/bmj.39576.709711.80
143. Doucet A, Favre G, Deschenes G. Molecular mechanism of edema formation in nephrotic syndrome: therapeutic implications. *Pediatr Nephrol.* Dec 2007;22(12):1983-90. doi:10.1007/s00467-007-0521-3
144. Epstein AA. Concerning the causation of edema in chronic parenchymatous nephritis; method for its alleviation. *Am J Med.* Nov 1952;13(5):556-61. doi:10.1016/0002-9343(52)90020-x
145. Orth SR, Ritz E. The nephrotic syndrome. *N Engl J Med.* Apr 23 1998;338(17):1202-11. doi:10.1056/NEJM199804233381707
146. Brown EA, Markandu ND, Roulston JE, Jones BE, Squires M, MacGregor GA. Is the renin-angiotensin-aldosterone system involved in the sodium retention in the nephrotic syndrome? *Nephron.* 1982;32(2):102-7. doi:10.1159/000182827
147. Schrier RW. Decreased effective blood volume in edematous disorders: what does this mean? *J Am Soc Nephrol.* Jul 2007;18(7):2028-31. doi:10.1681/ASN.2006111302
148. Ichikawa I, Rennke HG, Hoyer JR, et al. Role for intrarenal mechanisms in the impaired salt excretion of experimental nephrotic syndrome. *J Clin Invest.* Jan 1983;71(1):91-103. doi:10.1172/jci110756
149. Xiao M, Bohnert BN, Aypek H, et al. Plasminogen deficiency does not prevent sodium retention in a genetic mouse model of experimental nephrotic syndrome. *Acta physiologica (Oxford, England).* Jan 2021;231(1):e13512. doi:10.1111/apha.13512
150. Bohnert BN, Daiminger S, Worn M, et al. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) is not essential for epithelial sodium channel (ENaC)-mediated sodium retention in experimental nephrotic syndrome. *Acta physiologica (Oxford, England).* Dec 2019;227(4):e13286. doi:10.1111/apha.13286
151. Bohnert BN, Menacher M, Janessa A, et al. Aprotinin prevents proteolytic epithelial sodium channel (ENaC) activation and volume retention in nephrotic syndrome. *Kidney Int.* Jan 2018;93(1):159-172. doi:10.1016/j.kint.2017.07.023
152. Westaby S. Aprotinin in perspective. *Ann Thorac Surg.* Apr 1993;55(4):1033-41. doi:10.1016/0003-4975(93)90149-c
153. Bohnert BN, Essigke D, Janessa A, et al. Experimental nephrotic syndrome leads to proteolytic activation of the epithelial Na(+) channel in the mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* Oct 1 2021;321(4):F480-F493. doi:10.1152/ajprenal.00199.2021

154. Hall B, Limaye A, Kulkarni AB. Overview: generation of gene knockout mice. *Curr Protoc Cell Biol.* Sep 2009;Chapter 19:Unit 19 12 19 12 1-17. doi:10.1002/0471143030.cb1912s44
155. Zheng Z, Schmidt-Ott KM, Chua S, et al. A Mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 15 2005;102(7):2502-7. doi:10.1073/pnas.0409786102
156. Bohnert BN, Gonzalez-Menendez I, Dorffel T, et al. Essential role of DNA-PKcs and plasminogen for the development of doxorubicin-induced glomerular injury in mice. *Dis Model Mech.* Sep 1 2021;14(9)doi:10.1242/dmm.049038
157. Vallon V. *In vivo Studies of the Genetically Modified Mouse Kidney.* vol 94. 2003;p1-5.
158. Worn S, Bohnert BN, Worn M, et al. Renal effects of the serine protease inhibitor aprotinin in healthy conscious mice. *Acta Pharmacol Sin.* Jan 2022;43(1):111-120. doi:10.1038/s41401-021-00628-1
159. Boscardin E, Perrier R, Sergi C, et al. Severe hyperkalemia is rescued by low-potassium diet in renal betaENaC-deficient mice. *Pflugers Arch.* Oct 2017;469(10):1387-1399. doi:10.1007/s00424-017-1990-2
160. Artunc F, Ebrahim A, Siraskar B, et al. Responses to diuretic treatment in gene-targeted mice lacking serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1. *Kidney Blood Press Res.* 2009;32(2):119-27. doi:10.1159/000214439
161. Bohnert BN, Dorffel T, Daiminger S, et al. Retrobulbar Sinus Injection of Doxorubicin is More Efficient Than Lateral Tail Vein Injection at Inducing Experimental Nephrotic Syndrome in Mice: A Pilot Study. *Laboratory animals.* Dec 2019;53(6):564-576. doi:10.1177/0023677218824382
162. Bohnert BN, Artunc F. Induction of Nephrotic Syndrome in Mice by Retrobulbar Injection of Doxorubicin and Prevention of Volume Retention by Sustained Release Aprotinin. *Journal of visualized experiments : JoVE.* May 6 2018;(135)doi:10.3791/57642
163. Riehm H. Bestimmung von Natrium, Kalium und Calcium im Flammenphotometer nach Riehm-Lange. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie.* 1948/01/01 1948;128(2-3):249-264. doi:10.1007/bf00556494
164. Baron DN. Flame photometry. *Postgrad Med J.* Feb 1951;27(304):67-9. doi:10.1136/pgmj.27.304.67
165. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* May 7 1976;72(1):248-54. doi:10.1006/abio.1976.9999
166. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem.* Dec 1985;151(2):369-74. doi:10.1016/0003-2697(85)90190-3
167. Hervey GR. Determination of creatinine by the Jaffe reaction. *Nature.* Jun 20 1953;171(4364):1125. doi:10.1038/1711125a0
168. Fawcett JK, Scott JE. A rapid and precise method for the determination of urea. *J Clin Pathol.* Mar 1960;13(2):156-9. doi:10.1136/jcp.13.2.156
169. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol.* Jun 1978;31(6):507-20. doi:10.1136/jcp.31.6.507
170. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 1979;76(7):3116-20. doi:10.1073/pnas.76.7.3116
171. Burnette WN. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry.* 1981/04/01/1981;112(2):195-203. doi:10.1016/0003-2697(81)90281-5
172. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 1979;76(9):4350-4. doi:10.1073/pnas.76.9.4350
173. Hnasko TS, Hnasko RM. The Western Blot. In: Hnasko R, ed. *ELISA: Methods and Protocols.* Springer New York; 2015:87-96.
174. Essigke D, Ilyaskin AV, Worn M, et al. Zymogen-locked mutant prostaticin (Prss8) leads to incomplete proteolytic activation of the epithelial sodium channel (ENaC) and severely

- compromises triamterene tolerance in mice. *Acta physiologica (Oxford, England)*. May 2021;232(1):e13640. doi:10.1111/apha.13640
175. Essigke D, Bohnert BN, Worn M, et al. Sodium retention in nephrotic syndrome is independent of the activation of the membrane-anchored serine protease prostatic (CAP1/PRSS8) and its enzymatic activity. *Pflugers Arch.* accepted 05 Mar 2022 2022;
  176. Grahammer F, Nesterov V, Ahmed A, et al. mTORC2 critically regulates renal potassium handling. *J Clin Invest.* May 2 2016;126(5):1773-82. doi:10.1172/JCI80304
  177. Geller DS, Zhang J, Zennaro MC, et al. Autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1: mechanisms, evidence for neonatal lethality, and phenotypic expression in adults. *J Am Soc Nephrol.* May 2006;17(5):1429-36. doi:10.1681/ASN.2005111188
  178. Park J, Shrestha R, Qiu C, et al. Single-cell transcriptomics of the mouse kidney reveals potential cellular targets of kidney disease. *Science.* May 18 2018;360(6390):758-763. doi:10.1126/science.aar2131
  179. Chen L, Lee JW, Chou CL, et al. Transcriptomes of major renal collecting duct cell types in mouse identified by single-cell RNA-seq. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 14 2017;114(46):E9989-E9998. doi:10.1073/pnas.1710964114
  180. Lee JW, Chou CL, Knepper MA. Deep Sequencing in Microdissected Renal Tubules Identifies Nephron Segment-Specific Transcriptomes. *J Am Soc Nephrol.* Nov 2015;26(11):2669-77. doi:10.1681/ASN.2014111067
  181. Oxlund C, Kurt B, Schwarzensteiner I, et al. Albuminuria is associated with an increased prostatic in urine while aldosterone has no direct effect on urine and kidney tissue abundance of prostatic. *Pflugers Arch.* Jun 2017;469(5-6):655-667. doi:10.1007/s00424-017-1938-6
  182. Andreasen D, Vuagniaux G, Fowler-Jaeger N, Hummler E, Rossier BC. Activation of epithelial sodium channels by mouse channel activating proteases (mCAP) expressed in *Xenopus* oocytes requires catalytic activity of mCAP3 and mCAP2 but not mCAP1. *J Am Soc Nephrol.* Apr 2006;17(4):968-76. doi:10.1681/ASN.2005060637
  183. Reihill JA, Walker B, Hamilton RA, et al. Inhibition of Protease-Epithelial Sodium Channel Signaling Improves Mucociliary Function in Cystic Fibrosis Airways. *Am J Respir Crit Care Med.* Sep 15 2016;194(6):701-10. doi:10.1164/rccm.201511-2216OC
  184. Kawabata S, Miura T, Morita T, et al. Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin. *Eur J Biochem.* Feb 15 1988;172(1):17-25. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb13849.x
  185. Lisman T, Adelmeijer J, Huskens D, Meijers JCM. Aprotinin Inhibits Thrombin Generation by Inhibition of the Intrinsic Pathway, but is not a Direct Thrombin Inhibitor. *TH Open.* //31.08.2021 2021;05(03):e363-e375.
  186. Friis S, Uzzun Sales K, Godiksen S, et al. A matriptase-prostatic reciprocal zymogen activation complex with unique features: prostatic as a non-enzymatic co-factor for matriptase activation. *J Biol Chem.* Jun 28 2013;288(26):19028-39. doi:10.1074/jbc.M113.469932
  187. Buzza MS, Martin EW, Driesbaugh KH, Desilets A, Leduc R, Antalis TM. Prostatic is required for matriptase activation in intestinal epithelial cells to regulate closure of the paracellular pathway. *J Biol Chem.* Apr 12 2013;288(15):10328-37. doi:10.1074/jbc.M112.443432

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Professor F. Artunc.

Wenn nicht anders ausgewiesen wurden die Versuche nach Einarbeitung durch Herrn Professor F. Artunc oder Mitglieder der Arbeitsgruppe selbst- und eigenständig durch mich durchgeführt.

Die retrobulbäre Injektion von Doxorubicin zur Induktion des nephrotischen Syndroms wurde durch Herrn Professor F. Artunc und Herrn Dr. med. B. Bohnert durchgeführt.

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch Frau A. Janessa und Frau M. Xiao.

Die experimentelle Durchführung der Western Blots, im Detail die Aufbereitung der Proben, die Elektrophorese, das Blotting und die Färbung erfolgte durch Frau A. Janessa und Herrn M. Wörn aus der Arbeitsgruppe Artunc.

Die Aufarbeitung der entnommenen Nieren zur histologischen Untersuchung erfolgte in der Nephropathologischen Abteilung von Frau Professor K. Amann am Universitätsklinikum Erlangen durch Herrn Professor C. Daniel.

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, dass ich diese Doktorarbeit selbstständig verfasst habe. Ich versichere weiterhin keine über die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

## 8 Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

### Poster:

*„Die Rolle der membranständigen Serinprotease Protsasin bei der Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC) in vivo“*

D. Essigke; B. N. Bohnert; M. Xiao; A. Janessa; R. Szabo; T. H. Bugge; F. Artunc

Auf dem Forschungskolloquium der Medizinischen Fakultät Tübingen am 24.01.2019 in Tübingen

*„Die Ödementstehung beim Nephrotischen Syndrom der Maus ist unabhängig von der Enzym- und Gerüstfunktion der membranständigen Serinprotease Protsasin.“*

D. Essigke; B. N. Bohnert; M. Xiao; R. Szabo; T. H. Bugge; F. Artunc

Auf der 12. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie vom 01.-04. Oktober 2020 in Berlin

### Vortrag:

*„Die Rolle von Protsasin bei der Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC) unter physiologischen Bedingungen und beim nephrotischen Syndrom der Maus“*

D. Essigke; B. N. Bohnert; M. Xiao; A. Janessa; R. Szabo; T. H. Bugge; F. Artunc

Auf der 10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie vom 27.-30. September 2018 in Berlin

### Publikation:

Zymogen-locked mutant protsasin (Prss8) leads to incomplete proteolytic activation of the epithelial sodium channel (ENaC) and severely compromises triamterene tolerance in mice.

Daniel Essigke\*, Alexandr V. Ilyaskin\*, Matthias Wörn, Bernhard N. Bohnert, Mengyun Xiao, Christoph Daniel, Kerstin Amann, Andreas L. Birkenfeld, Roman Szabo, Thomas H. Bugge, Christoph Korbmacher, Ferruh Artunc

\* geteilte Erstautorenschaft

in Acta Physiol. 2021; 232:e13640. <https://doi.org/10.1111/apha.13640>



Sodium retention in nephrotic syndrome is independent of the activation of the membrane-anchored serine protease prostatic (CAP1/PRSS8) and its enzymatic activity

Daniel Essigke, Bernhard N. Bohnert, Matthias Wörn, Kingsley Omege, Andrea Janessa, Hubert Kalbacher, Andreas L. Birkenfeld, Thomas H. Bugge, Roman Szabo, Ferruh Artunc

in Pflügers Archiv - European Journal of Physiology zur Publikation angenommen am 04.03.2022

**Auszeichnungen:**

Abstractpreis der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie für den Abstract „Die Rolle von Prostatic bei der Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC) unter physiologischen Bedingungen und beim nephrotischen Syndrom der Maus“ bei der 10. Jahrestagung 2018

Abstractpreis der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie für den Abstract „Die Ödementstehung beim nephrotischen Syndrom der Maus ist unabhängig von der Enzym- und Gerüstfunktion der membranständigen Serinprotease Prostatic“ bei der 12. Jahrestagung 2020

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Artunc für die Überlassung dieses außerordentlich spannenden Themas und die umfassende Betreuung während der gesamten Dauer der Promotion bedanken.

Lieber Ferruh, mich hätte es nicht besser treffen können, mit Dir und durch Dich durfte ich meine ersten Schritte auf dem Weg der wissenschaftlichen Arbeit machen, einen besseren Doktorvater hätte ich mir nicht wünschen können. Vielen Dank für die vielen Stunden, es war mir eine Freude bei Dir promovieren zu dürfen!

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Dr. Bohnert bedanken, ohne Dich lieber Bernhard wäre ich wohl das ein oder andere Mal verzweifelt. Vielen Dank für Deine Unterstützung und unermüdliche Hilfsbereitschaft!

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei den Kooperationspartnern der nephropathologischen Abteilung in Erlangen Frau Professor Amann und Herrn Professor Daniel für die unkomplizierte Zusammenarbeit in der histopathologischen Aufarbeitung der Nieren bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Kollegen im nephrologischen Labor bedanken, im Besonderen bei Andrea Janessa die mit ihrem Wissen stets bei kleineren und größeren Problemen weiterhelfen konnte.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinen Mit-DoktorandInnen bedanken, die mich insbesondere bei der Wochenend- und Ferienbetreuung der Mäuse unterstützt haben.

Anhang