
Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Tierphysiologie
AG Molekulare Zellphysiologie
Prof. Dr. W. Clauss

**Transepitheliale Ionentransport-Prozesse
im pulmonalen Epithel von *Xenopus laevis*:
Modulation durch mechanischen Stress
und *n*-Alkohole**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Katrin Richter

Gießen, September 2014

Dekan: Prof. Dr. H. Zorn

Gutachter: Prof. Dr. W. Clauss

Prof. Dr. V. Grau

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract.....	3
1. Einleitung.....	5
1.1 Morphologie der respiratorischen Organe luftatmender Vertebraten.....	5
1.2 Ionentransport-Prozesse des pulmonalen Epithels.....	13
1.3 Fehlregulationen des transepithelialen Ionentransports im pulmonalen Epithel und ihre pathophysiologische Bedeutung.....	16
1.4 Physiologie und Pathophysiologie von mechanischen Kräften in der Lunge.....	17
1.5 Die <i>X. laevis</i> Lunge als Modellsystem für den alveolaren Ionentransport	21
1.6 Bearbeitete Fragestellung	23
2. Material und Methoden.....	27
2.1 Tier- und Gewebepräparationen	27
2.2 Molekularbiologischer Nachweis von mRNA in Lungenhomogenaten von <i>X. laevis</i> mittels RT-PCR.....	32
2.3 Elektrophysiologische Methoden	36
2.3.1 Die modifizierte Ussing-Kammer	36
2.3.2 Die <i>two-electrode voltage-clamp</i> (TEVC) Methode	40
2.4 ATP-Konzentration Messungen	45
2.5 Statistik und Datenverarbeitung.....	46
2.6 Verwendete Lösungen und Chemikalien.....	47
3. Ergebnisse	50
3.1 Charakterisierung der Wirkung von mechanischen Kräften auf die transepithelialen Ionentransport-Prozesse im pulmonalen Epithel von <i>X. laevis</i>	50

3.1.1 Charakterisierung der HD-induzierten K_{ATP} Kanal Aktivierung – Beteiligung von Pannexin- und Connexin Hemikanälen.....	50
3.1.2 Wirkung von zyklischer HD-Applikation auf das pulmonale Epithel von <i>X. laevis</i>	71
3.1.2.3 Charakterisierung der unter zyklischer HD-Applikation auftretenden Erhöhung.	77
3.1.3 Beteiligung von basolateralen K^+ Kanälen an dem HD-induzierten Effekt.....	79
3.2 Charakterisierung der modulierenden Wirkung von <i>n</i> -Alkoholen auf die Aktivität des CFTR.....	91
3.2.1 Charakterisierung des <i>n</i> -Alkohol-induzierten Effekt am nativen pulmonalen Epithel (<i>X. laevis</i>)	92
3.2.2 Charakterisierung der Wirkung von <i>n</i> -Alkoholen auf die Aktivität des hCFTR ...	100
4. Diskussion	105
4.1 Einfluss von mechanischen Kräften auf die transepithelialen Ionentransport-Prozesse im pulmonalen Epithel von <i>X. laevis</i>	105
4.1.1 Die mechanische Dehnung hat keinen Einfluss auf die Integrität des nativen pulmonalen Epithels von <i>X. laevis</i>	105
4.1.2 Beteiligung von ATP-sensitiven K^+ (K_{ATP}) Kanälen an dem HD-induzierten Effekt.....	106
4.1.3 Charakterisierung des HD-induzierten Mechanismus der K_{ATP} Kanal Aktivierung - Hemikanäle als Mechanosensoren im pulmonalen Epithel	108
4.1.4 Die HD-induzierten Effekte im pulmonalen Epithel von <i>X. laevis</i> unterliegen keiner Desensitivierung	112
4.1.5 HD induziert eine basolaterale K^+ Sekretion.....	114
4.1.6 Schlussfolgerung	116
4.2 Die modulierende Wirkung von <i>n</i> -Alkoholen auf die Aktivität des CFTR.....	119
4.2.1 <i>n</i> -Alkohole: Hypothesen und Fakten.....	119
4.2.1 Langkettige <i>n</i> -Alkohole induzieren eine CFTR-abhängige Cl^- Sekretion im pulmonalen Epithel	120
4.2.2 Schlussfolgerung und physiologische Relevanz für die Lunge.....	123
5. Literaturverzeichnis.....	125

6. Veröffentlichungen.....	140
7. Verzeichnisse.....	143
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	143
7.2 Tabellenverzeichnis	145
7.3 Verzeichnis der Abkürzungen	146
8. Anhang	150
9. <i>Curriculum Vitae</i>	154
10. Danksagung.....	157
11. Selbstständigkeitserklärung	158

Zusammenfassung

Die Flüssigkeitsschicht, die dem pulmonalen Epithel aufgelagert ist, stellt ein grundlegendes Charakteristikum der Luft-Blut-Schranke aller luftatmenden Vertebraten dar. Um einen effizienten Gasaustausch und eine funktionierende Pathogenabwehr zu gewährleisten, bedarf es einer strikten Regulation der Zusammensetzung und der Höhe dieser Schicht. Die Regulation beruht dabei hauptsächlich auf transepithelialen Iontentransport-Prozessen. Fehlregulationen dieser können sich hingegen in Lungenkrankheiten wie Mukoviszidose oder pulmonaler Ödeme manifestieren. Aus diesem Grund ist es wichtig die zugrundeliegenden Iontentransport-Prozesse im pulmonalen Epithel aufzuklären und etwaige Modulatoren dieser Prozesse zu identifizieren.

In dieser Arbeit wurden elektrophysiologische Ussing-Kammer Messungen an nativen Lungenpräparaten des Krallenfroschs *Xenopus laevis* (*X. laevis*) durchgeführt, um den Einfluss von 1) mechanischen Kräften (hydrostatischer Druck, HD; 5 cm Flüssigkeitssäule) und 2) *n*-Alkoholen auf die Iontentransport-Prozesse zu untersuchen.

1) Aus früheren Studien war bekannt, dass die Applikation von HD eine Freisetzung von ATP aus den pulmonalen Epithelzellen sowie eine Aktivierung von apikal lokalisierten ATP-sensitiven K^+ (K_{ATP}) Kanälen induziert (Bogdan *et al.* 2008; Richter 2010). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die K_{ATP} Kanäle indirekt in Folge einer HD-induzierten ATP-Freisetzung via mechanosensitiver Pannexin- und Connexin-Hemikanäle aktiviert werden. Die Erkenntnisse werden dadurch begründet, dass in Anwesenheit spezifischer Pannexin- (Probenecid) und Connexin- (MFA) Hemikanal Inhibitoren die HD-induzierte ATP-Freisetzung sowie die K_{ATP} Kanal Aktivierung ausblieb. In RT-PCR Untersuchungen konnten codierende Transkripte der K_{ATP} Kanal Untereinheiten Kir6.1 und SUR1, sowie der Pannexin- (Panx1) und Connexin- (Cx30 und Cx43) Hemikanäle auf mRNA Ebene in Lungenhomogenaten von *X. laevis* nachgewiesen werden. Um die physiologische Situation einer kontinuierlichen Atembewegung der Mammalia zu imitieren, wurde HD zyklisch (in 30 sec Intervallen) über einen Zeitraum von 30 min auf das Epithel appliziert. Sowohl die K_{ATP} Kanal Aktivierung als auch die ATP-Freisetzung waren durch diese zyklische Applikation über diesen Zeitraum wiederholbar und unterlagen keiner Desensitivierung. Diese Ergebnisse unterstreichen eine indirekte Aktivierung der K_{ATP} Kanäle in Folge einer mechanosensitiven ATP-Freisetzung und stellen einen neuartigen Mechanotransduktions-Prozess dar, in dem die Hemikanäle als eigentliche Mechanosensoren fungieren. Die zyklische HD Applikation

resultierte zudem in einer Erhöhung des Grundstroms und somit in einer gesteigerten ENaC-abhängigen Na⁺ Absorption des Epithels. Demnach können mechanische Kräfte (Dehnung) im pulmonalen Epithel von *X. laevis* sowohl Kurzzeit- als auch Langzeiteffekte induzieren und die transepithelialen Iontentransport-Prozesse maßgeblich beeinflussen.

2) Die Fähigkeit von *n*-Alkoholen wie Ethanol (EtOH), 1-Octanol (OCT) und 1-Heptanol (HEP), die Aktivität von Ionenkanälen zu modulieren, wurde bereits in neuronalen Zellen aufgezeigt (Mihic *et al.* 1997; Dilger 2002; Horishita & Harris 2008). Zudem konnte eine OCT- und HEP-induzierte Aktivierung des CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) Cl⁻ Kanals nachgewiesen werden. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus von *n*-Alkoholen ist jedoch noch nicht geklärt. Der CFTR ist im pulmonalen Epithel hoch abundant und spielt eine wichtige Rolle für die Flüssigkeitshomöostase der Lunge. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit der Mechanismus der *n*-Alkohol-induzierten CFTR Aktivierung erstmals an einem nativen pulmonalen Epithel (*X. laevis*) in Ussing-Kammer Messungen charakterisiert werden. Des Weiteren wurde der Einfluss der *n*-Alkohole auf den heterolog in Oocyten exprimierten humanen CFTR (hCFTR) mittels der *two-electrode voltage-clamp* (TEVC) Technik untersucht. Die langkettigen *n*-Alkohole OCT und HEP induzierten sowohl im pulmonalen Epithel als auch in dem hier verwendeten *in vitro* Modell eine CFTR-abhängige Cl⁻ Sekretion. Die OCT- und HEP-induzierte CFTR Aktivierung bedingte zudem die Aktivität der Adenylatzyklase. Wurde die Adenylatzyklase durch einen spezifischen Inhibitor (MDL-12330A) geblockt, so blieben die OCT- und HEP-induzierten Effekte aus. Die Adenylatzyklase stellte demnach den Angriffspunkt der *n*-Alkohole dar und induzierte eine cAMP-abhängige CFTR Aktivierung. Der kurz-kettige *n*-Alkohol EtOH zeigte in keinem der verwendeten Modellsysteme einen Einfluss auf die CFTR-Aktivität. Die Identifizierung der Adenylatzyklase als Angriffspunkt der *n*-Alkohole könnte einen generellen Wirkmechanismus darstellen, um die Aktivität von Ionenkanälen sowohl in nicht-erregbaren als auch in erregbaren Zellen zu modulieren.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit ein neuer Mechanotransduktions-Prozess sowie Wirkmechanismus von langkettigen *n*-Alkoholen (OCT und HEP) identifiziert. Beide Mechanismen stellen neue Modulatoren der pulmonalen Iontentransport-Prozesse dar und beeinflussen diese maßgeblich.

Abstract

The fluid layer covering the pulmonary epithelium represents a basic characteristic of the air-blood barrier of air-breathing vertebrates. In order to guarantee proper gas exchange and effective immune defence it is necessary that the composition and height of this fluid layer is tightly regulated. This regulation mainly depends on transepithelial ion transport mechanisms. This is also indicated by the fact that dysfunctions in ion transport can lead to severe lung disorders such as cystic fibrosis or pulmonary edema. Therefore, it is important to identify the basic ion transport processes of pulmonary epithelia and to identify possible modulators.

In the present study, electrophysiological Ussing-chamber measurements were performed on native lung preparations of the clawed frog *Xenopus laevis* (*X. laevis*). The aim was to characterize the impact of 1) mechanical forces (hydrostatic pressure, HP; 5 cm fluid column) as well as 2) *n*-alcohols on ion transport processes.

1) In earlier studies it was already shown that application of HP led to an ATP-release from the pulmonary epithelial cells and induced an activation of apically localized ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels (Bogdan *et al.* 2008; Richter 2010). Here, it is shown that K_{ATP} channels are indirectly activated by a HP-induced ATP-release via mechanosensitive pannexin- and connexin-hemichannels. This hypothesis is based on the findings that the HP-induced ATP-release, as well as K_{ATP} channel activation was absent after preincubation of the epithelium with specific pannexin- (Probenecide) and connexin- (MFA) hemichannel inhibitors. In RT-PCR experiments, mRNA transcripts encoding for the K_{ATP} channel subunits Kir6.1 and SUR1 as well as the pannexin- (Panx1) and connexin- (Cx30 and Cx43) hemichannels were detected in *X. laevis* lung homogenates. In order to simulate the physiological condition of the mammalian permanent breathing movements, HP was cyclical (30 sec intervals) applied to the epithelium over a period of 30 min. The HP-induced current decrease as well as the ATP-release were repeatable over this timescale and did not desensitize. The findings once more underline an indirect K_{ATP} channel activation induced by mechanosensitive ATP-release. This represents a novel mechanotransduction-process in which hemichannels function as mechanosensors. Cyclic HP application further resulted in an increase of the baseline current due to an increase in ENaC-dependent Na^+ absorption of the epithelium. Thus, mechanical forces (stretch) induced short term as well as long term effects in the pulmonary epithelium of *X. laevis* and have a significant influence on transepithelial ion transport processes.

2) The possibility of *n*-alcohols e.g. ethanol (EtOH), 1-octanol (OCT) and 1-heptanol (HEP) to modulate the activity of ion channels was shown earlier in neuronal cells (Mihic *et al.* 1997; Dilger 2002; Horishita & Harris 2008). Furthermore, an OCT- and HEP-induced activation of the CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) chloride channel was demonstrated. The underlying mechanism of action of *n*-alcohols is still unknown. CFTR is highly abundant in pulmonary epithelia and plays an important role in the fluid homeostasis of the lung. In this study the mechanism of the *n*-alcohol-induced CFTR activation was characterized for the first time in native pulmonary epithelia (*X. laevis*) by performing Ussing-chamber experiments. Furthermore, the impact of *n*-alcohols on heterologously expressed human CFTR (hCFTR) in *X. laevis* Oocytes was investigated by the two-electrode voltage clamp (TEVC) technique. The long chain *n*-alcohols OCT and HEP induced a CFTR-dependent Cl⁻ secretion in the pulmonary epithelium as well as in the *in vitro* model. Interestingly, the OCT- and HEP-induced CFTR activation required the activity of the adenylate cyclase. This was supported by the fact that the effects of OCT and HEP were absent when adenylate cyclase was inhibited by the specific inhibitor MDL-12330A. Thus, the adenylate cyclase seems to be the target of *n*-alcohols and consequently leads to cAMP-dependent CFTR activation. Interestingly, the short chain *n*-alcohol EtOH showed no impact on CFTR activity in both used model systems. The identification of the adenylate cyclase as the main target for *n*-alcohols may be a basic mechanism of action in order to modulate ion channel activity in both, non-excitabile and excitable cells.

Taken together a novel mechanotransduction-process as well as a mechanism of action for long chain *n*-alcohols (OCT and HEP) were identified. Both mechanisms represent novel modulators that significantly influence the pulmonary ion transport processes.

1. Einleitung

1.1 Morphologie der respiratorischen Organe luftatmender Vertebraten

Der Übergang vom Wasser hin zum Leben auf dem Land war wohl einer der entscheidendsten Schritte in der Evolution der Wirbeltiere (Vertebrata) und fand vor ca. 397 Millionen Jahren im Zeitalter des Devon statt (Janvier & Clément 2010; Niedźwiedzki *et al.* 2010). Die Grundvoraussetzung für diesen evolutiven Schritt war die Ausbildung spezieller, an das Landleben angepasster Atmungsorgane, der Lungen.

Die Lunge entwickelt sich embryonal durch eine Einstülpung des Vorderdarms (Ten Have-Opbroek 1991; Pepicelli *et al.* 1998; Weibel 2009). Innerhalb der luftatmenden Vertebraten haben sich jedoch unterschiedliche morphologische Lungendesigns entwickelt, von der einfachen sackartigen Lungenstruktur der Amphibien (Meban 1973) bis hin zu der schwammartig aufgebauten Lunge des Menschen (Weibel 2009) (vgl. Abb. 1 A). Die Hauptaufgabe der Lungen aller luftatmenden Vertebraten ist jedoch gleich, ein effizienter Gasaustausch, um den Energiebedarf zu decken (aerober Metabolismus). Luftatmende Vertebraten können prinzipiell mehrere Wochen ohne Essen und Tage lang ohne Wasser überleben, jedoch nur für wenige Minuten ohne O₂ (Maina 2000). Ein erwachsener Mensch zum Beispiel verbraucht in Ruhe ca. 14,5 l O₂ pro Stunde, bei Bewegung sogar bis zu 330 l O₂ pro Stunde (Maina 2000). Um diesen hohen Bedarf an O₂ decken zu können, fand bei den Säugetieren (Mammalia) eine Vergrößerung der respiratorischen Oberfläche durch die Miniaturisierung der Lungenstrukturen von der Trachea bis hin zu den winzigen Alveolen statt (vgl. Morphologie der menschlichen Lunge Abb. 1 B). In der menschlichen Lunge gibt es ca. 480 Millionen Alveolen mit einem Durchmesser von ~250 µm (Maina 2000; Ochs *et al.* 2004). Der kleinste bekannte Alveolus wurde mit einem Durchmesser von 30 µm in einer Fledermauslunge gefunden (Maina 2000). Durch diese Miniaturisierung wird eine Maximierung der respiratorischen Oberflächen auf engstem Raum erreicht. Mit einer Fläche von ~150 m² ist das respiratorische Alveolarepithel die größte mit der Außenwelt in Kontakt stehende Oberfläche des menschlichen Körpers (Maina 2000; Andreeva *et al.* 2007).

Trotz der unterschiedlichen Lungendesigns und der Ausbildung verschiedener Ventilationsstrategien innerhalb der luftatmenden Vertebraten, sind die respiratorischen Oberflächen evolutiv hoch konserviert. Die grundlegenden Charakteristika sollen nachfolgend vorgestellt werden.

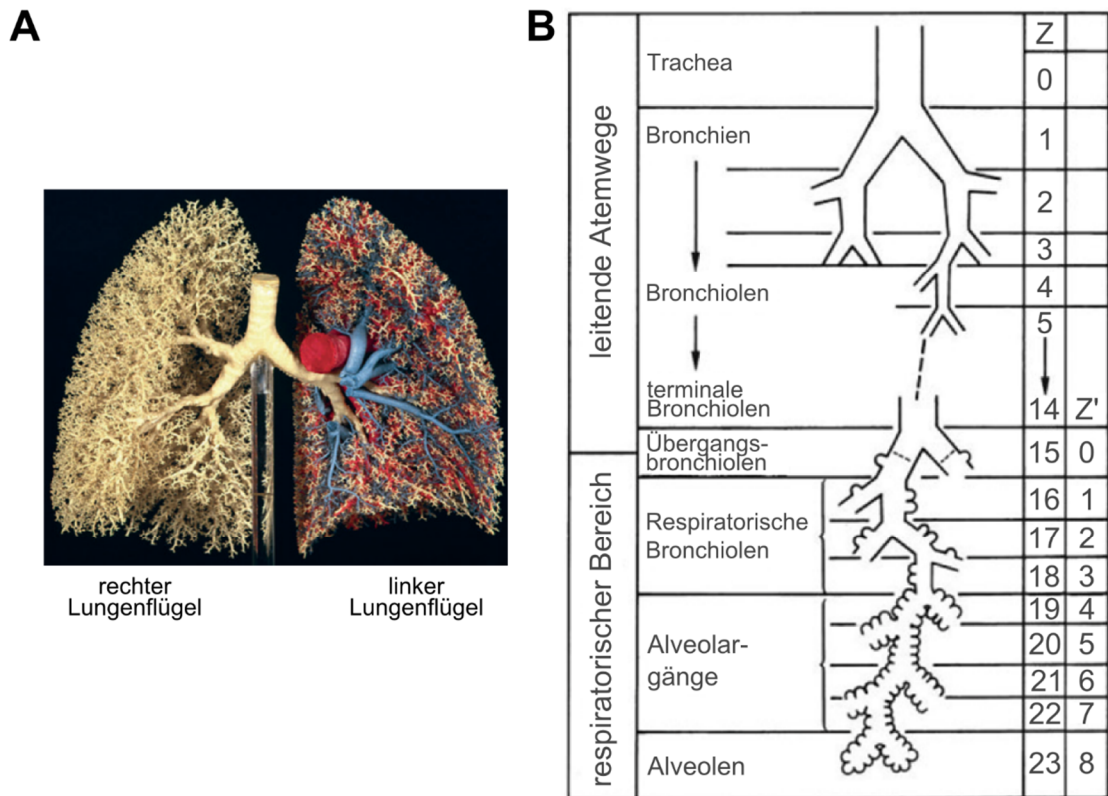


Abb. 1: Morphologie der menschlichen Lunge.

A) Darstellung der baumartig aufgebauten Lungenmorphologie des Menschen von der Trachea bis hin zu den immer kleiner werdenden Bronchien. In dem linken Lungenflügel sind die pulmonalen Arterien (rot) und Venen (blau) dargestellt. B) Modell der Verzweigung der Atemwege von der Trachea (Generation $Z = 0$) über die Bronchiolen bis hin zu den Alveolen. Während die ersten Generationen ($Z 1 - 15$) zur Weiterleitung der Atemluft dienen (leitende Atemwege), findet der Gasaustausch in den letzten 8 Generationen statt (respiratorischer Bereich; Generation $Z' 1 - 8$). Abbildung modifiziert nach Weibel (2009).

Die Oberfläche der Lunge wird von einem dünnen Epithel gebildet, dem sogenannten pulmonalen Epithel (Fronius *et al.* 2012). Das pulmonale Epithel kleidet die gesamte Lunge aus. Es lässt sich jedoch Anhand der Funktion in das obere Atemwegsepithel und das untere respiratorische Epithel unterteilen (Hollenhorst *et al.* 2011; Fronius *et al.* 2012). Zu den oberen Atemwegen zählen dabei die luftleitenden Strukturen wie Nase, Rachenraum, Luftröhre und Bronchien (Hollenhorst *et al.* 2011). Das Atemwegsepithel der Mammalia besteht aus einer großen Anzahl von cilientragenden Zellen und Clara-Zellen sowie einer geringeren Anzahl von undifferenzierten Basalzellen, serösen Zellen und Becherzellen (Jeffery & Reid 1975; Pack *et al.* 1980; Hollenhorst *et al.* 2011). Die Hauptaufgabe des Atemwegsepithels besteht darin, die eingeatmete Luft zu erwärmen und von Pathogenen und Schmutzpartikeln zu befreien. Für die Schutzfunktion liegt dem Epithel eine

Flüssigkeitsschicht (*airway surface liquid*, ASL) auf, die aus der oberen Mukusschicht, dem darauf folgenden *Surfactant* und der unteren periciliären Schicht besteht (Rubin 2002). Die Bestandteile der ASL werden durch die cilientragenden Zellen, Clara-Zellen und Becherzellen sezerniert (Hollenhorst *et al.* 2011). Der Mukus, als oberste Schicht der ASL, dient durch seine netzartige Struktur als eine Art Filter, in dem sich Fremdkörper, Partikel und Pathogene verfangen. Der Mukus mitsamt der darin enthaltenen Schadstoffe wird durch eine kontinuierliche Schlagbewegung der Cilien in orale Richtung abtransportiert und über Abhusten und Abschlucken schließlich aus der Lunge entfernt (Pilewski & Frizzell 1999). Dieser von den oberen Atemwegen getragene Selbstreinigungsmechanismus wird als *mucociliary clearance* bezeichnet und bedarf einer strikten Regulation der Viskosität und Zusammensetzung der periciliären Flüssigkeit, um ein optimales Schlagen der Cilien zu gewährleisten (Pilewski & Frizzell 1999; Hollenhorst *et al.* 2011). Für die Schutzfunktion sind im Atemwegsepithel zudem chemosensorische Bürstenzellen (englisch: *brush cells*) zu finden, welche über die klassische Geschmacks-Transduktionskaskade eine Detektion von gefährlichen Substanzen erlauben wie z.B. bestimmte Stoffwechselprodukte von Bakterien (Krasteva & Kummer 2012; Deckmann *et al.* 2014). Die Bürstenzellen können in Folge einer solchen chemosensorischen Aktivierung lokale Gegenmaßnahmen und aversive respiratorische Reflexe induzieren (Krasteva & Kummer 2012; Deckmann *et al.* 2014). Des Weiteren sind zur Abwehr von Pathogenen immunreaktive Proteine wie die *Surfactant*-Proteine A (SP-A) und D (SP-D) in der ASL enthalten (Kim *et al.* 2007; Orgeig *et al.* 2007). Der eigentliche Gasaustausch findet bei den luftatmenden Vertebraten im unteren respiratorischen Epithel statt, dem Alveolarepithel. Um einen effizienten Gasaustausch gewährleisten zu können, ist das Alveolarepithel sehr dünn (0,1 – 0,2 μM) (Hollenhorst *et al.* 2011). Während das Alveolarepithel der Amphibien nur aus einem Zelltyp (sogenannte Pneumonozyten) besteht, wird das Alveolarepithel der Mammalia aus zwei unterschiedlichen Epithelzellen gebildet, den alveolaren Typ 1 (AT1) und alveolaren Typ 2 (AT2) Zellen (Andreeva *et al.* 2007). Die großen, schuppenartigen AT1 Zellen, welche ca. 95% der Alveolaroberfläche bilden, scheinen hauptsächlich am Gasaustausch beteiligt zu sein (Andreeva *et al.* 2007). Hingegen zeichnen sich die kleineren, kubischen AT2 Zellen durch das Vorhandensein von submembranären Vesikel (*lamellar bodies*; osmiophile Vesikel) aus, die für die Synthese und Sekretion des *Surfactants* verantwortlich sind (Hollenhorst *et al.* 2011). Die Pneumonozyten der niederen luftatmenden Vertebraten scheinen die Zellfunktionen der AT1 und AT2 Zellen zu vereinen (Meban 1973; Fischer *et al.* 1989), da sie sich zum einen durch eine flächige Form auszeichnen und somit den AT1 Zellen der

Mammalia ähneln (Meban 1973; Maina 2002). Zum anderen besitzen Pneumonocyten die zur Produktion und Sekretion von *Surfactant* verantwortlichen *lamellar bodies* (Meban 1973), was eine charakteristische Funktion der AT2 Zellen darstellt.

Das Alveolarepithel ist ein elementarer Bestandteil der Luft-Blut Schranke. Der morphologische Aufbau der Luft-Blut Schranke ist unter den luftatmenden Vertebraten evolutiv hoch konserviert (Fronius *et al.* 2012). Von den Lungenfischen bis hin zu den Mammalia wird die Architektur der Luft-Blut Schranke als "*three-ply design*" bezeichnete, bestehend aus dem Alveolarepithel, der Basallamina und dem Endothelepithel (Maina & West 2005; Fronius *et al.* 2012) (siehe Abb. 2). Diese Architektur gewährleistet eine sehr kurze Diffusionsstrecke der Atemgase von dem Luftraum der Alveolen bis in das Blut (siehe Abb. 2). Des Weiteren ermöglicht das "*three-ply design*" die Verteilung einer geringen Menge Blut über eine extensive respiratorische Fläche. In der menschlichen Lunge werden dadurch 213 cm³ Kapillaren-Blut auf eine respiratorische Fläche von ~150 m² verteilt, eine Fläche so groß wie ein Tennisfeld (Maina 2000). Wie in dem oberen Atemwegsepithel, ist auch dem Alveolarepithel eine Flüssigkeitsschicht aufgelagert, die sogenannte *alveolar lining fluid* (ALF; vgl. Abb. 2). Das Vorkommen der ALF ist eine weitere hoch konservierte morphologische Besonderheit der luftatmenden Vertebraten und stellt für die Physiologie und Funktion der Lunge eine essentielle Komponente dar. Man könnte demnach die "*three-ply design*" Architektur der Luft-Blut Schranke auch als "*four-ply design*" bezeichnen (Fronius *et al.* 2012) (vgl. Abb. 2).

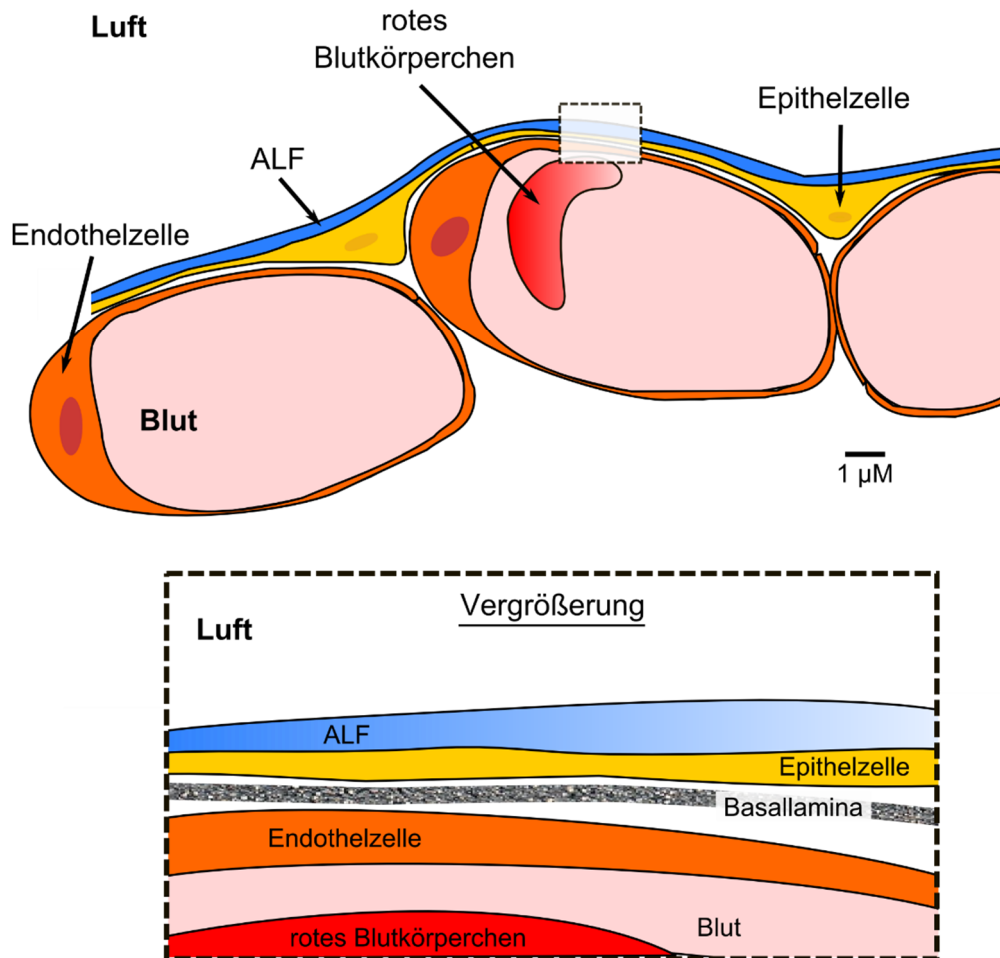


Abb. 2: Darstellung eines Querschnitts des distalen Bereichs einer Vertebratenlunge mit den Komponenten der Luft-Blut Schranke.

Die Luft-Blut Schranke wird aus dem respiratorischen Epithel, der Basallamina und dem Endothel gebildet. Die apikale Seite ist von einer Flüssigkeitsschicht bedeckt, der sogenannten *alveolar lining fluid* (ALF). In der Vergrößerung (untere Abbildung) ist die Basallamina deutlich zu erkennen. Die Darstellung beruht auf einer elektronenmikroskopischen Aufnahme von Fischer *et al.* (1989) und wurde modifiziert nach Fronius *et al.* (2012).

Die ALF wird hauptsächlich durch das Einströmen von Flüssigkeit aus dem Endothel entlang des Druckgradienten in den Luftraum der Alveolen bedingt (Fronius *et al.* 2012). Die 0,1 - 0,24 µM hohe Flüssigkeitsschicht (Stephens *et al.* 1996) hat vier essentielle Funktionen: 1) Eukaryotische Zellen benötigen zum Überleben grundsätzlich ein wässriges Milieu (Fronius *et al.* 2012). 2) O₂ diffundiert nicht über trockene respiratorische Oberflächen (Maina 2000), deshalb ist die ALF entscheidend für den Gasaustausch. 3) Die ALF bildet einen Schutzfilm über dem Epithel aus und ist unerlässlich für die Immunantwort z.B. durch die Bildung und Freisetzung von Cytokinen (Hollenhorst *et al.* 2011). 4) Die in der ALF enthaltenen

oberflächenaktiven Substanzen (*Surfactant*) reduzieren die Oberflächenspannung und verhindern so ein Kollabieren der Alveolen (Hollenhorst *et al.* 2011; Maina 2002). Bezüglich des letzten Punktes sei an dieser Stelle erwähnt, dass die Ausbildung eines *Surfactant*-Systems unter den Vertebraten ebenfalls hoch konserviert ist (Daniels & Orgeig 2001; Orgeig *et al.* 2007). Die zur Produktion, Speicherung und Sekretion von *Surfactant* benötigten *lamellar bodies*, wurden in allen Vertebraten Klassen gefunden (Daniels & Orgeig 2001; Hyatt *et al.* 2007).

Surfactant ist eine komplexe Mixtur aus Phospholipiden (hauptsächlich Phosphatidylcholine), Neutrallipiden und 4 verschiedenen *Surfactant*-Proteinen (SP) (Orgeig *et al.* 2007). Während SP-B und SP-C für die Regulation der Oberflächenspannung verantwortlich sind, spielen SP-A und SP-D eine wichtige Rolle für pulmonale Immunantworten und die alveolare *Surfactant*-Homöostase (Daniels & Orgeig 2001; Orgeig *et al.* 2007). Das SP-C ist zudem ein klassischer molekularer Marker für die Entwicklung der Lunge und wird bereits sehr früh in der Lungen-Entwicklung exprimiert (Hyatt *et al.* 2007). Nur in Vögeln kommt SP-C nicht vor (Daniels & Orgeig 2001). Die Expression von SP-B ist lebensnotwendig, da das Fehlen oder Mutationen des Proteins von der Entstehung neonataler respiratorischer Krankheiten bis hin zum neonatalen Tode führen können (Hyatt *et al.* 2007). Die Expression von SP-B sowie SP-C konnte bereits in der Lunge von Amphibien nachgewiesen werden (Hyatt *et al.* 2007). Dabei zeigte der zeitliche Vergleich der SP-B und SP-C Expressionsmuster während der Lungenentwicklung eine hohe Übereinstimmung der Amphibien zu den Mammalia (Hyatt *et al.* 2007). Während *Surfactant* in den Lungen der Mammalia die Oberflächenspannung herabsetzt und dadurch auch das Eindringen von Flüssigkeiten aus dem Blut über den intertestinalen Spalt in den Luftraum der Alveolen reduziert, ist die physiologische Bedeutung des *Surfactants* für niedere luftatmende Vertebraten noch relativ unbekannt (Maina 2000; Daniels & Orgeig 2001). Es wird jedoch vermutet, dass die antiadhäsive Wirkung des *Surfactants* für tief tauchende Tiere sowie aquatische Amphibien und Reptilien eine wichtige Rolle spielen könnte (Daniels & Orgeig 2001). Diese lassen während ihres expiratorischen Atmungszyklus die Lunge häufig teilweise oder vollständig kollabieren (Daniels & Orgeig 2001). Dabei kommen große Flächen des Epithels miteinander in Kontakt. In solchen Situationen könnte die antiadhäsive Wirkung des *Surfactants* unabdingbar sein für die Entfaltung der respiratorischen Organe bei der Inspiration (Daniels & Orgeig 2001). Auch wenn die Funktion des *Surfactant* bei den niederen luftatmenden Vertebraten noch nicht vollständig geklärt ist, steht es außer Frage, dass bei luftatmenden Vertebraten die Höhe, Zusammensetzung und Viskosität der Flüssigkeitsschicht über dem pulmonalen Epithel (ASL

und AFL) streng reguliert werden muss, um sowohl die *mucociliary clearance* der oberen Atemwege als auch einen effektiven Gasaustausch im Alveolarepithel gewährleisten zu können. Die Regulation des Flüssigkeitsfilms wird hauptsächlich über transepitheliale Ionentransport-Prozesse realisiert und wird in einem späteren Abschnitt (siehe Einleitung 1.2) detailliert beschrieben.

Unter den luftatmenden Vertebraten haben sich zwar unterschiedliche Spezies-spezifische Formen von Lungen und Atmungsstrategien entwickelt (Maina 2000). Unabhängig davon, mit welcher Ventilationsstrategie die Atmung stattfindet, sind die Zellen in den respiratorischen Organen aufgrund der kontinuierlichen Atembewegungen ständig verschiedenen mechanischen Kräften ausgesetzt (Wirtz & Dobbs 2000). Die mechanischen Kräfte sind definiert als: Druck (Kraft pro Fläche), Dehnung (Kraft-bedingte Deformation, z.B. Änderung der Länge) und Scherkraft (parallel zur Oberfläche wirkende Kraft, z.B. Bewegung einer Flüssigkeit auf der Zelloberfläche) (Wirtz & Dobbs 2000; Garcia *et al.* 2006). Auch die pulmonalen Epithelzellen mussten sich evolutiv an diese mechanischen Kräfte adaptieren. Vielmehr noch müssen die Zellen im Allgemeinen dazu in der Lage sein, mechanische Kräfte wahrzunehmen (Mechanorezeption) und sie in zelluläre (elektrochemische) Signale umzuwandeln. Dieser Prozess wird als Mechanotransduktion bezeichnet, ein überlebenswichtiger Reizwahrnehmungs-Sinn, der in allen Organismen von den Archeen bis hin zu den Mammalia zu finden ist (Orr *et al.* 2006; Poirier & Iglesias 2007). Die Zellen von mehrzelligen eukaryotischen Organismen sind mit einer Vielzahl von verschiedenen Mechanorezeptoren ausgestattet. Eine Übersicht der zellulären Strukturen, die an der Wahrnehmung mechanischer Kräfte und der zellulären Mechanotransduktion beteiligt sind, ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Zellen stehen über Zell-Zell Verbindungen (*Tight junctions*, *Gap junctions* und *Adhering junctions*), die u.a. durch Zelladhäsionsmoleküle wie Cadherine sowie Kanalproteine (Connexine) und Ankerproteine (Claudine) gebildet werden, im ständigen Kontakt zu benachbarten Zellen. Dadurch können sie ihre Umgebung wahrnehmen und es kann zu einer Kraftübertragung von Zelle zu Zelle kommen. Des Weiteren ist die Zelle von einem Netzwerk aus Proteinen (z.B. Collagen, Fibronectin, Laminin) und Glykosaminoglykanen (Heparan Sulfate, Syndecan, Glypican) umgeben, die zusammengenommen als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet werden (Bukoreshtliev *et al.* 2013). Die EZM kann an verschiedene Zelloberflächenrezeptoren (Integrine) binden. Dadurch bildet sie eine Art Gerüst um die Zellen und fungiert als eine extrazelluläre Signalstation, welche physikalische Kräfte auf die Zelle übertragen kann (Bukoreshtliev *et al.* 2013). Aktivierte Integrine sind ihrerseits intrazellulär über Kontaktproteine mit dem

Zytoskelett verbunden und können zusammen mit der fokalen Adhäsions Kinase (FAK) und weiteren Proteinen einen komplexen Zusammenschluss von Proteinen bilden, welcher als fokale Adhäsion bezeichnet wird (Bukoreshtliev *et al.* 2013). Die fokale Adhäsion stellt somit die Hauptverbindung zwischen dem Zytoskelett und der EZM dar. Das Zytoskelett (bestehend aus filamentösem Aktin (F-Aktin), Tubulin- und Intermediärfilamenten) kann zum einen an der Übertragung der physikalischen Kräfte über die EZM beteiligt sein oder eine direkte Konformationsänderung in Folge von intrazellulärer Dehnung erfahren und dadurch an Mechanotransduktions-Prozessen beteiligt sein (Jaalouk & Lammerding 2009).

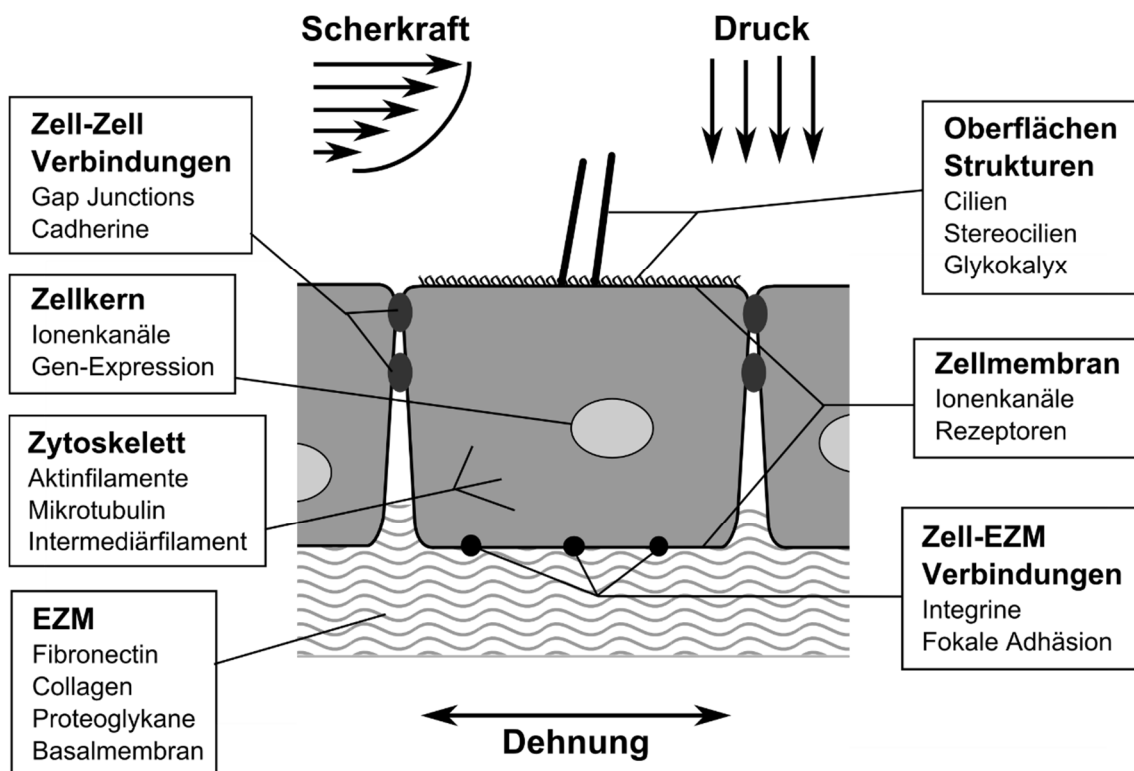


Abb. 3: Schematische Darstellung zellulärer Strukturen, die als Mechanosensoren fungieren und an der Mechanotransduktion beteiligt sein können.

Eine Vielzahl von zellulären Komponenten und extrazellulären Strukturen können von physikalischen Kräften (Druck, Dehnung, Scherkraft) beeinflusst werden und somit an Mechanotransduktions-Prozessen beteiligt sein. Dazu zählen Elemente wie die extrazelluläre Matrix (EZM), das Zytoskelett, der Zellkern, Zell-Zell-Verbindungen, verschiedene Oberflächen Strukturen, Bestandteile der Zellmembran und Zell-EZM Verbindungen. Die Abbildung wurde verändert nach Ingber (2006).

Eukaryotischen Zellen ist zudem eine sogenannte Glykokalyx aufgelagert, eine aus Polysacchariden bestehende Schicht, die an Glykoproteine gebunden ist und als Mediator von Scherkräften fungieren kann (Jaalouk & Lammerding 2009). Selbst der Zellkern wurde bereits als ein Mechanosensor beschrieben (Jaalouk & Lammerding 2009). Einige Zellen bilden spezielle Oberflächenstrukturen (Cilien) aus, über deren Auslenkung physikalische Kräfte detektiert werden können. Da die Zellmembran die äußere Begrenzung einer Zelle ist, stellt sie mit ihren integralen, mechanosensitiven Ionenkanälen wohl einen der wichtigsten Mediatoren der zellulären Mechanotransduktion dar.

Man ist sich heute sicher, dass die Fähigkeit zur Wahrnehmung der mechanischen Kräfte unerlässlich für die Physiologie und Funktion der Lunge ist (vgl. Einleitung 1.3). Auch das Auftreten krankhafter Veränderungen konnte mit der mechanischen Reizung von pulmonalen Epithelzellen in Verbindung gebracht werden (vgl. Einleitung 1.3). Hingegen sind die Erkenntnisse der zu Grunde liegenden Mechanotransduktions-Prozesse, die dafür verantwortlich sind wie Epithelzellen auf die mechanischen Reize reagieren, bislang noch weitgehend unbekannt. Wichtige Mechanosensoren könnten dabei mechanosensitive Ionenkanäle darstellen (Goodman & Schwarz 2003; Ingber 2006; Folgering *et al.* 2008). Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass eine der grundlegenden Funktionen von Epithelzellen der Transport von Ionen ist und das Vorkommen von verschiedenen mechanosensitiven Ionenkanälen in pulmonalen Epithelzellen bereits beschrieben wurde (Althaus *et al.* 2007; Ransford *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2010).

1.2 Ionentransport-Prozesse des pulmonalen Epithels

Wie zuvor beschrieben (vgl. Einleitung 1.1), ist die Lunge von luftatmenden Vertebraten von einem pulmonalen Epithel ausgekleidet. Der allgemeine Aufbau von Epithelien ist gekennzeichnet durch den Zusammenschluss von polarisierten Epithelzellen zu ein- oder mehrschichtigen Zellverbänden mit einer apikalen (nach außen gerichteten) und einer basolateralen (dem Blut zugewandten) Seite. Epithelien üben generell eine Barriere-Funktion aus und grenzen das Körperinnere gegenüber der Außenwelt ab. Des Weiteren ermöglichen sie einen kontrollierten Stoffaustausch. Um diesen gerichteten (vektoriellen) Transport durchführen zu können, besitzen die Epithelzellen spezielle Transportsysteme (Carrier, Ionenkanäle, Pumpen). Diese, in die Membran eingelagerte, Proteine ermöglichen einen gerichteten transzellulären Transport über das Epithel. Während der Transport über Ionenkanäle einen rein passiven Diffusionsvorgang entlang eines elektrochemischen

Gradienten darstellt, können Carrier und Pumpen (z.B. die Na⁺/K⁺-ATPase) unter Verbrauch von Energie (in Form von ATP) Stoffe auch entgegen eines vorherrschenden elektrochemischen Gradienten transportieren. Neben dem transzellulären Transport spielt auch der parazelluläre Transport eine entscheidende Rolle für Epithelien. Um diesen parazellulären Transport regulieren zu können, besitzen Epithelien sogenannte *Tight junctions* (ursprünglich auch *Zonula occludens* genannt), welche die Epithelzellen untereinander verbinden und somit ihre Permeabilität regulieren (Schneeberger & Lynch 1984; Cavanaugh *et al.* 2001) (vgl. Einleitung 1.1). *Tight junctions* bestehen aus verschiedenen Proteinen, welche koordiniert miteinander interagieren, um eine parazelluläre Barriere auszubilden (Overgaard *et al.* 2011). Der Grundaufbau einer *Tight junction* besteht prinzipiell aus transmembranen Proteinen (Claudine und Occludin) und den Gerüstproteinen *Zona occludens* (englisch: *scaffold proteins*) (Overgaard *et al.* 2011; Günzel & Yu 2013). Claudine bilden dabei *Tight junction* Stränge aus, welche mittels der intrazellulären *Zona occludens* Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett der Epithelzellen verbunden werden (Overgaard *et al.* 2011). Das transmembrane Protein Occludin kann direkt mit den Claudinen interagieren und hilft die Formation von *Tight junctions* zu regulieren (Overgaard *et al.* 2011). Der Aufbau von *Tight junctions* ist sehr divers. In der Lunge der Mammalia wurde bereits die Expression von 7 verschiedenen Claudinen nachgewiesen (Günzel & Yu 2013). Zudem können *Tight junctions* verschiedene weitere Proteine enthalten (z.B. Tricellulin) und durch Plasmaproteine und *junction* Adhäsions-Proteine reguliert werden (Overgaard *et al.* 2011). Die Zusammensetzung der *Tight junctions*, insbesondere welche Claudin-Typen enthalten sind, entscheidet maßgeblich über ihre Permeabilität und somit auch über die Dichte und den Widerstand von Epithelien (Overgaard *et al.* 2011). Mit einem Widerstand von $\sim 75000 \Omega/\text{cm}^2$ zählt die Harnblase zu den “dichten“ (englisch: *tight*) Epithelien (Schneeberger & Lynch 1984; Günzel & Yu 2013). Das pulmonale Epithel gehört hingegen zu den Resorptionsepithelien und weist einen Gewebewiderstand von $\sim 1000 \Omega/\text{cm}^2$ sowie eine hohe Wasserpermeabilität auf (Tarran 2004).

Die Fähigkeit des gerichteten Stoffaustauschs und eines kontrollierten parazellulären Transportes sind unerlässlich für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und der Körperhomöostase. Auch die Regulation der Zusammensetzung, Viskosität und Höhe der dem pulmonalen Epithel aufgelagerten Flüssigkeitsschicht (ASL und ALF; vgl. Einleitung 1.1) beruhen auf transepithelialen Ionentransport-Prozessen. Dadurch wird in den oberen Atemwegen die für die Selbstreinigung der Lunge essentielle *mucociliary clearance* gewährleistet (Pilewski & Frizzell 1999; Hollenhorst *et al.* 2011). Im Alveolarepithel

hingegen wird durch die aktive Rückresorption der Flüssigkeit aus dem Alveolarraum, ein Vorgang der als *alveolar fluid clearance* bezeichnet wird, ein effektiver Gasaustausch aufrecht gehalten (Althaus *et al.* 2011; Hollenhorst *et al.* 2011). Die Haupttriebkraft für die Flüssigkeitsresorption im pulmonalen Epithel stellt die passive Aufnahme von Na^+ Ionen über Amilorid-sensitive epitheliale Na^+ Kanäle (englisch: *epithelial Na^+ channel*; ENaC) sowie sogenannte *cyclic nucleotide-gated* (CNG) Kationen Kanäle, die keine Amilorid-Sensitivität aufweisen, dar (Johnson *et al.* 2002; Wilkinson *et al.* 2011). Dabei folgt Na^+ einem elektrochemischen Gradienten, der aktiv über die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase aufgebaut wird (Hollenhorst *et al.* 2011). Die Na^+/K^+ -ATPase transportiert zeitgleich drei Na^+ Ionen aus der Zelle heraus und zwei K^+ Ionen in die Zelle hinein. In Folge dieser Verschiebung von Na^+ über das Epithel wird ein osmotischer Gradient generiert. Entlang dieses Gradienten folgt H_2O passiv nach und wird so aus dem Luftraum entfernt. Im Gegensatz dazu führt eine gesteigerte Cl^- Sekretion auf der apikalen Seite des Epithels dazu, dass vermehrt H_2O in das Lungenlumen strömt. In Folge dessen kommt es zu einer Erhöhung des Flüssigkeitsfilms (Hollenhorst *et al.* 2011). Diese Cl^- Sekretion kann über den sogenannten *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) Cl^- Kanal und Ca^{2+} -abhängige Cl^- Kanäle (CaCC) stattfinden (Tarran 2004). Die Aufnahme von Cl^- in die Epithelzelle wird dabei über basolateral lokalisierte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Anionenaustauscher (Al Bazzaz *et al.* 2001) und $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}_2$ Co-Transporter (NKCC) (Haas & Forbush 2000) realisiert. Durch eine gezielte Aktivierung bzw. Hemmung der Na^+ Absorption und Cl^- Sekretion können somit die Eigenschaften des Flüssigkeitsfilms auf dem pulmonalen Epithel reguliert werden. Bei diesem Regulationsmechanismus spielen jedoch auch K^+ Kanäle eine wichtige Rolle, deren Hauptaufgabe die Kontrolle des Membranpotentials ist. Dadurch halten sie den elektrochemischen Gradienten, welcher für den Ionen- und Flüssigkeitstransport benötigt wird, aufrecht (Bardou *et al.* 2009; Bardou *et al.* 2012). K^+ Kanäle sind eine sehr diverse Ionenkanalfamilie. Allein im Alveolarepithel der Mammalia konnten bisher über 30 verschiedene K^+ Kanal-Typen identifiziert werden (Bardou *et al.* 2009). K^+ Kanäle werden anhand der Anzahl ihrer Transmembrandomänen (TMD) in 3 Gruppen eingeteilt: 1) 6 TMD K^+ Kanäle (Spannungs-abhängige K^+ Kanäle (K_V) und Ca^{2+} -abhängige K^+ Kanäle (K_{Ca})); 2) 4 TMD K^+ Kanäle (zwei-Poren Domänen K^+ Kanäle (K_2P); 3) 2 TMD K^+ Kanäle (*inwardly-rectifying* K^+ Kanäle (Kir)) (Bardou *et al.* 2009). Mit Ausnahme der K_2P Kanäle wurden bisher Mitglieder aller K^+ Kanal Gruppen im Alveolarepithel von Mammalia gefunden (Hollenhorst *et al.* 2011). In verschiedenen Studien konnte bereits eine potentielle Bedeutung der K_V Kanäle, K_{Ca} Kanäle und ATP-sensitiven K^+ (K_{ATP}) Kanäle für den transepithelialen

Ionen transport und der damit verbundenen *alveolar fluid clearance* aufgezeigt werden (Leroy *et al.* 2004; Leroy *et al.* 2006; Bardou *et al.* 2012).

1.3 Fehlregulationen des transepithelialen Ionen transports im pulmonalen Epithel und ihre pathophysiologische Bedeutung

Die ASL und ALF des pulmonalen Epithels müssen über transepitheliale Ionen transport-Prozesse strikt reguliert werden, um die *mucociliary clearance* und die *alveolar fluid clearance* aufrecht zu erhalten (vgl. Einleitung 1.2). Fehlregulationen in diesen fein abgestimmten transepithelialen Ionen transport-Prozessen können hingegen zur Ausbildung von schweren Krankheiten führen wie z.B. der Mukoviszidose (zystische Fibrose; englisch: *cystic fibrosis*; CF) (Pilewski & Frizzell 1999; O'Sullivan & Freedman 2009). Die Mukoviszidose ist auf Mutationen des für den CFTR codierenden Gens zurückzuführen. Sie zählt zu einer der häufigsten vererbaren Krankheiten unter der Kaukasischen Bevölkerung (Amaral & Kunzelmann 2007; Li & Naren 2010) und betrifft eines von 2500-4000 Neugeborenen (Amaral & Kunzelmann 2007). Neben dem pulmonalen Epithel (Tarran 2004; Fang *et al.* 2006) ist der CFTR in einer Vielzahl weiterer Gewebe und Organe zu finden, wie z.B. den Bauchspeicheldrüsenengängen (Wang *et al.* 2013), Leber- und Gallengängen (Martin *et al.* 2012), Dünndarm (Jakab *et al.* 2013) und Dickdarm (Weiner *et al.* 2008), Samenleiter (Ruan *et al.* 2012), Gebärmutter (Muchekehu & Quinton 2010) und den Schweißdrüsen (Reddy & Quinton 2009; Wine *et al.* 2013). Aufgrund dessen ist die Mukoviszidose eine Multi-Organ Krankheit. In der Lunge betrifft die Pathophysiologie der Mukoviszidose die oberen Atemwege. Durch die Mutation des CFTR Proteins kommt es zu einer teilweise oder vollkommen verminderten Cl^- Sekretion im Atemwegsepithel. In Folge dessen ist die Höhe der ASL reduziert und eine *mucociliary clearance* kann nicht mehr aufrechterhalten werden (Pilewski & Frizzell 1999). Die daraus resultierende Ansammlung von Mukus in den Atemwegen bietet einen optimalen Nährboden für Pathogene wie *Pseudomonas aeruginosa* und kann chronische Atemwegsinfektionen nach sich ziehen (Pilewski & Frizzell 1999; O'Sullivan & Freedman 2009). Die dadurch bedingten chronischen Entzündungsreaktionen führen zu einer zunehmenden Fibrosierung der gesamten Lunge. Damit einhergehend kann der Gasaustausch nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt zum tödlichen Lungenversagen (Davis 2006).

Eine Erhöhung der ALF (gesteigerte Cl^- Sekretion und/oder verminderte Na^+ Absorption) über dem respiratorischen Epithel führt zum Krankheitsbild der pulmonalen Ödeme. Die

Ansammlung von Flüssigkeit in dem respiratorischen Bereich der Lunge bedingt eine Verschlechterung des Gasaustauschs und führt zur Hypoxie (Sauerstoffmangel) (Fronius *et al.* 2012). Mögliche Ursachen für die Ausbildung von pulmonalen Ödemen können unterschiedlicher Natur sein, wie z.B. verschiedene Lungenkrankheiten (*acute lung injury*: ALI; *acute respiratory distress syndrome*: ARDS) und Schädigungen des Lungenepithels in Folge eines Unfalls oder Säureaspiration (Hollenhorst *et al.* 2011). Auch Patienten, die an einer Erhöhung des arteriellen Drucks des linken Herzens und damit verbunden an einer Erhöhung des Drucks in der pulmonalen Vene leiden, bilden pulmonale Ödeme aus (Hollenhorst *et al.* 2011). Häufig sind jedoch Änderungen der in der Lunge herrschenden physikalischen Kräfte mit der Bildung von pulmonalen Ödemen verbunden. Die Bedeutung von physikalischen Kräften für die Physiologie und Pathophysiologie der Lunge sollen nachfolgend näher erläutert werden.

1.4 Physiologie und Pathophysiologie von mechanischen Kräften in der Lunge

Wie bei einem Luftballon benötigt die Lunge der Mammalia externe Dehnungskräfte, um sich beim Einatmen aufzublähen (Fredberg & Kamm 2006). Diese Dehnungskräfte beruhen auf der Bewegung der Brustkorbwand mittels der assoziierten Atmungsmuskulatur (Fredberg & Kamm 2006). Bei jeder Atembewegung werden die Zellen somit mechanischen Kräften ausgesetzt. Auf das Atemwegsepithel wirken dabei hauptsächlich Scherkräfte, bedingt durch den entstehenden Luftstrom beim Ein- und Ausatmen. Im Alveolarepithel hingegen werden die Zellen in Folge der Brustkorbbewegung positivem und negativem transpulmonalen Druck ausgesetzt (Fronius 2012). Dabei entstehen beim normalen Einatmen Drücke von ~5 cm Wassersäule (Fronius 2012). Die maximale Lungkapazität eines adulten Menschen wird bei Drücken von 30 cm Wassersäule erreicht (Fredberg & Kamm 2006). Der Wirkungsbereich des transpulmonalen Drucks liegt somit zwischen 0 – 30 cm Wassersäule und ist interessanter Weise unabhängig von der Lungengröße, dem Körpergewicht und dem Entwicklungsstand der Lunge von Neonatal bis Adult (Fredberg & Kamm 2006). Vielmehr noch ist dieser Wirkungsbereich des transpulmonalen Drucks (0 – 30 cm Wassersäule) sogar Spezies übergreifend zu finden (Fredberg & Kamm 2006). Die auftretenden transpulmonalen Drücke in der Lunge resultieren in einer Dehnung des Alveolarepithels und somit in einer Deformation der Zellen (Fronius 2012). Die bei der Atmung auftretenden physikalischen

Kräfte sind unerlässlich für die Funktion und Physiologie der Lunge. Eine Übersicht der durch diese Kräfte beeinflussten Funktionen ist in Abbildung 4 dargestellt.

Basierend auf klinischen Beobachtungen und physiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass mechanische Stimuli bereits für das fetale Wachstum und die Entwicklung der Lunge entscheidend sind (Liu & Post 2000). Bereits im Mutterleib führt ein Fetus "Atembewegungen" durch. Dabei induziert die Dehnung der fetalen Lunge eine erhöhte Cl^- Sekretion. Dies resultiert in einen Flüssigkeitseinstrom in den zukünftigen Luftraum der Lunge, wodurch es zur Produktion von Molekülen der EZM sowie zur Expression von spezifischen Genen der Lungenzellen kommt (Liu & Post 2000). All diese Effekte werden durch spezielle Mechanotransduktions-Prozesse in den fetalen Lungenzellen hervorgerufen (Liu & Post 2000).

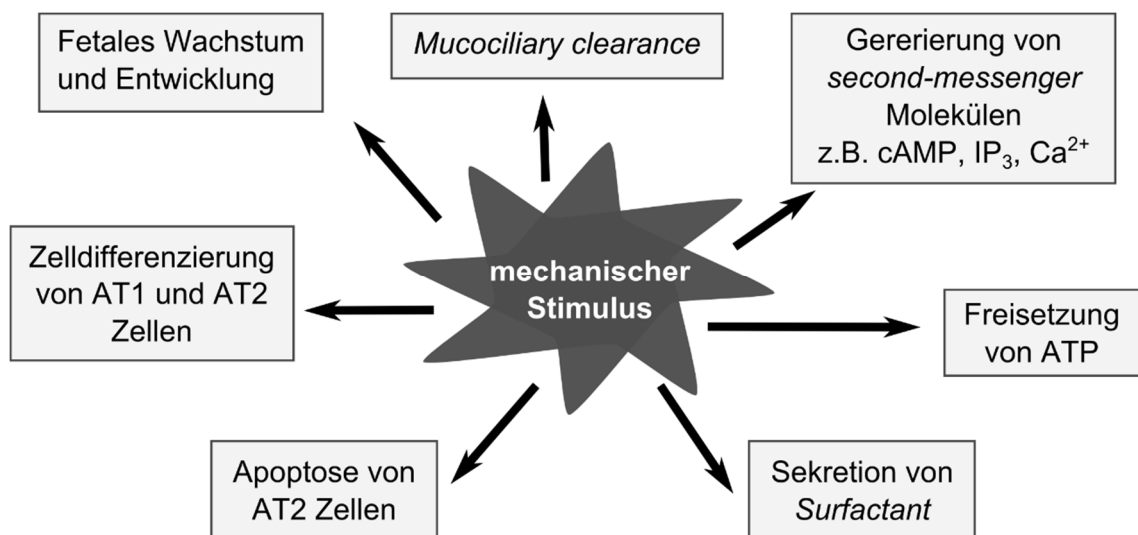


Abb. 4: Einfluss von mechnischen Stimuli auf die Funktion der Lunge.

Unter physiologischen Bedingungen sind mechanische Stimuli unerlässlich für eine Vielzahl von Lungenfunktionen (AT1 und 2: alveolare Typ 1 und 2 Zellen). Die Abbildung wurde verändert nach Fronius (2012).

In der adulten Lunge führt die Dehnung der Epithelzellen zur Generierung von *second-messenger* Molekülen wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP), Inositoltrisphosphat (IP_3) und Ca^{2+} (Liu *et al.* 1999; Wirtz & Dobbs 2000). Diese *second-messenger* Moleküle können ihrerseits verschiedene Proteinkinasen (z.B. Protein Tyrosin Kinase, Protein Kinase C (PKC), Mitogen-aktivierte

(MAP) Kinase) aktivieren und Veränderungen in der Expression von Genen bewirken (Liu *et al.* 1999). Auch die *mucociliary clearance* wird maßgeblich durch die Lungenbewegung beeinflusst (Tarran *et al.* 2005; Tarran *et al.* 2006). Des Weiteren bewirkt die Dehnung der Lunge die Differenzierung der AT1 und AT2 Zellen (Dobbs & Gutierrez 2001), die Produktion und Sekretion von *Surfactant* (Edwards 2001), die Apoptose von AT2 Zellen (Edwards 2001), sowie die Freisetzung des autokrinen und parakrinen Signalmoleküls ATP (Button *et al.* 2007; Ransford *et al.* 2009; Burnstock *et al.* 2012).

Neben dieser Vielzahl von positiven Einflüssen der physikalischen Kräfte auf die Physiologie und Funktion der Lunge, kann eine Erhöhung dieser Kräfte über das physiologische Maß hinaus hingegen zu pathophysiologischen Veränderungen führen. Bei Bergsteigern beispielsweise kommt es in großer Höhe auf Grund des dort herrschenden niedrigen atmosphärischen Drucks zu einem Anstieg des Druckgradienten des Blutes zu dem Luftraum der Lunge (Althaus *et al.* 2011). In Folge dessen strömt vermehrt Flüssigkeit aus dem Blut in das Lungenlumen und es kommt zur Ausbildung von Höhenlungenödem (englisch: *high-altitude pulmonary edema*, HAPE) (Althaus *et al.* 2011). Eine weitere Ursache für die Bildung von pulmonalen Ödemen stellt die künstliche Beatmung dar. Patienten, die an Lungenkrankheiten wie ALI oder ARDS leiden und ihren Sauerstoffbedarf nicht eigenständig decken können, müssen künstlich beatmet werden, um ihr Überleben zu sichern. Bei der künstlichen Beatmung ändern sich jedoch die physikalischen Kräfte in der Lunge und können Folgekrankheiten nach sich ziehen. Die auf künstlicher Beatmung beruhenden Krankheiten werden unter dem Begriff *ventilator-induced lung injury* (VILI) zusammengefasst und basieren auf einer Überdehnung des Alveolarepithels (Hollenhorst *et al.* 2011). Diese Überdehnung führt zu einer gesteigerten Permeabilität der Luft-Blut Schranke und somit zu einem erhöhten Flüssigkeitseinstrom in den Luftraum (Brower *et al.* 2000; Cavanaugh *et al.* 2001; Weinacker & Vaszar 2001). Bei 5-15% der künstlich beatmeten Patienten kommt es dadurch zur Ausbildung von pulmonalen Ödemen mit einer Mortalitätsrate von 34-60% (Cavanaugh *et al.* 2001). Durch die Verwendung von modifizierten Beatmungsstrategien, in denen niedrigere Tidalvolumen und somit auch niedrigere Drücke verwendet wurden, konnte die Mortalitätsrate von VILI Patienten auf 31% gesenkt werden (Brower *et al.* 2000; Frank & Matthay 2003). Dies belegt eine direkte Korrelation zwischen den in der künstlichen Beatmung eingesetzten physikalischen Kräften und der Bildung von pulmonalen Ödemen. VILI Patienten haben eine verringerte Flüssigkeitsresorption im Alveolarepithel und sind nicht dazu in der Lage, die Flüssigkeit aus den Alveolen zu resorbieren (Morty *et al.* 2007). Die beeinträchtigte Flüssigkeitsresorption stellt bei VILI Patienten somit den Hauptfaktor der

hohen Mortalitätsrate dar (Morty *et al.* 2007). Die einzige Behandlungsmaßnahme für pulmonale Ödeme ist demnach die Wiederherstellung der Flüssigkeitsresorption in den Alveolen, die auf einem effektiven Na^+ Transport beruht (vgl. Einleitung 1.2) (Ware & Matthay 2000; Berthiaume *et al.* 2002; Berthiaume & Matthay 2007). Wie in Abbildung 5 dargestellt, scheint es folglich einen direkten Zusammenhang zwischen den in der künstlichen Beatmung eingesetzten mechanischen Stimuli und der Aktivität von epithelialen Ionenkanälen zu geben. Die größte Aufgabe im Kampf gegen die Entstehung von VILI ist es demnach zu verstehen, welchen Einfluss physikalische Kräfte auf transepitheliale Ionen-transport-Prozesse haben.

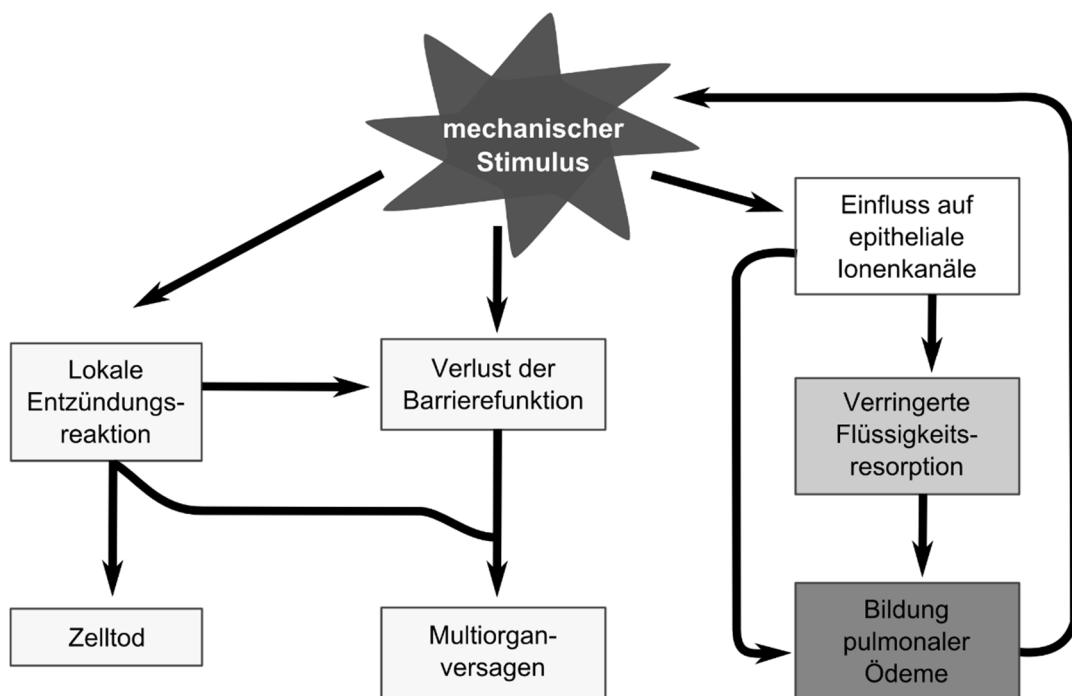


Abb. 5: Die künstliche Beatmung bedingt schädliche physikalische Kräfte und induziert die Bildung von *ventilator-induced lung injury* (VILI).

Bei der künstlichen Beatmung kann die Erhöhung der physikalischen Kräfte in der Lunge über die physiologischen Maße hinaus zur Ausbildung von *ventilator-induced lung injury* (VILI) führen, die tödlich enden kann. Dabei spielt auch der Einfluss dieser Stimuli auf die Aktivität von epithelialen Ionenkanälen eine Rolle, was zur Ausbildung von pulmonalen Ödemen führen kann. Die Abbildung wurde modifiziert nach Fronius (2012).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass pathophysiologische Veränderungen in den transepithelialen Ionentransport-Prozessen des pulmonalen Epithels zur Entstehung verheerender Krankheiten wie Mukoviszidose und pulmonale Ödeme führen können. Als mögliche Therapien dieser pathophysiologischen Zustände steht die Wiederherstellung des transepithelialen Ionentransportes im Vordergrund. Demnach ist es wichtig die transepithelialen Ionentransport-Prozesse im pulmonalen Epithel aufzuklären.

Die Untersuchung von transepithelialen Ionentransport-Prozessen in der Lunge von Mammalia und insbesondere im Alveolarepithel stellt sich, auf Grund der Miniaturisierung der Lungenstrukturen bis hin zu den winzigen Alveolen (vgl. Einleitung 1.1), jedoch als sehr schwierig dar. Häufig wurden deshalb Studien an isolierten und kultivierten AT1 und AT2 Zellen durchgeführt (Jain *et al.* 2001; Johnson *et al.* 2002), oder Lungen-Schnitte für elektrophysiologische Untersuchungen heran gezogen (Bourke *et al.* 2005; Helms *et al.* 2006; Shlyonsky *et al.* 2008). Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit das native pulmonale Epithel von *X. laevis* als Modellsystem für elektrophysiologische Messungen der alveolaren Ionentransport-Prozesse verwendet. Dieses Modellsystem soll nachfolgend vorgestellt werden.

1.5 Die *X. laevis* Lunge als Modellsystem für den alveolaren Ionentransport

Der berühmte dänische Mediziner und Tierphysiologe August Krogh (*1874; † 1949) formulierte einst die Hypothese: Für jede Fragestellung muss es ein Lebewesen geben, an dem man sie problemlos untersuchen kann (Krebs 1975). Bis heute ist diese Hypothese als das August-Krogh-Prinzip bekannt (Moyes & Schulte 2008). In Übereinstimmung mit dem August-Krogh-Prinzip wurde in der vorliegenden Arbeit das pulmonale Epithel von *X. laevis* als Modellsystem verwendet, um in Ussing-Kammer Messungen alveolare Ionentransport-Prozesse zu untersuchen.

Die grundlegenden und unter den luftatmenden Vertebraten hoch konservierten Gemeinsamkeiten der respiratorischen Morphologie, wie das “*four ply design*“ der Luft-Blut Schranke, wurden bereits beschrieben (siehe Einleitung 1.1). Zudem wurden in *X. laevis* die für Na^+ resorbierende Epithelien charakteristischen Ionentransport-Prozesse mit funktionellen, apikal lokalisierten ENaCs und der basolateral lokalisierten Na^+/K^+ ATPase nachgewiesen (Fischer *et al.* 1989; Kim 1990). Der funktionelle Nachweis des ENaCs wurde in einer Vielzahl von Studien mittels der apikalen Applikation des spezifischen ENaC

Inhibitors Amilorid erbracht (Fischer *et al.* 1989; Kim 1990; Fronius *et al.* 2003; Berk *et al.* 2004; Erb & Althaus 2014). Des Weiteren wurden die α , β und γ ENaC-Untereinheiten auch molekularbiologisch in verschiedenen Epithelien von *X. laevis* wie der Lunge, Niere und Haut nachgewiesen (Puoti *et al.* 1995). Dabei zeigten die ENaC Untereinheiten eine ca. 60%ige Übereinstimmung mit homologen ENaC Untereinheiten der Ratte (Puoti *et al.* 1995). Der funktionelle Nachweis der Na^+/K^+ ATPase im pulmonalen Epithel von *X. laevis* konnte ebenfalls mehrfach durch die basolaterale Applikation von Ouabain aufgezeigt werden (Fischer *et al.* 1989; Erb & Althaus 2014). Um die durch die Na^+/K^+ ATPase in die Zelle transportierten K^+ Ionen zu recyceln, benötigen Epithelzellen sogenannte K^+ Sickerkanäle, welche in der Nähe der Na^+/K^+ ATPase lokalisiert sind. Solche basolaterale K^+ Sickerkanäle wurden ebenfalls in *X. laevis* nachgewiesen (Ilek *et al.* 1990). Neben diesen typischen Charakteristika eines Na^+ absorbierenden Epithels, verfügt das pulmonale Epithel von *X. laevis* auch über verschiedene Komponenten eines Cl^- Transportsystems. So konnte der CFTR in der apikalen Membran sowohl funktionell, als auch immunhistologisch detektiert werden (Sommer *et al.* 2007). Zudem wurden die für eine Aufnahme von Cl^- Ionen in die Epithelzellen erforderlichen basolateralen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Anionenaustauscher und NKCC in der *X. laevis* Lunge funktionell nachgewiesen (Berger *et al.* 2010; Berger *et al.* 2011).

Die einfache sackartige Anatomie der *X. laevis* Lunge (Meban 1973; Hyatt *et al.* 2007) ermöglicht eine flächige Präparation des pulmonalen Epithels, welches anschließend mühelos in die Ussing-Kammer eingebaut werden kann (vgl. Material und Methoden 2.3.1). Durch den polaren Aufbau des Epithels entstehen eine apikale und eine basolaterale Seite, welche mittels eines Perfusionssystems mit unterschiedlichen Lösungen perfundiert und/oder mechanischen Kräften in Form von hydrostatischem Druck (HD; 5 cm Flüssigkeitssäule) ausgesetzt werden können (vgl. Material und Methoden 2.3.1). Die Lungen von Mammalia sind auf Grund ihres schwammartigen Aufbaus (siehe Einleitung Abb. 1) hingegen nicht für elektrophysiologische Ussing-Kammer Messungen geeignet. Mit einem Durchmesser von 30 – 250 μM sind die Alveolen der Mammalia schlichtweg zu klein für etwaige Ussing-Kammer Präparationen.

Ein großer Vorteil der Ussing-Kammer Messungen am pulmonalen Epithel von *X. laevis* ist, dass die Zellen in ihrer natürlichen physiologischen Umgebung verbleiben können mit all ihren ursprünglichen Zell-Zell Verbindungen. Begründet durch die morphologischen und funktionellen Ähnlichkeiten, können anhand der in Ussing-Kammer Messungen erhaltene Erkenntnisse auch Rückschlüsse auf die Ionentransport-Prozesse des Alveolarepithels der Mammalia gezogen werden. Somit stellt das pulmonale Epithel von *X. laevis* ein geeignetes

Modellsystem für die Untersuchung transepithelialer Ionen-transport-Prozesse im Alveolarepithel dar.

1.6 Bearbeitete Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden elektrophysiologische Ussing-Kammer Messungen durchgeführt, um transepitheliale Ionen-transport-Prozesse am pulmonalen Epithel des südafrikanischen Krallenfroschs *X. laevis* zu charakterisieren. Dabei lag der Fokus auf zwei Schwerpunkten: a) den Einfluss von mechanischen Kräften auf transepitheliale Ionen-transport-Prozesse zu charakterisieren; b) die Wirkung von *n*-Alkoholen auf die Aktivität des CFTR zu untersuchen.

Charakterisierung des Einflusses von mechanischen Kräften auf transepitheliale Ionen-transport-Prozesse

Um den Einfluss von mechanischen Kräften auf transepitheliale Ionen-transport-Prozesse im pulmonale Epithel von *X. laevis* zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine modifizierte Ussing-Kammer (Eigenbau des Instituts für Tierphysiologie, JLU Gießen) herangezogen und der transepitheliale Ionen-transport gemessen. In einer früheren Studie konnte in Messungen mit dieser modifizierten Ussing-Kammer bereits gezeigt werden, dass die mechanische Dehnung (hydrostatischer Druck; 5 cm Flüssigkeitssäule; apikal) des pulmonalen Epithels von *X. laevis* zur Aktivierung verschiedener Ionen-Leitfähigkeiten führt (Bogdan *et al.* 2008) (siehe Abb. 6).

Der HD-induzierte Effekt ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Die aktivierten Ionen-Leitfähigkeiten resultierten in einer Abnahme des transepithelialen Stroms (Bogdan *et al.* 2008). Das Epithel reagierte jedoch nur auf HD, wenn ein Druck-Gradient von dem apikalen zum basolateralen bzw. vom basolateralen zum apikalen Kompartiment der Ussing-Kammer angelegt wurde (Bogdan *et al.* 2008). Eine gleichzeitige Erhöhung der Flüssigkeitssäule auf beiden Seiten des Epithels, hatte hingegen keinen Effekt auf den transepithelialen Strom (Bogdan *et al.* 2008). Durch den Einsatz verschiedener spezifischer Inhibitoren konnten eine HD-induzierte Erhöhung der Na⁺ Absorption, Cl⁻ Sekretion und K⁺-Sekretion detektiert werden (Bogdan *et al.* 2008). Die K⁺ Sekretion stellte dabei die dominante Komponente dar, welche die beiden anderen überlagert und in einem Netto-Stromabfall resultierte. Des Weiteren wurde in der Studie von Bogdan *et al.* eine HD-induzierte Freisetzung von ATP aus den Epithelzellen aufgezeigt (Bogdan *et al.* 2008).

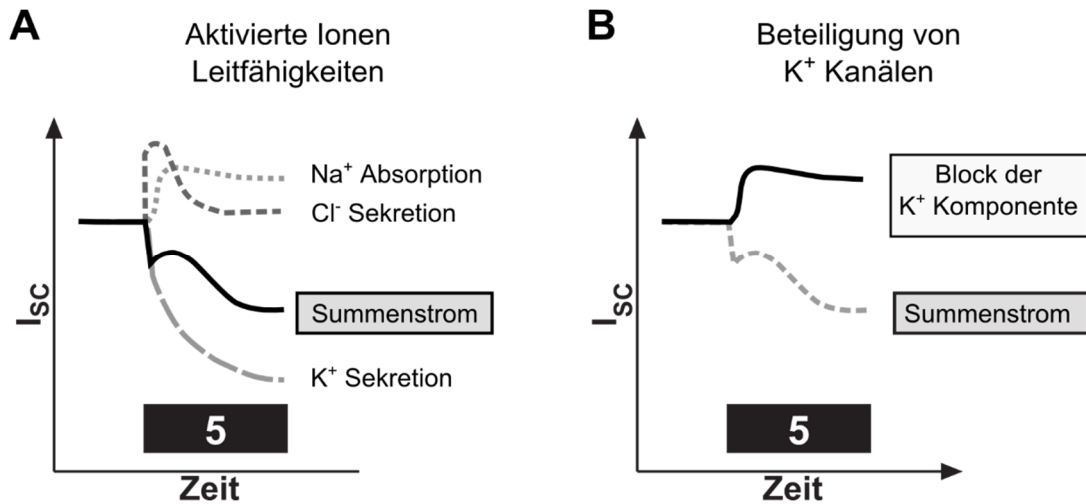


Abb. 6: Schematische Darstellung der veränderten Ionenleitfähigkeiten in Folge von mechanischem Stress (hydrostatischer Druck).

A) In Ussing-Kammer Messungen erfolgte die Aufzeichnung eines Kurzschlussstroms (englisch: *short-circuit current*; I_{SC}). Durch die Applikation von hydrostatischem Druck (HD; 5 cm Flüssigkeitssäule; schwarzer Balken) kam es zu einem Abfall des Summenstroms. Durch den Einsatz verschiedener spezifischer Inhibitoren konnte eine HD-induzierte erhöhte Na^+ Absorption, Cl^- Sekretion und K^+ Sekretion identifiziert werden. Die K^+ Komponente stellte dabei die dominante Komponente dar und induzierte einen Netto-Stromabfall. B) In Folge der Hemmung der K^+ Komponente wurde der I_{SC} in Richtung der Na^+ Absorption und Cl^- Sekretion verschoben, wodurch ein Netto-Stromanstieg sichtbar wurde. Die Abbildung wurde verändert nach Bogdan (2007) und Bogdan *et al.* (2008).

In einer darauffolgenden Studie am Institut für Tierphysiologie konnte nachgewiesen werden, dass die HD-induzierte K^+ -Sekretion im pulmonalen Epithel von *X. laevis* auf einer mechanosensitiven Aktivierung von apikal lokalisierten ATP-sensitiven K^+ -Kanälen (K_{ATP} -Kanälen) beruht (Richter 2010) (für eine ausführliche Beschreibung siehe Diskussion 4.1.1).

Das Hauptaugenmerk in der vorliegenden Arbeit beruhte auf:

1) Charakterisierung der HD-induzierten K_{ATP} Kanal Aktivierung. Dabei stellte sich die Frage, ob die HD-induzierte Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle a) auf einer direkten Mechanosensitivität der Kanäle beruht oder b) K_{ATP} Kanäle möglicherweise indirekt aktiviert werden z.B. über eine HD-induzierte ATP Freisetzung. Das Phänomen der HD-induzierten ATP-Freisetzung wurde bereits von Bogdan *et al.* aufgezeigt (Bogdan *et al.* 2008) und könnte auf einer mechanosensitiven Aktivierung von Connexin- und Pannexin-Hemikanälen beruhen, wie es schon in früheren Studien gezeigt wurde (Shestopalov & Panchin 2008; Knight *et al.* 2009; Sridharan *et al.* 2010). Durch den Einsatz von Connexin- und Pannexin-Hemikanal Inhibitoren sollte in Ussing-Kammer Messungen eine Beteiligung dieser Hemikanäle an den

HD-induzierten Effekten überprüft werden. Während der Ussing-Kammer Messungen wurden zudem Perfusatproben gesammelt, um mittels ATP-Konzentrationsmessungen eine etwaige HD-induzierte ATP-Freisetzung über die Hemikanäle nachzuweisen. 2) In weiteren Ussing-Kammer Experimenten sollte überprüft werden, ob die HD-induzierten Effekte über einen längeren Zeitraum wiederholbar sind und keiner Desensitivierung unterliegen. 3) Desweiteren sollte eine mögliche Beteiligung von basolateralen K^+ Kanälen an den HD-induzierten Effekten untersucht werden. Für diese Untersuchungen fand eine apikale Permeabilisierung des Epithels statt, in Folge dessen Ionentransport-Prozesse über die basolaterale Membran des Epithels isoliert charakterisiert werden konnten.

Charakterisierung des Einfluss von *n*-Alkoholen (Ethanol, 1-Heptanol und 1-Octanol) auf die Aktivität des CFTR

Primäre Alkohole (*n*-Alkohole) wie Ethanol, 1-Heptanol und 1-Octanol sind in der Medizin und Pharmazie als generelle Anästhetika bekannt (Alifimoff *et al.* 1989; Fang *et al.* 1997). Zudem werden *n*-Alkohole als Therapeutikum von Krankheiten wie dem essentiellen Tremor (Haubenberger *et al.* 2014; Nahab *et al.* 2011) und als Lösungsmittel in der Pharmazie (Qi *et al.* 2009), eingesetzt. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus von *n*-Alkoholen, sei es in der Anästhesie (Chau 2010) oder als Therapeutikum (Nahab *et al.* 2011), ist jedoch bis heute nicht geklärt.

Auf Grund der anästhetischen Wirkung der *n*-Alkohole wurden die meisten Untersuchungen bezüglich ihres Wirkmechanismus an erregbaren, neuronalen Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass *n*-Alkohole eine modulierende Wirkung auf die Aktivität von verschiedenen Ionenkanälen (Covarrubias *et al.* 1995; Horishita & Harris 2008) und Rezeptoren (Franks & Lieb 1994; Wood *et al.* 1995; Mihic *et al.* 1997; Komatsu *et al.* 2012) besitzen. Über den Einfluss von *n*-Alkoholen auf nicht-erregbare Zellen, wie Epithelzellen, ist hingegen nur wenig bekannt. Lediglich in einer Studie von Marcet *et al.* konnte an epithelialen Zelllinien eine modulierende Wirkung von *n*-Alkoholen auf die Aktivität des CFTR nachgewiesen werden (Marcet *et al.* 2004).

Wie bereits beschrieben, ist der CFTR im pulmonalen Epithel expremiert und spielt dort eine wichtige Rolle für die Regulation der pulmonalen Flüssigkeits-Homöostase (vgl. Einleitung 1.2). In der vorliegenden Arbeit sollte der Mechanismus der *n*-Alkohol-induzierten Modulation der Aktivität des CFTR erstmals an einem nativen pulmonalen Epithel (*X. laevis*) charakterisiert werden. Des Weiteren wurden die Oocyten von *X. laevis* als

heterologes Expressionssystem für den humanen CFTR (hCFTR) verwendet. Dadurch konnte in elektrophysiologischen *two-electrode voltage-clamp* (TEVC) Messungen die Wirkung von *n*-Alkoholen auch auf den hCFTR isoliert untersucht werden.

Ein Teil der im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse wurde bereits in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht (Richter *et al.* 2014) bzw. befindet sich in Revision (Richter *et al.* (2014 in Revision); vgl. 6. Veröffentlichungen). Diese Ergebnisse wurden jeweils mit einem entsprechendem Verweis markiert (siehe 3. Ergebnisse).

2. Material und Methoden

2.1 Tier- und Gewebepräparationen

Der Krallenfrosch *X. laevis* als Modellorganismus

Der südafrikanische Krallenfrosch *X. laevis* wird unter der Klasse der Amphibien zur Familie der Pipidae gezählt (Hilken *et al.* 1997). Er ist ursprünglich in den Regionen von Südafrika über Zaire und Uganda bis West-Kamerun beheimatet und bevorzugt dabei kältere Bergregionen (Cannatella & De Sá 1993). *X. laevis* ist in schlammigen, trüben Teichen und Seen zu finden und kann während der Trockenzeit in den Schlammschichten überdauern. Namensgebend für den Krallenfrosch sind die schwarzen Krallen an den inneren Phallangen (Cannatella & De Sá 1993).

Seit über 80 Jahren spielt *X. laevis* eine große Rolle als Modellorganismus in diversen Forschungsbereichen der Medizin und Biologie, wie z.B. Zell-Signalweiterleitung, Zell- und Entwicklungsbiologie, Molekularbiologie, Neurophysiologie, Toxikologie und Elektrophysiologie (Khokha 2012). Ende des 19. Jahrhunderts wurde *X. laevis* erstmals von Südafrika nach Europa importiert (Khokha 2012). Anfang des 20. Jahrhunderts wurden weibliche Krallenfrösche vermehrt zur Schwangerschaftsdiagnose verwendet, da das Schwangerschaftshormon hCG (humanes Chorion-Gonadotropin) im Urin von Schwangeren die Eiablage der Krallenfrösche hervorrufen kann (Thoroborg 1952; Cannatella & De Sá 1993; Gurdon & Hopwood 2000; Khokha 2012). Dies hatte zur Folge, dass *X. laevis* vermehrt in Laboren gehalten und gezüchtet wurde. Ein entscheidender Vorteil bei der Etablierung von *X. laevis* zu einem bedeutenden Modellorganismus ist auf die relativ einfache Haltung und Züchtung der Frösche unter Laborbedingungen zurückzuführen.

In der Elektrophysiologie konnte mit *X. laevis* als Modellorganismus in den 1950er und 1960er Jahren durch den dänischen Physiologen Hans Ussing (1911–2000) eine bedeutende Entdeckung gemacht werden. Er spannte die Haut des Krallenfroschs in eine mit Messelektroden versehene Kammer ein. Die Haut diente als Barriere zwischen den beiden Kompartimenten und ermöglichte es somit, direkte Ladungsverschiebungen, die über die Froschhaut flossen, zu messen. Zu Ehren ihres "Erfinders" wird diese Kammer als Ussing-Kammer bezeichnet. Die Ussing-Kammer revolutionierte das Wissen über transepitheliale Ionentransport-Prozesse (Li *et al.* 2004) und ist auch heute noch eine wichtige Messmethode in der Elektrophysiologie. Des Weiteren spielen die Oocyten von *X. laevis* als heterologes

Expressionssystem eine wichtige Rolle bei der Erforschung von Ionenkanälen und Rezeptoren (Hill *et al.* 2005; Khokha 2012).

Für die durchgeführten elektrophysiologischen Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurden ausgewachsene weibliche *X. laevis* Krallenfrösche als Modellorganismus herangezogen. Erworben wurden die Krallenfrösche als Wildfänge von der Firma *Xenopus Express* (Le Bourg, Frankreich). Die Haltung erfolgte in 250-Liter-Kunststoffbecken mit einem Besatz von max. 11 Tieren pro Becken. Zur Wasseraufbereitung verfügten die Becken über einen kontinuierlichen Wasserdurchfluss mit zusätzlicher Sauerstoff-Anreicherung mittels Druckluft. Des Weiteren wurde die Wassertemperatur durch Aquarium-Regelheizer (Eheim Jäger, Deizisau, Deutschland) auf 20°C gehalten und als Rückzugsmöglichkeit den Tieren halbierte Tontöpfe zur Verfügung gestellt. Für die Fütterung der Krallenfrösche wurden einmal wöchentlich kommerzielle Fischfutterpellets (Taubenhaus Lang, Langgöns, Deutschland) zunächst für mindestens 30 min in Wasser eingeweicht und anschließend an die Tiere verfüttert. Zwei Tage nach der Fütterung erfolgte ein kompletter Wasserwechsel der Becken, inklusive gründlicher Säuberung der Beckenwände sowie der Tontöpfe. Das Wohlbefinden der Tiere wurde täglich überprüft und alle Tätigkeiten bezüglich der Tierpflege protokolliert. Die Haltung, Fütterung und Tötung der Tiere wurde vom Regierungspräsidium in Gießen genehmigt (JLU-Nummer 400_M und 478_M) und gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Tötung der Tiere und Präparation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Organe/Gewebe von *X. laevis* benötigt. Zum einen wurden Oocyten für Messungen mit der *two-electrode voltage-clamp* (TEVC) Methode genutzt (siehe 2.3.2). Des Weiteren wurden Ussing-Kammer Experimente mit Lungenpräparaten durchgeführt (siehe 2.3.1). Die Lunge sowie der Pankreas von *X. laevis* wurden außerdem zur RNA Extraktion verwendet (siehe 2.2).

Vor der Tötung wurden die Krallenfrösche zunächst für mindestens 20 min in einen Eimer mit 4 - 8°C kaltem Wasser überführt und abgedunkelt in einem Kühlschrank aufbewahrt. Mit dieser Prozedur sollten die poikilothermen Tiere zunächst langsam herunter gekühlt werden. Anschließend wurden die Tiere für ca. 20 min in einem Eimer mit Eiswasser platziert. Dabei war darauf zu achten, dass sich die Nasenlöcher der Tiere nicht unterhalb der Wasseroberfläche befanden, um die Atmung sicher zu stellen. Mit Hilfe einer Stanze (Eigenbau des Instituts für Tierphysiologie, JLU Gießen) wurde im Anschluss an die

Herabkühlung das Gehirn der Tiere mechanisch zerstört und das Rückenmark mittels einer Knopfsonde sondiert. Direkt nach der Tötung erfolgte die Entnahme der Lungen, des Pankreas und der Ovarien. Da die Haut der Krallenfrösche von einer Schleimschicht bedeckt und mit Bakterien besiedelt ist, wurde zunächst ventral die Haut der Tiere großzügig entfernt. Somit sollten ein möglicher Kontakt mit der Haut und eine damit einhergehende Kontamination der inneren Organe bei der Präparation verhindert werden. Anschließend wurde die unter der Haut liegende Muskelschicht vorsichtig geöffnet und so ein Zugang zur Bauchhöhle geschaffen. Zunächst wurden die Ovarien der Krallenfrösche entnommen und in Kultur Oocyten Ringerlösung (KulORi; siehe Tabelle 3) überführt. Danach wurden die auf der dorsalen Seite befindlichen Lungenflügel vorsichtig mit einer Pinzette am distalen Ende gegriffen, etwaige Verwachsungen mit der Leber durchtrennt und die Lungenflügel mittels eines Schnittes durch den Bronchus frei präpariert. Die entnommenen Lungenflügel wurden in Normal-Ringerlösung (*normal Ringer's solution*; NRS; siehe 2.6, Tabelle 2) überführt, um ein Austrocknen zu verhindern. Wurden die Lungenflügel für die Ussing-Kammer Messungen benötigt, so konnten diese direkt weiter präpariert oder bis zum nächsten Tag bei 4 - 8°C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die für die RNA-Extraktion benötigten Lungenflügel (siehe 2.2) wurden hingegen in einem Cryoröhrchen in flüssigem Stickstoff Schock-gefrosten und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der Pankreas, welcher ebenfalls für die RNA-Extraktion benötigt wurde, befindet sich bei *X. laevis* angelagert an dem Magen (siehe Abb. 7). Mit Hilfe einer feinen Schere und Pinzette wurde der Pankreas vorsichtig frei präpariert und nach dem Schock-frosten in flüssigem Stickstoff wie die Lungenflügel ebenfalls bei -80°C gelagert.

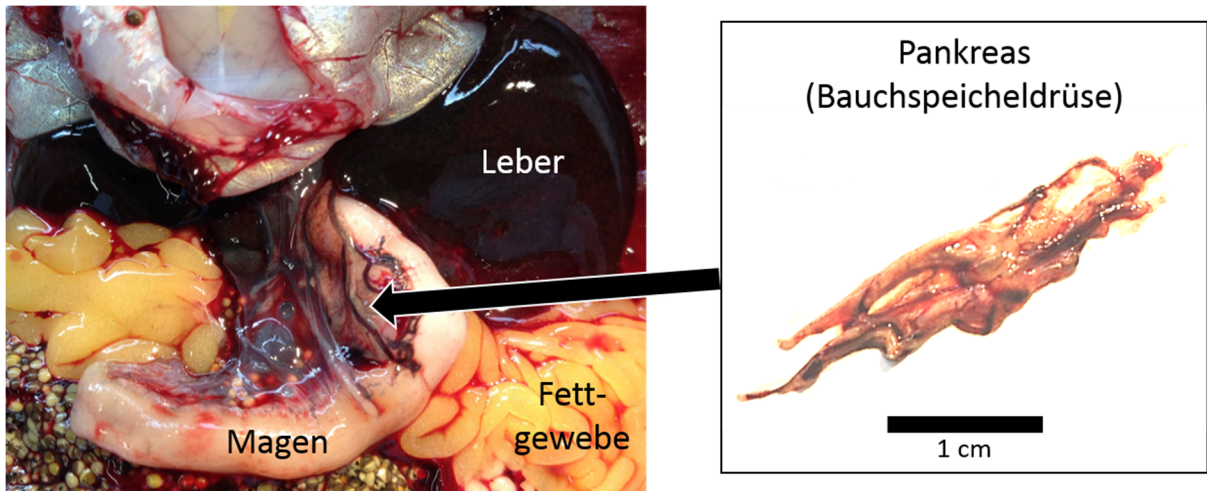


Abb. 7: Der Pankreas von *X. laevis*.

Der Pankreas von *X. laevis* ist ein ca. 2,5 – 3 cm langes Organ mit einer schwammartigen Struktur, welches dem Magen anliegt. In der Vergrößerung (rechte Bildseite) ist ein aus dem Frosch heraus präparierter Pankreas gezeigt.

Präparation der *X. laevis* Lungen

Die entnommenen Lungenflügel (siehe Abb. 8 A) wurden für die weitere Präparation in eine Wachsschale überführt. Dabei wurde das Gewebe ständig mit NRS befeuchtet. Um ein für die Ussing-Kammer Messungen (siehe 2.3.1) geeignetes flächiges Präparat zu erhalten, wurden die Lungenflügel von proximal nach distal vorsichtig mit einer Schere aufgeschnitten. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe von Nadeln aufgespannt und zwei mit Nadelspitzen versehenen Plastikringe (Eigenanfertigung des Instituts) aufgesetzt (siehe Abb. 8 B). Nach dem Durchtrennen des Gewebes zwischen den beiden Plastikringen, konnten die entsprechenden Gegenstücke der Ringe aufgesetzt werden. Diese Ringe waren passgenau auf die später verwendeten Ussing-Kammern abgestimmt (siehe 2.3.1). Pro Lungenflügel konnten somit zwei Präparate gefertigt werden.

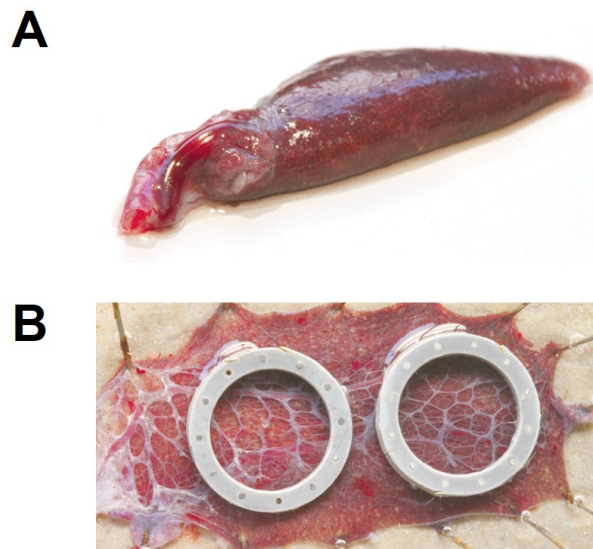


Abb. 8: Präparation der *X. laevis* Lunge.

Der sackförmig aufgebaute Lungenflügel (A) konnte mittels einer Schere geöffnet und durch die Verwendung von Nadeln flächig aufgespannt werden (B). Durch das Aufsetzen spezieller Plastikringe (mit Nadeln versehen) konnten aus einem Lungenflügel zwei geeignete Präparate für Ussing-Kammer Messungen hergestellt werden (Quelle: Institut für Tierphysiologie, JLU Gießen).

Vereinzelnung der *X. laevis* Oocyten

In dieser Arbeit wurden an *X. laevis* Oocyten mittels der TEVC Methode Ganzzellaufleitungen durchgeführt (siehe 2.3.2). Für diese Messungen war es notwendig, die Oocyten aus den entnommenen Ovarien zu vereinzeln. Dazu wurde in einer verschließbaren Petrischale Kollagenase (1,5 mg/ml; Biochem, Karlsruhe, Deutschland) in KulORi gelöst. Teile der Ovarien wurden dann in die Petrischale überführt und mit Hilfe zweier Pinzetten in kleine Stücke zerteilt. Die Inkubation der Ovarien-Stücke in der Kollagenase-Lösung erfolgte anschließend für 90 min auf einem Schüttler (IKA-Vibrax-VXR Janke und Kunkel). Darauf folgte eine 10-minütige Inkubation der Oocyten in einer Ca^{2+} -freien Oocyten Ringerlösung (Ca^{2+} -frei ORi; siehe Tabelle 3), um die Oocyten von der anheftenden Follikelschicht zu befreien. Abschließend wurden die Oocyten mit KulORi gewaschen und unter Zuhilfenahme eines Binokulars aussortiert. Für die elektrophysiologischen Messungen wurden in dieser Arbeit nur Oocyten der Stadien V und VI (Dumont 1972) verwendet, die einen charakteristischen dunklen vegetativen und hellen animalen Pol aufwiesen.

2.2 Molekularbiologischer Nachweis von mRNA in Lungenhomogenaten von *X. laevis* mittels RT-PCR

In dieser Arbeit sollten mittels der Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) Transkripte, welche für verschiedene Ionenkanäle bzw. Ionenkanaluntereinheiten codieren auf mRNA Ebene in der *X. laevis* Lunge nachgewiesen werden. Im Rahmen dessen wurde zunächst eine RNA-Extraktion aus Lungenhomogenaten (von drei verschiedenen Donoren) sowie dem Pankreas (von einem Donor) von *X. laevis* durchgeführt. Die erhaltene RNA wurde anschließend mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, in cDNA umgeschrieben. Durch den Einsatz verschiedener Primer konnten abschließend codierende Bereiche der gesuchten Ionenkanäle mittels PCR amplifiziert und via Agarose-Gelelektrophorese visualisiert werden.

RNA-Extraktion

Um die Gesamt-RNA aus den Geweben zu extrahieren, wurde das *RNeasy Midi Kit* (Quiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die bei -80°C gelagerten Lungenflügel und der Pankreas (siehe 2.1) wurden zunächst unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser fein zerkleinert. Für die Durchführung der RNA-Extraktion wurden von jedem Gewebe ca. 200 mg benötigt. Deshalb wurden von den Lungenflügeln der drei Donore jeweils nur die Hälfte der Organe für die weitere Präparation verwendet, wohingegen der deutlich kleinere Pankreas im Ganzen für die RNA Extraktion eingesetzt wurde. Um das Gewebe weiter mechanisch zu zerkleinern und somit die RNA Ausbeute zu erhöhen, wurden die gemörserten Präparate jeweils in ein 15 ml *Falcontube* überführt, welches 4 ml RLT Puffer (Bestandteil des *RNeasy Midi Kits*, versetzt mit β -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in einem Verhältnis von 10 μl pro ml Puffer) enthält. Mit Hilfe einer sterilen 10 ml Spritze und einer feinen Kanüle (0,8 mM Durchmesser) konnten die Präparate durch mehrmaliges Aufziehen und Ausstoßen weiter mechanisch zerkleinert werden. Die weitere Behandlung der Präparate erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zunächst wurde das erhaltene Zellysat bei 5000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues 15 ml *Falcontube* überführt, wohingegen das Pellet mit den Zelltrümmerresten verworfen wurde. Im nächsten Schritt erfolgte die Fällung der RNA mittels der Zugabe von 4 ml 70%igem, eiskaltem Ethanol (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Die mit dem Ethanol versetzten Proben wurden durch mehrfaches Schütteln gemischt. Zur Extraktion der gefällten RNA wurden die

Proben in zwei Schritten auf die *RNeasy-Midi*-Säule gegeben und für jeweils 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Während die RNA in diesem Schritt an die Säule gebunden wurde, konnte das Permeat jeweils verworfen werden. Dann wurde die Säule mit 2 ml RW1-Puffer und einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm gewaschen, wobei das Permeat erneut verworfen wurde. Um einer etwaigen Kontamination der Proben mit genomischer DNA vorzubeugen, wurde anschließend ein DNase-Verdau mit einem RNase-freien DNase-Set (Qiagen, Hilden) durchgeführt, indem die Säule für 15 min mit RNase-freier DNase I inkubiert wurde. Der DNase-Verdau wurde danach durch Waschen der Säule mit 2 ml RW1-Puffer, sowie zwei weiteren Waschschritten mit jeweils 4 ml RPE-Puffer gestoppt. Um eine Verunreinigung mit Ethanol zu verhindern, wurden die Säulen abschließend noch für 2,5 min und 5 min zentrifugiert. Die an die Membran der Säule gebundene Gesamt-RNA wurde nachfolgend durch die Zugabe von 250 µl RNase-freies Wasser eluiert. Nach einem 3-minütigen Zentrifugationsschritt wurde das Eluat erneut auf die Säule pipettiert, um die RNA-Eluation noch zu erhöhen. Die Konzentration der so gewonnenen RNA-Proben wurde abschließend photometrisch bestimmt (Photometer Modell Pharmacia GeneQuant, Biotech, San Francisco, USA) und die RNA-Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

cDNA Synthese mittels RT-PCR

Die extrahierte Gesamt-RNA wurde mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden zunächst von jeder Probe (RNA aus Lungenhomogenat I, II und III, sowie dem Pankreas) zwei RNA-Ansätze hergestellt, die 1 µg RNA sowie 2 µl Oligo(dt)15-Primer (Promega, Mannheim, Deutschland) enthielten. Die Ansätze wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und bei 70°C für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die RNA-Ansätze sofort auf Eis gestellt, um eine Sekundärfaltung zu verhindern.

Für den cDNA Synthese Ansatz wurde das *ImPro Reverse Transcription System* (Promega) verwendet und folgende Komponenten zusammen pipettiert:

5× M-MLV PCR Puffer (8 µl)

25 mM MgCl₂ (8 µl)

10 mM dNTPs (2 µl)

RNase Inhibitor (1 µl)

Reverse-Transkriptase (1 µl)

Für die benötigten Negativ-Kontrollen wurde anstelle des Enzyms RT die äquivalente Menge RNase-freies Wasser hinzu pipettiert. Anschließend wurden die jeweiligen RNA-Ansätze mit

den cDNA Synthese-Ansätzen zusammengefügt (Endvolumen 40 µl). Die RT-PCR wurde in einem Thermocycler (Modell TProfessional basic gradient, Biometra, Göttingen, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 10 min bei 20 °C, 75 min bei 43 °C und 5 min bei 99 °C. Die cDNA Proben wurden anschließend bei -20°C gelagert.

PCR

Um Transkripte, welche für bestimmte Proteine codieren, in den cDNA Proben detektieren zu können, wurden PCR Experimente mit verschiedenen spezifischen Primern durchgeführt. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 6 (siehe Anhang) aufgelistet und wurden mit Hilfe des Computerprogramms Primer 3 (Untergrasser *et al.* 2012) sowie der Datenbanken *Ensembl* (<http://www.ensembl.org> Version 38) und *Xenbase* (<http://xenbase.org>) erstellt. Da das Genom von *X. laevis* zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig sequenziert ist, wurden die Primer gegen die verfügbaren Gensequenzen von *X. laevis* oder *X. tropicalis* gerichtet (siehe Tabelle 6 und 7 im Anhang). Alle in dieser Arbeit eingesetzten Primer wurden von der Firma *Eurofins MWG Operon* (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Für die Herstellung eines 25 µl PCR-Ansatzes wurden folgende Komponenten in einem PCR-Tube (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) zusammen pipettiert:

- DEPC-H₂O (14,25 µl)
- 5x *GoTaq Flexi Buffer green* (5 µl)
- 2,5 mM dNTPs (0,5 µl)
- 25 mM MgCl₂ (3 µl)
- 10 pM/µl *Primer forward* (0,5 µl)
- 10 pM/µl *Primer reverse* (0,5 µl)
- GoTaq* DNA-Polymerase (0,25 µl)
- cDNA (1 µl)

Die Transkripte wurden mittels PCR in einem Thermocycler (*TProfessional basic gradient*, Biometra; *TProfessional basic*, Analytik Jena AG, Jena Deutschland) nach spezifischen Protokollen hergestellt. Die ausführlichen Protokolle der PCR Bedingungen sind in Tabelle 1 zu finden. Bei jeder PCR wurde jeweils die cDNA von drei verschiedenen Lungendonoren eingesetzt, sowie teilweise als zusätzliche Positiv-Kontrolle die cDNA-Proben des Pankreas.

Tabelle 1: Verwendete Primer und ihre PCR Bedingungen

Primer	<i>Denaturation</i>		<i>Annealing</i>		<i>Elongation</i>		<i>Zyklen</i>
	Temp. (°C)	Zeit (sec)	Temp. (°C)	Zeit (sec)	Temp. (°C)	Zeit (sec)	Anzahl
Kir6.1	95	45	58	30	72	45	30
SUR1	95	45	67	30	72	17	32
Cx30	95	45	58	30	72	45	32
Cx43	95	45	66	30	72	7	32
Panx1	95	45	58	30	72	45	35

Alle PCR Reaktionen hatten einen identischen anfänglichen *Denaturations*-Schritt für 5 min bei 95°C und einen abschließenden *Elongations*-Schritt für 10 min bei 72°C. Die Tabelle wurde verändert nach Richter *et al.* (2014).

Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse der PCR Ergebnisse

Zur Visualisierung der erhaltenen Transkripte wurde im Anschluss an die PCR eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden je 10 µl der PCR Reaktionsansätze auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, welches mit Ethidiumbromid (10µg/ml) oder mit 4,5 µl des DNA Farbstoff Midori Green (NIPPON Genetics, Düren, Deutschland) versetzt war. Zusätzlich zu den Proben wurden in der äußersten linken Tasche des Agarosegels 5 µl eines 100 bp-Markers (GeneDirex, Taoyuan County, Taiwan) aufgetragen. Anschließend wurde das Agarosegel in einer Gelelektrophoresekammer bei einer Spannung von 90 Volt (Spannungsgeber: Power Supply, Modell 1000/500, BioRad, München, Deutschland) für ca. 45 min gefahren. Bei dem verwendeten Laufpuffer handelte es sich um einen TAE-Laufpuffer (Zusammensetzung für 1 L: 4,84 g TRIZMA Base (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,88 ml >97 % Essigsäure (Roth), 2 ml 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,3, eingestellt mit Essigsäure)). Die Betrachtung des Agarosegels erfolgte dann unter einer UV-Lampe (W. Kranich GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland) und die Ergebnisse wurden mit einer Digitalkamera (PC 1225, Canon, Neu-Isenburg, Deutschland) abfotografiert.

Aufreinigung der Transkripte und Sequenzierung

Die in der Agarose-Gelelektrophorese erhaltenen Banden, die den Transkripten der gesuchten Ionenkanäle und deren Untereinheiten entsprachen, wurden ausgeschnitten und für die Sequenzierung mittels des Kits *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurde die DNA-Konzentration der erhalten Proben mit Hilfe eines Photometers (GeneQuant, Pharmacia) bestimmt. Die anschließende Sequenzierung erfolgte durch den Sequenzier-Service der Firma *Eurofins MWG Operon*. Zur Probenaufbereitung diente der durch *Eurofins* auf der Homepage bereit gestellte „SAMPLE SUBMISSION GUIDE“ (<http://www.eurofinsdna.com>). Abhängig von der Größe der detektierten Transkripte, mussten die Proben unterschiedliche cDNA-Endkonzentrationen aufweisen (150 – 300 bp: 2 ng/μl; 300 – 1000 bp: 5 ng/μl). Die entsprechende Menge der Probe wurde mit 0,15 μl des *forward* Primers versetzt und mit DEPC-Wasser auf das Endvolumen von 15 μl eingestellt. Abschließend wurden die Proben nach Herstellerangaben zur Sequenzierung geschickt.

Die von der Firma Eurofins erhaltenen Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe des online-Tools *Nucleotide sequence BLAST analysis* (<http://www.xenbase.org>) auf die Sequenzübereinstimmung überprüft. Abhängig von der Verfügbarkeit der *X. laevis* oder *X. tropicalis* Gensequenzen, erfolgte dann die Erstellung einer Sequenzidentität der detektierten Transkripte in Prozentangabe (siehe Tabelle 7).

2.3 Elektrophysiologische Methoden

2.3.1 Die modifizierte Ussing-Kammer

Die Ussing-Kammer wurde von dem dänischen Naturwissenschaftler Hans Ussing (30.12.1911 - 22.12.2000) entwickelt. Diese elektrophysiologische Messmethode erlaubt es, die durch Ionentransport hervorgerufenen Ladungsverschiebungen über einem Epithel zu detektieren. Epithelien sind polar aufgebaut und verfügen durch den Einbau verschiedener Membranproteine (Ionenkanäle und Rezeptoren) über die Fähigkeit Ionen vektoriell über das Epithel zu transportieren (siehe Einleitung 1.2). Der vektorielle Transport von Ionen bedeutet jedoch auch immer eine Verschiebung von Ladungen (elektrogener Transport), wodurch eine transepitheliale Spannung entsteht (englisch: *open-circuit voltage*). Das Prinzip der Ussing-Kammer beruht darauf, dass diese transepitheliale Spannung durch die Applikation eines entgegengesetzten Stroms kompensiert und somit die Spannung über dem Epithel auf 0 mV

geklemmt werden kann (englisch: *voltage clamp*). Dieser entgegengesetzt wirkende Strom wird als Klemmstrom (englisch: *short-circuit current*; I_{SC}) bezeichnet und stellt einen Netto-Ionenstrom dar. Durch den Einsatz verschiedener spezifischer Inhibitoren von Ionenkanälen ist es jedoch möglich, Änderungen im I_{SC} bestimmten Ionenkanälen zuzuordnen.

In dieser Arbeit wurde eine modifizierte Ussing-Kammer (Eigenbau des Instituts für Tierphysiologie, JLU Gießen) verwendet. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 9 dargestellt. Die Kammer bestand aus zwei Kompartimenten, zwischen die das zuvor präparierte Lungenepithel (siehe 2.1) eingespannt wurde. Zur Abdichtung wurde zusätzlich Silikon (Bayer, Leverkusen, Deutschland) auf alle Flächen, die mit dem Epithel in Berührung kamen, aufgetragen. Durch das eingespannte Epithel entstanden somit ein apikales und ein basolaterales Kompartiment, welche getrennt voneinander über ein gravitationsgetriebenes Perfusionssystem mit verschiedenen Ringerlösungen bzw. Pharmaka perfundiert werden konnten.

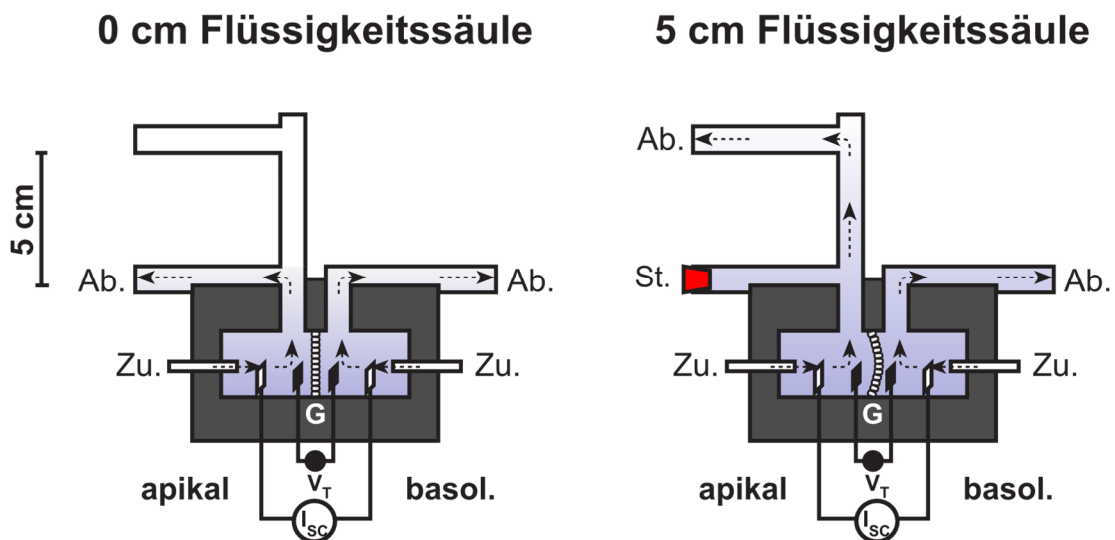


Abb. 9: Die modifizierte Ussing-Kammer.

Das apikale und basolaterale Kompartiment der Ussing-Kammer sind durch das Gewebe (G) getrennt. Die Perfusionslösung der Kompartimente tritt über einen Zulauf (Zu.) ein und läuft über den Abfluss (Ab.) wieder aus den Kompartimenten heraus. Mittels des Schornsteins auf der apikalen Seite kann durch Verstopfen des unteren Abflusses mit einem Stopfen (St.), die Abflusshöhe der Flüssigkeitssäule auf 5 cm erhöht werden. Durch die gewebsnahen Potentialelektroden kann das transepitheliale Potential (V_T) bestimmt werden. Die gewebsfernen Stromelektroden dienen der Messung des Klemmstroms (I_{SC}). Abbildung verändert nach Bogdan *et al.* (2008).

Auf der apikal ausgerichteten Seite der Ussing-Kammer war ein Schornstein angebracht, welcher einen Abfluss der Perfusionslösung aus der Kammer in 0 cm Höhe der Flüssigkeitssäule (Abb. 9; 0 cm Flüssigkeitssäule) erlaubte. Wurde der untere Abfluss jedoch mit einem Gummistopfen verschlossen, so stieg die Flüssigkeitssäule auf 5 cm an, wodurch ein hydrostatischer Druck (HD) auf das Epithel appliziert wurde (Abb. 9; 5 cm Flüssigkeitssäule). Die Abflusshöhe des basolateralen Kompartiments war hingegen nicht variabel auf einer Höhe von 0 cm Flüssigkeitssäule festgelegt.

Zur elektrischen Ableitung wurde die Ussing-Kammer mit vier Elektroden versehen, zwei Potential- und zwei Stromelektroden. Diese bestanden aus handelsüblichen 200 µl Pipettenspitzen, welche mittels einer Plexiglasschablone (Eigenbau des Instituts für Tierphysiologie, JLU Gießen) auf die entsprechende Form zurecht geschnitten wurden. Die zugeschnittenen Pipettenspitzen wurden anschließend mit einer Agarbrücke (1 M KCl Lösung mit 2,5% Agar) versehen (siehe Abb. 10). Der Agar wurde von der Fima Sigma bezogen. Die Agarbrücke wurde mit 1 M KCl Lösung überschichtet, in die ein chlorierter Silberdraht (10 sec bei 5 V in 0,1 M HCl Lösung) eingebracht wurde (siehe Abb. 10). Die Chlorierung des Silberdrahtes bewirkt dabei die Ausbildung einer AgCl_2 Schicht, welche die elektrische Signalübertragung von der 1 M KCl Lösung über den Silberdraht hin zum Messverstärker erlaubt (Sherman-Gold 1993).

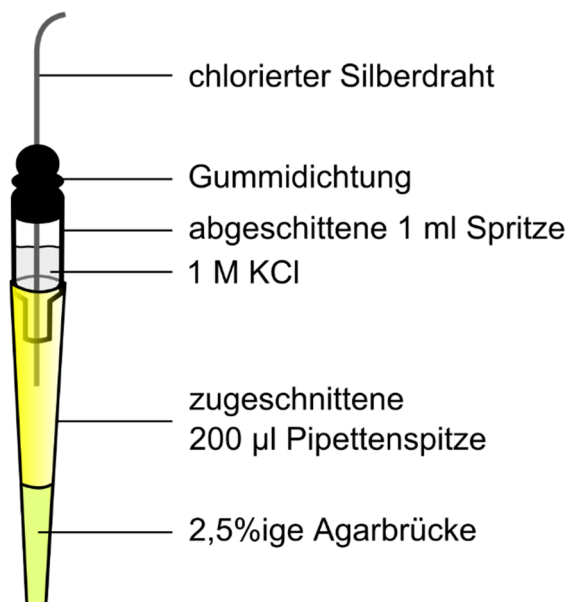


Abb. 10: Die Ussing-Kammer Elektroden.

Aufbau der in Eigenbau gefertigten Ussing-Kammer Elektroden. Für eine detaillierte Beschreibung siehe Text.

Vor den Messungen wurden die Elektrodenpaare mittels eines Voltmeters auf ihr Eigenpotential überprüft, welches 1,0 mV in NRS nicht übersteigen durfte. Über die Potentialelektroden konnte mittels eines *voltage-clamp* Messverstärkers (Modell EC-825cA Epithelial Voltage Clamp, Warner Instruments, Hamden, Connecticut, USA) die über dem Epithel vorliegende Potentialdifferenz (V_T) gemessen werden. Die beiden kürzeren Stromelektroden ermöglichten es den benötigten Klemmstrom auf das Epithel zu applizieren und somit das transepitheliale Potential auf 0 mV zu klemmen.

Sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Ussing-Kammer Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zum Beginn einer jeden Messung wurde das Epithel zunächst mit NRS perfundiert und der V_T Wert nach einer 2-5 minütigen Equilibrierungsphase notiert. Anschließend wurde das Potential mittels des *voltage-clamp* Messverstärkers auf 0 mV geklemmt und der I_{SC} kontinuierlich über einen analogen Schreiber (Phillips, Eindhoven, Deutschland; Kipp und Zonen, Delft, Holland) aufgezeichnet. Zusätzlich wurde der I_{SC} über einen Analog-Digital-Wandler (MacLab Interface, ADInstruments, Spechbach, Deutschland) digitalisiert und auf einem Computer (Macintosh LC II; Apple, Cupertino, USA) mittels der Software *Chart* (ADInstruments) aufgenommen und abgespeichert. Um Rückschlüsse auf den Zustand des Epithels treffen zu können, wurde nach dem Klemmvorgang der transepitheliale Widerstand (R_T) des eingespannten Epithels bestimmt. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe des *voltage-clamp* Messverstärkers 5 mV Spannungsimpulse für 1,5 sec auf das Epithel appliziert.

Anhand der daraus resultierenden Stromdifferenz (ΔI_{Puls}) konnte durch das Ohm'sche Gesetz der Widerstand bestimmt werden:

$$R_T [\Omega] = \frac{U [V]}{\Delta I_{Puls} [\mu A]}$$

Die Bestimmung des R_T erfolgte nicht nur zum Beginn einer jeden Messung, sondern auch immer vor, unter und nach der Applikation von HD bzw. eines Pharmakons.

Das Epithel benötigte eine ca. 3-stündige Equilibrierungszeit, bevor sich der I_{SC} auf einen stabilen Plateau-Wert einstellte. Dann konnte mit den eigentlichen Experimenten begonnen werden. Zur Charakterisierung der HD-induzierten Effekte auf den I_{SC} wurde in den Experimenten zunächst immer HD unter Kontrollbedingungen (NRS ohne Pharmakon bzw. in Anwesenheit des entsprechenden Lösungsmittels, siehe Tabelle 4) durchgeführt. Danach konnte das Epithel mit verschiedenen Pharmaka inkubiert (apikal und/oder basolateral)

werden. Anschließend erfolgte eine erneute Bestimmung der HD-induzierten Effekte in Anwesenheit der Pharmaka. Des Weiteren wurden der "Kontrolldruckeffekt" und der Druckeffekt in Anwesenheit verschiedener Pharmaka parallel an zwei unterschiedlichen Epithelpräparaten durchgeführt. Eine Ausnahme zu diesem beschriebenen Messablauf stellten die Experimente dar, in denen das Epithel apikal permeabilisiert wurde. Der Permeabilisierungsvorgang konnte direkt nach dem Klemmen des V_T auf 0 mV begonnen werden, ohne dass eine anfängliche Equilibrierungsphase des I_{SC} abgewartet werden musste. Bei dem Permeabilisierungsvorgang wurde das Epithel direkt nach dem Klemmen mit einer Hoch K^+ Lösung perfundiert (siehe Material und Methoden 2.6, Tabelle 2), um einen K^+ Gradienten (apikal \rightarrow basolateral) über dem Epithel zu generieren. In dieser Zeit konnte sich das Epithel an die gegebenen Bedingungen equilibrieren und einen stabilen I_{SC} bilden.

In den Ussing-Kammer Messungen wurde ein Netto-Ionenstrom (I_{SC}) gemessen, welcher sich aus verschiedenen Komponenten zusammensetzt. Ein Netto-Transport von Kationen von der apikalen zur basolateralen Seite (z.B. Na^+ Resorption), bzw. ein Netto-Transport von Anionen von basolateral nach apikal (Cl^- Sekretion) wurde in den Abbildungen als ein Anstieg des I_{SC} nach oben dargestellt. Eine entgegengesetzte Ionenverschiebung wurde dementsprechend als ein Abfall des I_{SC} abgebildet.

2.3.2 Die *two-electrode voltage-clamp* (TEVC) Methode

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels der TEVC Methode Ganzzelleableitungen an Oocyten von *X. laevis* durchgeführt. Dabei fanden zum einen Messungen mit nativen Oocyten, welche Connexin-Hemikanäle besitzen (Boer & van der Heyden 2005), statt. Zum anderen wurden die Oocyten als heterologes Expressionssystem für den humanen CFTR (hCFTR) und den humanen $\alpha\beta\gamma$ ENaC (hENaC) verwendet. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Injektion der cRNA

Um die Oocyten als heterologes Expressionssystem nutzen zu können, wurde in die zuvor vereinzelt Oocyten (siehe 2.1) cRNA des hCFTRs bzw. hENaCs injiziert. Die hCFTR Plasmid-DNA wurde dem Institut für Tierphysiologie (JLU Gießen) durch Prof. Dr. B. Schwappach (Georg-August-Universität, Göttingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. In einer Forschungsarbeit am Institut für Tierphysiologie (JLU Gießen) wurde anhand der

Plasmid-DNA mittels *in vitro* Transkription die RNA des hCFTR synthetisiert (Vitzthum 2011), welche somit für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stand. Die RNA des hENaC wurde bereits in einer früheren Forschungsarbeit am Institut für Tierphysiologie (JLU Gießen) aus einer adulten humanen Lunge kloniert (Fronius *et al.* 2010) und stand somit ebenfalls zur Verfügung.

Die RNA (hCFTR, hENaC) lagerte bei -80°C und wurde direkt vor der Injektion aufgetaut. Für die Injektion wurde ein Mikroinjektor (Drummond Scientific, Philadelphia, USA) verwendet auf dem eine Borosilikat-Kapillare (Hilgenberg) aufgesteckt wurde. Die Kapillaren wurden mit einem DMZ-Universal-Puller (Zeitz Instruments, Martinsried, Deutschland) ausgezogen. Vor dem Aufstecken wurde die Kapillare mit Mineralöl luftblasenfrei gefüllt. Nach der Säuberung des Injektors und des Arbeitsplatzes mit 70%igem Ethanol, konnte die Kapillare dann auf den Injektor aufgesteckt werden. Unter einem Binokular wurde überprüft, ob die Kapillarenspitze offen war. War dies nicht der Fall, so wurde mittels einer zuvor ebenfalls mit 70%igem Ethanol gereinigten Pinzette die Spitze vorsichtig vorne abgebrochen. Anschließend wurde die Kapillare für mindestens 10 min in Mineralöl eingetaucht, um einen Druckausgleich zu erzeugen. Während dessen konnten die Oocyten auf einem Injektionsschlitten (Eigenbau des Instituts für Tierphysiologie, JLU Gießen) platziert werden. Dieser befand sich in einer mit KulORi (hCFTR) bzw. NMDG-KulORi (hENaC) gefüllten Petrischale. Die aufgetaute RNA (1 μl ; hCFTR, hENaC) wurde auf eine mit Parafilm (Roth) bespannte Petrischale pipettiert und unter dem Binokular mittels des Injektors in die Kapillare aufgezogen. Anschließend konnten die Oocyten mit der Kapillare vorsichtig angestochen und mit Hilfe des Injektors die RNA injiziert werden.

Das Injektionsvolumen der hCFTR RNA betrug 50,6 nl und entsprach einer RNA Konzentration von 50 ng pro Oocyte. Die hENaC RNA wurde in einem Volumen von 23 nl pro Oocyte injiziert. Dies entsprach einer Konzentration von 9,2 ng RNA pro Zelle. Zur Kontrolle wurden parallel zur Injektion der hCFTR bzw. hENaC RNA nach demselben Prinzip Oocyten mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) Wasser injiziert. Dabei wurde das DEPC Wasser Volumen entsprechend angepasst (DEPC Kontrolle: hCFTR = 50,6 nl; hENaC = 23 nl). Die injizierten Oocyten wurden anschließend in einer 24-well Platte bei 17°C in einem Brutschrank gelagert. Dabei erfolgte die Lagerung der hCFTR injizierten Oocyten in KulORi. Die hENaC Oocyten wurden hingegen in NMDG-KulORi gelagert. Die TEVC Messungen des hCFTRs erfolgten nach einer Expressionszeit von 40 – 70 h. Der hENaC konnte bereits nach einer Expressionszeit von 24 h gemessen werden.

Experimenteller Aufbau und Messablauf

Die TEVC Methode erlaubt es, das Membranpotential (V_M) einer Zelle auf einen bestimmten Wert zu klemmen (Klemmpotential V_C). Zur Messung des Membranpotentials wird zunächst eine Potentialelektrode in die Zelle eingestochen. Im Zusammenspiel mit einer in der Umgebungslösung befindlichen Badelektrode, kann so mit Hilfe eines *voltage-clamp* Messverstärkers das V_M gemessen werden (siehe Abb. 11). Zusätzlich wird eine sogenannte Stromelektrode in die Zelle eingestochen. Über diese Stromelektrode kann dann ein dem Membranpotential entgegengesetzter Ausgleichsstrom auf die Zelle appliziert und so das Membranpotential auf einen bestimmten Wert geklemmt werden. Änderungen der transmembranen Ionentransportprozesse werden somit in Form eines Transmembranstroms (I_M) detektiert.

Der in dieser Arbeit verwendete TEVC Messaufbau ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt. Die Oocyten wurden in einer Messkammer (MK; Eigenbau des Instituts für Tierphysiologie, JLU Gießen) platziert. Die MK verfügte über einen Zulauf über welchen gravitationsgetrieben ORi (vgl. Material und Methoden 2.6, Tabelle 3) in die Messkammer perfundiert werden konnte. Die Perfusionslösung wurde dann in einer gegenüberliegenden Ablaufkammer (AK) aufgefangen und über einen Ablauf, welcher mit einer Saugfalsche verbunden war, abgesaugt. Das Sammeln der Perfusionslösung in der AK sollte etwaigen Flüssigkeitsschwankungen der Perfusionslösung in der MK vorbeugen. Mittels des Perfusionssystems konnten die in ORi gelösten Pharmaka somit auf die Oocyte appliziert und wieder ausgewaschen werden.

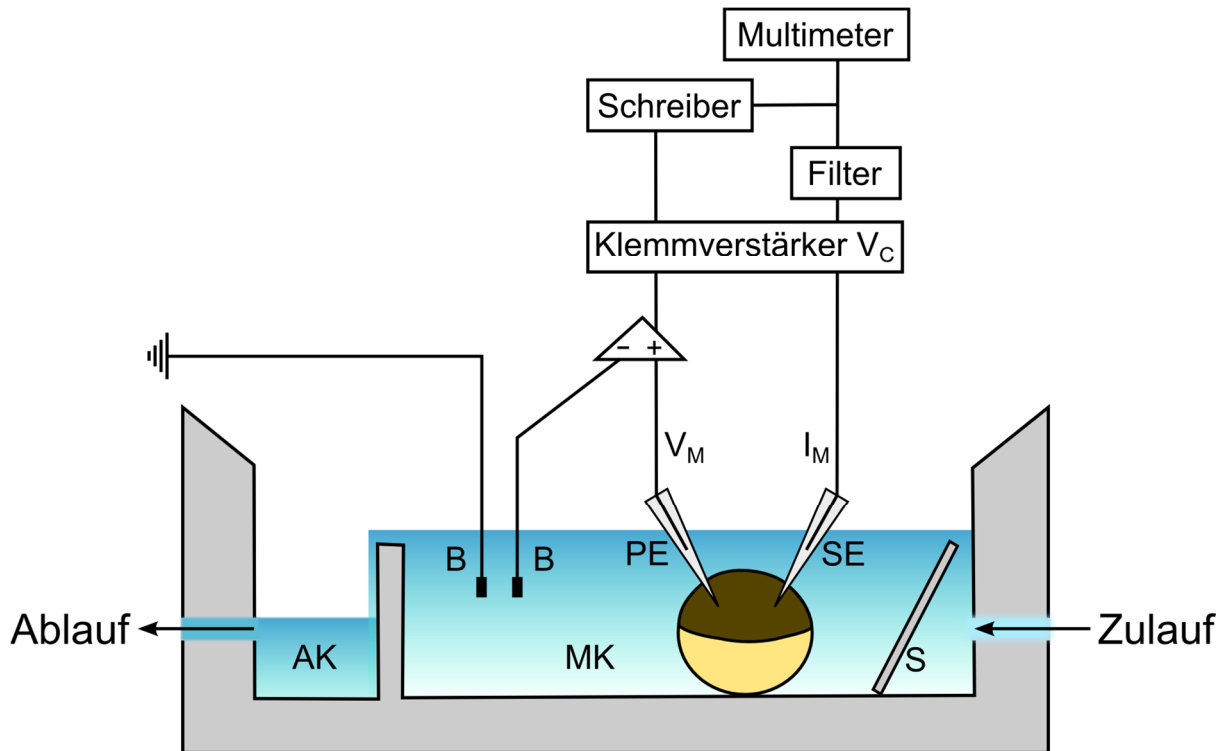


Abb. 11: Messaufbau der *two-electrode voltage-clamp* (TEVC) Messungen.

AK: Ablaufkammer; B: Badelektrode; IM: Transmembranstrom; MK: Messkammer; PE: Potentialelektrode; S: Schild; SE: Stromelektrode; VC: Klemmpotential; VM: Membranpotential.

Die Strom- und Potentialelektroden bestanden aus ausgezogenen Borosilikat-Kapillaren, welche mit 1 M KCl Lösung luftblasenfrei zu dreiviertel befüllt wurden. Anschließend wurden die Kapillaren auf einen chlorierten Silberdraht (bei 1 V für 10 sec in 0,1 M HCl) in eine Plexiglashalterung gesteckt und fixiert (siehe Abb. 12). Die auf diese Weise hergestellten Elektroden wurden dann auf Mikromanipulatoren aufgesetzt, wodurch sie mit einem *voltage-clamp* Messverstärker (*Oocyte Clamp OC-725B*, Warner Instruments) verbunden wurden. Die gemessenen elektrischen Signale wurden zusätzlich noch über einen Filter geleitet, um die Rauschamplitude der Messungen zu reduzieren.

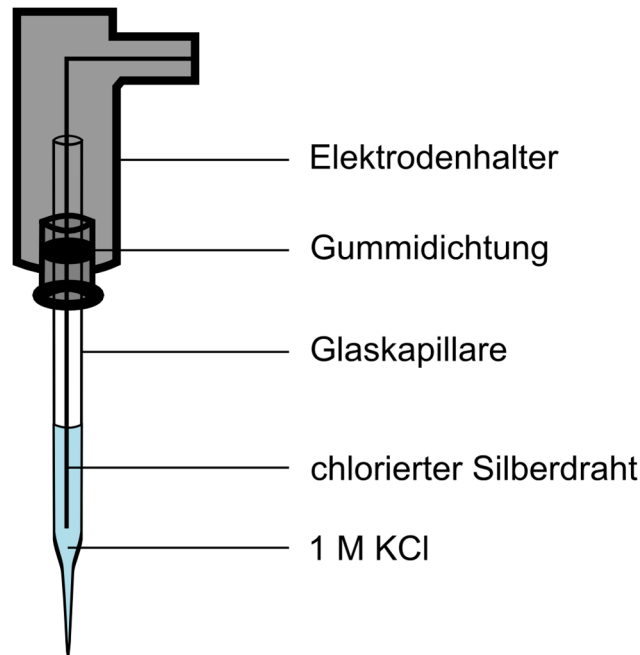


Abb. 12: Schematische Darstellung einer Messelektrode für *two-electrode voltage-clamp* (TEVC) Messungen.

Vor dem Beginn der Messungen wurden die Spitzen der beiden Elektroden mit Hilfe der Mikromanipulatoren in die Umgebungslösung gefahren. Über den *voltage-clamp* Messverstärker wurde dann zunächst das Eigenpotential der Elektroden auf 0 mV abgeglichen. Dann konnten die Elektroden vorsichtig in die Oocyte eingestochen werden. Nach einer Equilibrierungsphase von ca. 5 min konnte am *voltage-clamp* Messverstärker der V_M Wert der Oocyte abgelesen werden. Anschließend wurde mit Hilfe des *voltage-clamp* Messverstärker das Membranpotential auf -60 mV geklemmt. Dieses Membranpotential wurde für die TEVC Messungen in dieser Arbeit gewählt, da es dem Membranpotential der nativen Oocyten entspricht. Der I_M wurde kontinuierlich mit einem Schreiber (Kipp und Zonen, Delft, Holland) aufgezeichnet. Zudem wurden die Stromwerte mittels eines Amperemeters gemessen und protokolliert.

Zu Beginn der Messungen wurde unter der Perfusion von ORi zunächst so lange gewartet, bis sich der I_M auf einen stabilen Wert eingestellt hatte. Dann konnte mit den eigentlichen Experimenten begonnen werden (siehe 3.2.5).

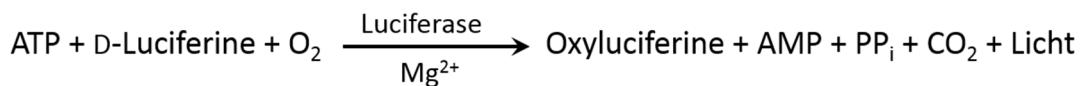
In den TEVC Messungen wurde ein transmembraner Netto-Ionenstrom (I_M) gemessen. Ein erhöhter Einwärtsstrom von positiver Ladung (z.B. Na^+ Ionen) in die Oocyte hinein bzw. von negativer Ladung (z.B. Cl^- Ionen) aus der Oocyte heraus, erhält ein negatives Vorzeichen und wurde in den Abbildungen immer als ein Abfall des I_M nach unten dargestellt.

2.4 ATP-Konzentration Messungen

In dieser Arbeit wurden während der Ussing-Kammer Messungen (siehe 2.3.1) Proben der Perfusionslösungen gesammelt und mittels eines Lumineszenz Assays die ATP-Konzentration bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 3 Tropfen (ca. 250 µl) der aus dem apikalen Kompartiment austretenden Perfusionslösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen und sofort auf Eis gestellt. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

Die Lumineszenz-Messungen wurden im Institut für Phytopathologie (JLU Gießen) an einem Mikroplattenlesegerät (*Infinite 200 microplate reader*; Tecan, Mainz, Deutschland) durchgeführt. Mit Hilfe der Software *Tecan i-control* (Version 1.6.19.2; Tecan) war es möglich das Mikroplattenlesegerät so zu programmieren, dass die Proben sowohl für eine bestimmte Zeit geschüttelt (6 mm orbitale Amplitude) als auch im Dunklen inkubiert werden konnten. Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt.

Zur Bestimmung der ATP-Konzentration wurden das *ATPlite™ Luminescence Assay System* (Perkin Elmer, Boston, Massachusetts, USA) verwendet. Das Prinzip dieser Lumineszenz-Reaktion beruht darauf, dass ATP in Anwesenheit des Substrates D-Luciferine durch das Enzym Luciferase unter Lichtfreisetzung in AMP und Oxyluciferine umgesetzt wird:



Die Proben wurden nach Angaben des Herstellers aufbereitet. In einer 96-well Platte (*96 flat-bottom black polystyrol*; Greiner, Frickenhausen, Deutschland) wurde zunächst 100 µl der Perfusionslösung mit 50 µl des Zell-Lyse Puffers versetzt und das Gemisch für 3 min geschüttelt. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl Substratlösung (enthält das Enzym Luciferase). Nach einem darauf folgenden 3 minütigen Schüttelvorgang wurden die 96-well Platten für 10 min in Ruhe im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Lichtemission automatisch durch das Mikroplattenlesegerät gemessen. Die gemessenen Lichtemissions-Werte wurden in Form einer Excel-Tabelle (Microsoft) durch die Software *Tecan i-control digital* dargestellt.

Parallel zu den Messungen der Perfusionslösungs-Proben aus den Ussing-Kammer Experimenten, wurde die Lumineszenz von ATP-Standard Proben gemessen. Somit konnte eine Eichkurve für die ATP-Messungen erstellt und die ATP-Konzentration im Anschluss quantifiziert werden. Das ATP war im *ATPlite™ Luminescence Assay System* enthalten. Es

wurde nach Angaben des Herstellers eine ATP-Verdünnungsreihe hergestellt: 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM, 10 pM, 1 pM. Für die Lumineszenzmessungen wurden zunächst 100 μ l frische NRS mit 100 μ l Zell-Lysepuffer in der 96-well Platte vermischt und für 3 min geschüttelt. Anschließend wurden 10 μ l der ATP-Verdünnungsreihe hinzu gegeben und die Platte erneut für 3 min geschüttelt. Es folgte die Zugabe von 50 μ l Substratlösung, ein erneutes Schütteln für 3 min, sowie die Inkubation im Dunkeln für 10 min. Dann wurde die Lumineszenz mit Hilfe des Mikroplattenmessgeräts detektiert. Die Eichkurve wurde in Form einer doppelt logarithmischen Darstellung erstellt. Es zeigte sich eine lineare Abhängigkeit ($R^2 = 1,0$) zwischen den gemessenen Lichtemissionswerten und der ATP-Konzentration in einem Bereich von 1 nM – 1 μ M ATP. Alle Werte, die sich unterhalb dieser Konzentration befanden, wurden nicht in die Bestimmung der linearen Regression mit einbezogen.

2.5 Statistik und Datenverarbeitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Werte als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*; SEM) angegeben. In den Ussing-Kammer Experimenten wurden immer Lungenpräparate von mindestens zwei verschiedenen Fröschen verwendet (die Anzahl der Präparate ist angegeben mit “n”). Für die statistische Analyse wurden zum einen die erhobenen Messwerte des I_{sc} (μ A/cm²) herangezogen. Um die durch Applikation von HD induzierten Änderungen im I_{sc} besser vergleichen zu können, wurden die Werte unter HD-Applikation ($I_{5\text{ cm}}$) auf die Werte vor HD-Applikation ($I_{0\text{ cm}}$) normalisiert ($I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}}$). Die in den TEVC Messungen erhaltenen I_M Werte (μ A) wurden als Delta-Werte (ΔI) angegeben. In allen durchgeführten TEVC Messreihen wurden Oocyten von mindestens zwei verschiedenen Fröschen verwendet und die entsprechende Anzahl der Oocyten mit “n“ gekennzeichnet.

In den ATP-Konzentrationsmessungen wurden etwaige Änderungen der extrazellulären ATP Konzentrationen als Änderungen der Lichtemission (relative Units) angegeben. Dabei wurden die Werte der Proben die unter Applikation von HD (5 cm Flüssigkeitssäule) gesammelt wurden, mit denen vor HD-Applikation statistisch verglichen.

Für die Signifikanzanalysen wurde der t-Test nach Student verwendet. Dabei wurden die Messwerte, welche vor und nach Applikation eines Pharmakons und/oder HD aufgenommen wurden, mittels des gepaarten t-Tests verglichen. Der statistische Vergleich von Messwerten aus unterschiedlichen Lungenpräparationen erfolgte hingegen mittels des ungepaarten t-Tests

und wurde jeweils in der Abbildungsunterschrift gekennzeichnet. Das Signifikanzniveau lag bei $P < 0,05$ und wurde in den Abbildungen mit “**” gekennzeichnet. P-Werte mit $P < 0,01$ wurden hingegen mit “***” markiert.

Für die Datenverarbeitung standen die Programme Excel 2007 und Word 2007 (Microsoft) zur Verfügung. Die Grafikbearbeitung der Stromspuren und Balkendiagramme erfolgte mit dem Programm Inkscape (Version 0.48). Zur Bearbeitung der Agarose-Gelelektrophorese-Bilder wurde das Programm GIMP2 (Version 2.6.9) verwendet.

2.6 Verwendete Lösungen und Chemikalien

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für die Ussing-Kammer Experimente mit den Lungen-Präparaten von *X. laevis* (in mM).

Substanz	NRS	Hoch-K ⁺
NaCl	100	3
KCl	3	100
CaCl ₂	1	1
MgCl ₂	1	1
HEPES	5	5
Glucose	10	10

NRS: *normal Ringer's solution* (Normal-Ringerlösung); Hoch-K⁺: Hoch-K⁺-Ringerlösung; Alle Lösungen wurden mittels TRIZMA Base (Merck) bzw. HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Mit Ausnahme von HEPES (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) wurden die in der Tabelle aufgeführten Substanzen von der Firma Fluka (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen zur Präparation und Kultivierung der Oocyten sowie für die Durchführung der TEVC Messungen (in mM).

Substanz	ORi	KulORi	NMDG-KulORi	Ca²⁺-frei ORi
NaCl	90	90	10	90
KCl	1	1	1	1
CaCl₂	2	2	2	-
MgCl₂	-	-	-	1
HEPES	5	5	5	5
Na⁺-Pyruvat	-	2,5	2,5	-
Penicillin G	-	0,02 g/l	0,02 g/l	-
Streptomycinsulfat	-	0,025 g/l	0,025 g/l	-
NMDG	-	-	80	-
EGTA	-	-	-	1

ORi: Oocyten-Ringerlösung; KulORi: Kultur-Oocyten-Ringerlösung; Alle Lösungen wurden mittels NaOH bzw. HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die Chlorid-Konzentration und Osmolarität der NMDG-haltigen Lösungen ergab sich durch Einstellen des pH-Werts mit HCl. Alle in der Tabelle aufgeführten Substanzen wurden von der Firma Fluka (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Ausnahmen bilden dabei HEPES, Streptomycinsulfat und EGTA, welche von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen wurden, sowie Na⁺-Pyruvat (Appllichem, Darmstadt, Deutschland).

Tabelle 4: In den elektrophysiologischen Messungen verwendete Pharmaka, sowie Angaben über verwendete Lösungsmittel und in den Experimenten eingesetzte Applikationskonzentrationen.

Substanz	Stammlösung (in mM)	Lösungsmittel	Applikations- konzentration (mM)
Amilorid	10	ddH ₂ O	0,01
Barium (BaCl₂)	-	-	10*
CFTR_{Inh}-172	20	DMSO	0,02 und 0,005
DIDS	500	DMSO	0,5
Ethanol	-	-	1 bis 1000*
Glibenclamid	100	DMSO	0,1 und 0,75
1-Heptanol	-	-	1*
HMR1098	30	ddH ₂ O	0,06
Lidocaine	-	-	1*
Mannitol	-	-	30*
MDL-12330A	20	DMSO	0,25 und 0,05
Meclofenamin-Säure	100	ddH ₂ O	0,1
NPPB	100	DMSO	0,1
Nystatin	75	DMSO	0,075
1-Octanol	-	-	1*
Probenecid	1000	DMSO	1
XE991	100	DMSO	0,1
Tetrapentyl- ammoniumchlorid	100	ddH ₂ O	0,1

ddH₂O: doppelt destilliertes Wasser; DMSO: Dimethylsulfoxid; * Die Chemikalien wurden direkt in NRS (*normal Ringer's solution*) eingewogen und gelöst. Die Bezugsquellen der Substanzen sind im Anhang in Tabelle 8 angegeben.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf zwei Schwerpunkten (vgl. Einleitung 1.6). Zum einen sollten die durch mechanische Kräfte (hydrostatischer Druck) induzierten Veränderungen des transepithelialen Ionentransportes im pulmonalen Epithel von *X. laevis* charakterisiert werden (siehe Ergebnisse 3.1). Der zweite Fokus lag auf der Charakterisierung des zugrundeliegenden Mechanismus der *n*-Alkohol-induzierten Aktivierung des CFTR (siehe Ergebnisse 3.2).

3.1 Charakterisierung der Wirkung von mechanischen Kräften auf die transepithelialen Ionentransport-Prozesse im pulmonalen Epithel von *X. laevis*

In einer früheren Studie am Institut für Tierphysiologie (JLU Gießen) konnte eine HD-induzierte Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen durch die Applikation von HD (5 cm Flüssigkeitssäule, apikale Seite) nachgewiesen werden (Richter 2010) (vgl. Einleitung 1.6). Basierend auf diesen bisherigen Erkenntnissen sollten in der vorliegenden Arbeit verschiedene Aspekte des HD-induzierten Effekts charakterisiert werden:

- a) sind K_{ATP} -Kanäle direkt mechanosensitiv oder werden sie indirekt aktiviert z.B. durch eine HD-induzierte ATP-Freisetzung über Pannexin- und Connexin-Hemikanäle (siehe Ergebnisse 3.1.1)?
- b) ist der HD-induzierte Effekt auch über einen längeren Zeitraum wiederholbar oder kommt es zu einer Desensitivierung (siehe Ergebnisse 3.1.2)?
- c) sind basolateral lokalisierte K^+ Kanäle an dem HD-induzierten Effekt beteiligt (Ergebnisse 3.1.3)?

3.1.1 Charakterisierung der HD-induzierten K_{ATP} Kanal Aktivierung – Beteiligung von Pannexin- und Connexin Hemikanälen

Zunächst sollten in molekularbiologischen Untersuchungen mögliche codierende Transkripte von Untereinheiten des K_{ATP} -Kanals sowie der Pannexin- und Connexin-Hemikanäle in Lungenhomogenaten von *X. laevis* auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Ergebnisse 3.1.1.1). Anschließend wurden unter Verwendung einer modifizierten Ussing-Kammer elektrophysiologische Messungen am pulmonalen Epithel von *X. laevis* durchgeführt. Dabei

galt es eine mögliche Beteiligung von Pannexin- und Connexin-Hemikanälen an dem HD-induzierten Effekt zu überprüfen (siehe Ergebnisse 3.1.2). Parallel dazu wurden ATP-Konzentrationsmessungen durchgeführt (siehe Ergebnisse 3.1.3), welche zur Untersuchung einer möglichen HD-induzierten ATP-Freisetzung dienen.

3.1.1.1 Molekularbiologischer Nachweis von codierenden Transkripten des K_{ATP} Kanals und der Hemikanäle

In dieser Arbeit wurde RNA aus Lungenhomogenaten von *X. laevis* extrahiert (siehe Material und Methoden 2.2). Mittels der molekularbiologischen Methode der RT-PCR und durch den Einsatz spezifischer Primer-Paare (siehe Anhang Tabelle 6) sollten etwaige codierende Transkripte der K_{ATP} -Kanal Untereinheiten sowie für Connexin- und Pannexin-Hemikanäle auf mRNA Ebene nachgewiesen werden.

3.1.1.1.1 K_{ATP} Kanal Untereinheiten

K_{ATP} -Kanäle sind heteromere Proteinkomplexe, die aus vier Kir6.x und vier SURx Untereinheiten bestehen (Leroy *et al.* 2004; Burke *et al.* 2008). Es existieren zwei Isoformen der Kir6x Untereinheit, die als Kir6.1 und Kir6.2 bezeichnet werden (Burke *et al.* 2008). Die SURx Untereinheit kann ebenfalls in zwei verschiedenen Isoformen auftreten, SUR1 und SUR2 (Burke *et al.* 2008).

Bisher konnten K_{ATP} Kanäle im pulmonalen Epithel von *X. laevis* lediglich pharmakologisch aufgezeigt werden (Richter 2010). In dieser Arbeit konnten in RT-PCR Experimenten mit RNA Proben von *X. laevis* Lungenhomogenaten (drei verschiedene Donore) Transkripte der Kir6.1 und SUR1 Untereinheit erstmals auf mRNA Ebene detektiert werden (siehe Abb. 13 A und C). Die Banden wurden anschließend aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 2.2). Anhand der Sequenzierung der aufgereinigten Transkripte konnte anschließend der Nachweis von Kir6.1 und SUR1 in den Lungenhomogenaten bestätigt werden (Sequenzierungsergebnisse siehe im Anhang Tabelle 7). Im Gegensatz dazu wurden codierende Transkripte von Kir6.2 nur in der Probe des Pankreas (RNA aus einem Donor extrahiert) gefunden (Abb. 13 B). Der Pankreas diene als positiv Kontrolle, da das Vorkommen der Kir6.2 und SUR1 Untereinheiten der K_{ATP} -Kanäle bereits bei Säugetieren in diesem Organ nachgewiesen wurden (Burke *et al.* 2008). Die Kir6.2 Untereinheit scheint nicht in dem pulmonalen Epithel von *X. laevis* vorzukommen, da eine spezifische Bande

lediglich in der Pankreas-Probe detektiert wurde. Eine Sequenzierung der Bande erfolgte in dieser Arbeit jedoch nicht und müsste für eine endgültige Bestätigung nachgeholt werden. In RT-PCR Experimenten mit Primern der SUR2 Untereinheit wurden hingegen keine der erwarteten Banden detektiert (Abb. 13 D). Demnach scheinen die hier verwendeten Primer nicht spezifisch für die gesuchten Transkripte gewesen zu sein.

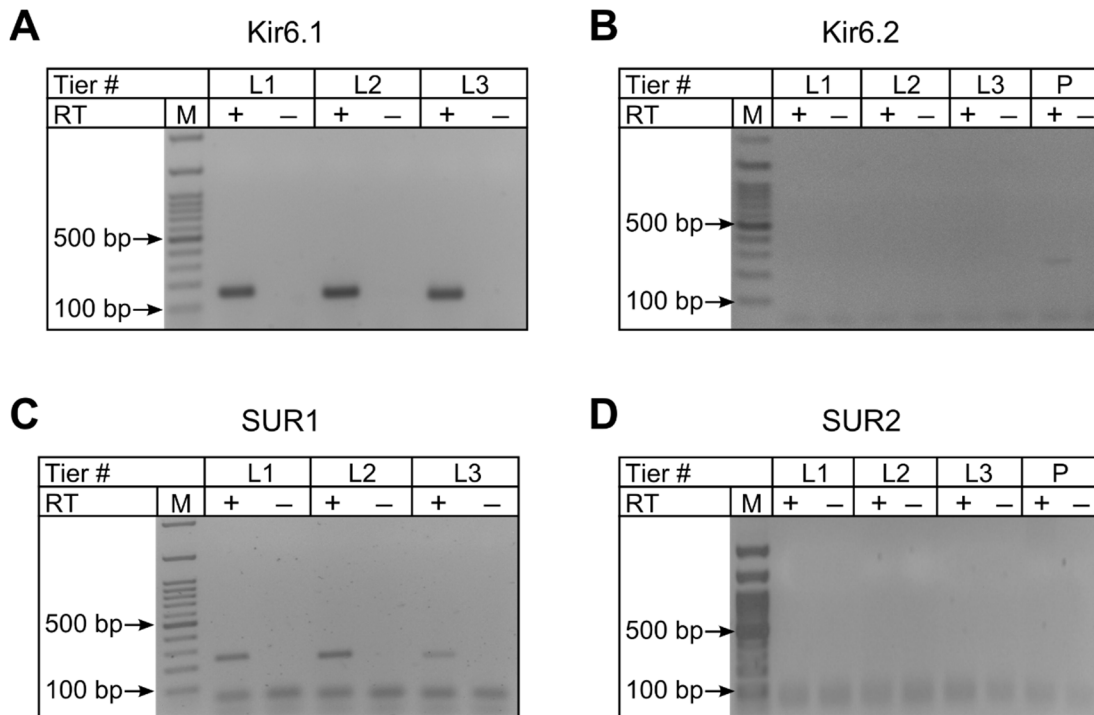


Abb. 13: Reverse-Transkriptase (RT)-PCR Experimente zum Nachweis von K_{ATP} -Kanal Untereinheiten auf mRNA Ebene.

Für die RT-PCR Experimente standen drei RNA Extrakte aus Lungenhomogenaten (L#) von drei verschiedenen *X. laevis* Donoren (Tier 1-3), sowie ein RNA Extrakt aus dem Pankreas (1 Donor), zur Verfügung (M: Marker der Bandengröße; +: mit RT Enzym; -: ohne RT Enzym). A) Transkripte, welche für Kir6.1 codieren (erwartete Bandengröße: 162 *base pairs* (bp)) konnten in allen drei Lungenhomogenat-Proben (L1 - L3) detektiert werden. B) Eine für Kir6.2 Transkripte spezifische Bande (erwartete Bandengröße: 247 bp) konnte sehr schwach in der Pankreas-Probe (P) gefunden werden. C) Transkripte der SUR1 Untereinheit (erwartete Bandengröße: 250 bp) wurden in den RNA-Extrakten aller Lungenhomogenate (L1 - L3) nachgewiesen. D) Für die SUR2 Untereinheit konnten keine spezifischen Transkripte detektiert werden (erwartete Bandengröße: 229 bp). Abbildung A und C verändert nach Richter *et al.* (2014).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Kir6.1 und SUR1 Untereinheiten auf mRNA-Ebene in Lungenhomogenaten von *X. laevis* vorhanden sind und somit einen funktionellen K_{ATP} -Kanal bilden könnten. Die Kir6.2 Untereinheit scheint hingegen nur im Pankreas von *X. laevis* vorzukommen jedoch nicht in der Lunge. Für die K_{ATP} -Kanal Untereinheit SUR2 konnte hingegen weder in der Lunge noch im Pankreas ein Nachweis auf mRNA-Ebene erfolgen.

3.1.1.1.2 Connexin- und Pannexin-Hemikanäle

Die zur Familie der *Gap junction* Proteine zählenden Connexin- und Pannexin-Proteine können in der Plasmamembran von Epithelzellen sogenannte Hemikanäle bilden, die u.a. für Ca^{2+} Ionen und ATP permeabel sind (D'hondt *et al.* 2011). In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die HD-induzierte Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle möglicherweise auf einer mechanosensitiven Freisetzung von ATP über Connexin- und Pannexin-Hemikanäle beruht (siehe Einleitung 1.6). Anhand von RT-PCR Experimenten konnten codierende Transkripte der Connexin-Hemikanäle Connexin43 (Cx43) und Connexin30 (Cx30) auf mRNA-Ebene in Lungenhomogenaten von *X. laevis* nachgewiesen werden (Abb. 14 A und B). Des Weiteren wurde ein Nachweis der Transkripte, welche für den Pannexin-Hemikanal Pannexin1 (Panx1) codieren, erbracht (Abb. 14 C).

Durch eine anschließende Sequenzierung der detektierten Banden konnte das Vorkommen von Cx43, Cx30 sowie Panx1 in den Lungenhomogenaten von *X. laevis* bestätigt werden (siehe Anhang Tabelle 7). Ein funktioneller Nachweis der Hemikanäle sollte nachfolgend mittels elektrophysiologischer Messungen erfolgen (siehe 3.1.1.2).

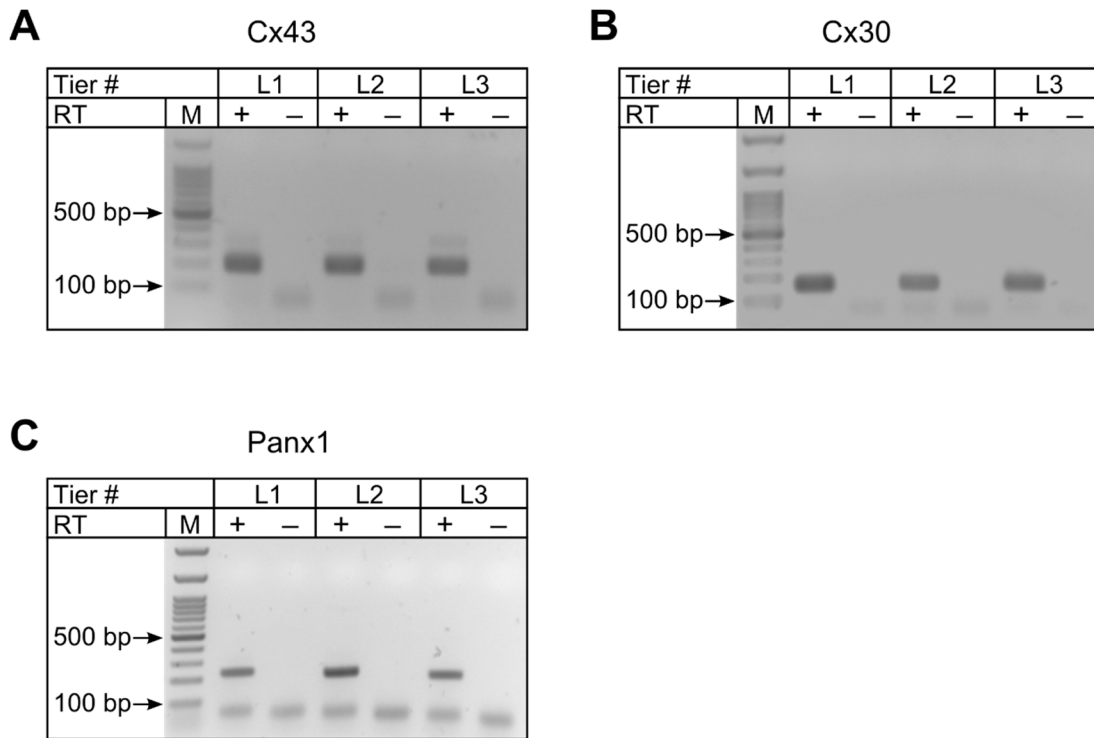


Abb. 14: RT-PCR Experimente zum Nachweis von Connexin- und Pannexin-Hemikanälen auf mRNA Ebene in Lungenhomogenaten von *X. laevis*.

A und B) In RNA Extrakten aus Lungenhomogenaten (L#) von drei verschiedenen *X. laevis* Donoren (Tier 1-3) konnten Transkripte, die für das Connexin43 (Cx43; erwartete Bandengröße: 194 *base pairs* (bp)) sowie für das Connexin30 (Cx30; erwartete Bandengröße: 158 bp) codieren, nachgewiesen werden (M: Marker der Bandengröße; +: mit RT Enzym; -: ohne RT Enzym). C) In allen drei RNA Proben konnten Transkripte des Pannexin1 (Panx1) mit der erwarteten Bandengröße (242 bp) detektiert werden. Abbildung verändert nach Richter *et al.* (2014).

3.1.1.2 Elektrophysiologische Untersuchungen zur Beteiligung von Connexin- und Pannexin-Hemikanälen an dem HD-induzierten Effekt

Nachdem auf mRNA Ebene sowohl codierende Transkripte der Kir6.1 und SUR1 K_{ATP} -Kanal Untereinheiten als auch Connexin- und Pannexin-Hemikanäle nachgewiesen wurden (siehe 3.1.1.1), sollte eine mögliche Beteiligung der Hemikanäle an dem HD-induzierten Effekt pharmakologisch untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden nachfolgend Experimente mit der modifizierten Ussing-Kammer durchgeführt. Zunächst wurden die prinzipiellen Charakteristika der Wirkung von HD auf die transepithelialen Ionentransport-Prozesse aufgezeigt (siehe 3.1.1.2.1). Anschließend wurden Experimente unter Verwendung

verschiedener Connexin- und Pannexin-Hemikanal Inhibitoren durchgeführt (siehe 3.1.1.2.2 – 3.1.1.2.3).

3.1.1.2.1 Der HD-induzierte Effekt am pulmonalen Epithel von *X. laevis*

Die prinzipiellen, durchgeführten Vorbereitungen der modifizierten Ussing-Kammer für die elektrophysiologischen Messungen wurden bereits unter Material und Methoden 2.3.1 beschrieben. Nachdem sich der Strom auf einen konstanten Wert eingestellt hatte, wurde HD (5 cm Flüssigkeitssäule) für 10 min apikal auf das Epithel appliziert. Die Erhöhung der Flüssigkeitssäule führte zu einem signifikanten Absinken des I_{SC} von $20,93 \pm 2,09 \mu A/cm^2$ ($I_{0\text{ cm}}$) auf $19,41 \pm 2,17 \mu A/cm^2$ ($I_{5\text{ cm}}$; Abb. 15 A; $P < 0,05$). Nach Wegnahme des HD wurde zunächst gewartet bis sich der Strom auf einen Plateau-Wert eingependelt hatte. Anschließend wurde erneut HD appliziert. Auch hier kam es zu einem signifikanten Abfall des I_{SC} ($I_{0\text{ cm}} = 24,0 \pm 2,23 \mu A/cm^2$; $I_{5\text{ cm}} = 21,97 \pm 2,21 \mu A/cm^2$; Abb. 15 A; $P < 0,01$). Für die statistische Analyse wurden die detektierten I_{SC} Werte normalisiert ($I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}}$). Der Vergleich der normalisierten Werte ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem 1. und 2. HD-induzierten Effekt (1. Effekt: $I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}} = 0,91 \pm 0,01$; 2. Effekt: $I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}} = 0,9 \pm 0,02$; Abb. 15 B; $P > 0,05$). Demnach war der HD-induzierte Effekt im gleichen Maße wiederholbar. Diese Ergebnisse stimmten mit einer früheren Studie überein (Bogdan 2007). Nachfolgend konnte demnach der 1. HD-induzierte Effekt als Kontroll-Experiment (ohne Pharmakon) dienen und der 2. HD-Effekt in Anwesenheit eines Pharmakons stattfinden.

Während der Ussing-Kammer Messungen wurde zudem vor (0 cm HD) und unter (5 cm HD) Applikation von HD der Widerstand des Epithels bestimmt (vgl. Material und Methoden 2.3.1), um eine etwaige Schädigung des Epithels in Folge der mechanischen Stimulation zu überprüfen. Der statistische Vergleich zeigte, dass sich die R_T Werte durch Erhöhung der Flüssigkeitssäule nicht signifikant veränderten (1. Effekt: $R_{T\ 0\text{ cm HD}} = 861,86 \pm 89,44 \Omega \cdot cm^2$; $R_{T\ 5\text{ cm HD}} = 847,95 \pm 93,24 \Omega \cdot cm^2$; Abb. 15 C; $P > 0,05$). Auch die wiederholte HD-Applikation führte zu keiner signifikanten Änderung (2. Effekt: $R_{T\ 0\text{ cm HD}} = 810,0 \pm 87,12 \Omega \cdot cm^2$; $R_{T\ 5\text{ cm HD}} = 838,1 \pm 98,06 \Omega \cdot cm^2$; Abb. 15 C; $P > 0,05$). Eine Erhöhung der mechanischen Kräfte hatte demnach keinen Einfluss auf den R_T des pulmonalen Epithels. Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die detektierte HD-induzierte Abnahme des I_{SC} nicht auf eine etwaige Schädigung des Epithels zurück zu führen war.

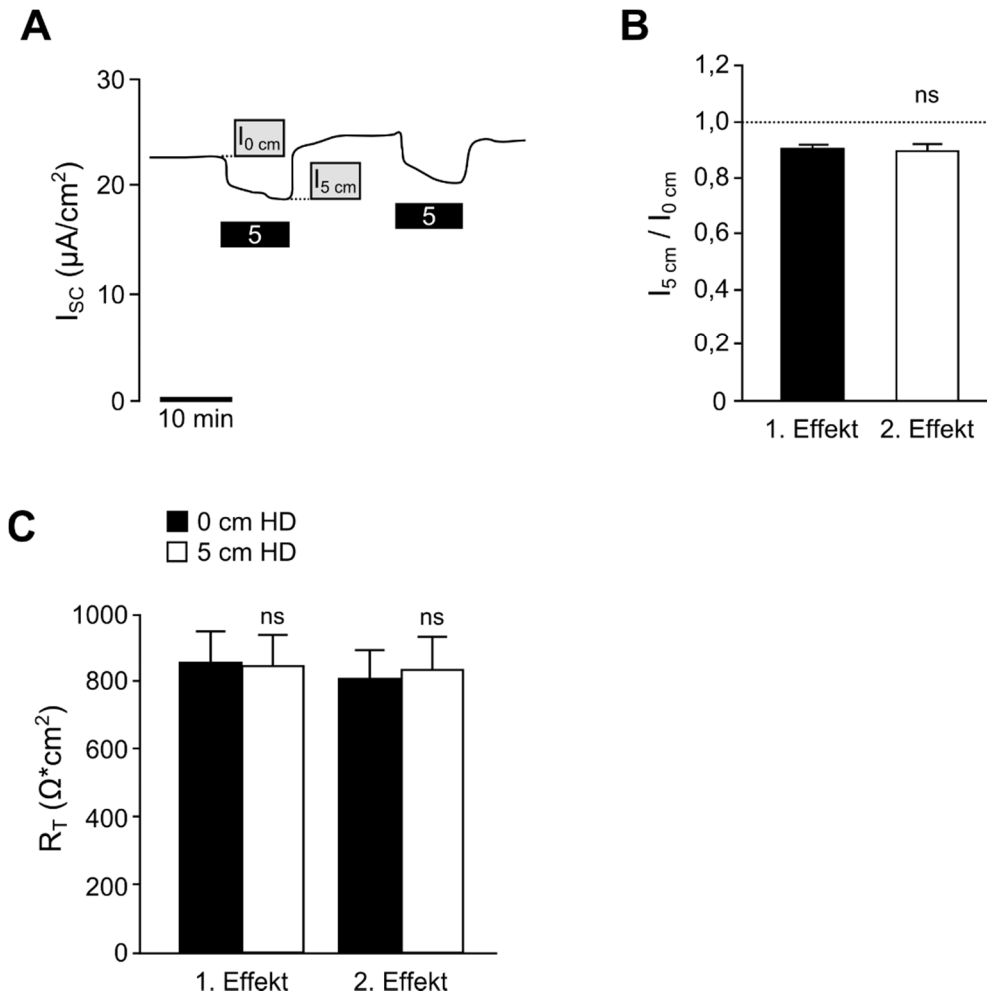


Abb. 15: Einfluss von hydrostatischem Druck (HD) auf den transepithelialen Ionentransport im pulmonalen Epithel von *X. laevis*.

A) Repräsentative Stromkurve. Die Applikation von HD (schwarzer Balken; 5 cm Flüssigkeitssäule; apikal) resultierte in einem Abfall des Kurzschlussstroms (*short circuit-current*: I_{sc}). Nach Absenken der Flüssigkeitssäule auf 0 cm pendelte sich der I_{sc} auf ein neues Plateau ein. Wurde anschließend die HD Applikation wiederholt, so kam es erneut zu einem HD-induzierten Abfall des Stroms. B) Für die statistische Auswertung wurden die I_{sc} Werte aus den in A) dargestellten Experimenten normalisiert ($I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}}$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem HD-induzierten Stromabfall bei der ersten HD Applikation (1. Effekt) und der wiederholten Applikation von HD (2. Effekt; $n = 28$; ns: nicht signifikant verschieden, $P > 0,05$). C) Während der in A) dargestellten Experimente wurde vor der Applikation (0 cm HD) und unter der Applikation von HD (5 cm HD) der transepitheliale Widerstand (R_T) des Epithels bestimmt. Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss von HD auf den R_T des Epithels ($n = 20$; ns: nicht signifikant verschieden; $P > 0,05$).

3.1.1.2.2 Der Connexin-Hemikanal Inhibitor Meclofenamin-Säure (MFA)

In vorherigen Experimenten wurde das Connexin43 (Cx43) auf mRNA-Ebene in Lungenhomogenaten von *X. laevis* detektiert (siehe 3.1.1.1.2). Als ein spezifischer Inhibitor des Cx43 wird die Meclofenamin-Säure (englisch: *meclofenamic-acid*; MFA) in der Literatur beschrieben (Luckprom *et al.* 2011). Mittels MFA sollte ein pharmakologischer Nachweis von Cx43 im pulmonalen Epithel von *X. laevis* erfolgen, sowie eine Beteiligung von Connexin-Hemikanälen an dem HD-induzierten Effekt überprüft werden.

In Ussing-Kammer Messungen wurde zunächst HD unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) appliziert (Abb. 16 A). Dies resultierte in einem signifikanten Abfall des Stroms von $28,81 \pm 2,43 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $25,27 \pm 2,52 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 16 A; $P < 0,01$). Nach Erreichen eines neuen Plateauwertes erfolgte die apikale Applikation von MFA ($100 \mu\text{M}$). Es konnte keine MFA-induzierte Änderung im I_{SC} festgestellt werden (Abb. 16 A; $P > 0,05$). Unter der darauf folgenden Applikation von HD kam es zu einem signifikanten Anstieg des Stroms von $31,95 \pm 2,49 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $34,81 \pm 2,65 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 16 A; $P < 0,01$). Die unter Kontrollbedingungen gezeigte HD-induzierte Strominhibition wurde demnach durch MFA gehemmt. Dies zeigte sich auch in dem statistischen Vergleich der normalisierten Werte (Kontrolle: $I_{5 \text{ cm}} / I_{0 \text{ cm}} = 0,85 \pm 0,03$; MFA: $I_{5 \text{ cm}} / I_{0 \text{ cm}} = 1,09 \pm 0,02$; Abb. 16 B; $P < 0,01$).

Anhand dieser Ergebnisse konnte pharmakologisch die Präsenz von Cx43 Hemikanälen im pulmonalen Epithel von *X. laevis*, sowie ihre Beteiligung an dem HD-induzierten Effekt, aufgezeigt werden. Da die HD-induzierte Hemmung des I_{SC} unter Kontrollbedingungen auf einer Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen beruhte (siehe Einleitung 1.6), scheinen Connexin-Hemikanäle einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität dieser Kanäle zu haben.

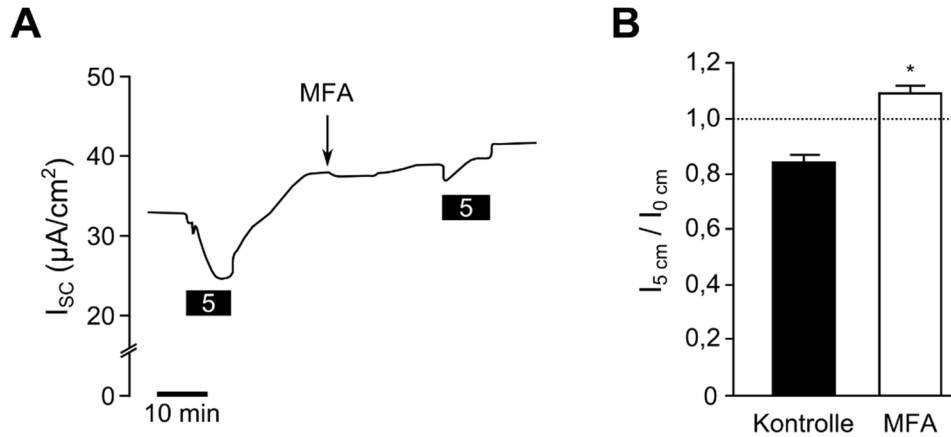


Abb. 16: Charakterisierung der Beteiligung von Connexin43 (Cx43) an dem HD-induzierten Effekt mittels Meclofenamin-Säure (MFA).

A) Die Applikation von HD (schwarzer Balken; apikal) führte zu einem Abfall des I_{sc} . Nach dem Erreichen eines neuen Stromplateaus wurde das Epithel zunächst mit dem Connexin43 (Cx43) Hemikanal Inhibitor Meclofenamin-Säure (MFA; 100 μ M; apikal) inkubiert. Durch die anschließende Applikation von HD für 10 min zeigten sich leichte Schwankungen im I_{sc} , bevor sich der Strom auf einen geringfügig erhöhten Stromwert einpendelte. B) Die statistische Analyse der HD-induzierten Änderungen im I_{sc} ($I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}}$) in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Anwesenheit (MFA) des Cx43 Inhibitors ergab, dass MFA den HD-Effekt signifikant inhibierte ($n = 24$; $*P < 0,05$). Abbildung modifiziert nach Richter *et al.* (2014).

3.1.1.2.3 Der Pannexin-Hemikanal Inhibitor Probenecid

Neben den Connexin-Hemikanälen wurden mittels RT-PCR zudem Transkripte, welche für Pannexin1 (Panx1) codieren, im Lungenhomogenat von *X. laevis* nachgewiesen (siehe 3.1.1.1.2). Um einen möglichen Einfluss von Pannexin-Hemikanälen auf den HD-induzierten Effekt elektrophysiologisch zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit der Pannexin Inhibitor Probenecid (Silverman *et al.* 2008) verwendet. Da Probenecid in wässrigen Lösungen nur schlecht löslich ist, wurde das Pharmakon in DMSO gelöst (siehe Material und Methoden 2.6, Tabelle 4). In den Ussing-Kammer Messungen wurde die Applikation von HD unter Kontrollbedingungen dementsprechend in Anwesenheit der äquivalenten Menge des Lösungsmittels (0,5 %) durchgeführt. Dadurch konnten etwaige DMSO-induzierte Effekte auf den Strom ausgeschlossen werden.

Die Erhöhung der Flüssigkeitssäule (5 cm) führte unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) zu einem Abfall des I_{sc} von $34,68 \pm 3,53 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $29,46 \pm 3,58 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 17 A; $P < 0,01$). Nach dem Absenken der Flüssigkeitssäule (0 cm) und Erreichen eines stabilen Plateauwertes, wurde 1 mM Probenecid apikal auf das Epithel appliziert. Der I_{sc}

veränderte sich in Folge der Probenecid Applikation nicht signifikant (Abb. 17 A; $P > 0,05$). Die anschließende Applikation von HD hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf den Strom ($I_{0\text{ cm}} = 39,2 \pm 3,87 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; $I_{5\text{ cm}} = 39,49 \pm 4,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; Abb. 17 A; $P > 0,05$). Mittels der statistischen Auswertung der normalisierten I_{SC} Werte ($I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}}$) konnte gezeigt werden, dass der Pannexin-Hemikanal Inhibitor Probenecid den HD-induzierten Effekt signifikant inhibiert (Kontrolle: $I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}} = 0,83 \pm 0,02$; Probenecid: $I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}} = 1,0 \pm 0,03$; Abb. 17 B; $P < 0,01$).

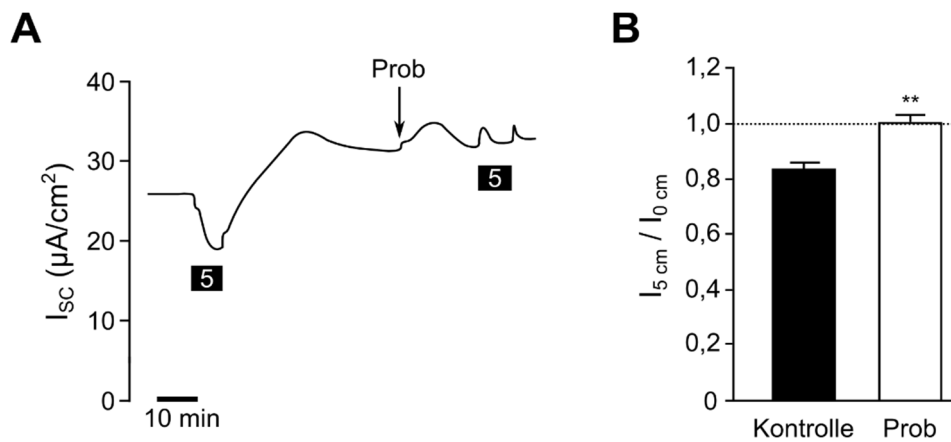


Abb. 17: Einfluss des Pannexin-Hemikanal Inhibitors Probenecid auf den HD-induzierten Effekt.

A) Nach Bestimmung der HD-induzierten Effekte (schwarzer Balken; 5 cm Flüssigkeitssäule; apikal) unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) wurde das Epithel apikal mit dem Pannexin-Hemikanal Inhibitor Probenecid (Prob; 1 mM) für 20 min inkubiert. Dabei zeigte sich ein kurzer Anstieg des I_{SC} , welcher dann wieder leicht abfiel. Wurde in Anwesenheit von Prob HD appliziert, so kam es zu einem moderaten Einfluss auf den I_{SC} , der sich innerhalb der 10 minütigen HD-Applikation leicht oberhalb des Ausgangswerts (vor HD) einpendelte. B) Statistische Auswertung der in A) dargestellten Experimente. Der unter Kontrollbedingungen (Kontrolle) detektierte HD-induzierte Stromabfall wurde durch Prob signifikant inhibiert ($n = 20$; $**P < 0,01$). Die Abbildung wurde modifiziert nach Richter *et al.* (2014).

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Pannexin-Hemikanälen einen Einfluss auf den HD-induzierten Effekt hat. Demnach scheinen Pannexin-Hemikanäle an der HD-induzierten K_{ATP} Kanal Aktivierung beteiligt zu sein.

3.1.1.2.4 Untersuchungen zur Wirkung von K_{ATP} Kanal Inhibitoren auf Connexin-Hemikanäle und den humanen $\alpha\beta$ ENaC

Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid besitzen die Fähigkeit K_{ATP} Kanäle zu inhibieren (Burke *et al.* 2008; Manning Fox *et al.* 2002). Für Glibenclamid sind zudem in der Literatur noch weitere unspezifische Effekte wie eine Aktivierung des hENaCs (Schnizler *et al.* 2003) und eine Hemmung des CFTRs (Schultz *et al.* 1999) beschrieben. Aus diesem Grund wurden in der Pharmazie verschiedene Derivate der Sulfonylharnstoffe entwickelt, die eine spezifischere Wirkung auf K_{ATP} Kanäle erzielen sollten. Zu diesen Derivaten zählt das Pharmakon HMR1098 (Manning Fox *et al.* 2002; Kaab *et al.* 2003). Der K_{ATP} Kanal Inhibitor HMR1098 wurde bereits in einer früheren Studie am pulmonalen Epithel von *X. laevis* verwendet (Richter 2010). Innerhalb dieser Studie zeigte sich, dass HMR1098 die HD-induzierte K_{ATP} Kanal Aktivierung vollständig inhibierte (Richter 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte hingegen gezeigt werden, dass auch der Connexin-Hemikanal Inhibitor MFA und der Pannexin-Hemikanal Inhibitor Probenecid den HD-induzierten Effekt signifikant inhibierten (vgl. Ergebnisse 3.1.2.2 und 3.1.2.3). Es stellte sich deshalb die Frage, ob HMR1098 eventuell auch einen unspezifischen, hemmenden Einfluss auf die Aktivität der Hemikanäle besitzt. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit in TEVC Messungen an nativen *X. laevis* Oocyten überprüft werden (siehe Ergebnisse 3.1.1.2.4.1). Da in einer früheren Studie die Beteiligung des ENaCs an dem HD-induzierten Effekt aufgezeigt wurde (Bogdan *et al.* 2008), sollten zudem etwaige unspezifische Wirkungen der K_{ATP} Kanal Inhibitoren HMR1098 und Glibenclamid auf den ENaC untersucht werden (siehe Ergebnisse 3.1.1.2.4.2). Für diese Untersuchungen wurde der hENaC heterolog in *X. laevis* Oocyten exprimiert und ebenfalls in TEVC Messungen überprüft.

3.1.1.2.4.1 Wirkung von HMR1098 auf Connexin-Hemikanäle

Zur Untersuchung etwaiger unspezifischer Nebeneffekte des K_{ATP} Kanal Inhibitors HMR1098 auf die Connexin-Hemikanäle wurden native Oocyten von *X. laevis* verwendet. Diese besitzen endogene Connexin-Hemikanäle wie das Cx31, Cx38 und Cx43 (Boer & van der Heyden 2005), die durch Ca^{2+} Ionen gehemmt werden (Scemes *et al.* 2007). Somit stellten die Oocyten in dieser Arbeit ein geeignetes Modellsystem dar, um eine mögliche Wirkung von HMR1098 auf die Aktivität der Connexin-Hemikanäle zu überprüfen.

Der anfängliche Messablauf der TEVC Messungen wurde bereits unter Material und Methoden 2.3.2 beschrieben. Nach dem Erreichen eines stabilen I_M unter ORi wurde die

Perfusionslösung für 2 min auf Ca^{2+} -freien ORi (siehe Tabelle 3) umgestellt, um somit die Connexin-Hemikanäle zu aktivieren. Dies resultierte in einer signifikanten Stromstimulation von $-0,16 \pm 0,03 \mu\text{A}$ auf $-0,63 \pm 0,07 \mu\text{A}$ (Ca^{2+} -frei Effekt; Abb. 18 A; $P < 0,01$). Die detektierte Stromstimulation war mit einer Aktivierung der Connexin-Hemikanäle gleichzusetzen, da dieser Effekt durch die anschließende Perfusion mit ORi, welche Ca^{2+} Ionen enthielt, reversibel war und sich der I_M wieder auf den Ausgangswert einpendelte (Abb. 18 A). Um nun eine etwaige Wirkung von HMR1098 auf die Connexin-Hemikanäle zu untersuchen, wurde HMR1098 ($60 \mu\text{M}$) zunächst in ORi gelöst und für 2 min auf die Oocyte appliziert. Nach dieser Inkubation, wurde erneut der Ca^{2+} -frei Effekt bestimmt, jedoch in Anwesenheit von HMR1098. Dabei kam es zu einer signifikanten Stromstimulation von $-0,18 \pm 0,05 \mu\text{A}$ auf $-0,72 \pm 0,09 \mu\text{A}$ (Abb. 18 A; $P < 0,01$). Für den statistischen Vergleich wurden delta-Werte aus der Differenz des I_M vor und unter Perfusion mit Ca^{2+} -frei ORi gebildet ($\Delta I_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$). Der unter Kontrollbedingungen (Kontrolle; ohne HMR1098) detektierte $\Delta I_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ unterschied sich nicht signifikant von dem $\Delta I_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ unter HMR1098 Applikation (Kontrolle: $\Delta I_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}} = 0,47 \pm 0,08 \mu\text{A}$; HMR1098: $\Delta I_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}} = 0,54 \pm 0,08 \mu\text{A}$; Abb. 18 B; $P > 0,05$). Demnach hatte HMR1098 keinen Einfluss auf die Aktivität der Connexin-Hemikanäle.

In parallel durchgeführten Kontrollexperimenten wurde der Ca^{2+} -frei Effekt zwei Mal an nativen Oocyten bestimmt, jedoch ohne Applikation von HMR1098 (Abb. 18 C). Die statistische Analyse der $\Delta I_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ Werte des 1. und 2. Ca^{2+} -frei Effekts ergab keinen signifikanten Unterschied (1. Effekt: $\Delta I_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}} = 0,65 \pm 0,14 \mu\text{A}$; 2. Effekt: $\Delta I_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}} = 0,71 \pm 0,11 \mu\text{A}$; Abb. 18 D; $P > 0,05$). Demnach war der Ca^{2+} -frei Effekt wiederholbar und die durch Ca^{2+} -frei ORi induzierte Aktivierung der Connexin-Hemikanäle unterlag keiner Desensitivierung.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der K_{ATP} -Kanal Inhibitor HMR1098 keinen Einfluss auf endogene Connexin-Hemikanäle von *X. laevis* Oocyten besitzt.

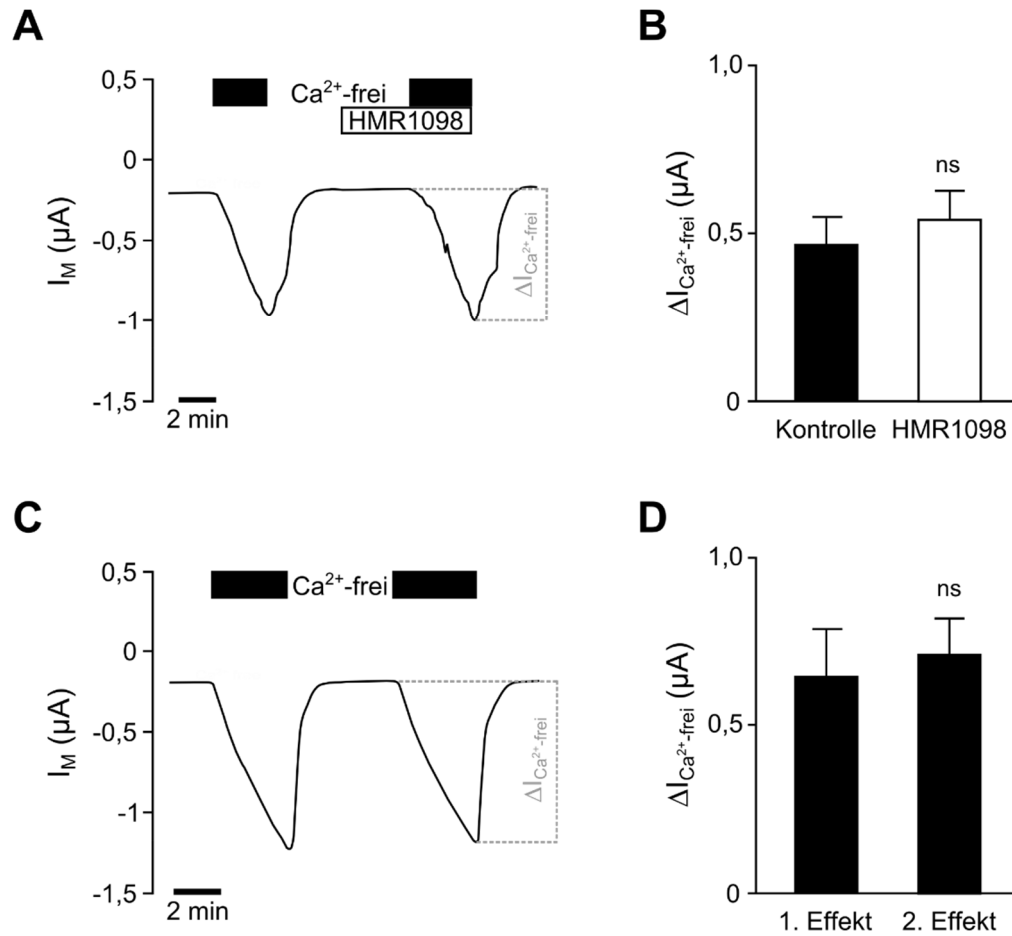


Abb. 18: Der Effekt von HMR1098 auf native Connexin-Hemikanäle in *X. laevis* Oocyten. A) Repräsentative Stromkurve einer *two-electrode voltage-clamp* (TEVC) Messung an nativen *X. laevis* Oocyten. Die Perfusion von Ca^{2+} -freiem ORI (Ca^{2+} -frei; schwarzer Balken) für 2 min resultierte unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon), sowie in Anwesenheit des K_{ATP} -Kanal Inhibitors HMR1098 (weißer Balken; $60 \mu\text{M}$) in einer Stimulation des Membranstroms (I_{M}). Der Ca^{2+} -frei Effekt war reversibel und wiederholbar. B) Für die statistische Auswertung wurden delta-Werte des I_{M} vor und unter Ca^{2+} -frei Perfusion gebildet ($\Delta I_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem $\Delta I_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ unter Kontrollbedingungen (Kontrolle; ohne Pharmakon) und in Anwesenheit von HMR1098 ($N = 3$, $n = 10$; ns: nicht signifikant verschieden; $P > 0,05$). C und D) Die Perfusion mit Ca^{2+} -frei (schwarzer Balken) resultierte in einer reversiblen Stimulation des I_{M} und war wiederholbar. Der statistische Vergleich der $\Delta I_{\text{Ca}^{2+}\text{-frei}}$ Werte zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen dem 1. und 2. Effekt ($N = 3$, $n = 9$; ns: nicht signifikant verschieden; $P > 0,05$). Die Abbildung wurde modifiziert nach Richter *et al.* (2014).

3.1.1.2.4.2 Überprüfung der Wirkung von K_{ATP} Kanal Inhibitoren auf den hENaC

In der vorliegenden Arbeit sollte ein möglicher Einfluss der K_{ATP} Kanal Inhibitoren HMR1098 und Glibenclamid auf den hENaC überprüft werden. Dazu wurden *X. laevis* Oocyten als heterologes Expressionssystem für den hENaC verwendet und TEVC Messungen durchgeführt (vgl. Material und Methoden 2.3.2).

Um eine Aussage über die Aktivität des in den Oocyten exprimierten hENaCs treffen zu können, wurde der ENaC-Inhibitor Amilorid (Althaus *et al.* 2011; Canessa *et al.* 1994; Goodman & Schwarz 2003) verwendet. Zur Bestimmung des Amilorid-sensitiven Stroms (I_{Amil}) wurden 10 μ M Amilorid (gelöst in ORi) perfundiert. Dies führte zu einer Abnahme des I_M von $-2,89 \pm 0,61 \mu$ A auf $-0,24 \pm 0,06 \mu$ A (Abb. 19 A; $P < 0,01$). Nach dem Auswaschen von Amilorid, erfolgte eine 2 minütige Perfusion mit HMR1098 (30 μ M; gelöst in ORi). In Folge dessen kam es zu einer signifikanten Abnahme des I_M von $1,61 \pm 0,39 \mu$ A auf $1,32 \pm 0,29 \mu$ A (Abb. 19 A; $P < 0,01$). Dieser Effekt deutete auf eine HMR1098-induzierte Inhibition des hENaC hin. Anschließend wurde in Anwesenheit von HMR1098 erneut der I_{Amil} bestimmt (Abb. 19 A). Es wurde dabei eine signifikante Abnahme des I_M von $1,32 \pm 0,29 \mu$ A auf $0,24 \pm 0,1 \mu$ A detektiert (Abb. 19 A; $P < 0,01$). Für den statistischen Vergleich wurden delta-Werte des I_{Amil} (ΔI_{Amil}) herangezogen, die unter Kontrollbedingungen (Kontrolle; ohne HMR1098) und in Anwesenheit von HMR1098 bestimmt wurden. Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss von HMR1098 auf den ΔI_{Amil} (Kontrolle: $\Delta I_{Amil} = 1,37 \pm 0,35 \mu$ A; HMR1098: $\Delta I_{Amil} = 1,08 \pm 0,23 \mu$ A; Abb. 19 B; $P > 0,05$). Obwohl die alleinige Applikation von HMR1098 einen signifikanten Einfluss auf den I_M hatte (Abb. 19 A), zeigte sich kein Effekt von HMR1098 auf den ΔI_{Amil} (Abb. 19 B).

In parallel durchgeführten Kontrollexperimenten wurde an hENaC exprimierenden Oocyten die Wiederholbarkeit des Amilorid-Effekts überprüft, indem der I_{Amil} zwei Mal unter Kontrollbedingungen (ohne HMR1098) bestimmt wurde (Abb. 19 C). Die statistische Auswertung der beiden ΔI_{Amil} Werte ergab keinen signifikanten Unterschied (1. Effekt: $\Delta I_{Amil} = 1,35 \pm 0,31 \mu$ A; 2. Effekt: $\Delta I_{Amil} = 1,42 \pm 0,32 \mu$ A; Abb. 19 D; $P > 0,05$). Somit war eine Desensitivierung des ENaC durch eine wiederholte Applikation von Amilorid ausgeschlossen und die in Abb. 19 A detektierten I_{Amil} Werte ohne und mit HMR1098 konnten statistisch miteinander verglichen werden.

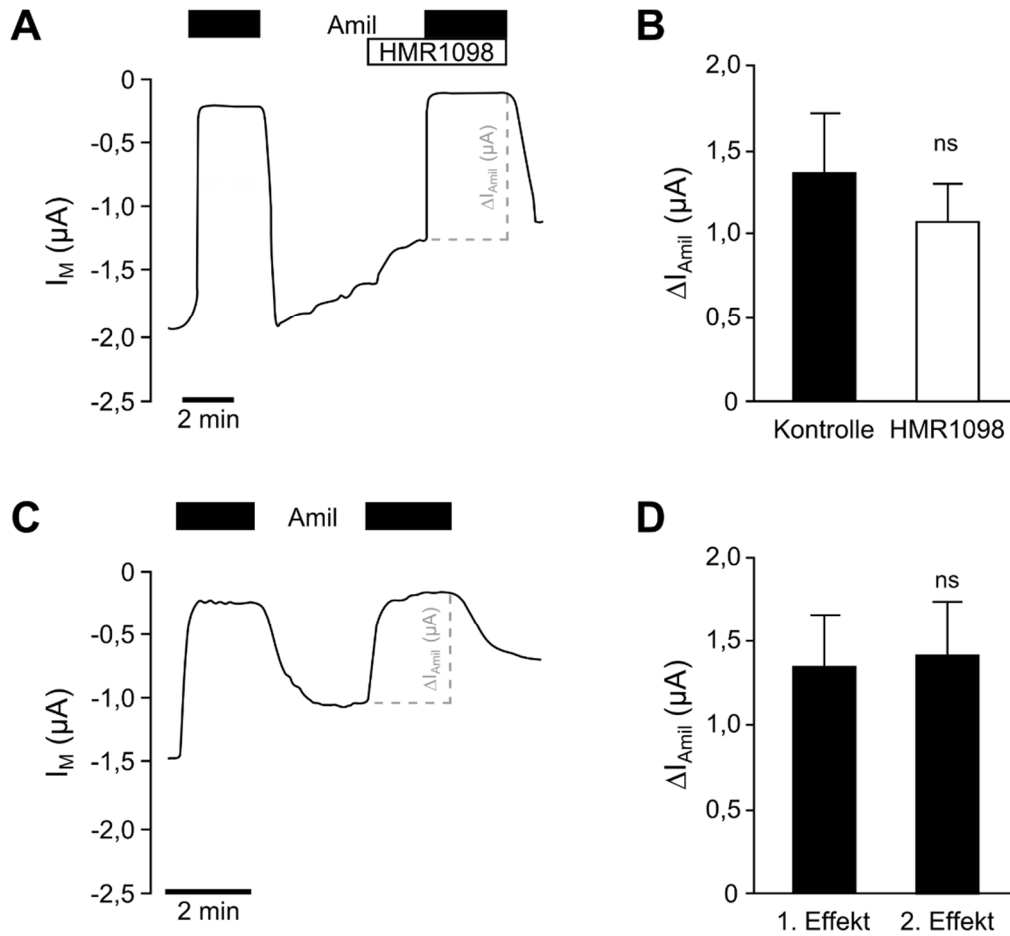


Abb. 19: Untersuchungen zur Wirkung von HMR1098 auf den humanen $\alpha\beta\gamma$ ENaC.

A) Der humane $\alpha\beta\gamma$ ENaC (hENaC) wurde heterolog in *X. laevis* Oocyten exprimiert und mittels des ENaC Inhibitors Amilorid (schwarzer Balken; Amil; 10 μ M) der Amilorid-sensitiven Strom (ΔI_{Amil}) bestimmt. Die Amilorid-induzierte Hemmung des I_M war reversibel. Dann wurde der K_{ATP} -Kanal Inhibitor HMR1098 (weißer Balken; 30 μ M) perfundiert, was zu einer leichten Stromhemmung führte. Abschließend wurde in Anwesenheit von HMR1098 erneut der ΔI_{Amil} bestimmt. B) Der statistische Vergleich des ΔI_{Amil} unter Kontrollbedingungen (Kontrolle; ohne Pharmakon) und unter HMR1098 zeigte keinen signifikanten Unterschied (N = 3, n = 16; ns: nicht signifikant verschieden; $P > 0,05$). C und D) In parallelen Messungen wurde der ΔI_{Amil} zwei Mal unter Kontrollbedingungen (ohne HMR1098) bestimmt. Der statistische Vergleich der ersten (1. Effekt) und zweiten (2. Effekt) ΔI_{Amil} Effekte zeigte keinen signifikanten Unterschied (N = 3, n = 13; ns: nicht signifikant verschieden; $P > 0,05$).

In weiteren Kontrollexperimenten wurde in DEPC-injizierten Oocyten (vgl. Material und Methoden 2.3.2) kontrolliert, ob eines der verwendeten Pharmaka einen etwaigen Effekt auf native Oocyten hat, die keinen ENaC exprimierten. Weder Amilorid (10 μ M) noch HMR1098 (30 μ M) zeigten einen Effekt auf den I_M dieser Oocyten (Daten nicht gezeigt; $P > 0,05$).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass HMR1098 eine inhibierende Wirkung auf den hENaC besitzt (Abb. 19 A). Der ΔI_{Amil} unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von HMR1098 war hingegen nicht signifikant verschieden voneinander, wodurch kein eindeutiger Einfluss von HMR1098 auf den hENaC nachgewiesen werden konnte. Dennoch deuten die Ergebnisse auf eine HMR1098-induzierte Hemmung des hENaCs hin. Dies steht im Widerspruch zu der Glibenclamid-induzierten ENaC Aktivierung, welche von Schnizler *et al.* gezeigt wurde (Schnizler *et al.* 2003). Auf Grund dessen wurden die zuvor beschriebenen Experimente mit dem K_{ATP} -Kanal Inhibitor Glibenclamid wiederholt (siehe Abb. 20). Die Verwendung von Glibenclamid erforderte DMSO als Lösungsmittel (siehe Tabelle 4). Dementsprechend wurden alle Perfusionslösungen ohne Glibenclamid äquivalent mit 0,1% DMSO versetzt.

Zu Beginn der Messung wurde zunächst der I_{Amil} bestimmt indem die Oocyten mit 10 μM Amilorid perfundiert wurden. Dies führte zu einer Hemmung des I_{M} von $-4,03 \pm 0,77 \mu\text{A}$ auf $-0,6 \pm 0,24 \mu\text{A}$ (Abb. 20 A; $P < 0,01$). Der Amilorid-induzierte Effekt war durch Auswaschen mit ORi reversibel. Anschließend wurde Glibenclamid (100 μM) appliziert. Dies resultierte in einer signifikanten Stromstimulation von $-3,38 \pm 0,69 \mu\text{A}$ auf $-3,72 \pm 0,77 \mu\text{A}$ (Abb. 20 A; $P < 0,01$). Die Glibenclamid-induzierte Stromstimulation deutete auf eine Aktivierung des hENaC hin. Abschließend wurde erneut mit Amilorid perfundiert, wodurch es zu einer signifikanten Hemmung des I_{M} auf $-0,66 \pm 0,3 \mu\text{A}$ kam (Abb. 20 A; $P < 0,01$). Der statistische Vergleich des ΔI_{Amil} unter Glibenclamid und unter Kontrollbedingungen (Kontrolle; ohne Glibenclamid) zeigte, dass Glibenclamid den ΔI_{Amil} signifikant erhöhte (Kontrolle: $\Delta I_{\text{Amil}} = 2,55 \pm 0,58 \mu\text{A}$; Glibenclamid: $\Delta I_{\text{Amil}} = 2,83 \pm 0,61 \mu\text{A}$; Abb. 20 B; $P < 0,01$). Demnach konnte eine aktivierende Wirkung von Glibenclamid auf den hENaC aufgezeigt werden. In parallelen Kontrollexperimenten (ohne Glibenclamid) induzierte die erste Applikation von Amilorid eine signifikante Stromhemmung von $-3,68 \pm 0,65 \mu\text{A}$ auf $-0,31 \pm 0,05 \mu\text{A}$ (Abb. 20 C; $P < 0,01$). Nach dem Auswaschen mit ORi wurde erneut Amilorid perfundiert, wodurch es zu einer signifikanten Hemmung des I_{M} von $-2,83 \pm 0,47 \mu\text{A}$ auf $-0,28 \pm 0,09 \mu\text{A}$ kam (Abb. 20 C; $P < 0,01$). Die statistische Auswertung der so ermittelten ΔI_{Amil} Werte ergab keinen signifikanten Unterschied (1. Effekt: $\Delta I_{\text{Amil}} = 2,19 \pm 0,4 \mu\text{A}$; 2. Effekt: $\Delta I_{\text{Amil}} = 2,43 \pm 0,38 \mu\text{A}$; Abb. 20 D; $P > 0,05$). Der Amilorid-induzierte Effekt war demnach nachweislich wiederholbar und unterlag keiner Desensitivierung.

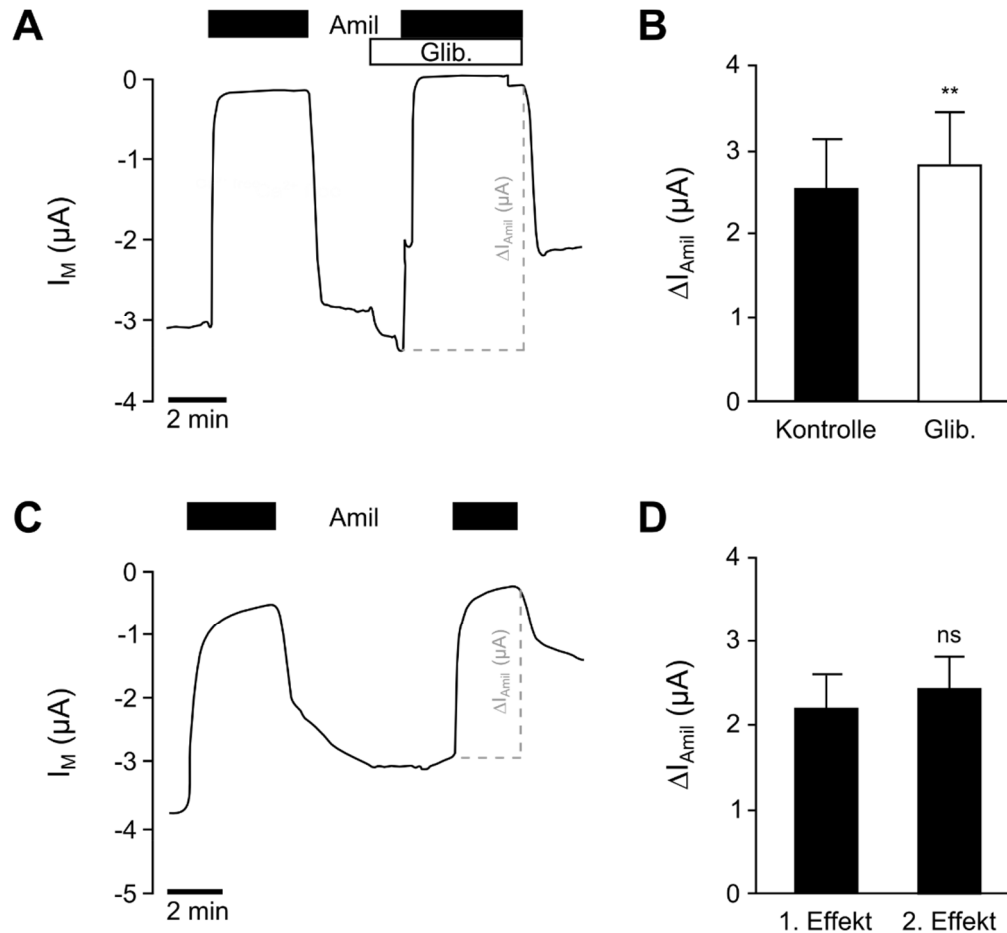


Abb. 20: Einfluss von Glibenclamid auf die Aktivität des hENaCs.

A) Repräsentative Stromspur einer TEVC Messung mit hENaC exprimierenden *X. laevis* Oocyten. Die Perfusion mit Amilorid (schwarzer Balken; Amil; 10 μ M) resultierte in einer Hemmung des I_M , welche reversibel war. Durch die Applikation des K_{ATP} -Kanal Inhibitors Glibenclamid (weißer Balken; 100 μ M) kam es zu einer Stromstimulation. Anschließend wurde Glibenclamid zusammen mit Amilorid perfundiert, was eine Hemmung des I_M zur Folge hatte. B) Der statistische Vergleich der Amilorid-sensitiven Ströme (ΔI_{Amil}) unter Kontrollbedingungen (Kontrolle; ohne Glibenclamid) und in Anwesenheit von Glibenclamid zeigte, dass Glibenclamid den ΔI_{Amil} signifikant erhöhte (N = 3, n = 12; **P<0,01). C und D) Der statistische Vergleich der ΔI_{Amil} , von parallel durchgeführten Kontrollexperimenten (ohne Glibenclamid), zeigte keinen Unterschied zwischen dem ΔI_{Amil} der ersten (1. Effekt) und zweiten (2. Effekt) Amilorid-Applikation (N = 3, n = 13; ns: nicht signifikant verschieden; P > 0,05).

In Übereinstimmung mit der früheren Studie von Schnizler *et al.* konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Glibenclamid den hENaC aktiviert. Im Gegensatz dazu konnte kein eindeutiger Effekt von HMR1098 auf den hENaC nachgewiesen werden. Es kann lediglich eine leichte inhibierende Wirkung von HMR1098 auf den hENaC vermutet werden. Da in einer früheren Studie sowohl Glibenclamid als auch HMR1098 den HD-

induzierten Abfall des I_{sc} vollständig inhibierten (Richter 2010), unterstützen die hier gezeigten Ergebnisse eine HD-induzierte Aktivierung von K_{ATP} Kanälen im pulmonalen Epithel von *X. laevis*.

3.1.1.3 HD-induzierte ATP-Freisetzung über mechanosensitive Connexin- und Pannexin Hemikanäle

In den vorherigen Experimenten konnte in elektrophysiologischen Messungen eine Beteiligung von Connexin- und Pannexin-Hemikanälen an der HD-induzierten K_{ATP} Kanal Aktivierung pharmakologisch nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse 3.1.1.2). Ein möglicher Mechanismus, der diese Beteiligung der Hemikanäle erklären könnte, ist eine mechanosensitive Freisetzung von ATP über die Hemikanäle. Eine solche Fähigkeit wurde bereits in früheren Studien sowohl für Connexin- als auch für Pannexin-Hemikanäle beschrieben (Guyot & Hanrahan 2002; Ransford *et al.* 2009; Li *et al.* 2010). Die HD-induzierte ATP-Freisetzung würde in den Epithelzellen zu einer Abnahme der intrazellulären ATP Konzentration ($[ATP]_i$) führen. Da K_{ATP} Kanäle durch intrazelluläres ATP gehemmt werden (Nichols 2006), würde eine HD-induzierte Abnahme der $[ATP]_i$ dementsprechend zu einer Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle führen. In dem hier verwendeten Modellsystem der *X. laevis* Lunge war es nicht möglich die $[ATP]_i$ der Epithelzellen zu bestimmen (vgl. Diskussion 4.1.3). Anstelle dessen wurden während der Ussing-Kammer Experimente Proben der aus dem apikalen Kompartiment austretenden Perfusionslösung gesammelt und mittels eines Lumineszenz Assays die darin enthaltene ATP-Konzentration bestimmt (siehe Material und Methoden 2.4). Die in den Proben detektierte extrazelluläre ATP Konzentration ($[ATP]_e$) gab indirekt eine Auskunft über eine etwaige ATP-Freisetzung. Eine Erhöhung der $[ATP]_e$ wäre somit einer Freisetzung von ATP aus den Epithelzellen heraus gleichzusetzen. Die Proben wurden während den Ussing-Kammer Messungen immer vor der Applikation von HD (0 cm Flüssigkeitssäule), sowie direkt nach Erhöhung der Flüssigkeitssäule (5 cm Flüssigkeitssäule) gesammelt. Für die statistische Analyse der ATP-Konzentrationsmessungen wurden die gemessenen Lichtemissions-Werte (relative Units) vor HD-Applikation und unter HD-Applikation miteinander verglichen. Ein Anstieg der Lichtemission war dabei gleichzusetzen mit einer Erhöhung der $[ATP]_e$.

Für die ATP-Konzentrationsmessungen wurden folgende Proben aus den Ussing-Kammer Messungen verwendet: a) Proben der 1. HD Effekte unter Kontrollbedingungen (Kontrolle 1; ohne Pharmakon; siehe 3.1.1.2.1, 3.1.1.2.2 und 3.1.1.2.3); b) Proben der wiederholten HD-Applikation ohne Pharmakon (Kontrolle 2; siehe 3.1.1.2.1); c) Proben der HD Effekte in Anwesenheit von MFA (siehe 3.1.1.2.2); d) Proben der HD Effekte unter Probenecid (siehe 3.1.1.2.3). Die statistische Auswertung der Proben ist in Abb. 21 dargestellt.

In Folge der Applikation von HD auf das pulmonale Epithel von *X. laevis* wurde ein signifikanter Anstieg der Lichtemission von $57,93 \pm 12,06$ auf $82,33 \pm 14,61$ detektiert (1 HD Effekt; Abb. 21; $P < 0,01$). Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Applikation von HD zu einem Anstieg der $[ATP]_e$ und dementsprechend zu einer HD-induzierten ATP-Freisetzung aus den Epithelzellen führte. Auch die wiederholte HD-Applikation unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) resultierte in einem signifikanten Anstieg der Lichtemission von $47,00 \pm 13,65$ auf $59,12 \pm 13,55$ (2 HD Effekt, Kontrolle; Abb. 21; $P < 0,01$) und demnach in einer Erhöhung der $[ATP]_e$. Im Gegensatz dazu wurde in den Proben, die in Anwesenheit des Connexin-Hemikanal Inhibitors MFA gesammelt wurden, keine HD-induzierte Änderung der Lichtemission detektiert (MFA: 0 cm Flüssigkeitssäule = $17,31 \pm 4,64$; 5 cm Flüssigkeitssäule = $15,69 \pm 4,49$; Abb. 21; $P > 0,05$). In Anwesenheit des Pannexin-Inhibitors Probenecid zeigte sich eine leichte HD-induzierte Abnahme der Lichtemission von $46,33 \pm 13,85$ auf $37,50 \pm 16,59$ (Prob; Abb. 21). Dieser Effekt war statistisch nicht signifikant ($P > 0,05$). Die Inkubation des Epithels mit MFA bzw. Probenecid führte demnach zu einer Inhibition der HD-induzierten ATP-Freisetzung.

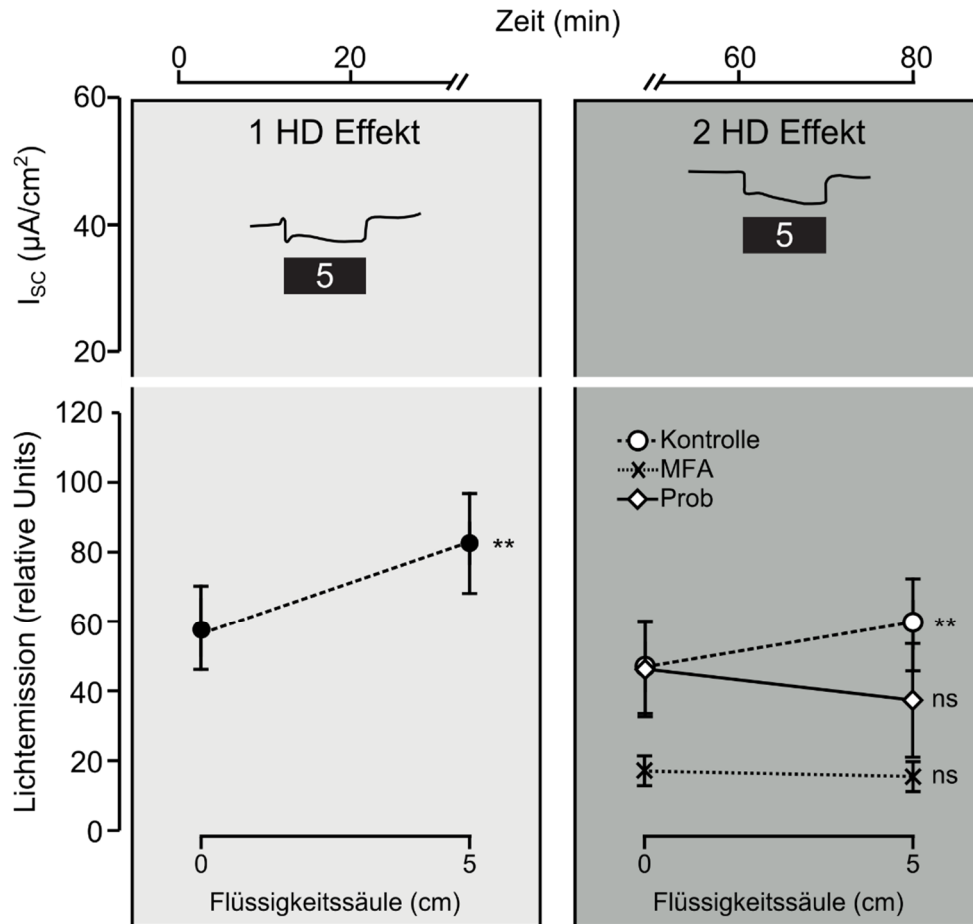


Abb. 21: HD-induzierte Änderungen der Lichtemissions-Werte.

In Ussing-Kammer Messungen wurde unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmaka) zwei Mal HD (5 cm Flüssigkeitssäule) appliziert und die HD-induzierten Effekte auf den I_{sc} detektiert (obere Abbildung; 1 HD Effekt, 2 HD Effekt). Während diesen Messungen wurden Proben der aus dem apikalen Kompartiment der Ussing-Kammer austropfende Perfusions-Lösung vor (0 cm Flüssigkeitssäule) und unter (5 cm Flüssigkeitssäule) HD-Applikation gesammelt. Mittels eines Lumineszenz-Assays wurde die Lichtemission gemessen, welche im unteren Teil der Abbildung dargestellt ist. Änderungen der Lichtemissions-Werte waren gleichzusetzen mit Änderungen der extrazellulären ATP-Konzentration ($[\text{ATP}]_e$). Die erste Applikation von HD (1 HD Effekt) resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Lichtemission (schwarze Kreise; $n = 42$; $**P < 0,01$) und somit in einem Anstieg der $[\text{ATP}]_e$. Die Gewebe wurden dann erneut HD ausgesetzt (2 HD Effekt), entweder unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon; Kontrolle; weiße Kreise), oder in Anwesenheit von MFA (100 μM ; apikal) bzw. Probenecid (Prob; 1 mM; apikal). Während es in der Kontrolle erneut zu einer signifikanten Erhöhung der Lichtemission kam ($n = 17$; $**P < 0,01$), zeigten sich unter MFA ($n = 13$) und Prob ($n = 12$) keine signifikanten Änderungen (ns: nicht signifikant verschieden; $P > 0,05$). Abbildung verändert nach Richter *et al.* (2014).

Neben der zuvor beschriebenen Bestimmung der Änderungen der Lichtemission, wurde für alle durchgeführten Kontrollmessungen (siehe Abb. 21; 1 HD Effekt; $n = 42$) eine Quantifizierung der $[ATP]_e$ durchgeführt. Dazu wurde in parallelen Lumineszenz-Messungen eine Eichkurve mit definierten ATP-Standard Konzentrationen erstellt (vgl. Material und Methoden 2.4). Anhand dieser Eichkurve konnte, unter Ermittlung der linearen Regression, die Quantifizierung der detektierten ATP Konzentration erfolgen. Die statistische Auswertung ist in Abb. 22 dargestellt. Vor der Applikation von HD konnte eine $[ATP]_e$ von $18,81 \pm 2,53$ nM detektiert werden (0 cm Flüssigkeitssäule; Abb. 22). In Folge der HD-Applikation stieg die $[ATP]_e$ signifikant auf $29,48 \pm 3,23$ nM an (5 cm Flüssigkeitssäule; Abb. 22; $P < 0,01$). Die Ergebnisse der durchgeführten ATP-Konzentrationsmessungen zeigen, dass die Applikation von HD zu einer ATP-Freisetzung aus den Epithelzellen führte (Abb. 21 und 22). Diese HD-induzierte ATP-Freisetzung war zudem wiederholbar (Abb. 21). In Anwesenheit der Hemikanal-Inhibitoren MFA bzw. Probenecid konnten hingegen keine HD-induzierten Änderungen der $[ATP]_e$ detektiert werden (Abb. 21). Daraus lässt sich schließen, dass die HD-induzierte ATP-Freisetzung auf einer mechanosensitiven Aktivierung von Connexin- und Pannexin-Hemikanälen beruhte. Des Weiteren unterstützen die Ergebnisse die Hypothese, dass K_{ATP} -Kanäle indirekt durch HD aktiviert werden, in Folge einer mechanosensitiven ATP-Freisetzung über Connexin- und Pannexin-Hemikanäle.

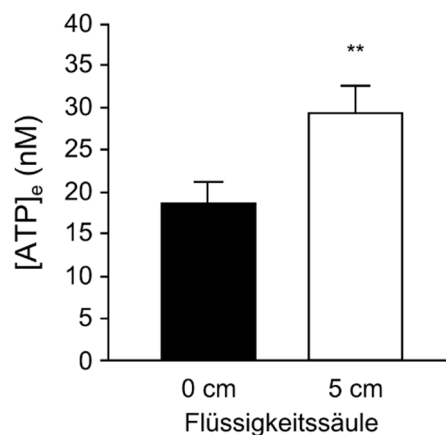


Abb. 22: HD-induzierte Änderung der $[ATP]_e$.

Anhand einer ATP-Standard Eichkurve konnten die in den Lumineszenz Messungen detektierten relativen Änderungen der $[ATP]_e$ quantifiziert werden. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der $[ATP]_e$ in Folge der Erhöhung der Flüssigkeitssäule von 0 cm auf 5 cm ($n = 42$; $**P < 0,01$).

3.1.2 Wirkung von zyklischer HD-Applikation auf das pulmonale Epithel von *X. laevis*

In den vorherigen Experimenten wurde das pulmonale Epithel für 10 min mechanisch gedehnt (HD; 5 cm Flüssigkeitssäule) und die daraus resultierenden Änderungen im I_{SC} detektiert. Die Applikation von HD erfolgte dabei höchstens zwei Mal. Die Atmung von Säugern ist jedoch ein kontinuierlicher Prozess und das pulmonale Epithel wird bei jeder Atembewegung transpulmonalen Drücken ausgesetzt die zu einer zyklischen Dehnung des pulmonalen Epithels führen (Fronius 2012). Um den physiologischen Charakter der Atmung zu imitieren, wurden in der vorliegenden Arbeit Messungen mit der modifizierten Ussing-Kammer durchgeführt, in denen das pulmonale Epithel von *X. laevis* über einen Zeitraum von 30 min zyklisch in 30 sec Intervallen HD ausgesetzt wurde.

3.1.2.1 Wiederholbarkeit des HD-induzierten Effekts

Zunächst sollte überprüft werden, ob der HD-induzierte Stromabfall über einen längeren Zeitraum wiederholbar ist. Nach dem Erreichen eines stabilen Plateaus des I_{SC} wurde in den Ussing-Kammer Messungen unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) HD für 30 sec appliziert (schwarzer Balken; 5 cm Flüssigkeitssäule; Abb. 23 A). Dies resultierte in einem Absinken des I_{SC} . Anschließend wurde die Flüssigkeitssäule für 30 sec auf 0 cm abgesenkt, wodurch der I_{SC} wieder anstieg (Abb. 23 A). Diese zyklische HD-Applikation wurde über einen Zeitraum von 30 min fortgeführt. Dabei war zu jedem Zeitpunkt ein HD-induzierter Abfall des I_{SC} zu beobachten (Abb. 23 A). Für die statistische Auswertung wurden delta-Werte aus den HD-induzierten Änderungen im I_{SC} gebildet (ΔI_{SC} ; Abb. 23 A und C).

In parallelen Experimenten wurde das Epithel zunächst für 10 min mit dem K_{ATP} Kanal Inhibitor HMR1098 (60 μ M; apikal) vorinkubiert. Dann wurde in Anwesenheit von HMR1098 HD zyklisch (30 sec Intervalle) über einen Zeitraum von 30 min auf das Epithel appliziert (Abb. 23 B). An den HMR1098 inkubierten Epithelien sahen die HD-induzierten Effekte, im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Kontrollmessungen (ohne HMR1098), vollkommen anders aus. Über den gesamten Zeitraum wurde der HD-induzierte Stromabfall durch HMR1098 inhibiert (Abb. 23 B). Dies wurde auch in dem statistischen Vergleich der ΔI_{SC} -Werte der beiden Messreihen deutlich (Abb. 23 C). Die ΔI_{SC} -Werte in Anwesenheit von HMR1098 waren signifikant verschieden zu den ΔI_{SC} -Werten der Kontrollmessungen (Abb.

23 C; $P < 0,05$). Lediglich an zwei Datenpunkten unterschieden sich die Werte nicht signifikant voneinander (Abb. 23 C; $P > 0,05$).

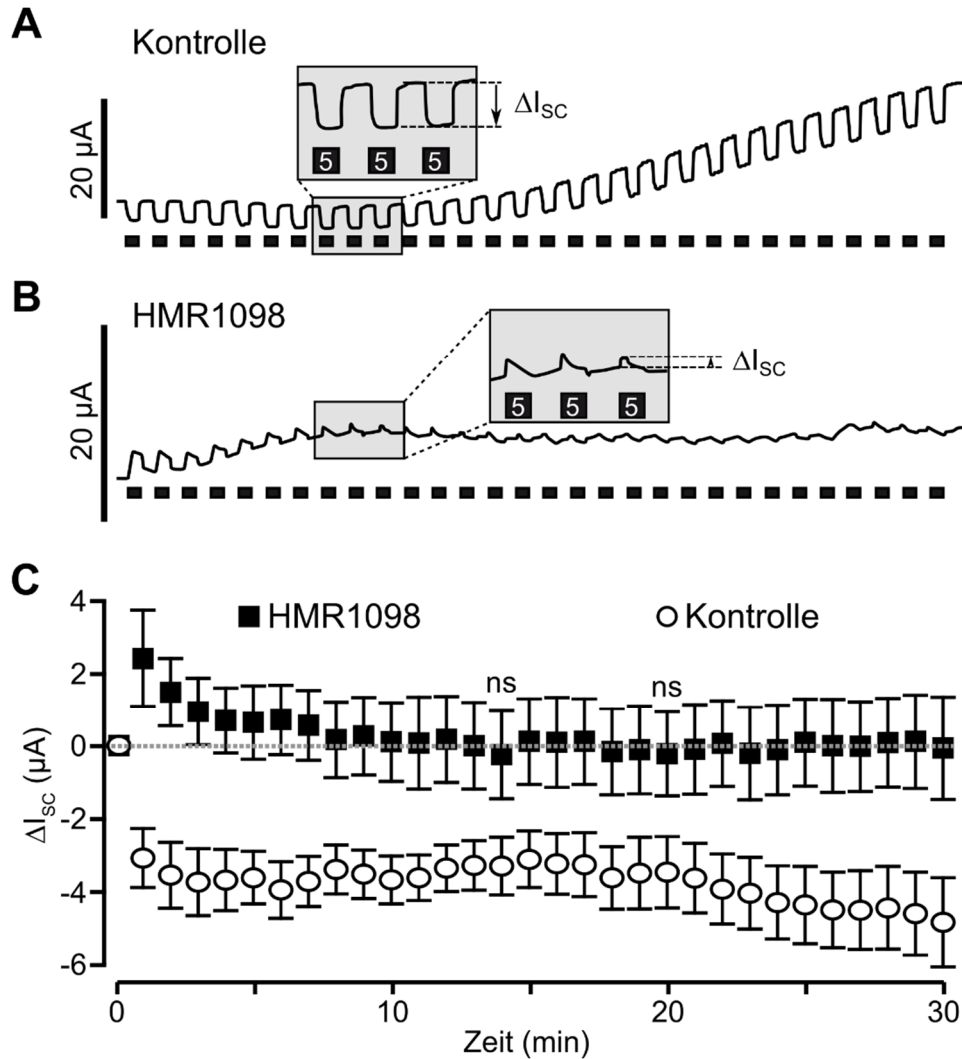


Abb. 23: Einfluss von zyklischer HD-Applikation auf den I_{sc} .

A) Unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) führte die periodische Applikation von HD in 30 sec Intervallen (schwarze Balken) über einen Zeitraum von 30 min immer zu einem HD-induzierten Stromabfall. B) Identischer Versuchsablauf wie in A) beschrieben, jedoch in Anwesenheit des K_{ATP} -Kanal Inhibitors HMR1098 (60 μM ; apikal). HMR1098 inhibierte den HD-induzierten Stromabfall. Zu Beginn der Messungen kam es vielmehr zu einem HD-induzierten Anstieg des I_{sc} . C) Zur statistischen Auswertung der in A) und B) gezeigten Experimente, wurden die HD-induzierten Effekte (ΔI_{sc}) mittels des ungepaarten Student's T-Tests analysiert. Der Vergleich der ΔI_{sc} -Werte der HMR1098-behandelten ($n = 8$) und der unbehandelten Gewebe (Kontrolle; $n = 8$) zu den äquivalenten Zeitpunkten zeigte, dass sich, mit Ausnahme von zwei Datenpunkten (ns: nicht signifikant verschieden; $P > 0,05$), alle Werte signifikant voneinander unterschieden ($P < 0,05$). Abbildung verändert nach Richter *et al.* (2014).

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass es innerhalb der 30-minütigen zyklischen HD-Applikation in den Kontrollmessungen (ohne HMR1098) zu einem signifikanten Anstieg des Grundstroms von $30,95 \pm 3,78 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $46,42 \pm 4,32 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ kam (Abb. 24 A und C; $P < 0,01$). Auch in Anwesenheit von HMR1098 ($60 \mu\text{M}$; apikal) konnte eine signifikante Erhöhung des Grundstroms von $32,5 \pm 4,35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $40,64 \pm 5,06 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ innerhalb der periodischen HD-Applikation detektiert werden (Abb. 24 B und C; $P < 0,01$). Für den statistischen Vergleich wurden delta-Werte des Grundstroms ($\Delta I_{\text{Grundstrom}}$) aus der Differenz des I_{SC} vor der ersten HD-Applikation zu dem I_{SC} nach der 30-minütigen zyklischen HD-Applikation gebildet (Abb. 24 C). Die Analyse ergab, dass HMR1098 den HD-induzierten Anstieg des Grundstroms signifikant inhibierte (Kontrolle: $\Delta I_{\text{Grundstrom}} = 15,47 \pm 2,33 \mu\text{A}$; HMR1098: $\Delta I_{\text{Grundstrom}} = 8,14 \pm 1,36 \mu\text{A}$; Abb. 24 C; $P < 0,05$).

Zusammenfassend konnte mit diesen Ergebnissen gezeigt werden, dass der HD-induzierte Effekt und dementsprechend die Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle über einen längeren Zeitraum (30 min) wiederholbar ist und demnach keiner Desensitivierung unterlag (Abb. 23). Die HD-induzierte K_{ATP} -Kanal Aktivierung konnte zudem während der zyklischen HD-Applikation über den gesamten Zeitraum durch HMR1098 inhibiert werden (Abb. 23). Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die zyklische HD-Applikation eine generelle Veränderungen in den transepithelialen Ionentransportprozessen bewirkt, da eine signifikante Erhöhung des Grundstroms zu beobachten war (Abb. 24).

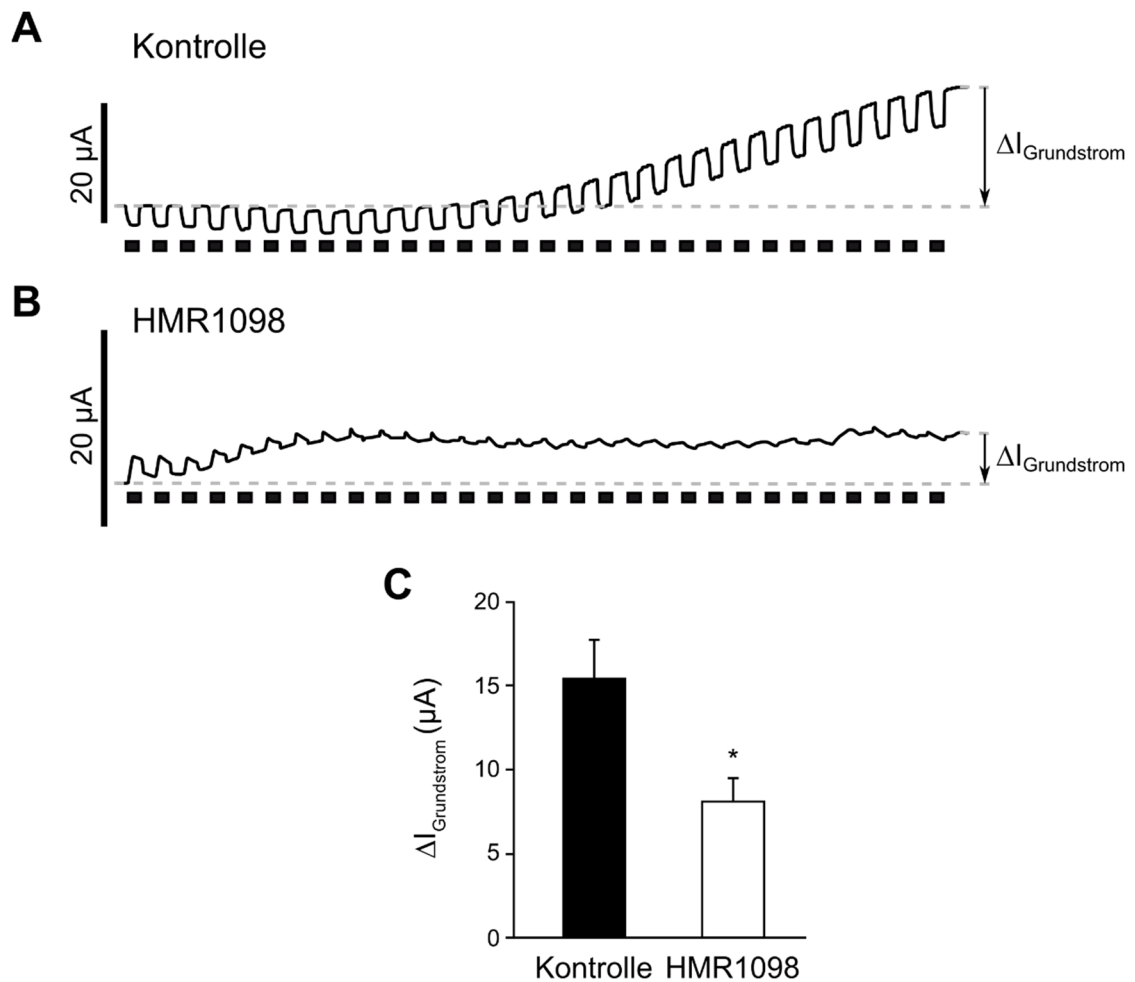


Abb. 24: Wirkung von periodischer HD-Applikation auf den Grundstrom.

A) Die periodische Applikation von HD in 30 sec Intervallen (schwarze Balken) führte über einen Zeitraum von 30 min unter Kontrollbedingungen (Kontrolle; ohne Pharmakon) zu einer Erhöhung des Grundstroms. B) Identischer Versuchsablauf wie in A) beschrieben, jedoch in Anwesenheit des K_{ATP} -Kanal Inhibitors HMR1098 (60 μ M; apikal). Innerhalb der 30-minütigen periodischen HD-Applikation kam es zu einer leichten Erhöhung des Grundstroms. C) Zur statistischen Auswertung der in A) und B) gezeigten Experimente, wurden die HD-induzierten Effekte auf den Grundstrom ($\Delta I_{Grundstrom}$) mittels des ungepaarten Student's T-Test analysiert. Der Vergleich der $\Delta I_{Grundstrom}$ -Werte der HMR1098-behandelten ($n = 8$) und der unbehandelten Gewebe (Kontrolle; $n = 8$) zeigte, dass HMR1098 den HD-induzierten Anstieg des Grundstroms signifikant inhibierte (* $P < 0,05$).

3.1.2.2 Messungen von extrazellulärem ATP unter periodischer HD-Applikation

In den vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die HD-induzierte Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle: a) indirekt durch eine HD-induzierte ATP-Freisetzung über Pannexin- und Connexin-Hemikanäle erfolgt (siehe 3.1.1.2 und 3.1.1.3); b) über einen

längeren Zeitraum (30 min) wiederholbar ist und keiner Desensitivierung unterliegt (siehe 3.1.2.1). Basierend auf der Hypothese der indirekten K_{ATP} Kanal Aktivierung sollte im Folgenden untersucht werden, ob die HD-induzierte ATP-Freisetzung auch über einen längeren Zeitraum (30 min) unter der zyklischen Applikation von HD nachweisbar ist.

Zu diesem Zweck wurden identische Messungen wie in Abb. 23 A dargestellt durchgeführt. Während dieser Messungen wurde die aus dem apikalen Kompartiment austretende Perfusions-Lösung vor der Applikation von HD (0 cm Flüssigkeitssäule), sowie direkt nach der Erhöhung der Flüssigkeitssäule (5 cm Flüssigkeitssäule) gesammelt. Alle Messungen fanden unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) statt. Die Probenentnahme erfolgte zu vier verschiedenen Zeitpunkten: bei der 1. (HD 1), 10. (HD 10), 20. (HD 20) und 30. (HD 30) Applikation von HD. Anschließend wurde die Lichtemission der Proben mittels des Lumineszenz-Assays (siehe Material und Methoden 2.4) bestimmt. Wie in den vorherigen ATP-Konzentrationsmessungen (siehe 3.1.1.3) wurden für die statistische Analyse die gemessenen Lichtemissionswerte der "0 cm Flüssigkeitssäule" Proben mit den "5 cm Flüssigkeitssäule" Proben verglichen. Ein Anstieg der Lichtemissions-Werte war gleichzusetzen mit einer Erhöhung der $[ATP]_e$ und demnach mit einer ATP-Freisetzung aus den Epithelzellen.

Die erste Applikation von HD resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Lichtemission von $19,25 \pm 2,36$ auf $47,63 \pm 8,58$ (HD1; Abb. 25; $P < 0,01$). In den Proben der 10. HD-Applikation konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Lichtemission von $36,38 \pm 11,75$ auf $44,88 \pm 12,48$ festgestellt werden (HD10; Abb. 25; $P < 0,05$). Die 20. HD-Applikation hingegen resultierte in einer leichten, aber nicht signifikanten Erhöhung der Lichtemission (HD20; Abb. 25; 0 cm Flüssigkeitssäule = $35,75 \pm 11,8$; 5 cm Flüssigkeitssäule = $40,0 \pm 14,12$; $P > 0,05$). Bei der 30. HD-Applikation kam es erneut zu einem signifikanten Anstieg der Lichtemission von $25,13 \pm 3,73$ auf $33,88 \pm 4,89$ (HD30; Abb. 25; $P < 0,05$).

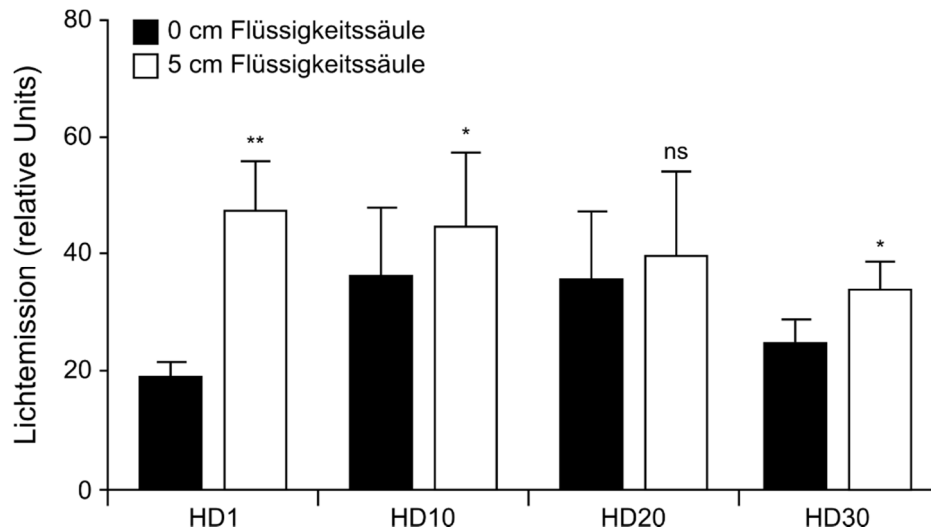


Abb. 25: Wiederholbarkeit der HD-induzierten ATP-Freisetzung.

In Ussing-Kammer Messungen wurden Präparate des pulmonalen Epithels von *X. laevis* einer periodischen HD-Applikation in 30 sec Intervallen über einen Zeitraum von 30 min ausgesetzt (Stromspur nicht gezeigt; identische Experimente wie in Abb. 23 A gezeigt). Alle Messungen fanden unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmaka) statt. Bei der 1. (HD 1), 10. (HD 10), 20. (HD 20) und 30. (HD 30) Applikation von HD wurden Proben der austropfenden Perfusions-Lösung (apikales Kompartiment der Ussing-Kammer) vor (0 cm Flüssigkeitssäule) und unter (5 cm Flüssigkeitssäule) HD-Applikation gesammelt. Die Proben wurden mittels eines Lumineszenz-Assays auf relative Änderungen der Lichtemission überprüft. Eine Erhöhung der Lichtemissions-Werte war dabei gleichzusetzen mit einem Anstieg der extrazellulären ATP-Konzentration ($[ATP]_e$) und demnach einer Freisetzung von ATP aus den Epithelzellen. Mit Ausnahme der 20. HD Applikation (HD20; n = 8; ns: nicht signifikant verschieden; $P > 0,05$), zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Lichtemissions-Werte in Folge der Applikation von HD (n = 8; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). Abbildung verändert nach Richter *et al.* (2014).

Anhand dieser Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die HD-induzierte ATP-Freisetzung im pulmonalen Epithel von *X. laevis* auch über einen längeren Zeitraum wiederholbar war. Lediglich in den HD20 Proben konnte kein signifikanter Anstieg der Lichtemission detektiert werden. Dies ist vermutlich auf die hohen SEM Werte der Messungen zurückzuführen (siehe Abb. 25). In den HD30 Proben kam es hingegen erneut zu einem signifikanten Anstieg der Lichtemission. Zusammenfassen unterstützen die hier gezeigten Ergebnisse eine indirekte K_{ATP} Kanal Aktivierung in Folge einer HD-induzierten ATP-Freisetzung.

3.1.2.3 Charakterisierung der unter zyklischer HD-Applikation auftretenden Erhöhung des Grundstroms

Wie unter 3.1.2.1 beschrieben, konnte in Ussing-Kammer Messungen ein Anstieg des Grundstroms in Folge der zyklischen HD-Applikation detektiert werden (siehe Abb. 24). Das pulmonale Epithel von *X. laevis* zählt zu den Na⁺-absorbierenden Epithelien (Hollenhorst *et al.* 2011). Dabei ist der größte Teil des transepithelialen Stroms Amilorid-sensitiv, bedingt durch die apikal lokalisierten ENaCs (Berk *et al.* 2004). Eine mögliche Erklärung für die unter zyklischer HD-Applikation aufgetretene Erhöhung des Grundstroms, könnte eine Steigerung der Na⁺-Leitfähigkeiten, z.B. durch den Einbau neuer ENaCs in die apikale Membran der Epithelzellen, sein.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in Ussing-Kammer Messungen nach dem Erreichen eines stabilen Stromplateaus zunächst der Amilorid-sensitive Strom (ΔI_{Amil}) bestimmt. Dadurch konnte eine Aussage über die ENaC-abhängige Na⁺ Absorption des Epithels getroffen werden. Die apikale Applikation von 10 μM Amilorid resultierte in einem signifikanten Abfall des I_{SC} von $31,58 \pm 3,96 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $4,17 \pm 2,27 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 26 A und B; $P < 0,01$). Anschließend wurde das Amilorid wieder ausgewaschen. Nachdem sich ein stabiler Stromwert eingestellt hatte, wurde über einen Zeitraum von 30 min HD in 30 sec Intervallen (vgl. Ergebnisse 3.1.2.1) auf das Epithel appliziert (Abb. 26 A). Nach Beendigung der zyklischen HD-Applikation wurde direkt Amilorid (10 μM ; apikal) appliziert, wodurch es zu einem Stromabfall von $45,03 \pm 8,44 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $8,67 \pm 5,42 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ kam (Abb. 26 A; $P < 0,01$).

In parallel durchgeführten Kontrollexperimenten wurde ebenfalls zu Beginn der Messungen der ΔI_{Amil} durch die apikale Applikation von 10 μM Amilorid bestimmt (Abb. 26 A und B). Es wurde ein Amilorid-induzierter Abfall des I_{SC} von $23,33 \pm 1,74 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $3,75 \pm 2,34 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ detektiert (Abb. 26 A und B; $P < 0,01$). Nach dem anschließenden Auswaschen von Amilorid, wurde das Epithel für weitere 30 min mit NRS perfundiert (Abb. 26 A). Diese Zeit war äquivalent zu der 30-minütigen zyklischen HD-Applikation. Im Anschluss daran wurde erneut Amilorid (10 μM ; apikal) appliziert, wodurch es zu einem signifikanten Stromabfall von $22,09 \pm 1,26 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $3,74 \pm 2,01 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ kam (Abb. 26 A; $P < 0,01$).

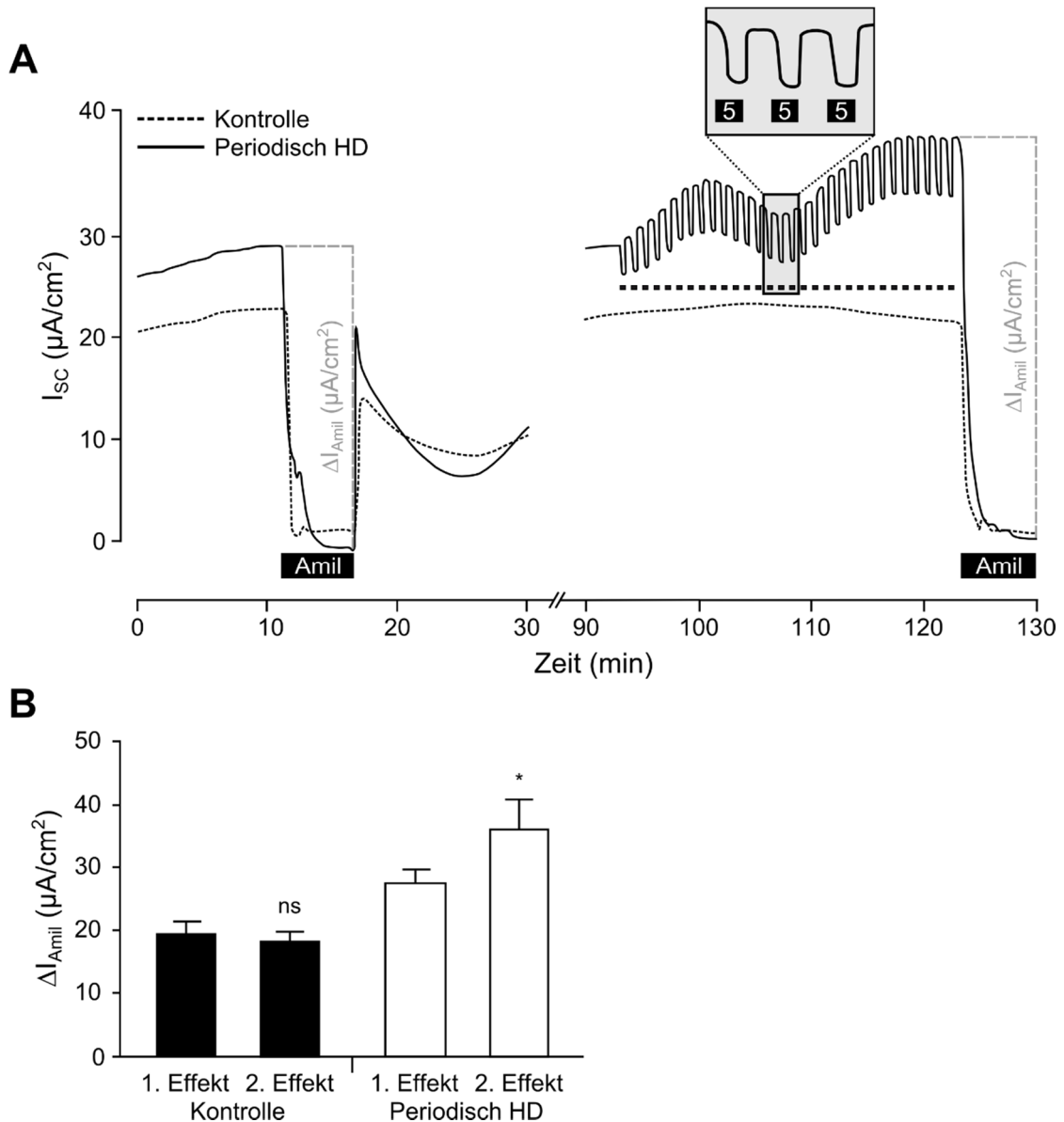


Abb. 26: Einfluss von zyklischer HD-Applikation auf den Amilorid-sensitiven Strom.

A) In allen Messungen wurde zunächst der Amilorid-sensitive Strom (ΔI_{Amil}) durch die apikale Applikation von Amilorid (schwarzer Balken; 10 μM) bestimmt. Anschließend wurde Amilorid wieder ausgewaschen. Nachdem sich ein neues Stromplateau eingependelt hatte, wurde das Epithel entweder für weitere 30 min mit NRS perfundiert (Kontrolle; gestrichelte Linie; ohne HD-Applikation), oder für 30 min einer periodischen HD-Applikation (Periodisch HD; durchgezogene Linie; HD in 30 sec Intervallen) ausgesetzt. Abschließend erfolgte erneut die Bestimmung des ΔI_{Amil} . B) Zur statistischen Analyse wurden die ΔI_{Amil} Effekte (1. und 2. Effekt) miteinander verglichen. Die ΔI_{Amil} Effekte in den Kontroll-Experimenten (Kontrolle) zeigten keinen signifikanten Unterschied ($n = 6$; ns: nicht signifikant verschieden; $P > 0,05$). Im Gegensatz dazu war der ΔI_{Amil} nach der periodischen HD-Applikation (2. Effekt; Periodisch HD) signifikant höher im Vergleich zu dem ΔI_{Amil} vor der HD-Applikation (1. Effekt; $n = 10$; * $P < 0,05$).

Zur statistischen Analyse wurden die in den beiden Messreihen (Abb. 26 A) aufgezeichneten ΔI_{Amil} Werte miteinander verglichen (Abb. 26 B). In den Kontroll-Experimenten (ohne zyklische HD-Applikation) unterschieden sich der erste ΔI_{Amil} Effekt (1. Effekt: $\Delta I_{\text{Amil}} = 19,59 \pm 1,98 \mu\text{A}$) nicht signifikant von dem zweiten ΔI_{Amil} (2. Effekt: $\Delta I_{\text{Amil}} = 18,35 \pm 1,41 \mu\text{A}$; Abb. 26 B; $P > 0,05$). Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleich der ΔI_{Amil} Werte vor (1. Effekt) und nach (2. Effekt) der zyklischen HD-Applikation hingegen einen signifikanten Unterschied (Periodisch HD; 1. Effekt: $\Delta I_{\text{Amil}} = 27,41 \pm 2,35 \mu\text{A}$; 2. Effekt: $\Delta I_{\text{Amil}} = 36,36 \pm 4,66 \mu\text{A}$; Abb. 26 B; $P < 0,05$). Demnach wurde durch die periodische HD-Applikation ein signifikanter Anstieg des ΔI_{Amil} induziert. Anhand der Ergebnisse konnte in dieser Arbeit eine Erhöhung der Na^+ Absorption im pulmonalen Epithel von *X. laevis* in Folge einer zyklischen Dehnung des Epithels aufgezeigt werden.

3.1.3 Beteiligung von basolateralen K^+ Kanälen an dem HD-induzierten Effekt

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung einer etwaigen Beteiligung von basolateralen K^+ Kanälen an dem HD-induzierten Effekt. Eine Möglichkeit, um die basolaterale Membran von Epithelien in Ussing-Kammer Messungen isoliert zu untersuchen, stellt die Permeabilisierung der apikalen Membran mittels eines Porenbildners dar. In Folge dessen können Ionen ungehindert die apikale Membran passieren, während die basolaterale Membran weiterhin als eine Barriere fungiert. Somit können die Ionentransport-Prozesse über die basolaterale Membran isoliert detektiert werden (Ilek *et al.* 1990).

Der in dieser Arbeit durchgeführte Permeabilisierungs-Vorgang ist schematisch in Abb. 27 A dargestellt. Wie bereits unter Material und Methoden 2.3.1 beschrieben konnte direkt nach dem Klemmen des Epithels auf 0 mV mit dem Permeabilisierungs-Vorgang begonnen werden. Das Epithel wurde zunächst apikal mit Hoch K^+ (siehe Material und Methoden 2.6, Tabelle 2) perfundiert. Dadurch wurde ein K^+ -Konzentrationsgradient (Hoch K^+ apikal \rightarrow NRS basolateral) über dem Epithel erzeugt. Die apikale Perfusion mit Hoch K^+ resultierte in einem Abfall des I_{SC} von $20,17 \pm 1,28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (NRS) auf $10,12 \pm 0,86 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Hoch K^+ ; Abb. 27 A und B; $P < 0,01$). Als Porenbildner wurde das Pharmakon Nystatin verwendet (Wills *et al.* 1996; Schultheiss & Diener 1997; Lehr 2002). Nystatin-Poren sind permeabel für Ionen und alle Teilchen, die nicht größer als Glukose sind (Holz & Finkelstein 1970).

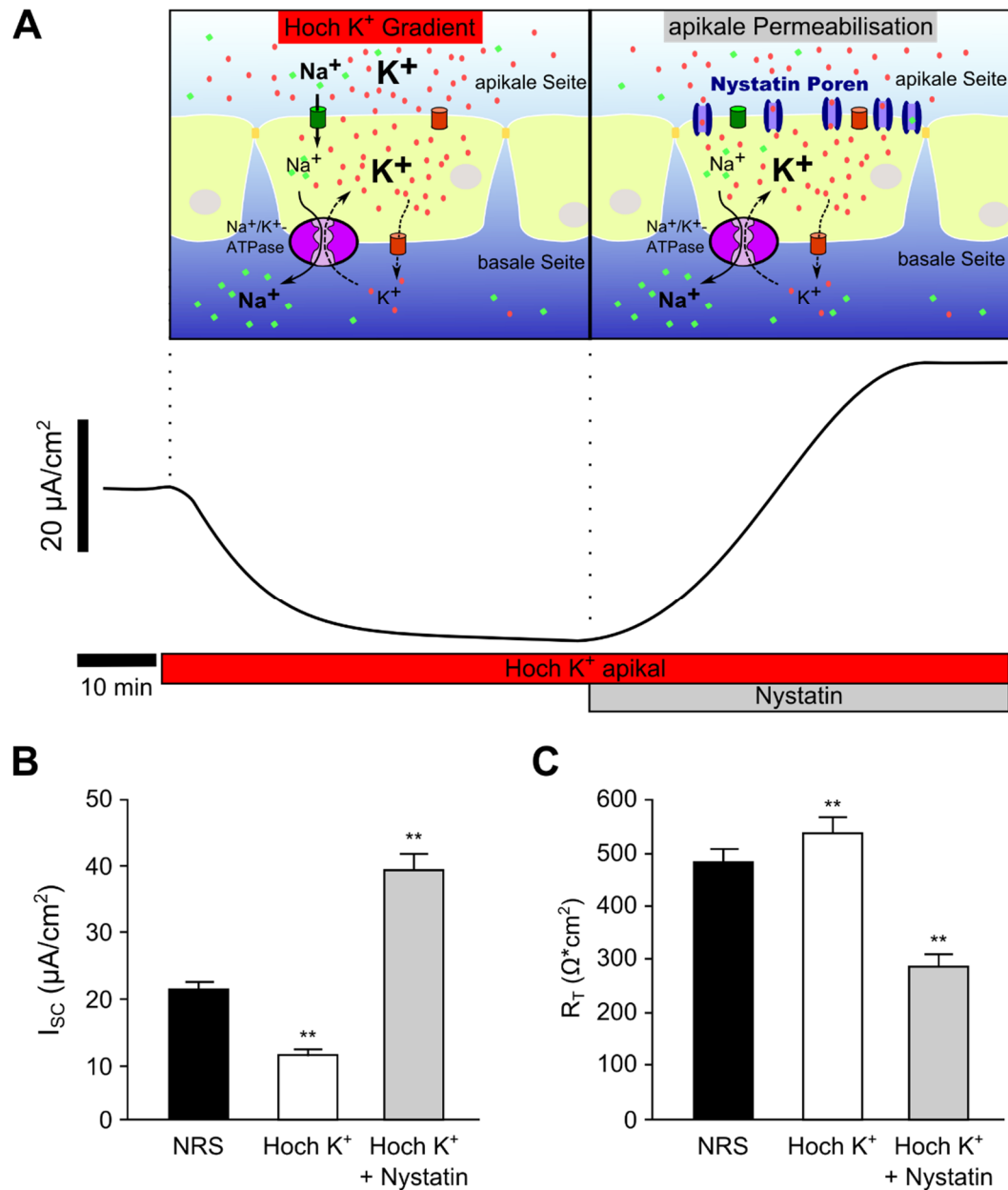


Abb. 27: Permeabilisierung der apikalen Membran am pulmonalen Epithel von *X. laevis*.

Schematische Darstellung des Permeabilisierungs-Prozesses der apikalen Membran (A) sowie die statistische Auswertung der Änderungen im I_{sc} (B) und im transepithelialen Widerstand (R_T) des Epithels (B). Zunächst wurde ein K^+ Gradient (apikal Hoch K^+ \rightarrow basolateral NRS) über dem Epithel generiert mittels einer apikalen Perfusion mit Hoch K^+ -Ringer (100 mM Na^+ gegen K^+ ausgetauscht). Dies resultierte in einem Abfall des I_{sc} sowie in einem leichten Anstieg des R_T ($n = 59$; $**P < 0,01$). Anschließend wurde der Porenbildner Nystatin (75 μM ; gelöst in Hoch K^+) apikal appliziert, welcher unselektive Poren in der apikalen Membran bildet. Aufgrund der Nystatin-induzierten Porenbildung kam es zu einem signifikanten Anstieg des I_{sc} und einer deutlichen Abnahme des R_T ($n = 59$; $**P < 0,01$). Die Nystatin-induzierte Abnahme des R_T war ein Indiz für eine erfolgreiche Permeabilisierung des Epithels.

Nystatin (75 μM) wurde in Hoch K^+ gelöst und apikal auf das Epithel appliziert. In Folge dessen kam es im Einklang mit einem erhöhten K^+ -Strom von apikal nach basolateral zu einem signifikanten Stromanstieg auf $38,95 \pm 2,36 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Nystatin + Hoch K^+ ; Abb. 27 B; $P < 0,01$).

Der Permeabilisierungs-Vorgang hatte eine signifikante Auswirkung auf den R_T des Epithels. Während die Applikation von Hoch K^+ zu einem Anstieg des R_T von $484,11 \pm 23,74 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (NRS) auf $541,25 \pm 29,65 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Hoch K^+) führte, kam es unter zusätzlicher Applikation von Nystatin zu einem signifikanten Abfall auf $288,84 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Nystatin + Hoch K^+ ; Abb. 27 C; $P < 0,01$). Die Abnahme des R_T und der Anstieg des I_{SC} sprechen für eine Permeabilisierung der apikalen Membran des Epithels in Folge der Bildung der Nystatin-Poren (Lehr 2002).

In den nachfolgenden Experimenten wurden alle als "apikal permeabilisiert" bezeichneten Epithelien nach diesem beschriebenen Permeabilisierungs-Protokoll behandelt. Erst dann wurde mit den eigentlichen Versuchen, d.h. Applikation von HD in An- oder Abwesenheit verschiedener Pharmaka, begonnen.

3.1.3.1 Einfluss von HD auf den I_{SC} am apikal permeabilisierten Epithel

Im Anschluss an die apikale Permeabilisierung des Epithels wurde der Einfluss von HD auf den I_{SC} untersucht. Die Erhöhung der Flüssigkeitssäule (5 cm; für 10 min) resultierte in einem signifikanten Anstieg des I_{SC} von $28,0 \pm 3,84 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $38,85 \pm 4,88 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 28 A; $P < 0,01$). Nach Absenken der Flüssigkeitssäule fiel der I_{SC} wieder ab und bildete ein neues Plateau aus. Anschließend erfolgte eine erneut HD-Applikation. Dies führte zu einem signifikanten Anstieg des I_{SC} von $33,89 \pm 5,06 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $38,69 \pm 5,06 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 28 A; $P < 0,01$). Der statistische Vergleich der normalisierten HD-induzierten Effekte ($I_{5 \text{ cm}} / I_{0 \text{ cm}}$) zeigte, dass die HD-induzierte Stromstimulation wiederholbar war (Abb. 28 B). Dabei war die zweite HD-induzierte Stromstimulation (2. Effekt) jedoch signifikant kleiner, im Vergleich zu dem 1. Effekt (1. Effekt: $I_{5 \text{ cm}} / I_{0 \text{ cm}} = 1,48 \pm 0,03$; 2. Effekt: $I_{5 \text{ cm}} / I_{0 \text{ cm}} = 1,2 \pm 0,04$; Abb. 28 B; $P < 0,01$).

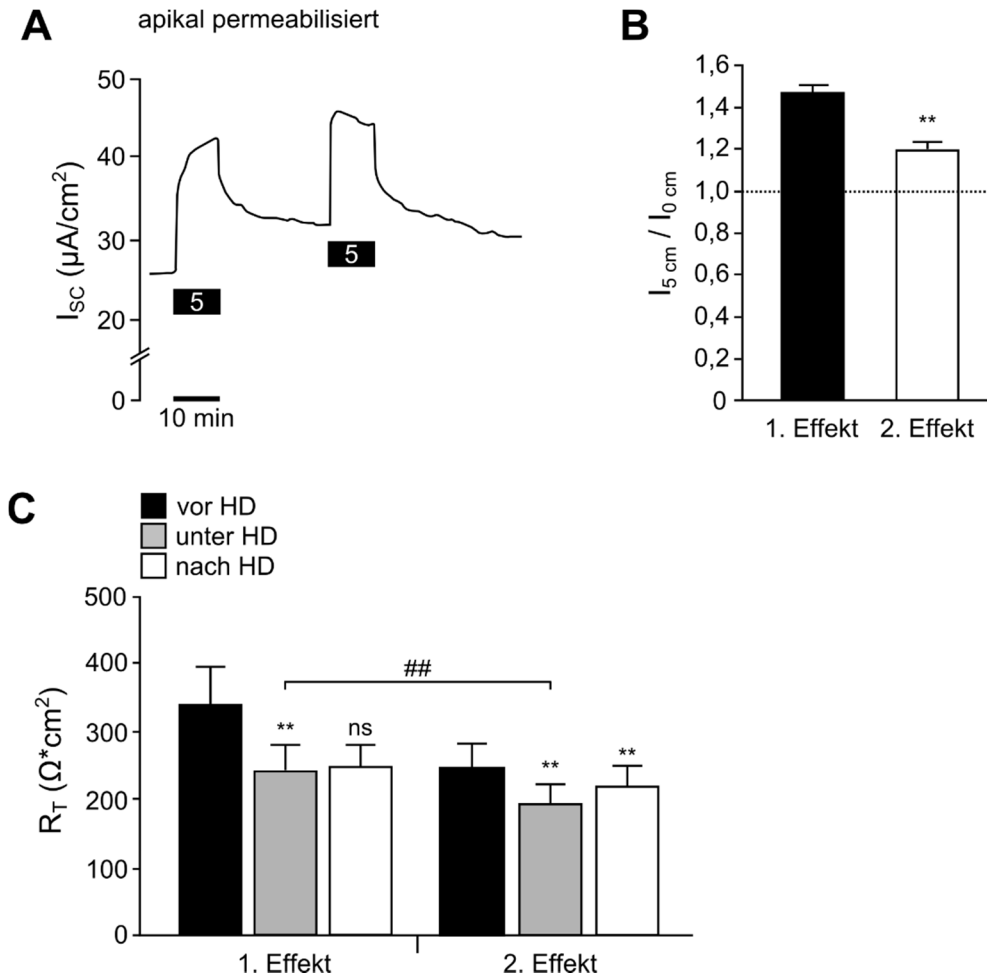


Abb. 28: Der HD-induzierte Effekt am apikal permeabilisierten Epithel.

A) Repräsentative Stromkurve. Die Applikation von HD (schwarzer Balken) auf ein apikal permeabilisiertes Epithel resultierte in einer Stromstimulation. Die HD-induzierte Stromstimulation war teilweise reversibel und wiederholbar. B) Statistische Auswertung der in A) dargestellten Experimente. Der Vergleich der HD-induzierten Effekte ($I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}}$) zeigte, dass die 1. HD Applikation zu einer signifikant höheren Stromstimulation führte (1. Effekt) als die wiederholte HD-Applikation (2. Effekt; $n = 11$; $**P < 0,01$). C) Die erste Applikation von HD (1. Effekt) führte zu einer signifikanten Abnahme des transepithelialen Widerstands (R_T ; $n = 11$; $**P < 0,01$). Die Wegnahme der HD (nach HD) zeigte hingegen keinen Effekt auf den R_T (ns: nicht signifikant verschieden; $P > 0,05$). Auch bei der 2. HD Applikation (2. Effekt) zeigte sich eine HD-induzierte Abnahme des R_T (2. Effekt unter Druck; $n = 11$; $**P < 0,01$). Der R_T stieg nach Wegnahme des HD (nach Druck) wieder signifikant an ($n = 11$; $**P < 0,01$). Die R_T Werte des 1. Effekts und 2. Effekts unter HD unterschieden sich signifikant voneinander ($n = 11$; $##P < 0,01$).

Die statistische Auswertung des während der Messungen detektierten R_T -Werte ergab, dass die erste Applikation von HD in einer Abnahme des R_T von $340,4 \pm 53,88 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (vor HD) auf $244,55 \pm 36,72 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (unter HD) resultierte (1. Effekt; Abb. 28 C; $P < 0,01$). Dies

deutete auf eine mögliche Schädigung des Epithels in Folge der Applikation von HD hin. Wurde erneut HD auf das Epithel appliziert, so sank der R_T von $247,52 \pm 33,53 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (vor HD) signifikant auf $196,18 \pm 27,82 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (unter HD) ab (2. Effekt; Abb. 28 C; $P < 0,01$). Das anschließende Absenken der Flüssigkeitssäule auf 0 cm (nach HD) führte hingegen zu einem signifikanten Anstieg des R_T auf $219,95 \pm 28,72 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (2. Effekt, nach Druck; Abb. 28 C; $P < 0,05$). Demnach scheint das Epithel auch nach wiederholter HD-Applikation funktionsfähig zu sein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Applikation von HD auf das apikal permeabilisierte Epithel zu einer Stromstimulation führte, die auf einer mechanosensitiven Aktivierung von basolateralen K^+ -Kanälen beruhen könnte. Dies sollte nachfolgend durch die Verwendung verschiedener Inhibitoren pharmakologisch untersucht werden. Da der 1. und 2. HD-induzierte Effekt sich signifikant voneinander unterschieden (siehe Abb. 28 B), wurde in den anschließenden Experimenten die Applikation von HD unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) und in Anwesenheit eines Pharmakons immer parallel an zwei verschiedenen Präparaten durchgeführt.

3.1.3.2 Die Applikation von HD erhöht die basolaterale K^+ -Leitfähigkeit

Um zu untersuchen, ob die zuvor detektierte HD-induzierte Stromstimulation auf einer mechanosensitiven Aktivierung von basolateralen K^+ -Kanälen beruhen könnte (siehe 3.1.3.1), wurden in dieser Arbeit die unspezifischen K^+ -Kanal Inhibitoren Ba^{2+} (Ridge *et al.* 1997; Maguire *et al.* 1999) und Tetrapentylammoniumchlorid (TPeA) (Yao & Kwan 1999; Pouokam & Diener 2012) verwendet (siehe Abb. 29).

Für Ba^{2+} ist in der Literatur beschrieben, dass es in sehr hohen Konzentrationen unspezifisch K^+ -Kanäle inhibiert (Ridge *et al.* 1997; Bogdan *et al.* 2008). Auf Grund dessen wurde in dieser Arbeit eine Ba^{2+} Konzentration von 10 mM gewählt und gleichzeitig sowohl apikal als auch basolateral auf das permeabilisierte Epithel appliziert. Da Ba^{2+} als $BaCl_2$ vorlag und dies bei der eingesetzten Konzentration von 10 mM zu einer Erhöhung der Lösungsmolarität führte, wurden die Epithelien schon zu Beginn der Messungen, d.h. während des Permeabilisierungs-Prozesses, mit 30 mM Mannitol (apikal und basolateral) vorinkubiert.

Die Applikation von $BaCl_2$ (10 mM; apikal und basolateral) resultierte am permeabilisierten Epithel in einem signifikanten Abfall des I_{SC} von $54,71 \pm 10,02 \mu A/cm^2$ auf $18,38 \pm 2,66 \mu A/cm^2$ (Abb. 29 A; $P < 0,01$). Der $BaCl_2$ -induzierte Stromabfall spricht für eine Inhibition von basolateralen K^+ -Kanälen. Wurde unter diesen Bedingungen HD appliziert, so kam es zu

keiner signifikanten Änderung im I_{sc} (vor HD: $I_{sc} = 18,38 \pm 2,66 \mu A$; unter HD: $I_{sc} = 17,95 \pm 3,36 \mu A$; Abb. 29 A; $P > 0,05$). In parallelen Kontrollexperimenten, die in Anwesenheit von 30 mM Mannitol (apikal und basolateral) durchgeführt wurden, zeigte sich hingegen eine signifikante HD-induzierte Stromstimulation von $43,31 \pm 6,69 \mu A/cm^2$ auf $61,21 \pm 9,1 \mu A/cm^2$ (Abb. 29 B; $P < 0,05$).

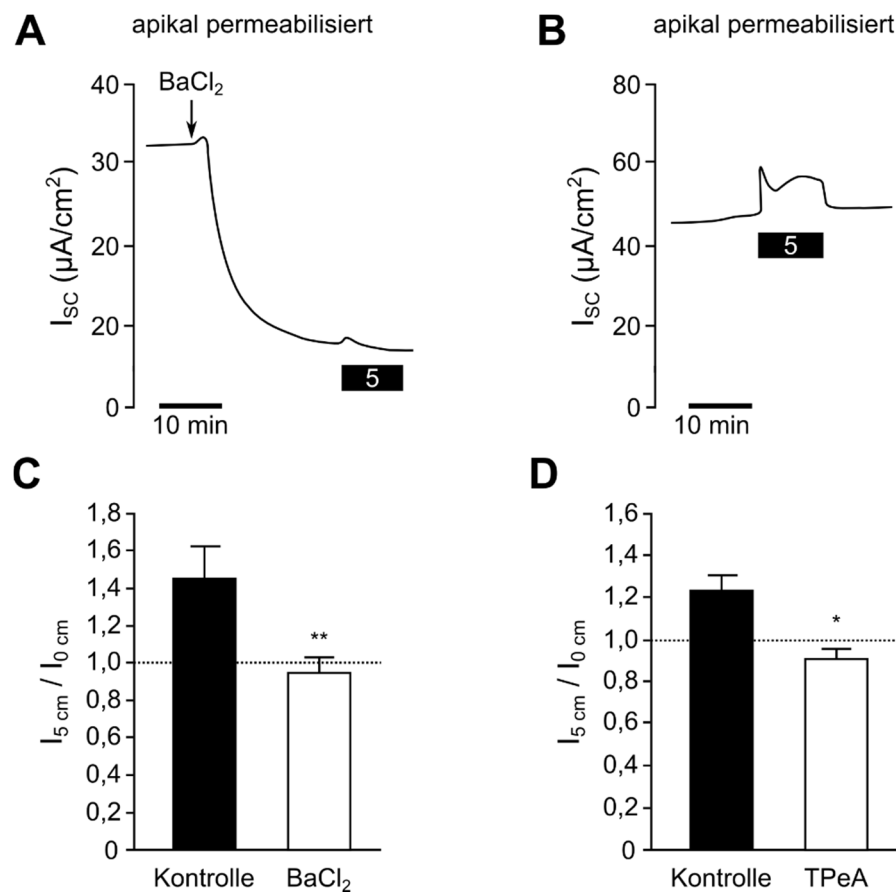


Abb. 29: Einfluss von $BaCl_2$ und TPcA auf den HD-induzierten Effekt.

A) Nach der apikalen Permeabilisierung wurde das Epithel mit 10 mM $BaCl_2$ (apikal und basolateral) inkubiert, was ein Absinken des I_{sc} zur Folge hatte. Wurde unter diesen Bedingungen HD appliziert (schwarzer Balken), zeigten sich keine Änderungen im I_{sc} . B) In parallel durchgeführten Kontrollexperimenten (ohne Pharmakon) resultierte die HD-Applikation in einer Stromstimulation. C) Der statistische Vergleich der HD-induzierten Effekte ($I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}}$) zeigten, dass die unter Kontrollbedingungen (Kontrolle) detektierte Stromstimulation durch $BaCl_2$ signifikant inhibiert wurde ($n = 7$; $**P < 0,01$; ungepaarter Student's T-Test). D) Die in A) und B) dargestellten Experimente wurden unter Verwendung des unspezifischen K^+ Kanal Inhibitors Tetrapentylammoniumchlorid (TPcA; 100 μM ; basolateral) durchgeführt. Der unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) auftretende HD-induzierte Stromanstieg wurde durch Inkubation des Epithels mit TPcA signifikant gehemmt ($n = 4$; $*P < 0,05$; ungepaarter Student's T-Test).

Die statistische Auswertung des $I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}}$ zeigte, dass BaCl_2 den Druckeffekt am apikal permeabilisierten Epithel signifikant inhibierte (Kontrolle: $I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}} = 1,46 \pm 0,17$; BaCl_2 : $I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}} = 0,96 \pm 0,08$; Abb. 29 C; $P < 0,01$). Diese Ergebnisse deuteten auf eine HD-induzierte Aktivierung von basolateralen K^+ -Kanälen hin und konnten anschließend mit dem unspezifischen K^+ -Kanal Inhibitor TPeA untermauert werden. Die unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) detektierte Stromstimulation (Kontrolle: $I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}} = 1,24 \pm 0,07$) wurde durch die basolaterale Inkubation des Epithels mit TPeA ($100\ \mu\text{M}$) signifikant gehemmt (TPeA: $I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}} = 0,91 \pm 4,67$; Abb. 29 D; $P < 0,05$). Anhand dieser Ergebnisse konnte geschlussfolgert werden, dass HD eine Aktivierung von basolateralen K^+ -Kanälen im apikal permeabilisierten Epithel von *X. laevis* induziert.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte zunächst überprüft werden, ob Connexin-Hemikanäle an diesem HD-induzierten Effekt beteiligt sind (siehe Ergebnisse 3.1.3.3). Des Weiteren sollte mittels spezifischer K^+ -Kanal Inhibitoren eine etwaige Beteiligung von 2-Poren K^+ - (K_2P) Kanälen (siehe Ergebnisse 3.1.3.4), sowie KCNQ (6 TMD) K^+ -Kanälen (siehe Ergebnisse 3.1.3.5) pharmakologisch überprüft werden.

3.1.3.3 Beteiligung von Connexin-Hemikanälen an dem HD-induzierten Effekt

In den zuvor beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die HD-induzierte Aktivierung der apikal lokalisierten K_{ATP} -Kanäle eine mechanosensitive ATP-Freisetzung über Hemikanäle voraussetzte (siehe Ergebnisse 3.1.1.2). Um eine etwaige Beteiligung von basolateral lokalisierten Connexin-Hemikanälen an dem HD-induzierten Effekt am permeabilisierten Epithel zu überprüfen, wurden Ussing-Kammer Experimente mit dem Connexin-Hemikanal Inhibitor MFA durchgeführt.

MFA ($100\ \mu\text{M}$) wurde gleichzeitig apikal und basolateral auf das permeabilisierte Epithel appliziert. In der Hälfte der durchgeführten Experimente (drei von sechs) führte dies zu einem Anstieg des I_{SC} , wohingegen in der anderen Hälfte ein MFA-induzierter Stromabfall detektiert wurde. Die statistische Auswertung aller Experimente zeigte, dass es zu einem leichten, aber nicht signifikanten Stromabfall von $45,55 \pm 7,62\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $36,63 \pm 3,44\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$ kam (Abb. 30 A; $P > 0,05$). Anschließend wurde HD in Anwesenheit von MFA appliziert. Dies resultierte in einem signifikanten HD-induzierten Anstieg des I_{SC} von $36,63 \pm 3,44\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $50,68 \pm 5,98\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 30 A; $P < 0,01$). In parallel durchgeführten Kontrollexperimenten (ohne MFA) führte die HD-Applikation ebenfalls zu einem signifikanten Stromanstieg von $41,01 \pm 8,02\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $64,34 \pm 12,12\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Stromkurve

nicht gezeigt; $P < 0,01$). Der statistische Vergleich der HD-induzierten Effekte unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) und in Anwesenheit von MFA zeigte keinen signifikanten Unterschied (Kontrolle: $I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}} = 1,57 \pm 0,12$; MFA: $I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}} = 1,37 \pm 0,05$; Abb. 30 B; $P > 0,05$).

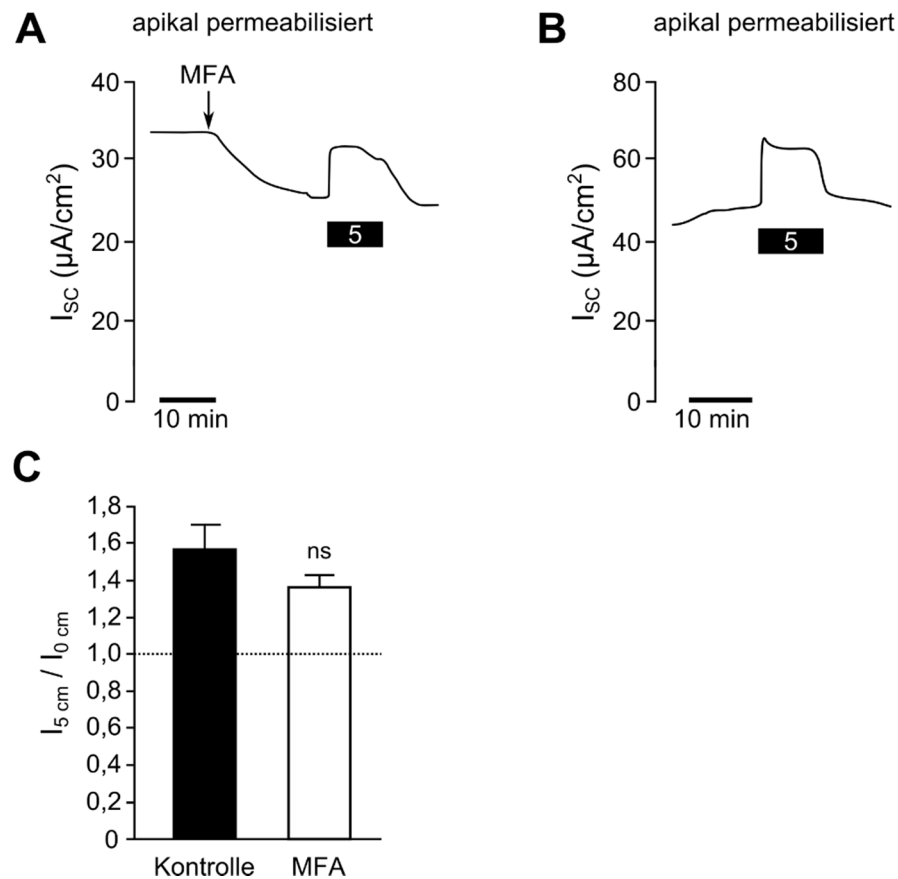


Abb. 30: Einfluss des Connexin-Hemikanal Inhibitors MFA auf den HD-Effekt am apikal permeabilisiertem Epithel.

A) In Folge der Applikation von MFA (100 μM ; apikal und basolateral) auf das permeabilisierte Epithel kam es zu einem Stromabfall. Die anschließende Erhöhung der Flüssigkeitssäule auf 5 cm (schwarzer Balken) führte zu einem Anstieg des I_{sc} . B) Auch in den parallel zu A) durchgeführten Kontrollexperimenten (ohne Pharmakon) konnte eine HD-induzierte Stromstimulation detektiert werden. C) Die statistische Analyse der HD-induzierten Effekte ($I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}}$), zeigte keinen signifikanten Einfluss von MFA auf den Druckeffekt ($n = 5$; ns: nicht signifikant verschieden; $P > 0,05$; ungepaarter Student's T-Test).

Da in diesen Untersuchungen kein Einfluss von MFA auf den HD-induzierten Effekt festgestellt wurde (siehe Abb. 30), lässt sich eine Beteiligung von basolateralen Connexin-Hemikanälen folglich ausschließen. Die Ergebnisse sprechen jedoch dafür, dass die apikale Permeabilisierung in dieser Arbeit erfolgreich war, da im unbehandelten (nicht-permeabilisierten) Epithel eine eindeutige Beteiligung von Hemikanälen an dem HD-induzierten Effekt nachgewiesen werden konnte (siehe Ergebnisse 3.1.1.2).

3.1.3.4 Beteiligung von 2-Poren K⁺-Kanälen an dem HD-induzierten Effekt

Mitglieder der K₂P Kanal Familie wurden bereits in Zelllinien aus humanen Atemwegsepithelien auf mRNA-Ebene nachgewiesen und können in der apikalen und basolateralen Membran lokalisiert sein (Davis & Cowley 2006; Inglis *et al.* 2007). Ein bekannter Inhibitor dieser K₂P Kanäle ist das Pharmakon Lidocain (Patel *et al.* 2013; Bruner *et al.* 2014).

Lidocain wurde nach dem apikalen Permeabilisierungs-Vorgang in einer Konzentration von 1 mM basolateral auf das pulmonalen Epithel von *X. laevis* appliziert. Dies führte zu einem Abfall des I_{SC} von $41,25 \pm 11,84 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $19,88 \pm 5,56 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 31 A; $P < 0,05$). Wurde unter diesen Bedingungen die Flüssigkeitssäule auf 5 cm erhöht, so kam es zu einer HD-induzierten Stromstimulation auf $27,33 \pm 7,36 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 31 A; $P < 0,05$). In parallel dazu durchgeführten Kontrollexperimenten (ohne Lidocain), zeigte sich ebenfalls eine HD-induzierte Stromstimulation (Stromkurve nicht gezeigt), welche sich nicht signifikant von dem HD-induzierten Effekt unter Lidocain unterschied (Abb. 31 B; $P > 0,05$). Der normalisierte HD-induzierte Effekt unter Kontrollbedingungen betrug $I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}} = 1,23 \pm 0,17$, in Anwesenheit von Lidocain $I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}} = 1,4 \pm 0,09$ (Abb. 31 B; $P > 0,05$).

Da Lidocain keinen Einfluss auf den HD-induzierten Effekt zeigte, konnte eine Beteiligung der K₂P Kanäle ausgeschlossen werden.

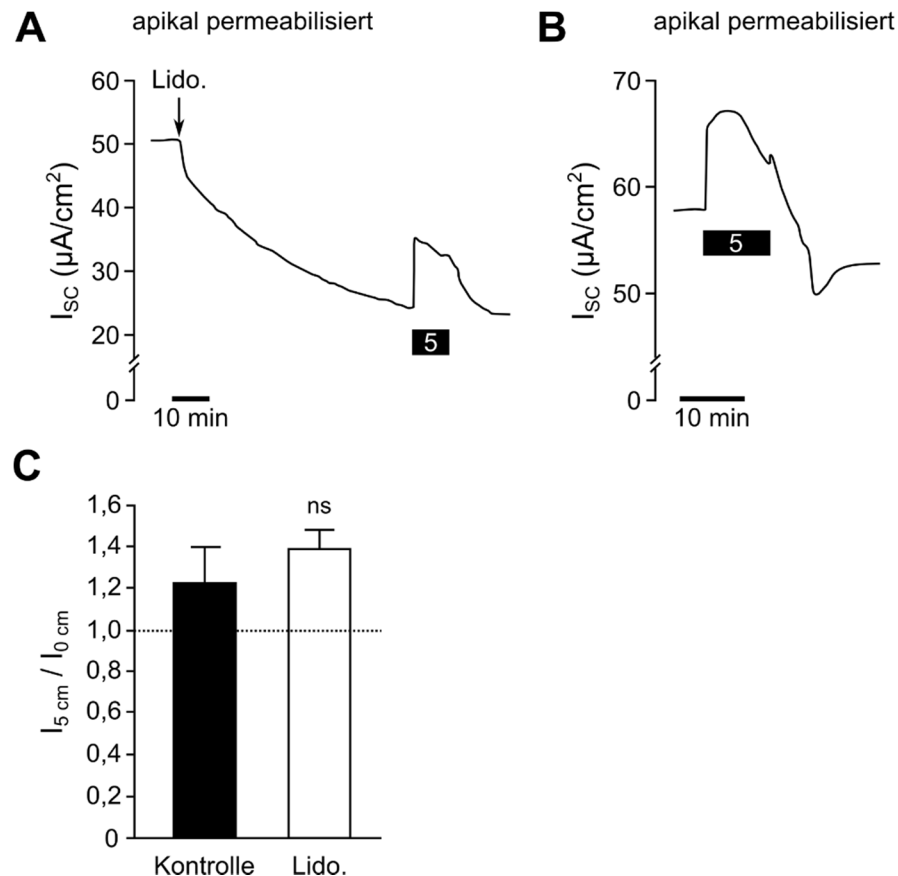


Abb. 31: Beteiligung von 2-Poren K^+ -Kanälen an dem HD-induzierten Effekt.

A) Zunächst wurde das apikal permeabilisierte Epithel mit dem bekannten 2-Poren K^+ -Kanal Inhibitor Lidocain (1 mM; basolateral) inkubiert. Dies führte zu einem Abfall des I_{sc} . Anschließend wurde HD (schwarzer Balken) appliziert, wodurch es zu einem Stromanstieg kam. B) Ein HD-induzierter Stromanstieg konnte auch in parallel durchgeführten Kontrollmessungen (ohne Pharmakon) detektiert werden. C) Die HD-induzierten Effekte ($I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}}$) wurden durch die Anwesenheit von Lidocain nicht beeinflusst ($n = 6$; ns: nicht signifikant verschieden; $P > 0,05$; ungepaarter Student's T-Test).

3.1.3.5 Beteiligung von KCNQ K^+ -Kanälen an dem HD-induzierten Effekt

KCNQ K^+ -Kanäle sind Spannungs-abhängige K^+ -Kanäle (K_v) und zählen zur Gruppe der 6 TMD K^+ -Kanälen (Robbins 2001; Bardou *et al.* 2009). Eine Vielzahl von Subtypen der KCNQ K^+ -Kanäle konnte bereits sowohl apikal als auch in der basolateralen Membran von verschiedenen pulmonalen Zelllinien detektiert werden (Moser *et al.* 2008). Um eine Beteiligung der KCNQ K^+ -Kanäle an dem HD-induzierten Effekt zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit der generelle KCNQ K^+ -Kanal Inhibitor XE991 verwendet (Robbins 2001; Moser *et al.* 2008).

Die basolaterale Applikation von XE991 (100 μM) auf das permeabilisierte Epithel resultierte in einem signifikanten Abfall des I_{SC} von $42,33 \pm 5,79 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $27,02 \pm 3,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 32 A; $P < 0,01$). Dies deutete auf eine XE991-induzierte Hemmung basolateraler K^+ -Leitfähigkeiten hin. Anschließend wurde in Anwesenheit von XE991 HD appliziert. Es kam in Folge dessen zu keiner signifikanten Änderung des I_{SC} ($I_{\text{SC}} = 27,26 \pm 2,97 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; Abb. 32 A; $P > 0,05$).

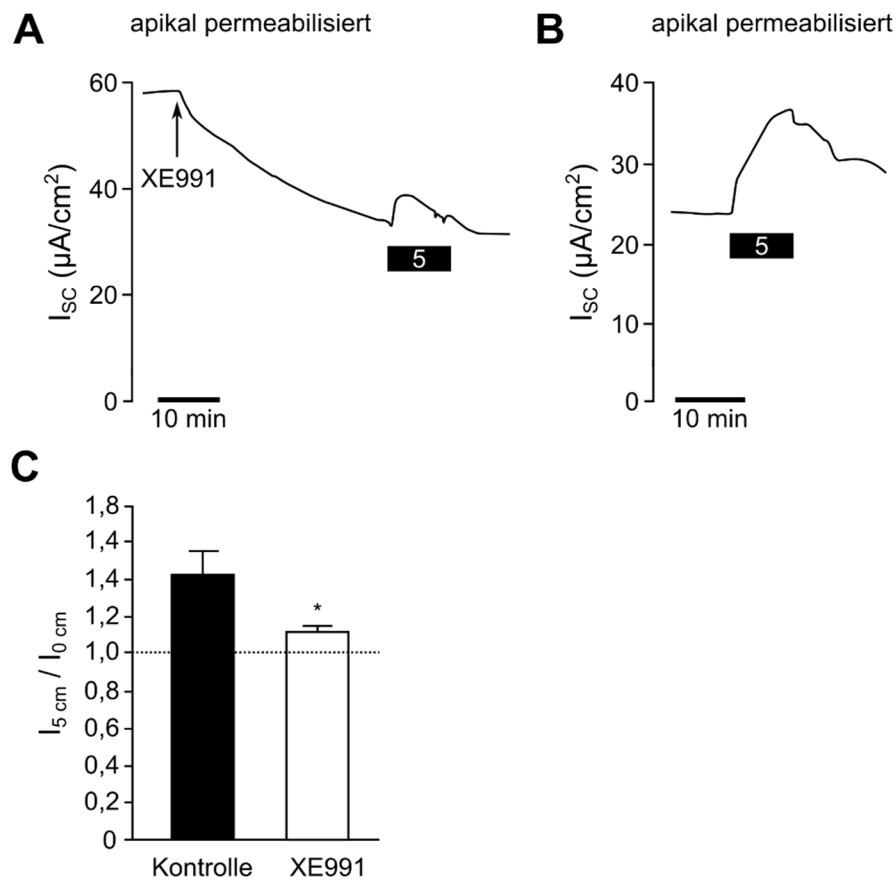


Abb. 32: Beteiligung von KCNQ K^+ Kanälen an dem HD-induzierten Effekt am apikal permeabilisierten Epithel.

A) Die basolaterale Inkubation des Epithels mit dem KCNQ-Kanal Inhibitor XE991 (100 μM) führte zu einem Abfall des Stroms. Wurde unter diesen Bedingungen HD (schwarzer Balken) appliziert, so kam es zu leichten Schwankungen im I_{SC} . B) Eine HD-induzierte Stromstimulation wurde in Kontrollexperimenten (ohne Pharmakon) detektiert. C) Die statistische Auswertung ergab, dass XE991 die HD-induzierte Stromstimulation (Kontrolle) signifikant hemmte ($n = 7$; $*P < 0,05$; ungepaarter Student's T-Test).

Im Gegensatz dazu zeigte sich in den parallel durchgeführten Kontrollexperimenten (Kontrolle; ohne XE991) ein HD-induzierter Stromanstieg von $31,11 \pm 6,67 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $38,82 \pm 6,21 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Stromkurve nicht gezeigt; $P < 0,05$). Der statistische Vergleich der HD-induzierten Effekte zeigte, dass XE991 die HD-induzierte Stromstimulation signifikant inhibierte (Kontrolle: $I_{5 \text{ cm}} / I_{0 \text{ cm}} = 1,36 \pm 0,14$; XE991: $I_{5 \text{ cm}} / I_{0 \text{ cm}} = 1,04 \pm 0,03$; Abb. 32 B; $P < 0,05$).

Anhand dieser Ergebnisse konnte eine Beteiligung von basolateralen KCNQ K^+ -Kanälen an der HD-induzierten Stromstimulation im apikal permeabilisierten Epithel nachgewiesen werden.

3.1.3.6 Beteiligung von KCNQ-Kanälen an dem HD-induzierten Effekt am nicht-permeabilisierten Epithel

Nachdem in den vorherigen Untersuchungen am apikal permeabilisierten Epithel eine Beteiligung der KCNQ K^+ -Kanäle an dem HD-induzierten Effekt aufgezeigt werden konnte (siehe 3.1.3.5), stellte sich die Frage, ob eine solche Beteiligung auch an den unbehandelten (nicht-permeabilisierten) Epithelien nachweisbar ist.

Aufgrund dessen wurden nachfolgend Ussing-Kammer Messungen mit nicht apikal permeabilisierten Epithelien durchgeführt. Nachdem sich ein stabiles Stromplateau gebildet hatte wurde zunächst HD unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) auf das Epithel appliziert. Dies resultierte in einer HD-induzierten Abnahme des I_{SC} von $29,59 \pm 2,04 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $24,53 \pm 1,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 33 A; $P < 0,01$). Nachdem sich ein neues Plateau ausgebildet hatte, wurde das Epithel basolateral mit XE991 ($100 \mu\text{M}$) inkubiert. Dadurch kam es zu einem Stromabfall von $36,59 \pm 1,44 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $31,64 \pm 1,02 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 33 A; $P < 0,01$). Dies deutete auf eine XE991-induzierte Hemmung von basolateralen K^+ -Kanälen hin. Unter der darauf folgenden Erhöhung der Flüssigkeitssäule auf 5 cm, wurde ein HD-induzierter Abfall des I_{SC} auf $29,05 \pm 0,64 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ detektiert (Abb. 33 A; $P < 0,01$). Der statistische Vergleich der HD-induzierten Effekte zeigte einen signifikanten Unterschied (Kontrolle: $I_{5 \text{ cm}} / I_{0 \text{ cm}} = 0,83 \pm 0,02$; XE991: $I_{5 \text{ cm}} / I_{0 \text{ cm}} = 0,92 \pm 0,01$; Abb. 33 B; $P < 0,05$). Der HD-induzierte Stromabfall (Kontrolle) wurde demnach durch die Anwesenheit von XE991 signifikant gehemmt (Abb. 33 B).

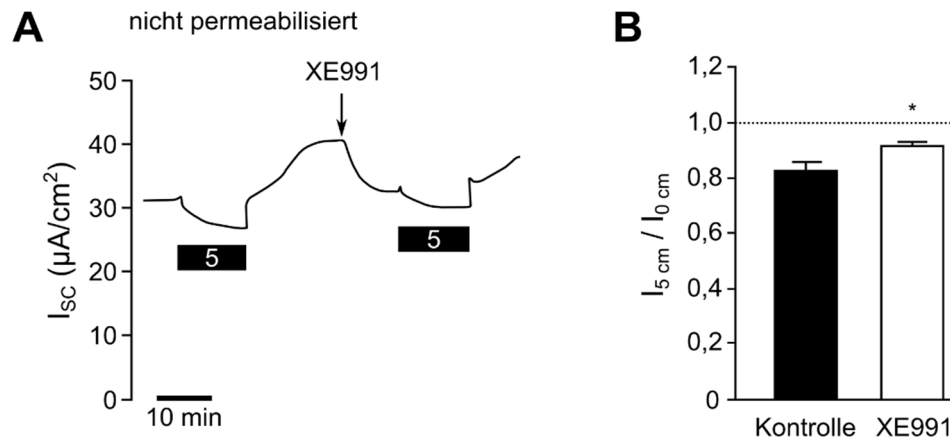


Abb. 33: Wirkung von XE991 auf den HD-induzierten Effekt am nicht permeabilisierten Epithel.

A) In Ussing-Kammer Messungen mit nicht apikal permeabilisierten Epithelien wurde zunächst HD (schwarzer Balken) unter Kontrollbedingungen (Kontrolle; ohne Pharmakon) appliziert. Dies resultierte in einem Abfall des I_{sc} . Nachdem sich ein erneutes Stromplateau einstellte, wurde das Epithel basolateral mit dem KCNQ K^+ -Kanal Inhibitor XE991 (100 μ M) inkubiert, was einen Stromabfall zur Folge hatte. Dann wurde in Anwesenheit von XE991 erneut HD appliziert. B) Statistische Auswertung des in A) gezeigten Versuchsablaufs. Der HD-induzierte Effekt ($I_{5\text{ cm}} / I_{0\text{ cm}}$) unter Kontrollbedingungen (Kontrolle) wurde durch die Anwesenheit von XE991 signifikant verringert ($n = 5$; $*P < 0,01$).

Der KCNQ K^+ -Inhibitor XE991 (100 μ M; basolateral) zeigte in dieser Arbeit nicht nur einen hemmenden Wirkung auf den HD-induzierten Effekt am apikal permeabilisierten Epithel (siehe 3.1.3.5). Vielmehr konnte auch am unbehandelten Epithel eine Wirkung von XE991 auf den HD-induzierten Effekt aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass basolaterale KCNQ K^+ -Kanäle im pulmonalen Epithel von *X. laevis* durch HD aktiviert werden.

3.2 Charakterisierung der modulierenden Wirkung von *n*-Alkoholen auf die Aktivität des CFTR

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Wirkung der *n*-Alkohole Ethanol (EtOH), 1-Heptanol (HEP) und 1-Octanol (OCT) auf den CFTR durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Ussing-Kammer Messungen durchgeführt und die Wirkung der *n*-Alkohole auf den CFTR im nativen pulmonalen Epithel von *X. laevis* untersucht (siehe Ergebnisse 3.2.1). Des Weiteren wurde der humane CFTR (hCFTR) im heterologen Expressionssystem der *X. laevis* Oocyten überexprimiert. Mittels TEVC Messungen konnte der *n*-Alkohol-

induzierte Effekt auf den hCFTR überprüft und charakterisiert werden (siehe Ergebnisse 3.2.2).

3.2.1 Charakterisierung des *n*-Alkohol-induzierten Effekt am nativen pulmonalen Epithel (*X. laevis*)

In einer früheren Studie wurde bereits eine aktivierende Wirkung der langkettigen *n*-Alkohole HEP und OCT auf den CFTR beschrieben (Marcet *et al.* 2004). Kurzkettige *n*-Alkohole wie EtOH zeigten hingegen keinen Einfluss auf die Aktivität des CFTRs (Marcet *et al.* 2004). Während die Experimente von Marcet *et al.* an Zelllinien durchgeführt wurden (Marcet *et al.* 2004), erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung der *n*-Alkohol-induzierten Effekte in Ussing-Kammer Messungen am nativen pulmonalen Epithel von *X. laevis*.

3.2.1.1 Der kurzkettige *n*-Alkohol Ethanol

Um einen möglichen Effekt von Ethanol auf den I_{SC} zu überprüfen, wurde in den Ussing-Kammer Messungen zunächst die Ausbildung eines stabilen Stromplateaus abgewartet. Dann erfolgte die apikale Applikation von 1 mM EtOH auf das Epithel (siehe Abb. 34 A). Dies resultierte in keiner signifikanten Änderung des I_{SC} (Kontrolle: $I_{SC} = 29,68 \pm 8,92 \mu A/cm^2$; 1 mM EtOH: $I_{SC} = 29,88 \pm 9,1 \mu A/cm^2$; Abb. 34 A und B; $P > 0,05$). Auch die anschließende schrittweise Erhöhung der EtOH Konzentration von 2 mM bis 1000 mM (apikal) führte zu keiner signifikanten Änderung des Stroms (Abb. 34 A und B; $P > 0,05$).

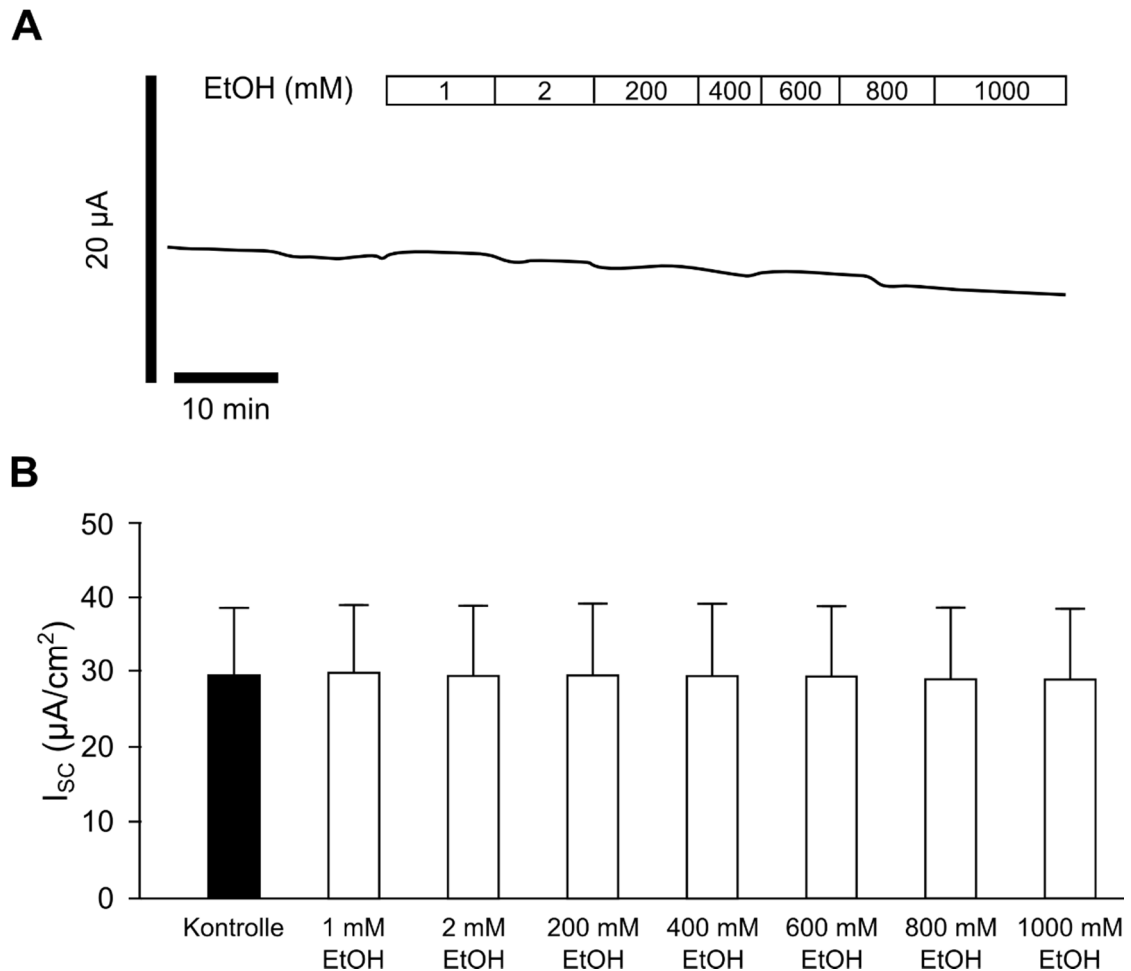


Abb. 34: Der kurzketttige n-Alkohol Ethanol zeigt keinen Einfluss auf den I_{SC} .

A) In Ussing-Kammer Messungen wurde Ethanol (EtOH) in aufsteigenden Konzentrationen von 1 mM bis 1000 mM (weißer Balken) apikal auf das pulmonale Epithel von *X. laevis* appliziert. Dabei konnte zu keinem Zeitpunkt ein Effekt auf den I_{SC} festgestellt werden. B) Statistische Auswertung der in A) dargestellten Experimente. Die Applikation von EtOH (weiße Balken) in aufsteigenden Konzentrationen (1 mM bis 1000 mM) zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den unter Kontrollbedingungen (schwarzer Balken; Kontrolle; ohne Pharmakon) detektierten I_{SC} ($n = 3$; $P > 0,05$). Die Abbildung wurde verändert nach Richter *et al.* (2014, in Revision).

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der kurzketttige *n*-Alkohol EtOH in Konzentrationen von 1 mM bis 1000 mM keinen Einfluss auf den I_{SC} besitzt und demnach auch keine aktivierende Wirkung auf den CFTR im pulmonalen Epithel von *X. laevis* hat.

3.2.1.2 Der langkettige *n*-Alkohol 1-Heptanol

Wie in den vorherigen Experimenten (siehe Ergebnisse 3.2.1.1) wurde in den Ussing-Kammer Messungen zunächst das Einstellen eines stabilen I_{SC} abgewartet. Anschließend wurde HEP (1 mM; apikal) auf das pulmonale Epithel von *X. laevis* appliziert. In Folge dessen kam es zu einer signifikanten Stromstimulation von $41,23 \pm 3,02 \mu A/cm^2$ auf $46,83 \pm 3,77 \mu A/cm^2$ (Abb. 35 A; $P < 0,01$). Um zu überprüfen, ob die detektierte HEP-induzierte Stromstimulation auf einer Aktivierung des im pulmonalen Epithel apikal lokalisierten CFTRs beruhte, wurde in parallelen Messungen das Epithel zunächst mit dem bekannten CFTR Inhibitor CFTR_{Inh}-172 (20 μM ; apikal) (Schultz *et al.* 1999; Sommer *et al.* 2007) inkubiert. Die apikale Inkubation mit dem CFTR_{Inh}-172 führte zu einer leichten Abnahme des I_{SC} von $36,65 \pm 3,88 \mu A/cm^2$ auf $35,34 \pm 4,55 \mu A/cm^2$, die jedoch nicht signifikant war (Stromspur nicht gezeigt; $P > 0,05$). Wurde anschließend in Anwesenheit des CFTR_{Inh}-172 zusätzlich HEP (1 mM; apikal) appliziert, so resultierte dies ebenfalls in keiner signifikanten Änderung des I_{SC} von $35,34 \pm 4,55 \mu A/cm^2$ auf $36,13 \pm 4,8 \mu A/cm^2$ (Stromspur nicht gezeigt; $P > 0,05$). Für die statistische Auswertung wurden die durch HEP-induzierten Änderungen im I_{SC} (ΔI_{HEP}) aus den Kontrollmessungen (ohne Pharmakon; Abb. 35 A und B) und in Anwesenheit des CFTR Inhibitors (CFTR_{Inh}; Stromspur nicht gezeigt) miteinander verglichen (Abb. 35 B). Während unter Kontrollbedingungen ein ΔI_{HEP} von $5,59 \pm 1,1 \mu A/cm^2$ (Kontrolle) detektiert wurde, so war der ΔI_{HEP} unter gleichzeitiger Applikation des CFTR_{Inh}-172 signifikant reduziert (CFTR_{Inh}: $\Delta I_{HEP} = 0,78 \pm 0,44 \mu A/cm^2$; Abb. 35 B; $P < 0,01$). Die unter Kontrollbedingungen gezeigte HEP-induzierte Stromstimulation (vgl. Abb. 35 A) wurde demzufolge durch den spezifischen CFTR Inhibitor signifikant inhibiert (Abb. 35 B). Auf Grund dieser Ergebnisse konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass HEP den CFTR im pulmonalen Epithel von *X. laevis* aktiviert.

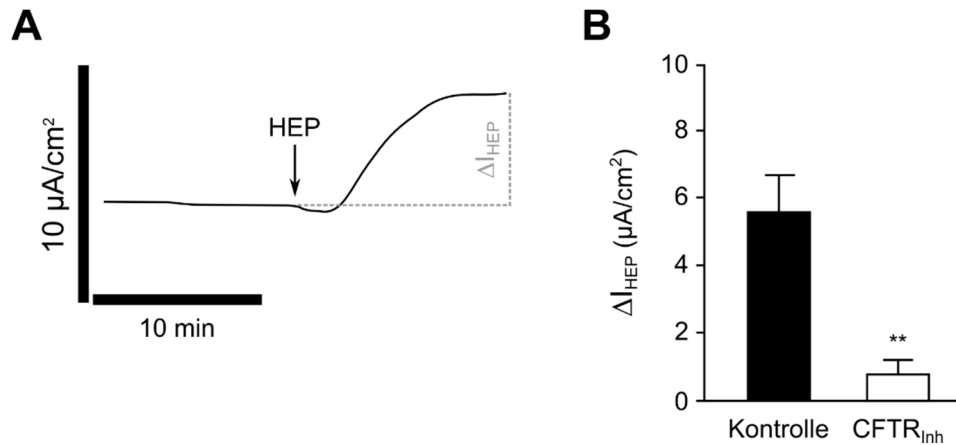


Abb. 35: Einfluss von 1-Heptanol auf den I_{SC} im pulmonalen Epithel von *X. laevis*.

A) Stromspur einer Ussing-Kammer Messung. Die apikale Applikation von 1-Heptanol (HEP; 1 mM) resultierte unter Kontrollbedingungen (Kontrolle; ohne Pharmakon) in einem Anstieg des I_{SC} . B) Statistischer Vergleich der HEP-induzierten Stromänderungen (ΔI_{HEP}) unter Kontrollbedingungen (Kontrolle; ohne Pharmakon) und in Anwesenheit des spezifischen CFTR Inhibitors CFTR_{Inh}-172 (CFTR_{Inh}; 20 μM ; apikal). Der unter Kontrollbedingungen detektierte ΔI_{HEP} (schwarzer Balken) wurde durch den CFTR_{Inh} (weißer Balken) signifikant verringert ($n = 7$; $**P < 0,01$). Die Abbildung wurde verändert nach Richter *et al.* (2014, in Revision).

3.2.1.3 Der langkettige *n*-Alkohol 1-Octanol

Nachdem in den vorherigen Experimenten eine HEP-induzierte Aktivierung des CFTRs nachgewiesen werden konnte, sollte in weiteren Messungen der Einfluss von OCT auf den I_{SC} untersucht werden. Die apikale Applikation von OCT (1 mM) auf das pulmonale Epithel von *X. laevis* führte zu einem signifikanten Anstieg des I_{SC} von $24,75 \pm 2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $27,37 \pm 2,23 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 36 A und B; $P < 0,01$).

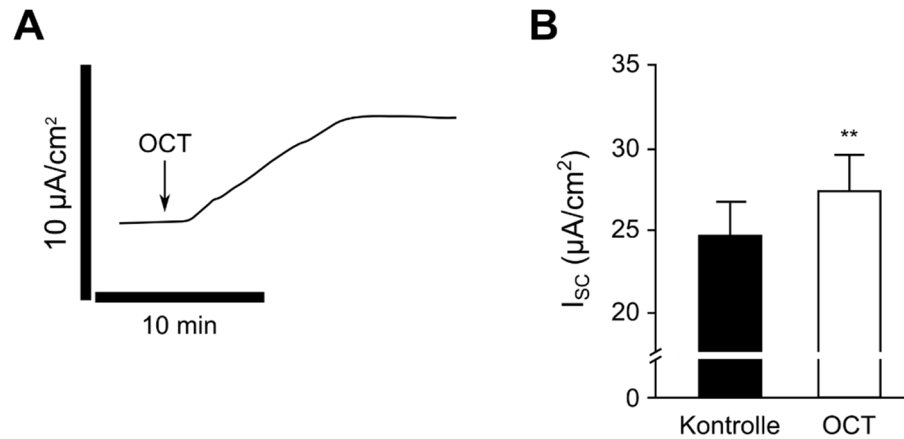


Abb. 36: Einfluss von 1-Octanol auf den I_{sc} im pulmonalen Epithel von *X. laevis*.

A) Repräsentative Stromspur des Effekts von 1-Octanol (OCT; 1 mM; apikal) auf den I_{sc} . B) Die statistische Analyse zeigte, dass der I_{sc} (Kontrolle) durch die apikale Applikation von OCT (1 mM) signifikant anstieg ($n = 9$; $**P < 0,01$). Die Abbildung wurde verändert nach Richter *et al.* (2014, in Revision).

Um zu überprüfen, ob die OCT-induzierte Stromstimulation auf einer Aktivierung des CFTRs beruhte, wurden in nachfolgenden Messungen die OCT-induzierten Effekte in Anwesenheit von verschiedenen Cl^- Kanal Inhibitoren untersucht. Parallel zu diesen Messungen wurden in weiteren Experimenten die OCT-induzierten Effekte unter Kontrollbedingungen (ohne Cl^- Kanal Inhibitoren; in Anwesenheit der entsprechenden Lösungsmittel siehe Tabelle 4) ermittelt (Stromspuren nicht gezeigt). In der statistischen Auswertung erfolgte der Vergleich der OCT-induzierten Stromänderungen (ΔI_{OCT}) unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) und in Anwesenheit der verschiedenen Inhibitoren (Abb. 37 B).

Die apikale Inkubation des Epithels mit dem bekannten CFTR Inhibitor CFTR_{Inh}-172 (20 µM) (Ma *et al.* 2002) inhibierte den OCT-induzierten Effekt signifikant (Kontrolle: $\Delta I_{OCT} = 3,17 \pm 0,6 \mu A/cm^2$; CFTR_{Inh}: $\Delta I_{OCT} = 0,12 \pm 0,72 \mu A/cm^2$; $P < 0,01$; Abb. 37 A und C). Im Gegensatz dazu zeigte DIDS (englisch: *4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene disulphonic acid*) in einer Konzentration von 500 µM (apikal) keinen Einfluss auf den OCT-induzierten Effekt (Kontrolle: $\Delta I_{OCT} = 3,17 \pm 0,61 \mu A/cm^2$; DIDS: $\Delta I_{OCT} = 4,34 \pm 0,63 \mu A/cm^2$; $P > 0,05$; Abb. 37 B und C). DIDS ist ein Inhibitor von sogenannten *high-conductance* Cl^- Kanälen und auswärts-gleichrichtenden Cl^- Kanälen, der jedoch keinen Einfluss auf den CFTR besitzt (Chappe *et al.* 1998; Yang *et al.* 2014). In Anwesenheit des generellen Cl^- Kanal Inhibitor NPPB (englisch: *5-nitro-2-(3-phenylpropyl-amino)benzoic acid*; 100 µM; apikal) (Schultz *et al.* 1999) wurde der OCT-induzierte Effekt ebenfalls signifikant inhibiert (Kontrolle: $\Delta I_{OCT} = 2,67 \pm 0,37 \mu A/cm^2$; NPPB: $\Delta I_{OCT} = -2,05 \pm 0,65 \mu A/cm^2$; $P < 0,01$; Abb. 37 C). Die gleichen

Effekte wurden unter Verwendung des Pharmakons Glibenclamid (glib), welches in hohen Konzentrationen (750 μM ; apikal) den CFTR inhibiert (Schultz *et al.* 1999), detektiert (Kontrolle: $\Delta I_{\text{OCT}} = 3,6 \pm 0,37 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; glib: $\Delta I_{\text{OCT}} = -2,38 \pm 0,71 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; $P < 0,05$; Abb. 37 C).

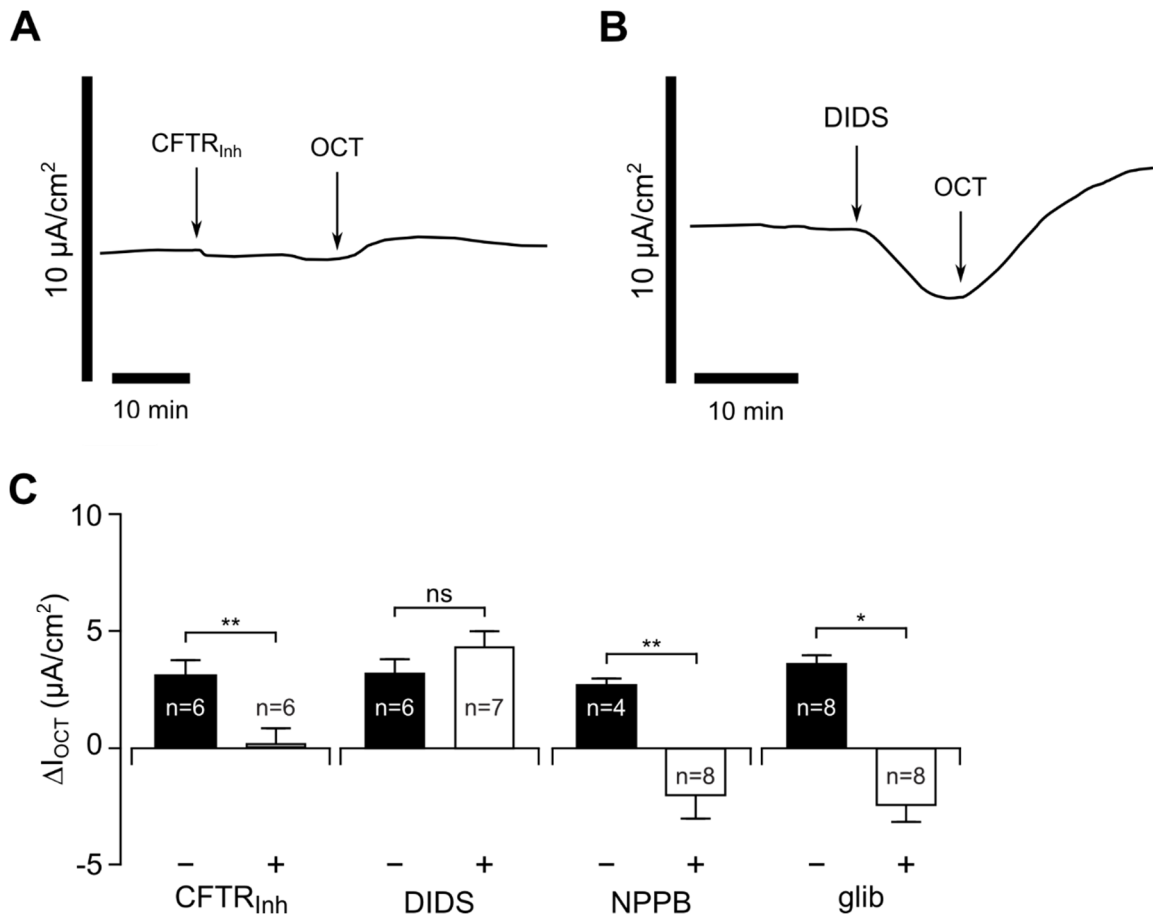


Abb. 37: Einfluss von Cl^- Kanal Inhibitoren auf den 1-Octanol-induzierten Effekt am pulmonalen Epithel von *X. laevis*.

A und B) Original Stromkurven des 1-Octanol (OCT; 1 mM; apikal) induzierten Effekts in Anwesenheit des CFTR_{Inh}-172 (CFTR_{Inh}; 20 μM ; apikal) oder DIDS (500 μM ; apikal). Während der OCT-induzierte Effekt durch den CFTR_{Inh} inhibiert wurde, zeigte DIDS keinen Einfluss auf den OCT-induzierten Effekt. C) Zusammenfassung der Experimente unter Verwendung verschiedener Cl^- Kanal Inhibitoren. Die OCT-induzierten Ströme (ΔI_{OCT}) wurden in Kontrollexperimenten ("-"; ohne Inhibitoren) und in Anwesenheit von Cl^- Inhibitoren ("+"; mit Inhibitoren) ermittelt. DIDS zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den OCT-induzierten Effekt (ns: nicht signifikant verschieden; $P > 0,05$). Im Gegensatz dazu inhibierten die als CFTR Blocker bekannten Substanzen CFTR_{Inh}, NPPB (100 μM ; apikal) und Glibenclamid (glib; 750 μM ; apikal) den OCT-induzierten Stromanstieg (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). Die Abbildung wurde verändert nach Richter *et al.* (2014, in Revision).

Zusammenfassend konnte in den Experimenten gezeigt werden, dass die OCT-induzierte Stimulation des I_{SC} (Abb. 36 und 37) sowohl durch den unspezifischen Cl^- Kanal Inhibitor NPPB als auch durch die spezifischen CFTR Inhibitoren CFTR_{Inh}-172 und Glibenclamid inhibiert wurde (Abb. 37). Anhand dieser Ergebnisse konnte eine OCT-induzierte CFTR Aktivierung im pulmonalen Epithel von *X. laevis* nachgewiesen werden.

3.2.1.4 Beteiligung der Adenylatzyklase an dem *n*-Alkohol-induzierten Effekt

In den vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die *n*-Alkohole HEP (siehe Ergebnisse 3.2.1.2) und OCT (siehe Ergebnisse 3.2.1.3) den CFTR im pulmonalen Epithel von *X. laevis* aktivieren. Ein bekannter Mechanismus zur Modulierung der CFTR Aktivität beruht auf dem Adenylatzyklase, cAMP und Proteinkinase A (PKA) Signalweg (Schultz *et al.* 1999) (für eine detaillierte Beschreibung siehe Diskussion 4.2.1). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Mechanismus der *n*-Alkohol-induzierten CFTR Aktivierung. Um zu überprüfen, ob die Adenylatzyklase an dem *n*-Alkohol-induzierten CFTR Aktivierungsmechanismus beteiligt ist, wurde in Ussing-Kammer Experimenten der bekannte Adenylatzyklase Inhibitor MDL-12330A (MDL) verwendet (Leung & Wong 2000; Bonnans *et al.* 2003; Zhu *et al.* 2005; Luo *et al.* 2013).

Es wurden zwei Messreihen durchgeführt und die HEP bzw. OCT-induzierten Änderungen des I_{SC} in An- und Abwesenheit von MDL überprüft (vgl. Abb. 38). In den Kontrollexperimenten (ohne MDL) wurde der *n*-Alkohol-induzierte Effekt unter Verwendung der äquivalenten Menge des Lösungsmittels DMSO durchgeführt (vgl. Material und Methoden Tabelle 4).

Für die Untersuchungen wurden die Epithelien zunächst mit MDL (50 μ M; apikal) vorinkubiert. In der HEP Messreihe führte die apikale Applikation von MDL zu einem signifikanten Abfall des I_{SC} von $33,05 \pm 3,16 \mu A/cm^2$ auf $25,88 \pm 1,86 \mu A/cm^2$ (Abb. 38 A; $P < 0,01$). Dieser MDL-induzierte Effekt zeigte sich auch in der OCT Messreihe (Abb. 38 C). Hier resultierte die apikale Applikation von MDL in einem signifikanten Abfall des I_{SC} von $44,85 \pm 6,58 \mu A/cm^2$ auf $35,92 \pm 6,16 \mu A/cm^2$ (Abb. 38 C; $P < 0,01$). Im Anschluss wurde in Anwesenheit von MDL 1 mM HEP appliziert (Abb. 38 A). Dies führte zu keiner signifikanten Änderung im I_{SC} (vor HEP: $I_{SC} = 25,88 \pm 1,86 \mu A/cm^2$; unter HEP: $I_{SC} = 25,91 \pm 2,04 \mu A/cm^2$; Abb. 38 B; $P > 0,05$). Auch die Applikation von OCT (1 mM; apikal) zeigte keinen signifikanten Effekt auf den Strom (vor OCT: $I_{SC} = 35,92 \pm 6,16 \mu A/cm^2$; unter OCT: $I_{SC} = 35,96 \pm 5,89 \mu A/cm^2$; Abb. 38 D; $P > 0,05$).

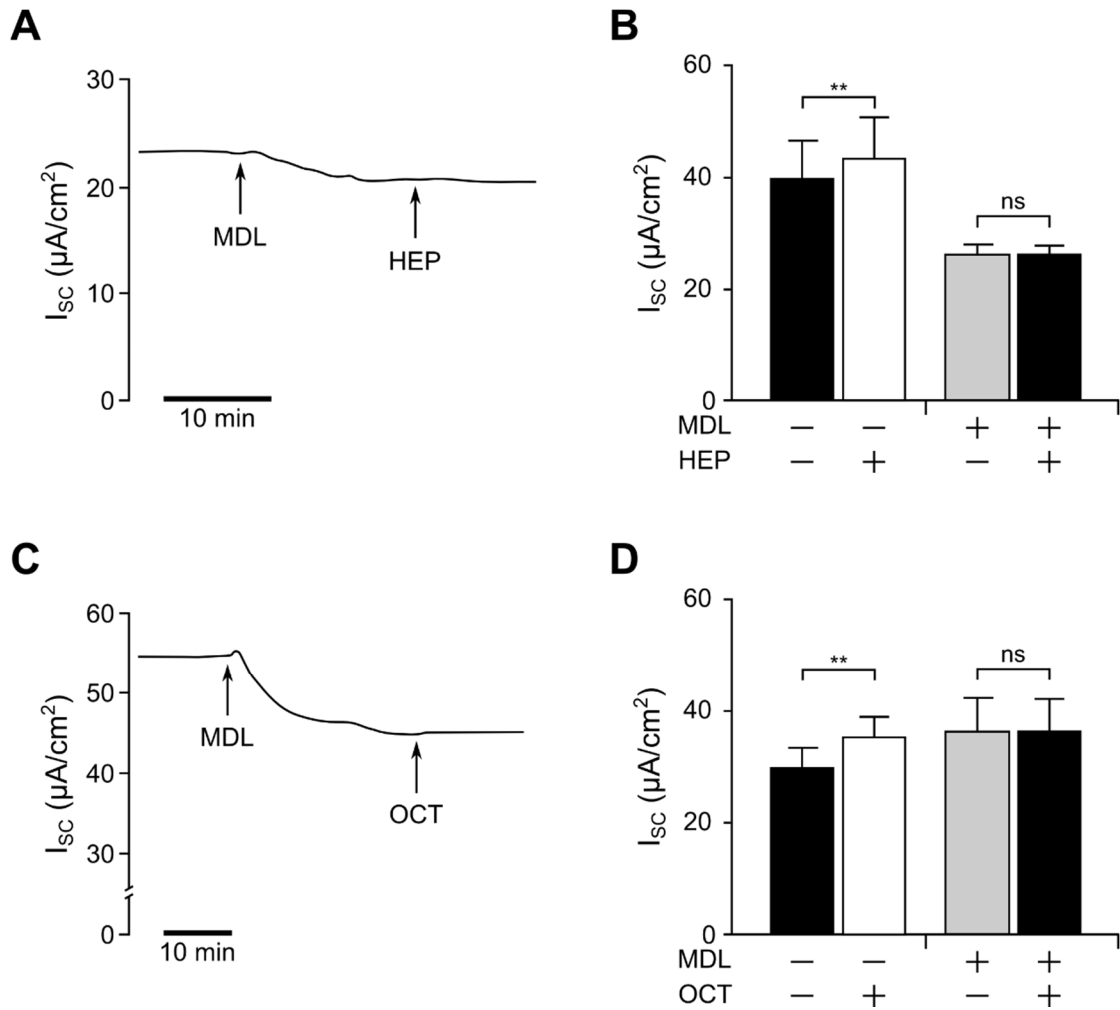


Abb. 38: Einfluss des Adenylylzyklase Inhibitors MDL-12330A auf den *n*-Alkohol-induzierten Effekt.

A) Die apikale Applikation des Adenylylzyklase Inhibitors MDL-12330A (50 µM) führte zu einem Abfall des I_{sc}. Unter diesen Bedingungen führte die zusätzliche Applikation von 1-Heptanol (HEP; 1 mM; apikal) zu keiner Änderung des Stroms. B) Detektierte Mittelwerte des I_{sc} in Anwesenheit (“+“) bzw. Abwesenheit (“-“) von MDL und/oder HEP. In Abwesenheit von MDL (Stromkurve der Kontrolleexperimente nicht gezeigt) wurde eine signifikante HEP-induzierte Stromstimulation detektiert (n = 6). Im Gegensatz dazu zeigte HEP in Anwesenheit von MDL keinen Effekt auf den I_{sc} (n = 6). C) Identische Experimente wie in A) dargestellt, wurden mit dem *n*-Alkohol 1-Octanol (OCT; 1 mM; apikal) durchgeführt. D) In Abwesenheit von MDL (Stromkurve der Kontrolleexperimente nicht gezeigt) induzierte OCT einen signifikanten Stromanstieg (n = 6). Keine OCT-induzierten Änderungen des I_{sc} konnten hingegen in Anwesenheit von MDL (n = 6) detektiert werden (ns: nicht signifikant verschieden, P > 0,05; **P < 0,01). Die Abbildung wurde verändert nach Richter *et al.* (2014, in Revision).

Im Gegensatz dazu konnten unter Kontrollbedingungen (ohne MDL) eine signifikante *n*-Alkohol-induzierte Stromstimulation detektiert werden. Die apikale Applikation von HEP führte zu einem signifikanten Anstieg des I_{sc} von $39,47 \pm 7,18 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $43,12 \pm 7,45$

$\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 38 B; $P < 0,01$). Auch die Applikation von OCT resultierte unter Kontrollbedingungen in einem signifikanten Stromanstieg von $29,75 \pm 3,34 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $34,74 \pm 3,88 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abb. 38 D; $P < 0,01$).

In den Messungen konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass die *n*-Alkohole HEP und OCT eine Stromstimulation induzieren (Abb. 38 B und D). Dieser Effekt wurde jedoch durch den Adenylatzyklase Inhibitor MDL inhibiert (Abb. 38). Anhand dessen konnte eine Beteiligung der Adenylatzyklase an dem *n*-Alkohol-induzierten CFTR Aktivierungsmechanismus im pulmonalen Epithel von *X. laevis* nachgewiesen werden.

3.2.2 Charakterisierung der Wirkung von *n*-Alkoholen auf die Aktivität des hCFTR

Mit Hilfe von elektrophysiologischen Ussing-Kammer Messungen konnte in den vorherigen Experimenten gezeigt werden, dass die *n*-Alkohole HEP und OCT den CFTR im pulmonalen Epithel von *X. laevis* aktivieren (vgl. Ergebnisse 3.2.1). In einer parallel zu der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie konnte in TEVC Messungen bereits eine OCT-induzierte Aktivierung des humanen CFTR (hCFTR) nachgewiesen werden (Vitzthum 2011). Nachfolgend sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst in TEVC Messungen überprüft werden, ob der hCFTR auch durch den *n*-Alkohol HEP aktiviert werden kann (siehe Ergebnisse 3.2.2.1). Des Weiteren wurde eine Beteiligung der Adenylatzyklase an der *n*-Alkohol-induzierten hCFTR Aktivierung untersucht (siehe Ergebnisse 3.2.2.2).

3.2.2.1 Wirkung von 1-Heptanol auf die Aktivität des hCFTR

Der hCFTR wurde heterolog in *X. laevis* Oocyten exprimiert und in TEVC Messungen elektrophysiologisch untersucht (vgl. Material und Methoden 2.3.2). Nachdem der I_M unter OR_i ein stabiles Plateau ausgebildet hatte, wurden die hCFTR exprimierenden Oocyten mit HEP (1 mM) perfundiert (Abb. 39 A). In Folge dessen kam es zu einer signifikanten Stromstimulation von $0,1 \pm 0,04 \mu\text{A}$ auf $0,62 \pm 0,2 \mu\text{A}$ (Abb. 39 B; $P < 0,05$). Die HEP-induzierte Stromstimulation wurde durch eine anschließende zusätzliche Applikation des spezifischen CFTR Inhibitors CFTR_{Inh}-172 signifikant inhibiert und sank auf $0,11 \pm 0,03 \mu\text{A}$ ab (Abb. 39 A und B; $P < 0,05$).

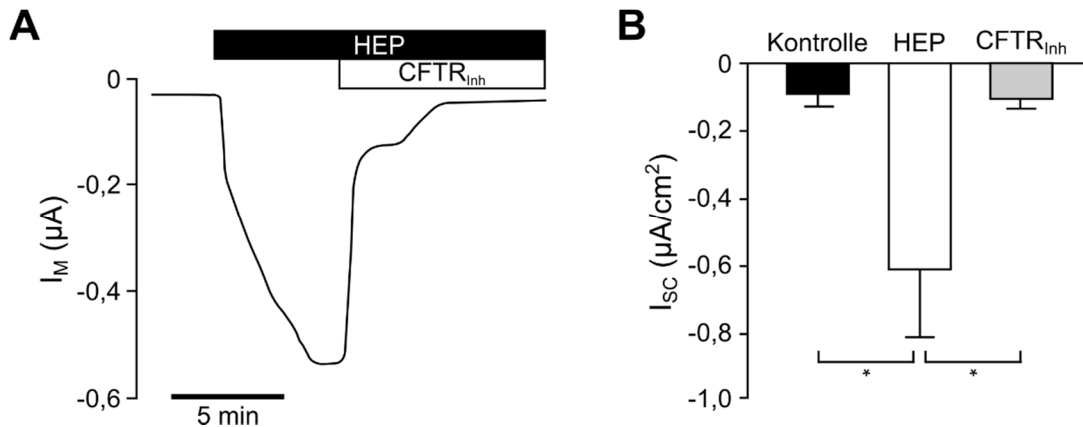


Abb. 39: Wirkung des CFTR_{Inh}-172 auf den 1-Heptanol-induzierten Effekt am hCFTR.

A) Die Applikation von 1-Heptanol (HEP; 1 mM; schwarzer Balken) resultierte in einer Stimulation des I_M von hCFTR exprimierenden Oocyten. Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Applikation des CFTR Inhibitors CFTR_{Inh}-172 (CFTR_{Inh}; 5 μ M; weißer Balken) gehemmt. B) Die statistische Analyse der in A) dargestellten Experimente zeigte, dass der unter Kontrollbedingungen detektierte I_M (Kontrolle; ohne Pharmakon) durch HEP signifikant stimuliert wurde. Die zusätzliche Applikation des CFTR_{Inh} hemmte den HEP-induzierten Effekt hingegen signifikant ($N = 2$, $n = 9$; * $P < 0,05$). Die Abbildung wurde verändert nach Richter *et al.* (2014, in Revision).

Da die HEP-induzierte Stimulation des I_M durch den CFTR_{Inh}-172 gehemmt wurde, konnte anhand dieser Ergebnisse eine HEP-induzierte hCFTR Aktivierung aufgezeigt werden.

3.2.2.2 Beteiligung der Adenylatzyklase an den *n*-Alkohol-induzierten Effekt am hCFTR

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl OCT (Vitzthum 2011) als auch HEP (vgl. Ergebnisse 3.2.2.1) den hCFTR aktivieren, sollte eine etwaige Beteiligung der Adenylatzyklase an dem *n*-Alkohol-induzierten hCFTR Aktivierungsmechanismus untersucht werden. Wie in den zuvor durchgeführten Ussing-Kammer Experimenten (vgl. Ergebnisse 3.2.1.4) wurde zu diesem Zweck der Adenylatzyklase Inhibitor MDL-12330A (MDL) verwendet.

Es wurden zwei Messreihen parallel durchgeführt und die OCT-induzierten Änderungen im I_M bei der ersten Applikation von OCT ($1\Delta I_{OCT}$; 1 mM) sowie bei der zweiten Applikation von OCT ($2\Delta I_{OCT}$) bestimmt (siehe Abb. 40 A). In Kontrollmessungen (ohne MDL) wurden die Oocyten für 10 min mit der äquivalenten Menge des Lösungsmittels DMSO (1,25%; vgl.

Material und Methoden Tabelle 4) inkubiert (Abb. 40 A), wohingegen in den eigentlichen Experimenten eine Inkubation mit MDL (250 μM) erfolgte (Abb. 40 B).

In den Kontrollmessungen führte die erste Applikation von OCT zu einer signifikanten Stimulation des I_M von $-0,11 \pm 0,01 \mu\text{A}$ auf $-0,72 \pm 0,17 \mu\text{A}$ ($1\Delta I_{\text{OCT}}$; Abb. 40 A; $P < 0,01$). Nach dem Auswaschen wurden die Oocyten für 10 min mit DMSO inkubiert, wodurch sich keine signifikanten Änderungen im I_M ergaben (vor DMSO: $I_M = -0,12 \pm 0,01 \mu\text{A}$; unter DMSO: $I_M = -0,12 \pm 0,15 \mu\text{A}$; Abb. 40 A; $P > 0,05$). Anschließend erfolgte eine erneute Applikation von OCT, wodurch es zu einem signifikanten Anstieg des I_M auf $-0,35 \pm 0,06 \mu\text{A}$ kam ($2\Delta I_{\text{OCT}}$; Abb. 40 A; $P < 0,01$).

In den MDL Experimenten führte die erste Applikation von OCT zu einem Stromanstieg von $-0,11 \pm 0,01 \mu\text{A}$ auf $-0,57 \pm 0,08 \mu\text{A}$ ($1\Delta I_{\text{OCT}}$; Abb. 40 B; $P < 0,01$). Im Anschluss wurden die Oocyten für 10 min mit MDL inkubiert. Dabei zeigte sich kein signifikanter Einfluss von MDL auf den I_M (vor MDL: $I_M = -0,13 \pm 0,02 \mu\text{A}$; unter MDL: $I_M = -0,12 \pm 0,06 \mu\text{A}$; Abb. 40 B; $P > 0,05$). In Folge der erneuten Applikation von OCT zeigte sich nur ein leichter, nicht signifikanter Anstieg des I_M auf $-0,16 \pm 0,03 \mu\text{A}$ (Abb. 40 B; $P > 0,05$).

Für die statistische Analyse wurden die OCT-induzierten Effekte der $2\Delta I_{\text{OCT}}$ ins Verhältnis zu den detektierten $1\Delta I_{\text{OCT}}$ gesetzt ($2\Delta I_{\text{OCT}} / 1\Delta I_{\text{OCT}}$; siehe Abb. 40 C). Der statistische Vergleich der Kontrollexperimente (DMSO) und MDL Experimente ergab eine signifikante Abschwächung der OCT-induzierten Effekte ($2\Delta I_{\text{OCT}} / 1\Delta I_{\text{OCT}}$) durch den Adenylatzyklase Inhibitor MDL (DMSO: $2\Delta I_{\text{OCT}} / 1\Delta I_{\text{OCT}} = 0,42 \pm 0,12$; MDL: $2\Delta I_{\text{OCT}} / 1\Delta I_{\text{OCT}} = 0,11 \pm 0,05$; Abb. 40 C; $P < 0,05$). Das Abschwächen des OCT-induzierten Effekts in Folge der Inkubation der Oocyten mit MDL belegte eine Beteiligung der Adenylatzyklase in dem hCFTR Aktivierungsmechanismus.

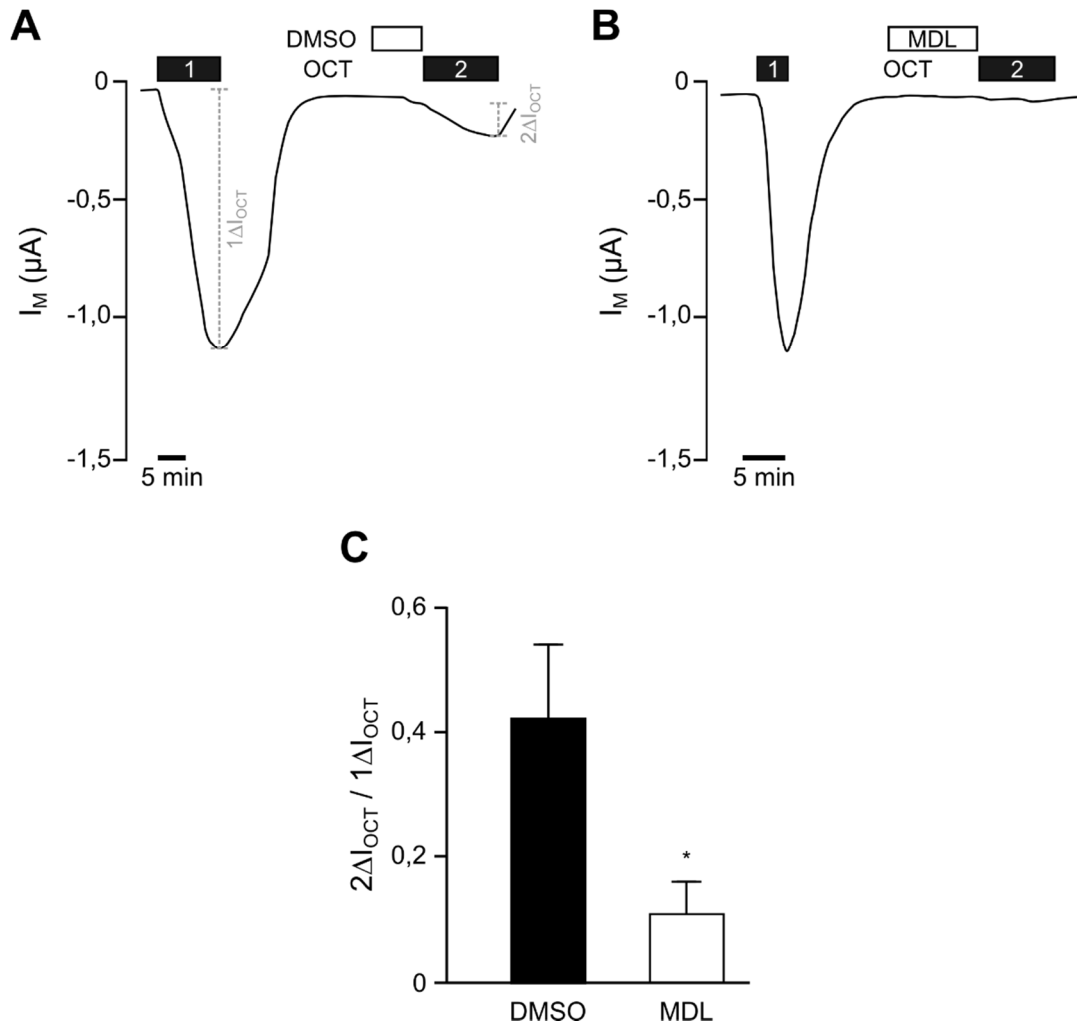


Abb. 40: Der Adenylatzyklase Inhibitor MDL-12330A hemmt die 1-Octanol-induzierte hCFTR Aktivierung.

A) In Kontrollmessungen (ohne MDL-12330A; MDL) führte die Applikation von 1-Octanol (OCT; 1 mM; schwarzer Balken) zu einer Simulation des I_M ($1\Delta I_{OCT}$). Nach dem Auswaschen wurden die hCFTR exprimierenden Oocyten für 10 min mit DMSO (dem Lösungsmittel von MDL; 1,25%; weißer Balken) inkubiert. Anschließend wurde der OCT-induzierte Effekt ein zweites Mal detektiert ($2\Delta I_{OCT}$). B) Gleicher experimenteller Ablauf wie in A), jedoch erfolgte eine 10 min Inkubation der Oocyten mit dem Adenylatzyklase Inhibitor MDL (250 μ M; weißer Balken). C) Zur statistischen Analyse wurden die OCT-induzierten Effekte der ersten ($1\Delta I_{OCT}$) und zweiten Applikation ($2\Delta I_{OCT}$) zueinander ins Verhältnis gesetzt ($2\Delta I_{OCT} / 1\Delta I_{OCT}$). Der unter Kontrollbedingungen ermittelte OCT-induzierte Effekt (DMSO; schwarzer Balken) wurde durch MDL (weißer Balken) signifikant abgeschwächt (N = 5, n = 11 für jede Messreihe; *P < 0,05). Der statistische Vergleich erfolgte mittels des ungepaarten t-Tests. Die Abbildung wurde verändert nach Richter *et al.* (2014, in Revision).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die langkettigen *n*-Alkohole (HEP und OCT) den CFTR aktivieren können. Die *n*-Alkohol-induzierte CFTR Aktivierung konnte sowohl am nativen pulmonalen Epithel von *X. laevis* (vgl. Ergebnisse 3.2.1) als auch am heterolog in Oocyten exprimierten hCFTR (vgl. Ergebnisse 3.2.2) gezeigt werden. Zudem konnte in beiden verwendeten Modellsystemen nachgewiesen werden, dass die *n*-Alkohol-induzierte CFTR Aktivierung die Aktivität der Adenylatzyklase voraussetzt. Wurde die Aktivität der Adenylatzyklase pharmakologisch inhibiert, so blieb auch die *n*-Alkohol-induzierte CFTR Aktivierung aus.

4. Diskussion

4.1 Einfluss von mechanischen Kräften auf die transepithelialen Ionentransport-Prozesse im pulmonalen Epithel von *X. laevis*

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit basieren auf folgenden Annahmen: a) Das pulmonale Epithel von luftatmenden Vertebraten ist, bedingt durch die Ventilation, ständig mechanischen Kräften wie Druck, Dehnung und Scherkraft ausgesetzt. Dabei stellt im Alveolarepithel die Dehnung der Zellen den hauptsächlichen mechanischen Stimulus dar. b) Ein effektiver Gasaustausch bedingt eine strikte Regulation der *alveolar fluid clearance* über aktive transepitheliale Ionentransport-Prozesse des Alveolarepithels. Aufgrund dieser Annahmen war das Ziel der vorliegenden Arbeit den Einfluss von mechanischen Kräften (Dehnung) auf die transepithelialen Ionentransport-Prozesse zu charakterisieren. Für die Untersuchungen wurde das pulmonale Epithel von *X. laevis* als Modellsystem für alveolare Ionentransport-Prozesse herangezogen (vgl. Einleitung 1.5).

4.1.1 Die mechanische Dehnung hat keinen Einfluss auf die Integrität des nativen pulmonalen Epithels von *X. laevis*

In der vorliegenden Arbeit wurden in Ussing-Kammer Messungen das pulmonale Epithel von *X. laevis* einem mechanischen Stimulus (Dehnung) in Form von HD (5 cm Flüssigkeitssäule) ausgesetzt. Um auszuschließen, dass die mechanische Dehnung des Epithels zu einer etwaigen Schädigung führt, wurde während der Ussing-Kammer Messungen der transepitheliale Widerstand (R_T) bestimmt. Da die Integrität und Dichte eines Epithels maßgeblich durch *Tight junctions* bestimmt wird und die Ausbildung von *Tight junctions* zu einer Erhöhung des R_T führt (Günzel & Yu 2013), sollten sich etwaige HD-induzierte Schädigungen des Epithels in einer Abnahme des R_T manifestieren.

Am nativen, nicht permeabilisierten Epithel von *X. laevis* konnten in dieser Arbeit keine HD-induzierten Änderungen im R_T festgestellt werden (Abb. 15). Selbst eine wiederholte Applikation von HD zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den R_T (Abb. 15).

Die hier gezeigten Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Erkenntnissen aus früheren Studie, in denen AT2 Zellen einer zyklischen mechanischen Dehnung ausgesetzt wurden (Cavanaugh *et al.* 2001; Cavanaugh *et al.* 2006). Dies resultierte in einer Abnahme der Expression des charakteristischen *Tight junction* Proteins Occludin (Cavanaugh *et al.* 2001). Des Weiteren

wurde eine Erhöhung des parazellulären Transportes über das alveolare Epithel in Folge der mechanischen Reizung festgestellt und damit eine Verringerung der Dichte des Epithels (Cavanaugh *et al.* 2006). Auch in der früheren Studie von Bogdan *et al.* wurde eine signifikante Abnahme des R_T in Folge der Applikation von HD festgestellt (Bogdan *et al.* 2008). Dieser Effekt war jedoch sehr gering und die Autoren sprachen der Abnahme im R_T nur eine untergeordnete Rolle zu (Bogdan *et al.* 2008). In der vorliegenden Arbeit konnten hingegen keine Effekte von HD auf den R_T festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede im Vergleich zu den Ergebnissen von Bogdan *et al.* (Bogdan *et al.* 2008) könnte in der Durchführung der Präparation der *X. laevis* Lunge liegen. Es ist nicht auszuschließen, dass beim Öffnen und Aufspannen des *X. laevis* Lungenflügels, abhängig von der präparierenden Person, das Epithel vielleicht schon leichtere Verletzungen davon trägt, die sich im Laufe der Ussing-Kammer Messungen oder durch HD Applikation noch verstärken.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss von HD auf den R_T und somit auf die Integrität des nativen pulmonalen Epithels von *X. laevis* aufgezeigt werden. Demnach lag die Stärke des hier verwendeten mechanischen Stimulus (5 cm Flüssigkeitssäule) im physiologischen Rahmen und führte zu keiner Schädigung des Epithels. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass in der Mammalia Lunge unter physiologischen Bedingungen ein transpulmonaler Druck von 0 – 30 cm Wassersäule auftritt (Fredberg & Kamm 2006).

4.1.2 Beteiligung von ATP-sensitiven K^+ (K_{ATP}) Kanälen an dem HD-induzierten Effekt

In der vorliegenden Arbeit konnte in Ussing-Kammer Messungen ein direkter Einfluss von HD auf die transepithelialen Ionentransport-Prozesse aufgezeigt werden. Die Applikation von HD resultierte in einem signifikanten Abfall des I_{SC} von ~10% (Abb. 15). Zudem war der HD-induzierte Effekt reversibel und im gleichen Maße wiederholbar (Abb. 15). Die Reversibilität und Wiederholbarkeit des HD-induzierten Effekts sprachen erneut dafür, dass die mechanische Dehnung nicht zu etwaigen Schädigungen des Epithels führte (vgl. Diskussion 4.1.1). Desweiteren stimmten die Ergebnisse mit den Erkenntnissen aus vorherigen Studien überein (Bogdan 2007; Bogdan *et al.* 2008; Richter 2010) (siehe Einleitung 1.6; Abb. 6).

Anhand von elektrophysiologischen Untersuchungen konnte pharmakologisch bereits nachgewiesen werden, dass der HD-induzierte Stromabfall auf einer K^+ Sekretion über ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) Kanäle beruhte (Richter 2010). Wie bereits beschrieben (vgl. Ergebnisse 3.1.1.1.1), stellen K_{ATP} Kanäle hetero-oktamere Proteinkomplexe dar, die aus je vier Kir.6x Untereinheiten und vier SURx (englisch: *sulfonylurea receptor*) Untereinheiten gebildet werden (Nichols 2006). Dabei kann die Kir6x Untereinheit in den Isoformen Kir6.1 und Kir6.2 vorkommen (Burke *et al.* 2008). Die SURx Untereinheit existiert in den Isoformen SUR1 und SUR2 mit den beiden Splice-Varianten SUR2A und SUR2B (Burke *et al.* 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals das Vorkommen der K_{ATP} Kanal Untereinheiten Kir6.1 und SUR1 auf mRNA Ebene in Lungenhomogenaten von *X. laevis* aufgezeigt werden (Abb. 13). Die Kir6.1 und SUR1 Untereinheit könnten im pulmonalen Epithel von *X. laevis* zu einem funktionsfähigen K_{ATP} Kanal assemblieren. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass ein funktioneller Nachweis von Kir6.1/SUR1 assemblierten K_{ATP} Kanälen schon *in vivo* in Gliazellen von Fröschen erfolgte (Skatchkov *et al.* 2002), sowie in *in vitro* Experimenten an humanen K_{ATP} Kanälen (Surah-Narwal *et al.* 1999). Die Kir6.1 Untereinheit wurde zudem bereits in alveolaren Epithelzellen von Säugern sowohl auf mRNA Ebene (Leroy *et al.* 2004; Bardou *et al.* 2012) als auch auf Protein Ebene (Bardou *et al.* 2012) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte die in der *X. laevis* Lunge detektierte SUR1 Untereinheit im pulmonalen Epithel der Mammalia bisher noch nicht auf mRNA Ebene nachgewiesen.

Neben dem Nachweis der Kir6.1 und SUR1 Untereinheiten konnten in dieser Arbeit Transkripte, welche für Kir6.2 codieren, im Pankreas von *X. laevis* detektiert werden (Abb. 13). Dies würde mit Ergebnissen aus früheren Studien übereinstimmen, in denen ebenfalls Kir6.2 im Pankreas von Mammalia auf mRNA Ebene nachgewiesen wurde (Burke *et al.* 2008). Eine Bestätigung mittels Sequenzierungs-Analysen der detektierten Transkripte erfolgte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht.

Zusammenfassend konnte das Vorkommen der K_{ATP} Kanäle im pulmonalen Epithel von *X. laevis* erstmal auch auf mRNA Ebene nachgewiesen werden. Zudem konnte eine HD-induzierte Abnahme des I_{SC} detektiert werden, welche nach Erkenntnissen aus einer früheren Studie auf einer HD-induzierten K_{ATP} Kanal Aktivierung beruht (Richter 2010).

Es stellte sich die Frage, welcher Wirkmechanismus der HD-induzierten K_{ATP} Kanal Aktivierung zugrunde lag: 1) K_{ATP} Kanäle könnten direkt als mechanosensitive Kanäle fungieren. Eine direkte Mechanosensitivität der K_{ATP} Kanäle wurde schon in früheren Studien beschrieben. Dabei konnte eine mechanosensitive Aktivierung sowohl durch Dehnung (van

Wagoner 1993) als auch durch Scherkraft (Chatterjee *et al.* 2006) aufgezeigt werden. 2) Die HD-induzierte K_{ATP} Kanal Aktivierung könnte indirekt hervorgerufen werden, z.B. in Folge einer Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration (Nichols 2006; Burke *et al.* 2008). Diese Hypothese wird durch die hohe Sensitivität der K_{ATP} Kanäle gegenüber intrazellulärem ATP unterstützt, da sowohl die Kir6x als auch die SURx Untereinheiten Bindestellen für ATP besitzen, an die im geschlossenen Zustand des Kanals ATP oder MgATP gebunden ist (Burke *et al.* 2008).

Nachfolgend galt es den HD-induzierten Mechanismus der K_{ATP} Kanal Aktivierung zu charakterisieren.

4.1.3 Charakterisierung des HD-induzierten Mechanismus der K_{ATP} Kanal Aktivierung - Hemikanäle als Mechanosensoren im pulmonalen Epithel

Wie zuvor beschrieben (siehe 4.1.2), war ein Ziel der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung des HD-induzierten Aktivierungsmechanismus der K_{ATP} Kanäle. Der Fokus der Untersuchungen beruhte dabei auf einer etwaigen indirekten K_{ATP} Kanal Aktivierung in Folge einer HD-induzierten ATP-Freisetzung. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass eine mechanosensitive Freisetzung von ATP schon vielfach in der Literatur beschrieben wurde (Button *et al.* 2007; Fitz 2007; Ransford *et al.* 2009; Burnstock *et al.* 2012), unter anderem auch im pulmonalen Epithel von *X. laevis* (Bogdan 2007; Bogdan *et al.* 2008).

Eine mechanosensitive ATP-Freisetzung konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Es wurden Analysen der $[ATP]_e$ von Perfusat Proben, die während der Messungen aus dem apikalen Kompartiment der Ussing-Kammer gesammelt wurden, durchgeführt. Dabei konnte eine HD-induzierte, signifikante Erhöhung der $[ATP]_e$ festgestellt werden (Abb. 21). Die HD-induzierte ATP-Freisetzung war zudem auch bei einer erneuten Applikation von HD wiederholbar (Abb. 21), wodurch eine physiologische Bedeutung des detektierten Effekts bestärkt wurde. Aus den Epithelzellen freigesetztes ATP kann über die Bindung und Aktivierung von purinergen Rezeptoren (P2X und P2Y) diverse Effekte vermitteln. Für diese purinergen Rezeptoren ist in der Literatur eine halb-maximale Aktivierung bei $[ATP]_e$ von 3-500 nM beschrieben worden (Fitz 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde ein HD-induzierter Anstieg der $[ATP]_e$ um ~11 nM detektiert (Abb. 22). Diese freigesetzte $[ATP]_e$ liegt im Rahmen der beschriebenen halb-maximalen Aktivierungskonzentration der

purinergen Rezeptoren und würde zudem wohl keine Auswirkung auf die intrazellulären Energiespeicher der Zellen haben.

Eine Freisetzung von ATP aus Epithelzellen kann prinzipiell über zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen: a) Freisetzung über ATP-angereicherte Vesikel; b) eine Ionenkanal-vermittelte ATP-Freisetzung (Fitz 2007). Die vesikuläre Freisetzung von ATP erfolgt über Exozytose und bedarf einen intrazellulären Anstieg der Ca^{2+} Konzentration (Ransford *et al.* 2009). Eine Ionenkanal-vermittelte ATP-Freisetzung wurde bereits für eine Vielzahl von Ionenkanälen beschrieben, u.a. für den CFTR (Prat *et al.* 1996; Reigada & Mitchell 2005), den purinergen P2X7 Rezeptor (Ransford *et al.* 2009), sogenannte Spannungs-abhängige Anionen-Kanäle (Fitz 2007) und Maxi-Anionen Kanäle (Bell *et al.* 2003), sowie über Pannexin- und Connexin-Hemikanäle (Bao *et al.* 2004a; Bao *et al.* 2004b; Ransford *et al.* 2009; Luckprom *et al.* 2011; Hanner *et al.* 2012).

Interessanterweise wurde für Pannexin- und Connexin-Hemikanäle bereits gezeigt, dass sie zu einer mechanosensitiven ATP-Freisetzung befähigt sind (Guyot & Hanrahan 2002; Bao *et al.* 2004a; Bao *et al.* 2004b; Cherian *et al.* 2005; Ransford *et al.* 2009; Boyce *et al.* 2014). Pannexin- und Connexin-Proteine zählen zur Familie der *Gap Junctions* und sind beide zur Ausbildung von sogenannten Hemikanälen (bestehend aus jeweils 6 Pannexin- bzw. Connexin-Proteinen) befähigt (Evans & Martin 2002; Scemes *et al.* 2007; Shestopalov & Panchin 2008). Pannexine kommen meist als ungekoppelte (englisch: *non junctional*) Hemikanäle vor, die eine Kommunikation zwischen dem Cytoplasma und dem extrazellulären Raum herstellen (Bao *et al.* 2004a; Shestopalov & Panchin 2008). Connexine hingegen können über eine Kopplung zweier Connexin-Hemikanäle von benachbarten Zellen eine interzelluläre Zell-verbindernde *Gap junction* ausbilden (Scemes *et al.* 2007; Shestopalov & Panchin 2008). Zudem besitzen Pannexin- und Connexin-Proteine eine ähnliche Leitfähigkeit für Ca^{2+} Ionen, ATP und andere Signalmoleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 1,5 kDa (D'hondt *et al.* 2011), können in Vertebraten koexistieren (Shestopalov & Panchin 2008) und wurden schon in einer Vielzahl von Geweben und Organen nachgewiesen (Ransford *et al.* 2009; D'hondt *et al.* 2011; Boyce *et al.* 2014) u.a. auch in der Lunge von Mammalia (Guyot & Hanrahan 2002; Baranova *et al.* 2004; Ransford *et al.* 2009). Bisher wurden 24 verschiedene Connexin-Typen sowie 3 verschiedene Pannexin-Typen (Panx1, 3 und 3) bei Mammalia beschrieben (Baranova *et al.* 2004; D'hondt *et al.* 2011). Bei *X. laevis* wurden hingegen nur 7 verschiedene Connexin-Typen (z.B. Cx30, Cx43) und zwei verschiedene Pannexin-Typen (Panx1 und 2) nachgewiesen (Boer & van der Heyden 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnten codierende Transkripte der Connexin-Hemikanäle Cx43 und Cx30, sowie des Pannexin-Hemikanals Panx1 in Lungenhomogenaten von *X. laevis* nachgewiesen werden (Abb. 14). Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Arbeiten, in denen Untersuchungen an *X. laevis* Oocyten und Embryonen, sowie vergleichende Sequenzanalysen durchgeführt wurden, überein (Gimlich *et al.* 1990; Boer & van der Heyden 2005). Zusammengenommen mit ihrer Fähigkeit zur mechanosensitiven ATP-Freisetzung, stellten Connexin- und Pannexin-Hemikanäle potentielle Mechanosensoren für den HD-induzierten Effekt am pulmonalen Epithel von *X. laevis* dar.

Der Nachweis einer Beteiligung der Connexin- und Pannexin-Hemikanäle an dem HD-induzierten Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit mittels spezifischer Inhibitoren der Connexin- (MFA (Luckprom *et al.* 2011)) und Pannexin- (Probenecid (Silverman *et al.* 2008; Patel *et al.* 2014)) Hemikanäle aufgezeigt werden. In den ATP-Konzentrations-Messungen wurde der unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmakon) detektierte HD-induzierte Anstieg der $[ATP]_e$ sowohl durch Inkubation des pulmonalen Epithels mit MFA als auch mit Probenecid vollständig inhibiert (Abb. 21). Anhand dieser Daten konnte somit eine mechanosensitive HD-induzierte ATP-Freisetzung über die Hemikanäle nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in den Ussing-Kammer Experimenten der HD-induzierte Abfall des I_{sc} sowohl durch MFA (Abb. 16) als auch in Anwesenheit von Probenecid (Abb. 17) inhibiert (vgl. Ergebnisse 3.1.1.2). Basierend auf der Tatsache, dass der HD-induzierte Stromabfall nachweislich auf einer Aktivierung der K_{ATP} Kanäle beruht (Richter 2010), konnte demnach ein direkter Einfluss der Hemikanal-Inhibitoren (MFA und Probenecid) auf die Aktivität der K_{ATP} Kanäle nachgewiesen werden. Zusammengenommen mit der Erkenntnis, dass die Applikation von HD eine mechanosensitive ATP-Freisetzung über Connexin- und Pannexin-Hemikanäle induzierte, lassen diese Ergebnisse auf eine indirekte Aktivierung der K_{ATP} Kanäle schließen. Eine direkte Mechanosensitivität der K_{ATP} Kanäle erscheint im pulmonalen Epithel von *X. laevis* hingegen als sehr unwahrscheinlich, da der HD-induzierte und K_{ATP} Kanal-abhängige Stromabfall in Anwesenheit der Hemikanal-Inhibitoren vollständig ausblieb (Abb. 16 und 17). Die Hemikanal-Inhibitoren imitierten somit den Effekt einer K_{ATP} Kanal Inhibition. Etwaige unspezifische Wirkungen der verwendeten Inhibitoren konnten zudem in TEVC Messungen an nativen *X. laevis* Oocyten ausgeschlossen werden. Native *X. laevis* Oocyten besitzen endogene Connexin-Hemikanäle wie z.B. Cx43 (Boer & van der Heyden 2005), welches in dieser Arbeit auch auf mRNA Ebene in Lungenhomogenaten von *X. laevis* nachgewiesen wurde (Abb. 14). In den durchgeführten TEVC Messungen zeigte der K_{ATP} Kanal Inhibitor HMR1098 keine

unspezifischen Effekte auf die Connexin-Hemikanäle (Abb. 18). Im Gegensatz dazu konnte in einer parallelen Studie am Institut für Tierphysiologie (JLU Gießen) unter Verwendung des gleichen Modellsystems gezeigt werden, dass MFA die Aktivität der Connexin-Hemikanäle inhibiert (Geißert 2011). Auch eine etwaige unspezifische Aktivierung des hENaCs durch den K_{ATP} Kanal Inhibitor HMR1098 konnte ausgeschlossen werden (Abb. 19). Zusammenfassend belegen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse eine HD-induzierte indirekte Aktivierung von K_{ATP} Kanälen in Folge einer ATP-Freisetzung über mechanosensitive Pannexin- und Connexin-Hemikanäle.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass in der vorliegenden Arbeit die mechanosensitive ATP-Freisetzung nur indirekt in Form von HD-induzierten Änderungen der $[ATP]_e$ untersucht wurde. Ein direkter Nachweis für Veränderungen der $[ATP]_i$ wäre anhand der verwendeten nativen Lungenpräparate hingegen nicht möglich gewesen. Bisher wurden Untersuchungen zur Änderungen der $[ATP]_i$ in Folge von mechanischem Stress nur mit Zellkulturen durchgeführt (Cavanaugh *et al.* 2001). Für diese Studien lysierten Cavanaugh *et al.* die Zellen nach der mechanischen Stimulation und ermittelten über einen Lumineszenz-Assay die $[ATP]_i$. Mit dem restlichen Lysat wurde die Anzahl der gesamten in der Probe enthaltenen Proteine bestimmt und die gemessene $[ATP]_i$ darauf normalisiert (Cavanaugh *et al.* 2001). Solche Untersuchungen wären mit dem hier verwendeten nativen Gewebe, welches neben Pneumonocyten auch Endothelzellen, Bindegewebe usw. enthält, nicht möglich gewesen. Eine HD-induzierte ATP-Freisetzung über mechanosensitive Hemikanäle wird jedoch durch die Tatsache gestützt, dass dieses Phänomen bereits für Cx43 (Guyot & Hanrahan 2002) und Panx1 (Ransford *et al.* 2009) in pulmonalen Epithelzellen nachgewiesen wurden. Zudem wurde in einer weiteren Studie eine Co-Lokalisation von Kir6.1 und Cx43 in *lipid rafts* aufgezeigt (Ahmad Waza *et al.* 2012). Bei einer Co-Lokalisation von K_{ATP} Kanälen und Hemikanälen in Multiprotein-Komplexen würden vermutlich auch lokale Änderungen der $[ATP]_i$ ausreichen, um K_{ATP} Kanäle zu aktivieren und nicht eine signifikante Änderung der gesamten $[ATP]_i$ bedingen. Eine Ausbildung solcher Multiprotein-Signalkomplexe wurde bereits für den CFTR beschrieben (Huang *et al.* 2001). Huang *et al.* zeigten eine Co-Lokalisation des CFTR mit seinen regulatorischen Interaktionspartnern (z.B. PKA, Adenylatzyklase) auf, wodurch die lokal begrenzte Bildung von cAMP bereits zu einer Aktivierung des CFTR führen kann (Huang *et al.* 2001). Eine Aktivierung von K_{ATP} Kanälen in Folge einer Pannexin-Hemikanal vermittelten ATP-Freisetzung und der damit einhergehenden Abnahme der $[ATP]_i$, wurde zudem in Neuronen nachgewiesen (Kawamura *et al.* 2010). Diese Tatsachen untermauern eine indirekte Aktivierung von K_{ATP} Kanälen

durch eine HD-induzierte ATP-Freisetzung über mechanosensitive Connexin- und Pannexin-Hemikanäle.

4.1.4 Die HD-induzierten Effekte im pulmonalen Epithel von *X. laevis* unterliegen keiner Desensitivierung

Die Atmung ist ein kontinuierlicher Prozess, der bei jeder Atembewegung mechanische Kräfte auf das pulmonale Epithel bedingt. In Anlehnung an diesen physiologischen Charakter der Atmung sollte in der vorliegenden Arbeit eine Wiederholbarkeit der zuvor beschriebenen HD-induzierten Effekte (HD-induzierter Stromabfall und mechanosensitive ATP-Freisetzung) überprüft werden. Die zyklische Applikation von HD (in 30 sec Intervallen) auf das pulmonale Epithel zeigte auch über einen Zeitraum von 30 min einen wiederholbaren HD-induzierten Abfall des I_{SC} (Abb. 23). Zudem konnte eine HD-induzierte ATP-Freisetzung über eine längere zeitliche Periode nachgewiesen werden (Abb. 25). Selbst nach der 30. Applikation von HD wurde ein signifikanter Anstieg der $[ATP]_e$ detektiert (Abb. 25). Diese Ergebnisse waren ein weiterer Beleg für die zuvor beschriebene Hypothese der indirekten K_{ATP} Kanal Aktivierung über eine mechanosensitive Hemikanal-vermittelte ATP-Freisetzung (vgl. Diskussion 4.1.3). Des Weiteren stehen diese Daten im Einklang mit einer früheren Studie, in der humane Atemwegs-Epithelzellen sowohl zyklischen als auch dauerhaften transepithelialen Druck-Änderungen ausgesetzt wurden (Button *et al.* 2007). Während in den zyklisch stimulierten Zellen über einen Zeitraum von 1 h ein Anstieg der $[ATP]_e$ detektiert werden konnte, zeigte sich in den dauerhaft mechanisch gedehnten Zellen keine Änderung der $[ATP]_e$ (Button *et al.* 2007). Demnach scheinen die kontinuierlichen Änderungen der Druck-Verhältnisse, was den physiologischen Bedingungen der Mammalia-Atmung entspricht, der entscheidende Stimulus für die ATP-Freisetzung zu sein.

Während in der vorliegenden Arbeit die HD Applikation zu einer Freisetzung von ~11 nM ATP führte (vgl. Diskussion 4.1.2), wurde in einer anderen Studie in Folge von mechanischer Stimulation ein Anstieg der $[ATP]_e$ von bis zu 1 μ M detektiert (Okada *et al.* 2006). Es stellt sich somit die Frage, wie Epithelzellen dazu in der Lage sind ATP kontinuierlich freisetzen können, ohne dabei in metabolischen Stress zu geraten. Eine mögliche Erklärung wäre ein etwaiges ATP Recycling-System. Spezielle ATP-Transporter könnten Beispielsweise freigesetztes ATP wieder zurück in die Zelle transportieren. Solche ATP-Transporter sind in der Literatur bereits in Vesikeln von pulmonalen Epithelzellen beschrieben worden (Okada *et al.* 2013; Sesma *et al.* 2013). In der Zellmembran wurden jedoch bisher noch keine ATP-

Transporter nachgewiesen. Eine weitere Form des ATP Recyclings wurde hingegen bereits in Form eines komplexen Ectonukleotidase-Systems gezeigt. Die Ectonukleotidasen können extrazelluläres ATP innerhalb von Sekunden zu Purinen und Pyrimidinen abbauen (Lazarowski 2003; Button *et al.* 2007). Das auf diese Weise gebildete Adenosin kann über sogenannte Nucleosid-Transporter wieder zurück in die Zelle transportiert werden (Wang *et al.* 1997). Das Ectonukleotidase-System kann zudem von mechanischen Kräften beeinflusst werden. Eine Erhöhung der Ectonukleotidasen Konzentration in Folge einer zyklischen Zell-Dehnung wurde bereits nachgewiesen (Eckle *et al.* 2007). Auch wenn die Herkunft und etwaige Recycling-Systeme noch nicht vollständig geklärt sind, so steht es doch außer Frage, dass Epithelzellen zu einer mechanosensitiven ATP-Freisetzung befähigt sind.

In der vorliegenden Arbeit zeigte die zyklische HD Applikation zum einen die Wiederholbarkeit der mechanosensitiven ATP-Freisetzung auf. Des Weiteren konnte die Reproduzierbarkeit der Kurzzeiteffekte in Form des HD-induzierten Stromabfalls nachgewiesen werden. Es konnten jedoch auch Langzeiteffekte der zyklischen HD Applikation auf den Grundstrom des Epithels aufgezeigt werden. In Folge der 30 min zyklischen mechanischen Dehnung kam es zu einer signifikanten Erhöhung des I_{SC} (Abb. 24). Dieser Effekt war unter Inkubation des Epithels mit dem K_{ATP} Kanal Inhibitor HMR1098 jedoch signifikant reduziert. Somit war die detektierte Erhöhung des Grundstroms u.a. abhängig von der Aktivität der K_{ATP} Kanäle (Abb. 24). Der detektierte Anstieg des Grundstroms sprach für eine durch zyklische HD-Applikation induzierte Erhöhung der transepithelialen Ionenleitfähigkeit, etwa durch eine erhöhte Abundanz von Ionenkanälen und/oder Transportern. Ein solches Phänomen wurde bereits für die Na^+/K^+ -ATPase beschrieben. Fischer *et al.* konnten in alveolaren Epithelzellen eine Erhöhung der Abundanz der Na^+/K^+ -ATPase in Folge einer zyklischen mechanischen Dehnung feststellen (Fisher & Margulies 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des spezifischen ENaC Inhibitors Amilorid eine Erhöhung der ENaC Aktivität in Folge der zyklischen mechanischen Stimulierung im pulmonalen Epithel von *X. laevis* nachgewiesen werden (Abb. 26). Da die Erhöhung des Grundstroms jedoch in Anwesenheit des K_{ATP} Kanal Inhibitors HMR1098 reduziert war, scheint die Aktivität der K_{ATP} Kanäle eine modulierende Wirkung auf den ENaC zu haben. Diese Hypothese steht im Einklang mit früheren Studien an alveolaren Epithelzellen (Leroy *et al.* 2006; Trinh *et al.* 2007; Bardou *et al.* 2012). In elektrophysiologischen Messungen resultierte eine Langzeit-Inkubation (24 h) der Epithelzellen mit dem K_{ATP} Kanal Inhibitor Glibenclamid in einer Reduzierung des Grundstroms sowie des Amilorid-sensitiven Na^+ Stroms (Leroy *et al.* 2006). Zudem konnte

molekularbiologisch eine Abnahme der ENaC Expression durch die Inkubation der alveolaren Epithelzellen mit Glibenclamid aufgezeigt werden, wohingegen bekannte Aktivatoren der K_{ATP} Kanäle zu einer gesteigerten ENaC Expression führten (Trinh *et al.* 2007; Bardou *et al.* 2012). Demnach könnte die zyklische mechanische Dehnung der *X. laevis* Lunge zu einer K_{ATP} Kanal-vermittelten Erhöhung der ENaC Expression und damit einhergehend zu einer Verstärkung des Amilorid-sensitiven Stroms führen. Eine weitere Erklärung für die Erhöhung des Grundstroms könnte eine ATP-induzierte Aktivierung von purinergen Rezeptoren (P2X und P2Y) darstellen. In einer früheren Arbeit am pulmonalen Epithel von *X. laevis* zeigte sich durch die Erhöhung der $[ATP]_e$ und der damit einhergehenden Aktivierung von purinergen Rezeptoren ein signifikanter Anstieg des I_{sc} (erhöhte Na^+ Absorption) (Fronius *et al.* 2004). Auch wenn der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht aufgeklärt wurde, so konnte in dieser Arbeit als ein Langzeiteffekt der zyklischen mechanischen Stimulation des pulmonalen Epithels eine erhöhte Na^+ Absorption verzeichnet werden. Zudem konnte eine Wiederholbarkeit der Kurzzeiteffekte (HD-induzierter Stromabfall und mechanosensitive ATP-Freisetzung) auch über einen längeren Zeitraum aufgezeigt werden. Die Kurzzeiteffekte unterliegen somit keiner Desensitivierung. In Übereinstimmung mit den zyklischen Atembewegungen der Mammalia, spricht dies für eine physiologische Relevanz der hier detektierten Effekte.

4.1.5 HD induziert eine basolaterale K^+ Sekretion

In den vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass apikal lokalisierte K_{ATP} Kanäle indirekt durch eine HD-induzierte ATP-Freisetzung über mechanosensitive Pannexin- und Connexin-Hemikanäle aktiviert werden. Das Ergebnis dieses Mechanotransduktions-Prozesses war eine apikale K^+ Sekretion, die in der charakteristischen HD-induzierten Abnahme des I_{sc} und somit einer Hyperpolarisation der Epithelzellen resultierte (vgl. Diskussion 4.1.2 bis 4.1.3). In der Literatur wird hingegen basolateralen K^+ Kanälen eine maßgebliche Beteiligung an der Aufrechterhaltung und Regulation des Membranpotentials zugeschrieben (Greenwood *et al.* 2009). Diverse K^+ Kanäle wurden bereits in der basolateralen Membran von pulmonalen Epithelzellen nachgewiesen. Zu diesen zählen u.a. Spannungs-abhängige KCNQ K^+ Kanäle (mit den Subtypen KCNQ1 bis KCNQ5), Ca^{2+} -sensitive K^+ Kanäle und Kir Kanäle (Bardou *et al.* 2009; Hollenhorst *et al.* 2011). Aufgrund dessen sollte in der vorliegenden Arbeit eine etwaige Beteiligung von basolateralen K^+ Kanälen am HD-induzierten Effekt überprüft werden.

Für Untersuchungen von basolateralen K^+ Kanäle stellt die apikale Permeabilisierung eine geeignete Methode dar (Schultheiss & Diener 1997; Trinh *et al.* 2007). Die apikale Permeabilisierung erfolgte in den Ussing-Kammer Messungen in Anwesenheit eines K^+ Gradienten (apikal Hoch $K^+ \rightarrow$ basolateral NRS) mittels des Porenbildner Nystatin (Lehr 2002; Schultheiss & Diener 1997). Im apikal permeabilisierten Epithel konnte in dieser Arbeit eine HD-induzierte Stromstimulation detektiert werden (Abb. 28). Der HD-induzierte Effekt beruhte dabei auf einer mechanosensitiven Aktivierung einer basolateralen K^+ Sekretion, da er in Anwesenheit von allgemeinen K^+ Kanal Inhibitoren ($BaCl_2$ und TPeA) ausblieb (Abb. 28 und 29). Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Beteiligung von mechanosensitiven Hemikanälen an dem HD-induzierten Effekt (vgl. Diskussion 4.1.3), zeigte der Connexin Inhibitor MFA keinen Einfluss auf den HD-induzierten Effekt im apikal permeabilisierten Epithel (Abb. 31). Demnach konnte eine Beteiligung der Hemikanäle am HD-induzierten Effekt der basolateralen Membran widerlegt werden. Auch die Aktivität von K_2P Kanälen spielte keine Rolle für den HD-induzierten Effekt (Abb. 32). Im Gegensatz dazu konnte eine Beteiligung von KCNQ K^+ Kanälen aufgezeigt werden, da der HD-induzierte Effekt in Anwesenheit des bekannten KCNQ K^+ Kanal Inhibitors XE991 ausblieb (Abb. 33). Ein Einfluss der basolateralen KCNQ K^+ Kanälen an dem HD-induzierten Effekt konnte zudem auch am nicht permeabilisierten Epithel und somit unter physiologischen Bedingungen, aufgezeigt werden (Abb. 34). Demnach kommt es im pulmonalen Epithel von *X. laevis* sowohl zu einer HD-induzierten apikalen K^+ Sekretion über K_{ATP} Kanäle als auch zu einer basolateralen K^+ Sekretion über KCNQ K^+ Kanäle.

Die Hypothese einer gleichzeitigen Aktivierung von K_{ATP} und KCNQ K^+ Kanälen wird durch die Tatsache bekräftigt, dass a) sowohl K_{ATP} Kanäle als auch KCNQ K^+ Kanäle bereits im pulmonalen Epithel nachgewiesen wurden (Bardou *et al.* 2009); b) beide K^+ Kanal Typen wichtige Regulatoren des Membranpotentials in Epithelzellen sind (Leroy *et al.* 2006); c) die Aktivität von K_{ATP} und KCNQ K^+ Kanälen mit der Expression des $\alpha\beta\gamma$ ENaC und des CFTR im alveolaren Epithel korreliert (Leroy *et al.* 2006; Bardou *et al.* 2012) (vgl. Diskussion 4.1.4); und demnach d) beide K^+ Kanäle einen maßgeblichen Einfluss auf die transepithelialen Ionentransport-Prozesse haben (Leroy *et al.* 2006; Trinh *et al.* 2007; Greenwood *et al.* 2009; Bardou *et al.* 2012). Der Nachweis einer direkten Mechanosensitivität der KCNQ K^+ Kanäle liegt bisweilen noch nicht vor und konnte auch in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgen. Es konnte jedoch bereits für die KCNQ K^+ Kanal Subtypen KCNQ-1, -4 und -5 eine Sensitivität gegenüber Änderungen des Zellvolumens nachgewiesen werden

(Yeung *et al.* 2006; Hammami *et al.* 2009; Takahira *et al.* 2011) und somit wird eine Mechanosensitivität der KCNQ K⁺ Kanäle weiterhin diskutiert (Morris 2011).

Ungeachtet der Frage, ob KCNQ K⁺ Kanäle als Mechanosensoren fungieren oder indirekt über etwaige Mechanotransduktions-Prozesse beeinflusst werden, konnte in der vorliegenden Arbeit eine HD-induzierte basolaterale K⁺ Sekretion über diese Kanäle im pulmonalen Epithel von *X. laevis* aufgezeigt werden. Der zugrunde liegende Aktivierungs-Mechanismus sowie die Identifizierung des KCNQ K⁺ Kanal Typs bedarf hingegen weitere Untersuchungen.

4.1.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte ein direkter und zudem zyklisch wiederholbarer HD-induzierter Abfall des I_{SC} im pulmonalen Epithel von *X. laevis* nachgewiesen werden. Der HD-induzierte Stromabfall beruhte dabei auf der indirekten Aktivierung von K_{ATP} Kanälen in Folge einer mechanosensitiven ATP-Freisetzung über Connexin- und Pannexin-Hemikanäle (siehe Abb. 41). Es konnte somit ein neuer Mechanotransduktions-Mechanismus, in dem Pannexin- und Connexin-Hemikanäle als Mechanosensoren fungieren, im pulmonalen Epithel von *X. laevis* aufgezeigt werden. Dieser Mechanotransduktions-Prozess könnte möglicherweise auch generell in Epithelien stattfinden.

In Na⁺ resorbierenden Epithelien wie dem pulmonalen Epithel, ist eine Erhöhung des transepithelialen Ionentransports gleichzusetzen mit einer erhöhten Flüssigkeitsabsorption. Die detektierte HD-induzierte Abnahme des I_{SC} weist somit auf eine verringerte Absorption des Epithels hin. Die physiologische Relevanz des aufgezeigten Mechanotransduktions-Prozesses könnte demnach eine Art Feedback-Mechanismus des Epithels sein, welcher die Regulation des transepithelialen Ionentransports und damit einhergehend des Flüssigkeitsvolumens über dem Epithel, an die mechanische Ausdehnung des Epithels anpasst. Wenn man davon ausgeht, dass bei der Atmung der Mammalia das alveolare Epithel beim Einatmen wie ein Luftballon ausgedehnt wird (vgl. Einleitung 1.4), resultiert dies folglich in einer Vergrößerung der Oberfläche. Um den ALF unter diesen Bedingungen auf einer konstanten Höhe zu halten, müsste demnach eine verringerte Flüssigkeitsresorption stattfinden. Dieser Kurzzeiteffekt konnte in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden. Vielmehr noch war der Abfall des I_{SC} auch unter einer zyklischen mechanischen Stimulation, was den physiologischen Bedingungen der Atmung entspricht, detektierbar und unterlag keiner Desensitivierung.

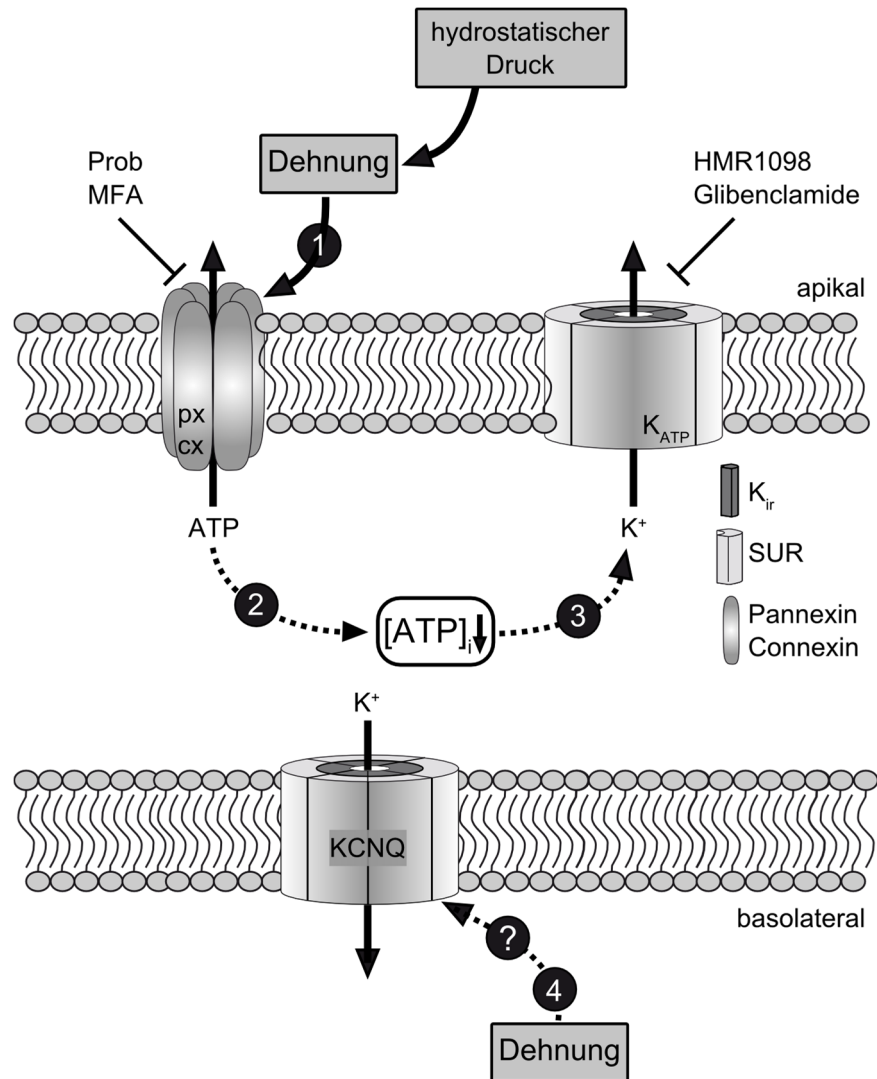


Abb. 41: Zusammenfassung der HD-induzierten Effekte am pulmonalen Epithel von *X. laevis*.

1) Die Applikation von HD resultiert in einer Dehnung des Epithels und induziert eine mechanosensitive Aktivierung von Pannexin- (px) und Connexin- (cx) Hemikanälen. 2) Die Öffnung der Hemikanäle führt zu einer Freisetzung von ATP, welche durch die Hemikanal Inhibitoren Probenecid (Prob) und MFA inhibiert werden kann. Die ATP-Freisetzung bedingt zudem eine Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration $[ATP]_i$. 3) In Folge der Abnahme der $[ATP]_i$ kommt es zu einer Aktivierung von apikal lokalisierten K_{ATP} Kanälen. Dies resultiert in einer K^+ Sekretion und dadurch in einer HD-induzierten Abnahme des I_{SC} . 4) Des Weiteren führt die HD-induzierte Dehnung des Epithels über einen bisher unbekanntem Mechanismus zur Öffnung von basolateralen KCNQ K^+ Kanälen. Damit verbunden kommt es zu einer HD-induzierten basolateralen K^+ Sekretion. Die Abbildung wurde verändert nach Richter *et al.* (2014).

Als ein Langzeiteffekt zeigte sich in Folge der zyklischen mechanischen Stimulation eine Erhöhung des Grundstroms. Dieser Langzeiteffekt war mit einer erhöhten Na^+ Absorption

gleichzusetzen und dementsprechend auch mit einer erhöhten Flüssigkeitsresorption. Demnach konnte in dieser Arbeit gleichzeitig auch eine aktive Anpassung des Epithels an sich zyklisch ändernde mechanische Kräfte nachgewiesen werden, die sich in Form einer Modulation der transepithelialen Ionentransport-Prozesse darstellte. Dieser Langzeiteffekt könnte einer etwaigen Erhöhung der Permeabilität des Epithels und dem dadurch bedingten vermehrten Einströmen von Flüssigkeit in den Luftraum in Folge der zyklischen Dehnung, entgegenwirken.

Es ist bereits bekannt, dass Epithelzellen schon unter basalen Bedingungen kontinuierlich ATP freisetzen (Taylor *et al.* 1998; Okada *et al.* 2006) und freigesetztes ATP als autokrines und parakines Signalmolekül diverse zelluläre Prozesse modulieren kann (Lazarowski 2003; Fitz 2007). Die hier aufgezeigte mechanosensitive ATP-Freisetzung stellt somit für das pulmonale Epithel eine Möglichkeit dar, die Menge an freigesetztem ATP zu regulieren und an etwaige Stresssituationen anzupassen. Eine Kopplung der ATP-Freisetzung an das Auftreten mechanischer Kräfte wäre demnach von großer Bedeutung für die Physiologie der Epithelzellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass HD nicht nur eine apikale K^+ Sekretion sondern gleichzeitig auch eine basolaterale K^+ Sekretion induziert, die über KCNQ K^+ Kanäle vermittelt wird (siehe Abb. 41). Der zugrundeliegende Mechanismus der HD-induzierten KCNQ K^+ Kanal Aktivierung ist noch nicht aufgeklärt und könnte wie bei den K_{ATP} Kanälen auch indirekt über einen Mechanotransduktions-Prozess hervorgerufen werden. Dennoch erscheint eine gleichzeitige Aktivierung von K_{ATP} Kanälen und KCNQ K^+ Kanälen aus physiologischer Sicht als sinnvoll. Für beide K^+ Kanal Typen wurde bereits eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der *alveolar clearance* (Sakuma *et al.* 1998; Leroy *et al.* 2006; Trinh *et al.* 2007; Bardou *et al.* 2012) sowie bei Reparaturprozessen von pulmonalen Epithelien (Trinh *et al.* 2007; Bardou *et al.* 2009) beschrieben, Prozesse die maßgeblich von mechanischen Kräften beeinflusst werden.

Die hier aufgezeigten neuen Erkenntnisse der Wirkung von mechanischen Kräften auf die transepithelialen Ionentransport-Prozesse könnten auch generell im Alveolarepithel von Mammalia eine wichtig Rolle spielen und möglicherweise neue Ansatzpunkte zur Behandlung von VILI Patienten sein. Doch es sind längst noch nicht alle Komponenten der komplexen Mechanotransduktions-Prozesse im pulmonalen Epithel geklärt.

4.2 Die modulierende Wirkung von *n*-Alkoholen auf die Aktivität des CFTR

Ein Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Charakterisierung des Mechanismus der *n*-Alkohol-induzierten Modulierung der Aktivität des CFTR. In der Diskussion soll nachfolgend zunächst ein Überblick über die bisherigen Kenntnisse zur Wirkung von *n*-Alkoholen auf Ionenkanäle und Rezeptoren sowie ihrer Verwendung in der Medizin und Pharmakologie erfolgen (Diskussion 4.2.1). Anschließend sollen vor diesem Hintergrund die hier erzielten Ergebnisse sowie deren physiologische Relevanz diskutiert werden.

4.2.1 *n*-Alkohole: Hypothesen und Fakten

Primäre Alkohole (*n*-Alkohole) wie Ethanol (EtOH), 1-Heptanol (HEP) und 1-Octanol (OCT) sind in der Wissenschaft hauptsächlich auf Grund ihrer generellen anästhetischen Wirkung bekannt (Alifimoff *et al.* 1989; Fang *et al.* 1997). Neben der anästhetischen Wirkung, sind *n*-Alkohole in der Medizin auch durch ihre Verwendung als pharmazeutische Therapie zur Behandlung von neurologischem unkontrolliertem Zittern (essentiell Tremor) bekannt (Nahab *et al.* 2011; Haubenberger *et al.* 2014). Des Weiteren wird OCT als Lösungsmittel u.a. bei der Herstellung von Inhalationsmedikamenten eingesetzt (Qi *et al.* 2009). Durch eine Aerolisierung von Medikamenten können die Wirkstoffe bei Inhalation bis tief in die unteren Atemwege gebracht werden (Qi *et al.* 2009).

Während die potentielle anästhetische Wirkung der *n*-Alkohole bereits lange vor der Entdeckung von Stickstoffmonoxid (NO) und Diethylether bekannt war, so sind die zugrundeliegenden Mechanismen bis heute nicht vollständig geklärt (Chau 2010). Es gibt zwei verschiedene Hypothesen wie *n*-Alkohole ihre anästhetische Wirkung über das zentrale Nervensystem (ZNS) realisieren, die Lipid-Hypothese und die Protein-Hypothese (Peoples *et al.* 1996). Die Lipid-Hypothese beruht auf der Annahme, dass *n*-Alkohole die Fluidität von Zellmembranen erhöhen und in Folge dessen indirekt die Aktivität von neuronalen Zellen modulieren können (Kaufman 1977; Zavoico & Kutchai 1980; Lyon *et al.* 1981; Goldstein 1984). Im Gegensatz dazu wird in der Protein-Hypothese eine direkte Interaktion von *n*-Alkoholen mit Ionenkanälen/Rezeptoren des ZNS vermutet, die in einer anästhetischen Wirkung resultiert (Alifimoff *et al.* 1989; Peoples *et al.* 1996). Die Lipid-Hypothese scheint heute überholt zu sein, da in zahlreichen Studien eine Interaktion von *n*-Alkoholen mit verschiedenen Proteinen nachgewiesen werden konnte. Es wurde bereits eine modulierende

Wirkung von *n*-Alkoholen auf die Aktivität von Spannungs-abhängigen Na⁺ (Horishita & Harris 2008) und K⁺ (Covarrubias *et al.* 1995) Kanälen sowie auf eine Vielzahl von Rezeptoren der erregbaren, neuronalen Zellen wie die Strychnin-sensitiven Glycin Rezeptoren (GlyR) (Mihic *et al.* 1997), Gamma-Aminobuttersäure (englisch: *gamma-amino-butyric acid*; GABA) Rezeptoren (Mihic *et al.* 1997), nikotinerge Acetylcholin Rezeptoren (nAChR) (Franks & Lieb 1994; Wood *et al.* 1995), der sogenannte TRPA1 Rezeptor (englisch: *Transient Receptor Potential Ankyrin 1*) (Komatsu *et al.* 2012), und purinerge P₂X Rezeptoren (Weight *et al.* 1999; Dilger 2002) gezeigt. Aufgrund der anästhetischen Wirkung von *n*-Alkoholen wurden die meisten Untersuchungen an Ionenkanälen bzw. Rezeptoren von neuronalen/erregbaren Zellen durchgeführt. Über die Wirkung von *n*-Alkoholen auf nicht-erregbare Zellen ist hingegen kaum etwas bekannt. In einer Studie von Marcet *et al.* konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass OCT die Aktivität des CFTR reguliert (Marcet *et al.* 2004). Der CFTR ist in der apikalen Membran von Epithelzellen lokalisiert (Tarran 2004; Fang *et al.* 2006). Die *n*-Alkohol-induzierte CFTR Aktivierung schien dabei jedoch nicht auf einer direkten Interaktion mit dem CFTR Protein zu beruhen, sondern indirekt über die PKA vermittelt zu werden (Marcet *et al.* 2004).

Der CFTR ist im pulmonalen Epithel hoch abundant und spielt eine wichtige Rolle für die Flüssigkeitshomöostase (Tarran 2004; Fang *et al.* 2006). Die Verwendung von OCT als Lösungsmittel in der Inhalationstherapie führt jedoch dazu, dass der CFTR dem *n*-Alkohol OCT ausgesetzt ist. In Anbetracht der Studie von Marcet *et al.* (Marcet *et al.* 2004), kann dies die Aktivität des CFTR im pulmonalen Epithel beeinflussen und Nebenwirkungen auf die Flüssigkeitshomöostase auslösen. Auf Grund dessen scheint die Aufklärung des Wirkmechanismus der *n*-Alkohol-induzierten CFTR Aktivierung sowohl aus medizinischer als auch aus pharmakologischer Sicht wichtig. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Wirkung von *n*-Alkoholen auf die Aktivität des CFTR in einem nativen pulmonalen Epithel sowie in hCFTR exprimierenden Oocyten zu überprüfen und den zugrundeliegenden Wirkmechanismus zu charakterisieren.

4.2.1 Langkettige *n*-Alkohole induzieren eine CFTR-abhängige Cl⁻ Sekretion im pulmonalen Epithel

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals in Ussing-Kammer Experimenten an einem nativen pulmonalen Epithel (*X. laevis*) der Einfluss von *n*-Alkoholen (EtOH, HEP und OCT) auf den transepithelialen Ionentransport untersucht. Die Applikation der *n*-Alkohole HEP und OCT

auf das pulmonale Epithel von *X. laevis* führte zu einem Anstieg des I_{sc} (Abb. 36 und 37). Der HEP und OCT-induzierte Stromanstieg wurde durch verschiedenen CFTR Inhibitoren (NPPB, Glibenclamid und CFTR_{Inh}-172 (Schultz *et al.* 1999)) geblockt (Abb. 36 - 38). Somit konnte eine HEP- und OCT-induzierte Aktivierung des CFTR Proteins in einem nativen pulmonalen Epithel nachgewiesen werden. Der kurzkettige *n*-Alkohol EtOH zeigte hingegen keinen Effekt auf den I_{sc} und dementsprechend auch keinen Einfluss auf die Aktivität des CFTRs (Abb. 35). Demnach scheint die Kettenlänge der *n*-Alkohole eine Rolle für die Aktivierung des CFTR zu spielen. Dieses Phänomen wurde bereits in der früheren Studie von Marcet *et al.* beschrieben (Marcet *et al.* 2004). Dort zeigte sich, dass die Wirkung der *n*-Alkohol abhängig von Anzahl der C-Atome war. Während kurzkettige *n*-Alkohole (wie EtOH, Butanol und 1-Hexanol) keinen Effekt auf den CFTR zeigten, konnten langkettige *n*-Alkohole (HEP, OCT) den CFTR aktivieren (Marcet *et al.* 2004).

Die Fähigkeit der *n*-Alkohole HEP und OCT den CFTR zu aktivieren, konnte des Weiteren auch am heterolog in Oocyten exprimierten hCFTR aufgezeigt werden. Während der grundlegende Nachweis der OCT-induzierten hCFTR Aktivierung bereits in einer früheren Studie erbracht wurde (Vitzthum 2011), konnte in der vorliegenden Arbeit zudem eine HEP-induzierte hCFTR Aktivierung nachgewiesen werden (Abb. 40). Somit wurde ein weiterer Beleg für die *n*-Alkohol-induzierte CFTR Aktivierung erbracht und die Erkenntnisse aus den zuvor beschriebenen Ussing-Kammer Messungen am pulmonalen Epithel von *X. laevis* untermauert.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des zugrundeliegenden Mechanismus der *n*-Alkohol-induzierten CFTR Aktivierung. Der CFTR zählt zur diversen Familie der ABC Proteine (Burke *et al.* 2008). Er besteht aus zwei TMD, welche jeweils mit einer intrazellulären Nukleotid-Bindedomäne assoziiert sind, sowie einer regulierenden Domäne (R-Domäne), welche Phosphorylierungsstellen für die PKA und Proteinkinase C (PKC) beinhaltet (Sheppard & Welsh 1999). Für die Aktivierung des CFTR Proteins muss sowohl die Bindung von ATP an seine Nukleotid-Bindedomänen erfolgen als auch die Phosphorylierung der R-Domäne durch die PKA (Sheppard & Welsh 1999). Die Phosphorylierung der R-Domäne setzt zunächst eine Adenylatzyklase-abhängige Umwandlung von ATP zu cAMP voraus. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration. In Folge dessen wird die PKA aktiviert und es kommt zur Phosphorylierung der R-Domäne (Levitan 1994; Aleksandrov *et al.* 2007).

In der früheren Studie von Marcet *et al.* wurde als Wirkmechanismus der *n*-Alkohol-induzierten CFTR Aktivierung die PKA als primärer Interaktionspartner für OCT beschrieben

(Marcet *et al.* 2004). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich hingegen, dass in Anwesenheit des Adenylatzyklase Inhibitors MDL-12330A sowohl OCT als auch HEP keinen Einfluss auf die CFTR Aktivität hatten. Diese Erkenntnisse konnte in den Experimenten am pulmonalen Epithel von *X. laevis* sowie in den hCFTR exprimierenden Oocyten belegt werden (Abb. 39 und 41). Die Fähigkeit von MDL-12330A die Adenylatzyklase zu inhibieren wurde bereits in diversen Epithelien wie dem Darmepithel (Feng *et al.* 2013), epididymalem Epithel (Leung & Wong 2000) und auch im Atemwegsepithel (Luo *et al.* 2013), aufgezeigt. Aufgrund dessen konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass die Adenylatzyklase den Interaktionspartner der langkettigen *n*-Alkohole OCT und HEP darstellt und diese den CFTR somit indirekt aktivieren. Eine Modulation der Adenylatzyklase-Aktivität wurde bereits in früheren Studien für *n*-Alkohole (z.B. HEP und Nonanol) und für Alkohole mit zwei (Diol) oder drei (Thilo) Hydroxylgruppen beschrieben (Yoshimura *et al.* 2006; Kou & Yoshimura 2007; Hasanuzzaman & Yoshimura 2010). Zudem stehen die hier gezeigten Ergebnisse nicht im Widerspruch zu der früheren Studie von Marcet *et al.* (2004). Die Adenylatzyklase generiert cAMP, welches dann an die PKA bindet und diese aktivieren kann (Fimia & Sassone-Corsi 2001). In dem cAMP/PKA-abhängigen CFTR Aktivierungsmechanismus steht die Adenylatzyklase somit am ganz Anfang der Signalkaskade und noch vor der PKA. Eine Diskrepanz ergibt sich nur darin, dass in der Studie von Marcet *et al.* kein *n*-Alkohol-induzierter Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration detektiert werden konnte (Marcet *et al.* 2004). Dieses Phänomen kann jedoch dadurch erklärt werden, dass es nur zu einer geringen und lokal begrenzten Änderungen der cAMP Konzentration kommt. Ein solches Phänomen der CFTR Aktivierung, ohne sichtbare Änderungen der intrazellulären cAMP Konzentration, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Huang *et al.* 2001; Li *et al.* 2007; Li & Naren 2010). Es kommt dabei zur Bildung eines Multiprotein Signalkomplexes des CFTR Proteins mit seinen regulierenden Interaktionspartnern (Adenylatzyklase und PKA) innerhalb spezialisierter Mikrodomänen (Li & Naren 2010). Durch diese Komplexbildung ist eine lokale Aktivierung des CFTRs möglich, ohne die gesamte intrazelluläre cAMP Konzentration zu beeinflussen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit die Adenylatzyklase als ein neuer Interaktionspartner von langkettigen *n*-Alkoholen (OCT und HEP) nachgewiesen werden. Die *n*-Alkohol-induzierte Aktivierung der Adenylatzyklase führte dann über den cAMP/PKA Signalweg zu einer Aktivierung des CFTR. Somit können langkettige *n*-Alkohole die Ionentransport-Prozesse in Epithelzellen modulieren. Über den hier aufgezeigten Wirkmechanismus könnten *n*-Alkohole zudem auch die Aktivität von Ionenkanälen und

Rezeptoren in neuronalen Zellen modulieren. Dies stellt einen neuen Aspekt zur generellen anästhetischen Wirkung von *n*-Alkoholen dar. So wurde bereits in einer früheren Studie gezeigt, dass die anästhetischen Effekte von *n*-Alkoholen mit der Modulation der Adenylatzyklase korrelieren (Wand *et al.* 2001). Zudem wurde die Adenylatzyklase-vermittelte Aktivierung der PKA als kritische Komponente der neuronalen EtOH Anästhesie identifiziert (Maas *et al.* 2005). Die PKA wurde darüber hinaus auch als wichtiger Modulator von Ionenkanälen und Rezeptoren, die bekannt dafür sind an der Anästhesie beteiligt zu sein (wie GlyR, GABA_A und nAChR), in der Literatur beschrieben (Levitan 1994; Talwar & Lynch 2014). Demzufolge könnte man mutmaßen, dass die Adenylatzyklase auch ein entscheidender Angriffspunkt bei den anästhetischen Effekten der *n*-Alkohole darstellen könnte.

4.2.2 Schlussfolgerung und physiologische Relevanz für die Lunge

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit am nativen pulmonalen Epithel von *X. laevis* gezeigt werden, dass a) der kurzketttige *n*-Alkohol EtOH keinen Einfluss auf den transepithelialen Ionentransport besitzt, b) langkettige *n*-Alkohole (HEP und OCT) eine CFTR-abhängige Cl⁻ Sekretion induzieren; c) die HEP- und OCT-induzierte CFTR Modulation auf einer *n*-Alkohol-induzierten Aktivierung der Adenylatzyklase beruht (Abb. 42). Da die Adenylatzyklase einen gemeinsamen Angriffspunkt der *n*-Alkohole darstellte, könnte dieser Mechanismus auch ein neuer Aspekt bei der Aufklärung der generellen anästhetischen Wirkung von *n*-Alkoholen sein.

Zudem sind die hier gezeigten Erkenntnisse wichtig für die potenzielle Verwendung von OCT als Lösungsmittel bei Inhalations-Therapien. Da der CFTR eine wichtige Rolle für die Flüssigkeitshomöostase in der Lunge spielt, könnte eine OCT-induzierte CFTR Aktivierung demnach unerwünschte Nebenwirkungen nach sich ziehen. Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass die Entstehung von kardiogenen pulmonalen Ödemen auf einer aktiven CFTR-abhängigen Cl⁻ Sekretion beruht, die sekundär einen Flüssigkeitseinstrom in die Alveolen bedingt (Solymosi *et al.* 2013). Basierend auf der Erkenntnis der vorliegenden Arbeit, dass OCT eine CFTR-abhängige Cl⁻ Sekretion im nativen pulmonalen Epithel induzierte, besteht somit die Gefahr während der Inhalations-Therapie die Bildung von pulmonalen Ödemen zu begünstigen. In Inhalations-Therapien könnten *n*-Alkohole demnach den Gasaustausch in der Lunge negativ beeinflussen und stellen somit ein Risiko für Patienten dar. Im Gegensatz dazu könnte eine Inhalation von *n*-Alkoholen für Mukoviszidose-Patienten durchaus hilfreich sein.

Diese Patienten leiden in Folge einer verminderten CFTR-abhängigen Cl^- Sekretion an einer Verschleimung der oberen Atemwege. Eine *n*-Alkohol-induzierte CFTR Aktivierung würde dem entgegenwirken. Aber auch hier kommt als limitierender Faktor hinzu, dass die *n*-Alkohole bei der Behandlung nur in die oberen Atemwege gelangen dürfen. Außerdem könnte die Adenylatzyklase als Interaktionspartner der *n*-Alkohole noch weitere unspezifische Effekte hervorrufen. Demnach erscheint ein Einsatz von *n*-Alkoholen in der Mukoviszidose-Therapie als fragwürdig.

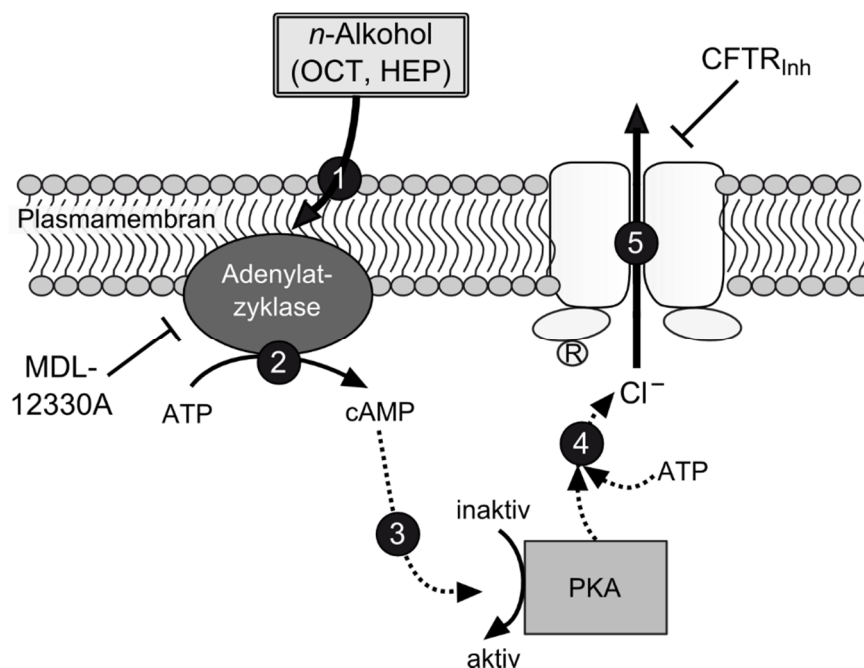


Abb. 42: Modell des Wirkmechanismus der *n*-Alkohol-induzierten indirekten CFTR Aktivierung.

Die *n*-Alkohole 1-Octanol (OCT) und 1-Heptanol (HEP) aktivieren die Adenylatzyklase (1). In Folge dessen kommt es zur Katalyse von ATP zu cAMP (2). Das generierte cAMP kann an die Proteinkinase A (PKA) binden und sie aktivieren (3). Die aktivierte PKA induziert über Phosphorylierung der R Domäne (R) und in Anwesenheit von ATP die Aktivierung des CFTR Proteins (4). Dadurch kommt es zu einer CFTR-abhängigen Cl^- Sekretion der Epithelzellen (5). Die Abbildung wurde verändert nach Huang *et al.* (2001) und Cohen *et al.* (2008).

5. Literaturverzeichnis

- Ahmad Waza, A., Andrabi, K. & Ul Hussain, M. (2012). Adenosine-triphosphate-sensitive K⁺ channel (Kir6.1): A novel phosphospecific interaction partner of connexin 43 (Cx43). *Experimental Cell Research* **318**, 2559–2566.
- Al Bazzaz, F.J., Hafez, N., Tyagi, S., Gailey, C.A., Toofanfard, M., Alrefai, W.A., Nazir, T.M., Ramaswamy, K. & Dudeja, P.K. (2001). Detection of Cl⁻-HCO₃⁻ and Na⁺-H⁺ exchangers in human airways epithelium. *JOP* **2**, 285–290.
- Aleksandrov, A.A., Aleksandrov, L.A. & Riordan, J.R. (2007). CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel. *Pflugers Arch.* **453**, 693–702.
- Alifimoff, J.K., Firestone, L.L. & Miller, K.W. (1989). Anaesthetic potencies of primary alkanols: implications for the molecular dimensions of the anaesthetic site. *Br. J. Pharmacol.* **96**, 9–16.
- Althaus, M., Bogdan, R., Clauss, W.G. & Fronius, M. (2007). Mechanosensitivity of epithelial sodium channels (ENaCs): laminar shear stress increases ion channel open probability. *FASEB J.* **21**, 2389–2399.
- Althaus, M., Clauss, W.G. & Fronius, M. (2011). Amiloride-sensitive sodium channels and pulmonary edema. *Pulm. Med.* **2011**, 830320.
- Amaral, M.D. & Kunzelmann, K. (2007). Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 334–341.
- Andreeva, A.V., Kutuzov, M.A. & Voyno-Yasenetskaya, T.A. (2007). Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **293**, L259.
- Bao, L., Locovei, S. & Dahl, G. (2004a). Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Letters* **572**, 65–68.
- Bao, L., Sachs, F. & Dahl, G. (2004b). Connexins are mechanosensitive. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C1389-95.
- Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., Shagin, D., Nazarenko, S., Geraymovych, E., Litvin, O., Tiunova, A., Born, T.L., Usman, N., Staroverov, D., Lukyanov, S. & Panchin, Y. (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* **83**, 706–716.
- Bardou, O., Privé, A., Migneault, F., Roy-Camille, K., Dagenais, A., Berthiaume, Y. & Brochiero, E. (2012). K⁺ channels regulate ENaC expression via changes in promoter activity and control fluid clearance in alveolar epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1818**, 1682–1690.
- Bardou, O., Trinh, N.T. & Brochiero, E. (2009). Molecular diversity and function of K⁺ channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **296**, L145.
- Bell, P.D., Lapointe, J.Y., Sabirov, R., Hayashi, S., Peti-Peterdi, J., Manabe, K., Kovacs, G. & Okada, Y. (2003). Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4322–4327.

- Berger, J., Hardt, M., Clauss, W.G. & Fronius, M.** (2010). Basolateral Cl⁻ uptake mechanisms in *Xenopus laevis* lung epithelium. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **299**, R92.
- Berger, J., Richter, K., Clauss, W.G. & Fronius, M.** (2011). Evidence for basolateral Cl⁻ channels as modulators of apical Cl⁻ secretion in pulmonary epithelia of *Xenopus laevis*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**, R616-23.
- Berk, A., Fronius, M., Clauss, W. & Schnizler, M.** (2004). Prostaglandin E₂ induces upregulation of Na⁺ transport across *Xenopus* lung epithelium. *J. Comp. Physiol.* **174**, 83–89.
- Berthiaume, Y., Folkesson, H.G. & Matthay, M.A.** (2002). Lung edema clearance: 20 years of progress: invited review: alveolar edema fluid clearance in the injured lung. *J. Appl. Physiol.* **93**, 2207–2213.
- Berthiaume, Y. & Matthay, M.A.** (2007). Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **159**, 350–359.
- Boer, T.P. de & van der Heyden, M.A.** (2005). *Xenopus* connexins: how frogs bridge the gap. *Differentiation* **73**, 330–340.
- Bogdan, R.** (2007). Charakterisierung Druck-induzierter Ionenströme am Pulmonalepithel von *Xenopus laevis*. Doktorarbeit, Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Bogdan, R., Veith, C., Clauss, W. & Fronius, M.** (2008). Impact of mechanical stress on ion transport in native lung epithelium (*Xenopus laevis*): short-term activation of Na⁺, Cl⁻ and K⁺ channels. *Pflugers Arch.* **456**, 1109–1120.
- Bonnans, C., Mainprice, B., Chanez, P., Bousquet, J. & Urbach, V.** (2003). Lipoxin A4 stimulates a cytosolic Ca²⁺ increase in human bronchial epithelium. *J. Biol. Chem.* **278**, 10879–10884.
- Bourke, S., Mason, H.S., Borok, Z., Kim, K.J., Crandall, E.D. & Kemp, P.J.** (2005). Development of a lung slice preparation for recording ion channel activity in alveolar epithelial type I cells. *Respir. Res.* **6**, 40.
- Brower, R.G.M., Matthay, A., Morris, A., Schoenfeld, D., Thompson, B.T. & Wheeler, A.** (2000). Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1301–1308.
- Boyce, A.K.J., Wicki-Stordeur, L.E. & Swayne, L.A.** (2014). Powerful partnership: crosstalk between pannexin 1 and the cytoskeleton. *Front. Physiol.* **5**, 27.
- Bruner, J.K., Zou, B., Zhang, H., Zhang, Y., Schmidt, K. & Li, M.** (2014). Identification of novel small molecule modulators of K₂P18.1 two-pore potassium channel. *Eur. J. Pharmacol.* **740**, 603-610.
- Bukoreshtliev, N.V., Haase, K. & Pelling, A.E.** (2013). Mechanical cues in cellular signalling and communication. *Cell Tissue Res.* **352**, 77–94.
- Burke, M.A., Mutharasan, R.K. & Ardehali, H.** (2008). The sulfonyleurea receptor, an atypical ATP-binding cassette protein, and its regulation of the K_{ATP} channel. *Circ. Res.* **102**, 164–176.
- Burnstock, G., Brouns, I., Adriaensen, D. & Timmermans, J.P.** (2012). Purinergic signaling in the airways. *Pharmacological Reviews* **64**, 834–868.

- Button, B., Picher, M. & Boucher, R.C.** (2007). Differential effects of cyclic and constant stress on ATP release and mucociliary transport by human airway epithelia. *J. Physiol.* **580**, 577–592.
- Canessa, C.M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J.D. & Rossier, B.C.** (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* **367**, 463–467.
- Cannatella, D.C. & De Sá, R.O.** (1993) *Xenopus laevis* as a model organism. *Syst. Biol.* **42**, 476–507.
- Cavanaugh, K.J.J., Oswari, J. & Margulies, S.S.** (2001). Role of stretch on tight junction structure in alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**, 584–591.
- Chappe, V., Mettey, Y., Vierfond, J.M., Hanrahan, J.W., Gola, M., Verrier, B. & Becq, F.** (1998). Structural basis for specificity and potency of xanthine derivatives as activators of the CFTR chloride channel. *Br. J. Pharmacol* **123**, 683–693.
- Chatterjee, S., Levitan, I., Wei, Z. & Fisher, A.B.** (2006). K_{ATP} channels are an important component of the shear-sensing mechanism in the pulmonary microvasculature. *Microcirculation* **13**, 633–644.
- Chau, P.L.** (2010). New insights into the molecular mechanisms of general anaesthetics. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 288–307.
- Cherian, P.P., Siller-Jackson, A.J., Gu, S., Wang, X., Bonewald, L.F., Sprague, E. & Jiang, J.X.** (2005). Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol. Biol. Cell.* **16**, 3100–3106.
- Cohen, Staci A Padove, Hatt, H., Kubanek, J. & McCarty, N.A.** (2008). Reconstitution of a chemical defense signaling pathway in a heterologous system. *J. Exp. Biol.* **211**, 599–605.
- Covarrubias, M., Vyas, T.B., Escobar, L. & Wei, A.** (1995). Alcohols inhibit a cloned potassium channel at a discrete saturable site. Insights into the molecular basis of general anesthesia. *J. Biol. Chem.* **270**, 19408–19416.
- Daniels, C.B. & Orgeig, S.** (2001). The comparative biology of pulmonary surfactant: past, present and future. *Comp. Biochem. Physiol.* **129**, 9–36.
- Davis, K.A. & Cowley, E.A.** (2006). Two-pore-domain potassium channels support anion secretion from human airway Calu-3 epithelial cells. *Pflugers Arch.* **451**, 631–641.
- Davis, P.B.** (2006). Cystic fibrosis since 1938. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 475–482.
- Deckmann, K., Filipski, K., Krasteva-Christ, G., Fronius, M., Althaus, M., Rafiq, A., Papadakis, T., Renno, L., Jurastow, I., Wessels, L., Wolff, M., Schütz, B., Weihe, E., Chubanov, V., Gudermann, T. & Klein, J., Bschleipfer, T. & Kummer, W.** (2014). Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 8287–8292.
- D'hondt, C., Ponsaerts, R., Smedt, H. de, Vinken, M., Vuyst, E. de, Bock, M. de, Wang, N., Rogiers, V., Leybaert, L., Himpens, B. & Bultynck, G.** (2011). Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cell. Signal* **23**, 305–316.

- Dilger, J.P.** (2002). The effects of general anaesthetics on ligand-gated ion channels. *Br. J. Anaesth.* **89**, 41–51.
- Dobbs, L.G. & Gutierrez, J.A.** (2001). Mechanical forces modulate alveolar epithelial phenotypic expression. *Comp. Biochem. Physiol.* **129**, 261–266.
- Dumont J. N.** (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* **136**, 153–179.
- Eckle, T., Füllbier, L., Wehrmann, M., Khoury, J., Mittelbronn, M., Ibla, J., Rosenberger, P. & Eltzschig, H.K.** (2007). Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury. *J. Immunol.* **178**, 8127–8137.
- Edwards, Y.S.** (2001). Stretch stimulation: its effects on alveolar type II cell function in the lung. *Comp. Biochem. Physiol.* **129**, 245–260.
- Erb, A. & Althaus, M.** (2014). Actions of hydrogen sulfide on sodium transport processes across native distal lung epithelia (*Xenopus laevis*). *PLoS ONE* **9**, e100971.
- Evans, W.H. & Martin, P.E.** (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Mol. Membr. Biol.* **19**, 121–136.
- Fang, X., Song, Y., Hirsch, J., Galletta, L.J., Pedemonte, N., Zemans, R.L., Dolganov, G., Verkman, A.S. & Matthay, M.A.** (2006). Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **290**, L242.
- Fang, Z., Ionescu, P., Chortkoff, B.S., Kandel, L., Sonner, J., Laster, M.J. & Eger, E.I.** (1997). Anesthetic potencies of *n*-alkanols: results of additivity and solubility studies suggest a mechanism of action similar to that for conventional inhaled anesthetics. *Anesth. Analg.* **84**, 1042–1048.
- Feng, X.Y., Li, Y., Li, L.S., Li, X.F., Zheng, L.F., Zhang, X.L., Fan, R.F., Song, J., Hong, F., Zhang, Y. & Zhu, J.X.** (2013). Dopamine D1 receptors mediate dopamine-induced duodenal epithelial ion transport in rats. *Transl. Res.* **161**, 486–494.
- Fimia, G.M. & Sassone-Corsi, P.** (2001). Cyclic AMP signalling. *J. Cell. Sci.* **114**, 1971–1972.
- Fischer, H., van Driessche, W. & Clauss, W.** (1989). Evidence for apical sodium channels in frog lung epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **256**, C764.
- Fisher, J.L. & Margulies, S.S.** (2002). Na⁺-K⁺-ATPase activity in alveolar epithelial cells increases with cyclic stretch. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **283**, L737-46.
- Fitz, J.G.** (2007). Regulation of cellular ATP release. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **118:199-208.**, 199–208.
- Folgering, J.H.A., Sharif-Naeini, R., Dedman, A., Patel, A., Delmas, P. & Honoré, E.** (2008). Molecular basis of the mammalian pressure-sensitive ion channels: focus on vascular mechanotransduction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **97**, 180–195.
- Frank, J.A. & Matthay, M.A.** (2003). Science review: mechanisms of ventilator-induced injury. *Crit. Care* **7**, 233–241.

- Franks, N.P. & Lieb, W.R.** (1994). Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* **367**, 607–614.
- Fredberg, J.J. & Kamm, R.D.** (2006). Stress transmission in the lung: pathways from organ to molecule. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 507–541.
- Fronius, M.** (2012). Mechanical forces impair alveolar ion transport processes: a putative mechanism contributing to the formation of pulmonary edema. In *Lung Diseases: Selected State of the Art Reviews* (Irusen, E. M., ed), 561–578, InTech, Rijeka, Croatia.
- Fronius, M., Berk, A., Clauss, W. & Schnizler, M.** (2004). Ion transport across *Xenopus* alveolar epithelium is regulated by extracellular ATP, UTP and adenosine. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **139**, 133–144.
- Fronius, M., Bogdan, R., Althaus, M., Morty, R.E. & Clauss, W.G.** (2010). Epithelial Na⁺ channels derived from human lung are activated by shear force. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **170**, 113–119.
- Fronius, M., Clauss, W. & Schnizler, M.** (2003). Stimulation of transepithelial Na⁺ current by extracellular Gd³⁺ in *Xenopus laevis* alveolar epithelium. *J. Membr. Biol.* **195**, 43–51.
- Fronius, M., Clauss, W.G. & Althaus, M.** (2012). Why do we have to move fluid to be able to breathe? *Front. Physiol.* **3**, 146.
- Garcia, C.S., Prota, L.F., Morales, M.M., Romero, P.V., Zin, W.A. & Rocco, P.R.** (2006). Understanding the mechanisms of lung mechanical stress. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **39**, 697–706.
- Geißert L.** (2011). Charakterisierung der mechanosensitiven Aktivierung ATP-sensitiver K⁺-Kanäle (K_{ATP}-Kanäle) im pulmonalen Epithel von *Xenopus laevis*. Bachelorthesis, Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Gimlich, R.L., Kumar, N.M. & Gilula, N.B.** (1990). Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos. *J. Cell Biol.* **110**, 597–605.
- Goldstein, D.B.** (1984). The effects of drugs on membrane fluidity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **24**, 43–64.
- Goodman, M.B. & Schwarz, E.M.** (2003). Transducing touch in *Caenorhabditis elegans*. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 429–452.
- Greenwood, I.A., Yeung, S.Y.M., Hettiarachi, S., Andersson, M. & Baines, D.L.** (2009). KCNQ-encoded channels regulate Na⁺ transport across H441 lung epithelial cells. *Pflugers Arch.* **457**, 785–794.
- Günzel, D. & Yu, A.S.** (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev.* **93**, 525–569.
- Gurdon, J.B. & Hopwood, N.** (2000). The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *Int. J. Dev. Biol.* **44**, 43–50.
- Guyot, A. & Hanrahan, J.W.** (2002). ATP release from human airway epithelial cells studied using a capillary cell culture system. *J. Physiol.* **545**, 199–206.

- Haas, M. & Forbush, B.I.** (2000). The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu. Rev. Physiol.* **62:515-34.**, 515–534.
- Hammami, S., Willumsen, N.J., Olsen, H.L., Morera, F.J., Latorre, R. & Klaerke, D.A.** (2009). Cell volume and membrane stretch independently control K⁺ channel activity. *J. Physiol.* **587**, 2225–2231.
- Hanner, F., Lam, L., Nguyen, M.T.X., Yu, A. & Peti-Peterdi, J.** (2012). Intrarenal localization of the plasma membrane ATP channel pannexin1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **303**, F1454-9.
- Hasanuzzaman, M. & Yoshimura, M.** (2010). Effects of straight chain alcohols on specific isoforms of adenylyl cyclase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **34**, 743–749.
- Haubenberger, D., Nahab, F.B., Voller, B. & Hallett, M.** (2014). Treatment of essential tremor with long-chain alcohols: still experimental or ready for prime time? *Tremor Other Hyperkinet. Mov.* **4**.
- Helms, M.N., Self, J., Bao, H.F., Job, L.C., Jain, L. & Eaton, D.C.** (2006). Dopamine activates amiloride-sensitive sodium channels in alveolar type I cells in lung slice preparations. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **291**, L610.
- Hilken, G., Iglauer, F. & Richter, H.P.** (1997). Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Labortier - Biologie, Haltung, Zucht und experimentelle Nutzung. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Hill, W.G., Southern, N.M., MacIver, B., Potter, E., Apodaca, G., Smith, C.P. & Zeidel, M.L.** (2005). Isolation and characterization of the *Xenopus* oocyte plasma membrane: a new method for studying activity of water and solute transporters. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **289**, F217.
- Hollenhorst, M.I., Richter, K. & Fronius, M.** (2011). Ion transport by pulmonary epithelia. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 174306.
- Holz, R. & Finkelstein, A.** (1970). The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* **56**, 125–145.
- Horishita, T. & Harris, R.A.** (2008). *n*-Alcohols inhibit voltage-gated Na⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **326**, 270–277.
- Huang, P., Lazarowski, E.R., Tarran, R., Milgram, S.L., Boucher, R.C. & Stutts, M.J.** (2001). Compartmentalized autocrine signaling to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at the apical membrane of airway epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 14120–14125.
- Hyatt, B.A., Resnik, E.R., Johnson, N.S., Lohr, J.L. & Cornfield, D.N.** (2007). Lung specific developmental expression of the *Xenopus laevis* surfactant protein C and B genes. *Gene Expr. Patterns* **7**, 8–14.
- Illek, B., Fischer, H. & Clauss, W.** (1990). Aldosterone regulation of basolateral potassium channels in alveolar epithelium. *Am. J. Physiol.* **259**, L230-7.
- Ingber, D.E.** (2006). Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.* **20**, 811–827.

- Inglis, S.K., Brown, S.G., Constable, M.J., McTavish, N., Olver, R.E. & Wilson, S.M.** (2007). A Ba²⁺-resistant, acid-sensitive K⁺ conductance in Na⁺-absorbing H441 human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **292**, L1304.
- Jaalouk, D.E. & Lammerding, J.** (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 63–73.
- Jain, L., Chen, X.J., Ramosevac, S., Brown, L.A. & Eaton, D.C.** (2001). Expression of highly selective sodium channels in alveolar type II cells is determined by culture conditions. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **280**, L646.
- Jakab, R.L., Collaco, A.M. & Ameen, N.A.** (2013). Characterization of CFTR High Expresser cells in the intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **305**, G453-65.
- Janvier, P. & Clément, G.** (2010). Palaeontology: Muddy tetrapod origins. *Nature* **463**, 40–41.
- Jeffery, P.K. & Reid, L.** (1975). New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopic study. *J. Anat.* **120**, 295–320.
- Johnson, M.D., Widdicombe, J.H., Allen, L., Barbry, P. & Dobbs, L.G.** (2002). Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 1966–1971.
- Kaab, S., Zwermann, L., Barth, A., Hinterseer, M., Englert, H.C., Gogelein, H. & Nabauer, M.** (2003). Selective block of sarcolemmal IK_{ATP} in human cardiomyocytes using HMR1098. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **17**, 435–441.
- Kaufman, R.D.** (1977). Biophysical mechanisms of anesthetic action: historical perspective and review of current concepts. *Anesthesiology* **46**, 49–62.
- Kawamura, M., Ruskin, D.N. & Masino, S.A.** (2010). Metabolic autocrine regulation of neurons involves cooperation among pannexin hemichannels, adenosine receptors, and K_{ATP} channels. *J. Neurosci.* **30**, 3886–3895.
- Khokha, M.K.** (2012). *Xenopus* white papers and resources: folding functional genomics and genetics into the frog. *Genesis* **50**, 133–142.
- Kim, J.K., Kim, S.S., Rha, K.W., Kim, C.H., Cho, J.H., Lee, C.H., Lee, J.G. & Yoon, J.H.** (2007). Expression and localization of surfactant proteins in human nasal epithelium. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **292**, L879.
- Kim, K.J.** (1990). Active Na⁺ transport across *Xenopus* lung alveolar epithelium. *Respir. Physiol.* **81**, 29–39.
- Knight, M.M., McGlashan, S.R., Garcia, M., Jensen, C.G. & Poole, C.A.** (2009). Articular chondrocytes express connexin 43 hemichannels and P2 receptors - a putative mechanoreceptor complex involving the primary cilium? *J. Anat.* **214**, 275–283.
- Komatsu, T., Uchida, K., Fujita, F., Zhou, Y. & Tominaga, M.** (2012). Primary alcohols activate human TRPA1 channel in a carbon chain length-dependent manner. *Pflugers Arch.* **463**, 549–559.

- Kou, J. & Yoshimura, M.** (2007). Isoform-specific enhancement of adenylyl cyclase activity by *n*-alkanols. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **31**, 1467–1472.
- Krasteva, G. & Kummer, W.** (2012). "Tasting" the airway lining fluid. *Histochem. Cell Biol.* **138**, 365–383.
- Krebs, H.A.** (1975). The August Krogh Principle: "For many problems there is an animal on which it can be most conveniently studied". *J. Exp. Zool.* **194**, 221–226.
- Lazarowski, E.R.** (2003). Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Molecular Pharmacology* **64**, 785–795.
- Lehr, C.M.** (2002). Cell culture models of biological barriers. *In vitro* test. CRC Press, London.
- Leroy, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y. & Brochiero, E.** (2004). Molecular identity and function in transepithelial transport of K_{ATP} channels in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **286**, L1027.
- Leroy, C., Prive, A., Bourret, J.C., Berthiaume, Y., Ferraro, P. & Brochiero, E.** (2006). Regulation of ENaC and CFTR expression with K⁺ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **291**, L1207.
- Leung, G.P. & Wong, P.Y.** (2000). Activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat epididymal epithelium by genistein. *Biol. Reprod.* **62**, 143–149.
- Levitan, I.B.** (1994). Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 193–212.
- Li, A., Leung, C.T., Peterson-Yantorno, K., Mitchell, C.H. & Civan, M.M.** (2010). Pathways for ATP release by bovine ciliary epithelial cells, the initial step in purinergic regulation of aqueous humor inflow. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **299**, C1308.
- Li, C., Krishnamurthy, P.C., Penmatsa, H., Marrs, K.L., Wang, X.Q., Zaccolo, M., Jalink, K., Li, M., Nelson, D.J., Schuetz, J.D. & Naren, A.P.** (2007). Spatiotemporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia. *Cell* **131**, 940–951.
- Li, C. & Naren, A.P.** (2010). CFTR chloride channel in the apical compartments: spatiotemporal coupling to its interacting partners. *Integr. Biol.* **2**, 161–177.
- Li, H., Sheppard, D. N. & Hug, M. J.** (2004). Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J. Cyst. Fibros.* **3**, 123–126.
- Liu, M. & Post, M.** (2000). Invited review: mechanochemical signal transduction in the fetal lung. *J. Appl. Physiol.* **89**, 2078–2084.
- Liu, M., Tanswell, A.K. & Post, M.** (1999). Mechanical force-induced signal transduction in lung cells. *Am. J. Physiol.* **277**, L667-83.
- Luckprom, P., Kanjanamekanant, K. & Pavasant, P.** (2011). Role of connexin43 hemichannels in mechanical stress-induced ATP release in human periodontal ligament cells. *J. Periodont. Res.* **46**, 607–615.

- Luo, Y.L., Guo, H.-M., Zhang, Y.L., Chen, P.X., Zhu, Y.X., Huang, J.H. & Zhou, W.L.** (2013). Cellular mechanism underlying formaldehyde-stimulated Cl⁻ secretion in rat airway epithelium. *PLoS ONE* **8**, e54494.
- Lyon, R.C., McComb, J.A., Schreurs, J. & Goldstein, D.B.** (1981). A relationship between alcohol intoxication and the disordering of brain membranes by a series of short-chain alcohols. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **218**, 669–675.
- Ma, T., Thiagarajah, J.R., Yang, H., Sonawane, N.D., Folli, C., Galletta, Luis J V & Verkman, A.S.** (2002). Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J. Clin. Invest.* **110**, 1651–1658.
- Maas, J.W., Vogt, S.K., Chan, G.C.K., Pineda, V.V., Storm, D.R. & Muglia, L.J.** (2005). Calcium-stimulated adenylyl cyclases are critical modulators of neuronal ethanol sensitivity. *J. Neurosci.* **25**, 4118–4126.
- Maguire, D., MacNamara, B., Cuffe, J.E., Winter, D., Doolan, C.M., Urbach, V., O'Sullivan, G.C. & Harvey, B.J.** (1999). Rapid responses to aldosterone in human distal colon. *Steroids* **64**, 51–63.
- Maina, J.N.** (2000). Comparative respiratory morphology: themes and principles in the design and construction of the gas exchangers. *Anat. Rec.* **261**, 25–44.
- Maina, J.N.** (2002). Fundamental structural aspects and features in the bioengineering of the gas exchangers: comparative perspectives. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **163**, 1-108.
- Maina, J.N. & West, J.B.** (2005). Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood-gas barrier. *Physiol. Rev.* **85**, 811–844.
- Manning Fox, J.E., Kanji, H.D., French, R.J. & Light, P.E.** (2002). Cardiospecificity of the sulphonylurea HMR1098: studies on native and recombinant cardiac and pancreatic K_{ATP} channels. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 480–488.
- Marcet, B., Becq, F., Norez, C., Delmas, P. & Verrier, B.** (2004). General anesthetic octanol and related compounds activate wild-type and Δ F508 cystic fibrosis chloride channels. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 905–914.
- Martin, C.R., Zaman, M.M., Ketwaroo, G.A., Bhutta, A.Q., Coronel, E., Popov, Y., Schuppan, D. & Freedman, S.D.** (2012). CFTR dysfunction predisposes to fibrotic liver disease in a murine model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **303**, G474-81.
- Meban, C.** (1973). The pneumonocytes in the lung of *Xenopus laevis*. *J. Anat.* **114**, 235–244.
- Mihic, S.J., Ye, Q., Wick, M.J., Koltchine, V.V., Krasowski, M.D., Finn, S.E., Mascia, M.P., Valenzuela, C.F., Hanson, K.K., Greenblatt, E.P., Harris, R.A. & Harrison, N.L.** (1997). Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA_A and glycine receptors. *Nature* **389**, 385–389.
- Morris, C.E.** (2011). Voltage-gated channel mechanosensitivity: fact or friction? *Front. Physiol.* **2**, 25.
- Morty, R.E., Eickelberg, O. & Seeger, W.** (2007). Alveolar fluid clearance in acute lung injury: what have we learned from animal models and clinical studies? *Intensive Care Med.* **33**, 1229–1240.

- Moser, S.L., Harron, S.A., Crack, J., Fawcett, J.P. & Cowley, E.A. (2008). Multiple KCNQ potassium channel subtypes mediate basal anion secretion from the human airway epithelial cell line Calu-3. *J. Membr. Biol.* **221**, 153–163.
- Moyes, C.D. & Schulte, P.M. (2008). Tierphysiologie. Pearson Studium, München.
- Muchekehu, R.W. & Quinton, P.M. (2010). A new role for bicarbonate secretion in cervico-uterine mucus release. *J. Physiol.* **588**, 2329–2342.
- Nahab, F.B., Wittevrongel, L., Ippolito, D., Toro, C., Grimes, G.J., Starling, J., Potti, G., Haubenberger, D., Bowen, D., Buchwald, P., Dong, C., Kalowitz, D. & Hallett, M. (2011). An open-label, single-dose, crossover study of the pharmacokinetics and metabolism of two oral formulations of 1-octanol in patients with essential tremor. *Neurotherapeutics* **8**, 753–762.
- Nichols, C.G. (2006). K_{ATP} channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* **440**, 470–476.
- Niedźwiedzki, G., Szrek, P., Narkiewicz, K., Narkiewicz, M. & Ahlberg, P.E. (2010). Tetrapod trackways from the early Middle Devonian period of Poland. *Nature* **463**, 43–48.
- Ochs, M., Nyengaard, J.R., Jung, A., Knudsen, L., Voigt, M., Wahlers, T., Richter, J. & Gundersen, H.J. (2004). The number of alveoli in the human lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 120–124.
- Okada, S.F., Nicholas, R.A., Kreda, S.M., Lazarowski, E.R. & Boucher, R.C. (2006). Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. *J. Biol. Chem.* **281**, 22992–23002.
- Okada, S.F., Ribeiro, C.M.P., Sesma, J.I., Seminario-Vidal, L., Abdullah, L.H., van Heusden, C., Lazarowski, E.R. & Boucher, R.C. (2013). Inflammation promotes airway epithelial ATP release via calcium-dependent vesicular pathways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*
- Orgeig, S., Bernhard, W., Biswas, S.C., Daniels, C.B., Hall, S.B., Hetz, S.K., Lang, C.J., Maina, J.N., Panda, A.K., Perez-Gil, J., Possmayer, F., Veldhuizen, R.A. & Yan, W. (2007). The anatomy, physics, and physiology of gas exchange surfaces: is there a universal function for pulmonary surfactant in animal respiratory structures? *Integr. Comp. Biol.* **47**, 610–627.
- Orr, A.W., Helmke, B.P., Blackman, B.R. & Schwartz, M.A. (2006). Mechanisms of mechanotransduction. *Dev. Cell* **10**, 11–20.
- O'Sullivan, B.P. & Freedman, S.D. (2009). Cystic fibrosis. *Lancet* **373**, 1891–1904.
- Overgaard, C.E., Daugherty, B.L., Mitchell, L.A. & Koval, M. (2011). Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxid. Redox. Signal.* **15**, 1179–1193.
- Pack, R.J., Al Ugaily, L.H., Morris, G. & Widdicombe, J.G. (1980). The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell Tissue Res.* **208**, 65–84.
- Patel, D., Zhang, X. & Veenstra, R.D. (2014). Connexin hemichannel and pannexin channel electrophysiology: how do they differ? *FEBS Lett.* **588**, 1372–1378.

- Patel, S.K., Jackson, L., Warren, A.Y., Arya, P., Shaw, R.W. & Khan, R.N. (2013). A role for two-pore potassium (K₂P) channels in endometrial epithelial function. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 134–146.
- Peoples, R.W., Li, C. & Weight, F.F. (1996). Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 185–201.
- Pepicelli, C.V., Lewis, P.M. & McMahon, A.P. (1998). Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr. Biol.* **8**, 1083–1086.
- Pilewski, J.M. & Frizzell, R.A. (1999). Role of CFTR in airway disease. *Physiol. Rev.* **79**, S215.
- Poirier, C.C. & Iglesias, P.A. (2007). An integrative approach to understanding mechanosensation. *Brief. Bioinformatics* **8**, 258–265.
- Pouokam, E. & Diener, M. (2012). Modulation of ion transport across rat distal colon by cysteine. *Front. Physiol.* **3**, 43.
- Prat, A.G., Reisin, I.L., Ausiello, D.A. & Cantiello, H.F. (1996). Cellular ATP release by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am. J. Physiol.* **270**, C538.
- Puoti, A., May, A., Canessa, C.M., Horisberger, J.D., Schild, L. & Rossier, B.C. (1995). The highly selective low-conductance epithelial Na channel of *Xenopus laevis* A6 kidney cells. *Am. J. Physiol.* **269**, C188-97.
- Qi, A., Friend, J.R., Yeo, L.Y., Morton, D.A.V., McIntosh, M.P. & Spiccia, L. (2009). Miniature inhalation therapy platform using surface acoustic wave microfluidic atomization. *Lab. Chip* **9**, 2184–2193.
- Ransford, G.A., Fregien, N., Qiu, F., Dahl, G., Conner, G.E. & Salathe, M. (2009). Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **41**, 525–534.
- Reddy, M.M. & Quinton, P.M. (2009). PKA mediates constitutive activation of CFTR in human sweat duct. *J. Membr. Biol.* **231**, 65–78.
- Reigada, D. & Mitchell, C.H. (2005). Release of ATP from retinal pigment epithelial cells involves both CFTR and vesicular transport. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, C132.
- Richter, K. (2010). Wirkung von hydrostatischem Druck auf Ionen-transport-Prozesse im Lungenepithel von *X. laevis*: Funktionelle Charakterisierung ATP-sensitiver K⁺-Kanäle. Diplomarbeit, Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Richter, K., Kiefer, K.P., Grzesik, B.A., Clauss, W.G. & Fronius, M. (2014). Hydrostatic pressure activates ATP-sensitive K⁺ channels in lung epithelium by ATP release through pannexin and connexin hemichannels. *FASEB J.* **28**, 45–55.
- Ridge, F.P., Duszyk, M. & French, A.S. 1997. A large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel in a human lung epithelial cell line (A549). *Biochim. Biophys. Acta.* **1327**, 249–258.
- Robbins, J. (2001). KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Ther.* **90**, 1–19.
- Ruan, Y.C., Shum, Winnie W C, Belleannée, C., Da Silva, N. & Breton, S. (2012). ATP secretion in the male reproductive tract: essential role of CFTR. *J. Physiol.* **590**, 4209–4222.

- Rubin, B.K.** (2002). Physiology of airway mucus clearance. *Respir. Care* **47**, 761–768.
- Sakuma, T., Takahashi, K., Ohya, N., Nakada, T. & Matthay, M.A.** (1998). Effects of ATP-sensitive potassium channel opener on potassium transport and alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Pharmacol. Toxicol.* **83**, 16–22.
- Scemes, E., Suadicani, S.O., Dahl, G. & Spray, D.C.** (2007). Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron. Glia. Biol.* **3**, 199–208.
- Schneeberger, E.E. & Lynch, R.D.** (1984). Tight junctions. Their structure, composition, and function. *Circ. Res.* **55**, 723–733.
- Schnizler, M., Berk, A. & Clauss, W.** (2003). Sensitivity of oocyte-expressed epithelial Na⁺ channel to glibenclamide. *Biochim. Biophys. Acta.* **1609**, 170–176.
- Schultheiss, G. & Diener, M.** (1997). Regulation of apical and basolateral K⁺ conductances in rat colon. *Br. J. Pharmacol.* **122**, 87–94.
- Schultz, B.D., Singh, A.K., Devor, D.C. & Bridges, R.J.** (1999). Pharmacology of CFTR chloride channel activity. *Physiol. Rev.* **79**, S109–44.
- Sesma, J.I., Kreda, S.M., Okada, S.F., van Heusden, C., Moussa, L., Jones, L.C., O'Neal, W.K., Togawa, N., Hiasa, M., Moriyama, Y. & Lazarowski, E.R.** (2013). Vesicular nucleotide transporter regulates the nucleotide content in airway epithelial mucin granules. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **304**, C976–84.
- Sheppard, D. N. & Welsh, M.J.** (1999). Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**, S23.
- Sherman-Gold, R.** (1993). *The Axon Guide for Electrophysiology and Biophysics Laboratory Techniques*. Axon Instruments, Inc; Sunnyvale, CA.
- Shestopalov, V.I. & Panchin, Y.** (2008). Pannexins and gap junction protein diversity. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 376–394.
- Shlyonsky, V., Goolaerts, A., Mies, F. & Naeije, R.** (2008). Electrophysiological characterization of rat type II pneumocytes *in situ*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **39**, 36–44.
- Silverman, W., Locovei, S. & Dahl, G.** (2008). Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, C761.
- Skatchkov, S.N., Rojas, L., Eaton, M.J., Orkand, R.K., Biedermann, B., Bringmann, A., Pannicke, T., Veh, R.W. & Reichenbach, A.** (2002). Functional expression of Kir6.1/SUR1-K_{ATP} channels in frog retinal Müller glial cells. *Glia.* **38**, 256–267.
- Solymosi, E.A., Kaestle-Gemhardt, S.M., Vadász, I., Wang, L., Neye, N., Chupin, Cécile Julie Adrienne, Rozowsky, S., Ruehl, R., Tabuchi, A., Schulz, H., Kapus, A., Morty, R.E. & Kuebler, W.M.** (2013). Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E2308–16.

- Sommer, D., Bogdan, R., Berger, J., Peters, D.M., Morty, R.E., Clauss, W.G. & Fronius, M.** (2007). CFTR-dependent Cl^- secretion in *Xenopus laevis* lung epithelium. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **158**, 97–106.
- Sridharan, M., Adderley, S.P., Bowles, E.A., Egan, T.M., Stephenson, A.H., Ellsworth, M.L. & Sprague, R.S.** (2010). Pannexin 1 is the conduit for low oxygen tension-induced ATP release from human erythrocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **299**, H1146.
- Stephens, R.H., Benjamin, A.R. & Walters, D.V.** (1996). Volume and protein concentration of epithelial lining liquid in perfused in situ postnatal sheep lungs. *J. Appl. Physiol.* **80**, 1911–1920.
- Surah-Narwal, S., Xu, S.Z., McHugh, D., McDonald, R.L., Hough, E., Cheong, A., Partridge, C., Sivaprasadarao, A. & Beech, D.J.** (1999). Block of human aorta Kir6.1 by the vascular K_{ATP} channel inhibitor U37883A. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 667–672.
- Takahira, M., Sakurai, M., Sakurada, N. & Sugiyama, K.** (2011). Swelling-activated potassium channel in porcine pigmented ciliary epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 5928–5932.
- Talwar, S. & Lynch, J.W.** (2014). Phosphorylation mediated structural and functional changes in pentameric ligand-gated ion channels: Implications for drug discovery. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **53**, 218–223.
- Tarran, R.** (2004). Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **1**, 42–46.
- Tarran, R., Button, B. & Boucher, R.C.** (2006). Regulation of normal and cystic fibrosis airway surface liquid volume by phasic shear stress. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 543–561.
- Tarran, R., Button, B., Picher, M., Paradiso, A.M., Ribeiro, C.M., Lazarowski, E.R., Zhang, L., Collins, P.L., Pickles, R.J., Fredberg, J.J. & Boucher, R.C.** (2005). Normal and cystic fibrosis airway surface liquid homeostasis. The effects of phasic shear stress and viral infections. *J. Biol. Chem.* **280**, 35751–35759.
- Taylor, A.L., Kudlow, B.A., Marrs, K.L., Gruenert, D.C., Guggino, W.B. & Schwiebert, E.M.** (1998). Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia. *Am. J. Physiol.* **275**, C1391–406.
- Ten Have-Opbroek, A.A.** (1991). Lung development in the mouse embryo. *Exp. Lung Res.* **17**, 111–130.
- Thorborg, J.V.** (1952). The use of *Xenopus laevis*, *Bufo bufo*, and *Rana esculenta* as test animals for gonadotrophic hormones. V. Experience with the Gali-Mainini spermiation reaction as a routine test for pregnancy diagnosis and quantitative assay of chorionic gonadotrophin. *Acta. Endocrinol.* **11**, 147–155.
- Trinh, N.T., Prive, A., Kheir, L., Bourret, J.C., Hijazi, T., Amraei, M.G., Noel, J. & Brochiero, E.** (2007). Involvement of K_{ATP} and K_{vLQT1} K^+ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **293**, L870.
- Untergrasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. & Rozen, S.G.** (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic. Acids Research* **40**(15), e115.

- van Wagoner, D.R.** (1993). Mechanosensitive gating of atrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ. Res.* **72**, 973–983.
- Vitzthum, C.** (2011). Einfluss von 1-Octanol auf den heterolog in *X. laevis* Oocyten exprimierten hCFTR. Masterthesis, Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Wand, G., Levine, M., Zweifel, L., Schwindinger, W. & Abel, T.** (2001). The cAMP-protein kinase A signal transduction pathway modulates ethanol consumption and sedative effects of ethanol. *J. Neurosci.* **21**, 5297–5303.
- Wang, J., Haanes, K.A. & Novak, I.** (2013). Purinergic regulation of CFTR and Ca²⁺-activated Cl⁻ channels and K⁺ channels in human pancreatic duct epithelium. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **304**, C673-84.
- Wang, J., Schaner, M.E., Thomassen, S., Su, S.F., Piquette-Miller, M. & Giacomini, K.M.** (1997). Functional and molecular characteristics of Na⁺-dependent nucleoside transporters. *Pharm. Res.* **14**, 1524–1532.
- Ware, L.B. & Matthay, M.A.** (2000). The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1334–1349.
- Weibel, E.R.** (2009). What makes a good lung? *Swiss. Med. Wkly.* **139**, 375–386.
- Weight, F.F., Li, C. & Peoples, R.W.** (1999). Alcohol action on membrane ion channels gated by extracellular ATP (P2X receptors). *Neurochem. Int.* **35**, 143–152.
- Weinacker, A.B. & Vaszar, L.T.** (2001). Acute respiratory distress syndrome: physiology and new management strategies. *Annu. Rev. Med.* **52**, 221–237.
- Weiner, S.A., Caputo, C., Bruscia, E., Ferreira, E.C., Price, J.E., Krause, D.S. & Egan, M.E.** (2008). Rectal potential difference and the functional expression of CFTR in the gastrointestinal epithelia in cystic fibrosis mouse models. *Pediatr. Res.* **63**, 73–78.
- Wilkinson, W.J., Benjamin, A.R., De, P., Orogo-Wenn, M.C., Yamazaki, Y., Staub, O., Morita, T., Adriaensen, D., Riccardi, D., Walters, D.V. & Kemp, P.J.** (2011). Alveolar epithelial CNGA1 channels mediate cGMP-stimulated, amiloride-insensitive, lung liquid absorption. *Pflugers Arch.* **462**, 267-79.
- Wills, N.K., Reuss, L. & Lewis, S.A.** (1996). Epithelial transport. A guide to methods and experimental analysis. Chapman & Hall, London.
- Wine, J.J., Char, J.E., Chen, J., Cho, H.-J., Dunn, C., Frisbee, E., Joo, N.S., Milla, C., Modlin, S.E., Park, I.-H., Thomas, Ewart A C, Tran, K.V., Verma, R. & Wolfe, M.H.** (2013). *In vivo* readout of CFTR function: ratiometric measurement of CFTR-dependent secretion by individual, identifiable human sweat glands. *PLoS ONE* **8**, e77114.
- Wirtz, H.R. & Dobbs, L.G.** (2000). The effects of mechanical forces on lung functions. *Respir. Physiol.* **119**, 1–17.
- Wood, S.C., Tonner, P.H., Armendi, A.J. de, Bugge, B. & Miller, K.W.** (1995). Channel inhibition by alkanols occurs at a binding site on the nicotinic acetylcholine receptor. *Mol. Pharmacol.* **47**, 121–130.

- Yang, N., Lei, Z., Li, X., Zhao, J., Liu, T., Ning, N., Xiao, A., Xu, L. & Li, J.** (2014). Chloroquine stimulates Cl^- secretion by Ca^{2+} activated Cl^- channels in rat ileum. *PLoS ONE* **9**, e87627.
- Yao, X. & Kwan, H.Y.** (1999). Activity of voltage-gated K^+ channels is associated with cell proliferation and Ca^{2+} influx in carcinoma cells of colon cancer. *Life Sci.* **65**, 55–62.
- Yeung, C.H., Barfield, J.P. & Cooper, T.G.** (2006). Physiological volume regulation by spermatozoa. *Mol. Cell. Endocrinol.* **250**, 98–105.
- Yoshimura, M., Pearson, S., Kadota, Y. & Gonzalez, C.E.** (2006). Identification of ethanol responsive domains of adenylyl cyclase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **30**, 1824–1832.
- Zavoico, G.B. & Kutchai, H.** (1980). Effects of *n*-alkanols on the membrane fluidity of chick embryo heart microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **600**, 263–269.
- Zhang, W.K., Wang, D., Duan, Y., Loy, M.M., Chan, H.C. & Huang, P.** (2010). Mechanosensitive gating of CFTR. *Nat. Cell Biol.* **12**, 507–512.
- Zhu, J.X., Zhang, G.H., Yang, N., Rowlands, D.K., Wong, H.Y.C., Tsang, L.L., Chung, Y.W. & Chan, H.C.** (2005). Activation of apical CFTR and basolateral Ca^{2+} -activated K^+ channels by tetramethylpyrazine in Caco-2 cell line. *Eur. J. Pharmacol.* **510**, 187–195.

6. Veröffentlichungen

Der präsentierende Autor der Poster und Vorträge wurde jeweils mit einem “*” markiert.

WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

Richter, K., Vitzthum, C. Clauss, W. G., Fronius, M. (2014). Long chain alcohols 1-octanol and 1-heptanol activate CFTR Cl⁻ channel by increasing the activity of adenylate cyclase. In: *PLoS One* (in Revision)

Hecker, A., Küllmar, M., Wilker, S., **Richter, K.**, Atanasova, S., Timm, T., Zakrzewicz, A., Klein, J., Kaufmann, A., Bauer, S., Padberg, W., Kummer, W., Jaciauskiene, S., Fronius, M., Schweda, E.K.H., Lochnit, G., Grau, V. (2014). Inhibition of ATP-induced IL-1 β release via nicotinic acetylcholine receptor subunit α 9. In: *Journal of Immunology* (in Revision)

Richter, K., Kiefer, K., Grzesik, B. A., Clauss, W., Fronius, M. (2014). Hydrostatic pressure activates ATP-sensitive K⁺ channels in lung epithelium by ATP release through pannexin and connexin hemichannels. In: *The FASEB Journal* 28

Berger, J., **Richter, K.**, Clauss, W. G., Fronius, M. (2010). Evidence for basolateral Cl⁻ channels as modulators of apical Cl⁻ secretion in pulmonary epithelia of *Xenopus laevis*. In: *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*

Hollenhorst, M. I. & **Richter, K.**, Fronius, M. (2011): Ion Transport by Pulmonary Epithelia. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, S. 1–16

KONFERENZ BEITRÄGE/POSTER PRÄSENTATIONEN

Richter, K.*, Clauss, W., Fronius, M.: “Mechanically induced stretch of native pulmonary epithelium activates both K_{ATP} and KCNQ channels”, German Physiological Society, Mainz, Germany, 2014

Richter, K.*, Clauss, W., Fronius, M.: “K_{ATP} and KCNQ channels are activated by mechanically induced stretch in native pulmonary epithelium (*Xenopus laevis*)”, Early Career Physiologists’ Symposium, Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin, Ireland, 2013

Küllmar, M.*, Hecker, A., **Richter, K.**, Wilker, S., Atanasova, S., Zakrzewicz, A., Stumpf, S., Kaufmann, A., Bauer, S., Kummer, W., Padberg, W., Fronius, M., Grau, V. (2013): ATP-mediated release of interleukin-1 β is inhibited by acetylcholine. *Infection* 41: S26

Küllmar, M.*, Hecker, A., **Richter, K.**, Wilker, S., Atanasova, S., Zakrzewicz, A., Stumpf, S., Kaufmann, A., Bauer, S., Kummer, W., Padberg, W., Fronius, M., Grau, V. (2013): Leukocytic acetylcholine inhibits ATP-mediated IL-1 β release in rat renal allografts. *Transplant Int* 26: 55

Küllmar, M.*, Hecker, A., **Richter, K.**, Wilker, S., Atanasova, S., Zakrzewicz, A., Stumpf, S., Kaufmann, A., Bauer, S., Kummer, W., Padberg, W., Fronius, M., Grau, V. (2013): ATP-mediated release of interleukin-1 β is inhibited by activation of nicotinic acetylcholine receptors containing subunit $\alpha 9$. *Auton Neurosci* 177: 318

Richter, K.*, Kiefer, K., Lintges, M., Geissert, L., Clauss, W., Fronius, M.: “Mechanosensitive activation of ATP-sensitive K⁺ channels in native pulmonary epithelium depends on pannexin and connexin hemichannel mediated ATP release”, *The FASEB Journal*. 2013; 27:1148.11

Richter, K.*, Kiefer, K., Lintges, M., Geissert, L., Bender, N., Clauss, W., Fronius, M.: “Mechanosensitive ATP-release through pannexin and connexin hemichannels involves activation of ATP-sensitive K⁺ channels in native pulmonary epithelium”, German Physiological Society, Heidelberg, Germany, 2013

Richter, K.*, Kiefer, K., Lintges, M., Geissert, L., Clauss, W., Fronius, M.: “Hemichannels participate in ATP-sensitive K⁺ channel activation via mechanosensitive ATP-release in native pulmonary epithelium (*Xenopus laevis*)”, 5th GGL Conference on Life Science, Giessen, Germany, 2012

Richter, K.*, Clauss, W., Fronius, M.: “Mechanical stress activates ATP-sensitive K⁺ channels in native pulmonary epithelium (*Xenopus laevis*)”, *The FASEB Journal*. 2012; 26:698.4

Richter, K.*, Clauss, W., Fronius, M.: “Hemichannels participate in the mechanosensitive activation of ATP-sensitive K⁺ channels in native pulmonary epithelium (*Xenopus laevis*)”, German Physiological Society, Dresden, Germany, 2012

Richter, K.*, Clauss, W., Fronius, M.: “Mechanical stress activates ATP-sensitive K⁺ channels in native pulmonary epithelium (*Xenopus laevis*)”, 4th Annual Conference of the International Giessen Graduate School for the Life Science, Giessen, Germany, 2011

Berger, J., **Richter, K.**, Bednarz, M.*, Clauss, W., Fronius, M.: “Basolateral Cl⁻ channels as modulators of apical Cl⁻ secretion in native lung epithelium (*Xenopus laevis*)”, German Physiological Society, Regensburg, Germany, 2011

Richter, K.*, Clauss, W., Fronius, M.: “The anesthetic octanol activates CFTR-dependent Cl⁻ secretion in native pulmonary epithelium (*Xenopus laevis*)”, German Physiological Society, Regensburg, Germany, 2011

Richter, K., Grzesik, B., Bogdan, R., Clauss, W., Fronius, M.* (2010). ATP-sensitive K⁺-channels in pulmonary epithelium (*Xenopus laevis*) are activated by mechanical stress. Acta Physiologica. 2010; Volume 198, Supplement 677:P-TUE-42

VORTRÄGE

Richter, K.*, Clauss, W., Fronius, M.: “K_{ATP} and KCNQ channels are activated by mechanically induced stretch in native pulmonary epithelium (*Xenopus laevis*)”, Early Career Physiologists’ Symposium, Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin, Ireland, 2013

Richter, K.*, Warren, A., Clauss, W., Fronius, M.: “Mechanically induced stretch of native pulmonary epithelium (*Xenopus laevis*) activates different types of K⁺ channels (K_{ATP}, KCNQ)”, 6th GGL Conference on Life Science, Giessen, Germany, 2013

Richter, K.*, Kiefer, K., Lintges, M., Geissert, L., Clauss, W., Fronius, M.: “Hydrostatic pressure induced ATP-sensitive K⁺ channel activation depends on pannexin and connexin hemichannel mediated ATP release”, FEPS Young Investigator Symposium, Santiago de Compostela, Spain, 2012

Richter, K.*, Clauss, W., Fronius, M.: “Mechanical stress activates ATP-sensitive K⁺ channels in native pulmonary epithelium (*Xenopus laevis*)”, Pre-EB Epithelial Transport Meeting For Young Researchers 2012, Experimental Biology Symposium, San Diego, CA, USA, 2012

7. Verzeichnisse

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Morphologie der menschlichen Lunge.....	6
Abb. 2: Darstellung eines Querschnitts des distalen Bereichs einer Vertebratenlunge mit den Komponenten der Luft-Blut Schranke.	9
Abb. 3: Schematische Darstellung zellulärer Strukturen, die als Mechanosensoren fungieren und an der Mechanotransduktion beteiligt sein können.....	12
Abb. 4: Einfluss von mechnischen Stimuli auf die Funktion der Lunge.....	18
Abb. 5: Die künstliche Beatmung bedingt schädliche physikalische Kräfte und induziert die Bildung von <i>ventilator-induced lung injury</i> (VILI).	20
Abb. 6: Schematische Darstellung der veränderten Ionenleitfähigkeiten in Folge von mechanischem Stress (hydrostatischer Druck).....	24
Abb. 7: Der Pankreas von <i>X. laevis</i>	30
Abb. 8: Präparation der <i>X. laevis</i> Lunge.....	31
Abb. 9: Die modifizierte Ussing-Kammer.	37
Abb. 10: Die Ussing-Kammer Elektroden.	38
Abb. 11: Messaufbau der <i>two-electrode voltage-clamp</i> (TEVC) Messungen.....	43
Abb. 12: Schematische Darstellung einer Messelektrode für <i>two-electrode voltage-clamp</i> (TEVC) Messungen.	44
Abb. 13: Reverse-Transkriptase (RT)-PCR Experimente zum Nachweis von K_{ATP} -Kanal Untereinheiten auf mRNA Ebene.	52
Abb. 14: RT-PCR Experimente zum Nachweis von Connexin- und Pannexin-Hemikanälen auf mRNA Ebene in Lungenhomogenaten von <i>X. laevis</i>	54
Abb. 15: Einfluss von hydrostatischem Druck (HD) auf den transepithelialen Ionentransport im pulmonalen Epithel von <i>X. laevis</i>	56
Abb. 16: Charakterisierung der Beteiligung von Connexin43 (Cx43) an dem HD-induzierten Effekt mittels Mecolfenamin-Säure (MFA).....	58
Abb. 17: Einfluss des Pannexin-Hemikanal Inhibitors Probenecid auf den HD-induzierten Effekt.....	59
Abb. 18: Der Effekt von HMR1098 auf native Connexin-Hemikanäle in <i>X. laevis</i> Oocyten.	62

Abb. 19: Untersuchungen zur Wirkung von HMR1098 auf den humanen $\alpha\beta\gamma$ ENaC.	64
Abb. 20: Einfluss von Glibenclamid auf die Aktivität des hENaCs.	66
Abb. 21: HD-induzierte Änderungen der Lichtemissions-Werte.	69
Abb. 22: HD-induzierte Änderung der $[ATP]_e$	70
Abb. 23: Einfluss von periodischer HD-Applikation auf den I_{SC}	72
Abb. 24: Wirkung von periodischer HD-Applikation auf den Grundstrom.	74
Abb. 25: Wiederholbarkeit der HD-induzierten ATP-Freisetzung.	76
Abb. 26: Einfluss von zyklischer HD-Applikation auf den Amilorid-sensitiven Strom.	78
Abb. 27: Permeabilisierung der apikalen Membran am pulmonalen Epithel von <i>X. laevis</i>	80
Abb. 28: Der HD-induzierte Effekt am apikal permeabilisierten Epithel.	82
Abb. 29: Einfluss von $BaCl_2$ und TPeA auf den HD-induzierten Effekt.	84
Abb. 30: Einfluss des Connexin-Hemikanal Inhibitors MFA auf den HD-Effekt am apikal permeabilisierten Epithel.	86
Abb. 31: Beteiligung von 2-Poren K^+ -Kanälen an dem HD-induzierten Effekt.	88
Abb. 32: Beteiligung von KCNQ K^+ Kanälen an dem HD-induzierten Effekt am apikal permeabilisierten Epithel.	89
Abb. 33: Wirkung von XE991 auf den HD-induzierten Effekt am nicht permeabilisierten Epithel.	91
Abb. 34: Der kurzkettige n-Alkohol Ethanol zeigte keinen Einfluss auf den I_{sc}	93
Abb. 35: Einfluss von 1-Heptanol auf den I_{SC} im pulmonalen Epithel von <i>X. laevis</i>	95
Abb. 36: Einfluss von 1-Octanol auf den I_{SC} im pulmonalen Epithel von <i>X. laevis</i>	96
Abb. 37: Einfluss von Cl^- Kanal Inhibitoren auf den 1-Octanol-induzierten Effekt am pulmonalen Epithel von <i>X. laevis</i>	97
Abb. 38: Einfluss des Adenylatzyklase Inhibitors MDL-12330A auf den n-Alkohol- induzierten Effekt.	99
Abb. 39: Wirkung des CFTR _{Inh} -172 auf den 1-Heptanol-induzierten Effekt am hCFTR.	101
Abb. 40: Der Adenylatzyklase Inhibitor MDL-12330A hemmt die 1-Octanol-induzierte hCFTR Aktivierung.	103
Abb. 41: Zusammenfassung der HD-induzierten Effekte am pulmonalen Epithel von <i>X. laevis</i>	117
Abb. 42: Modell des Wirkmechanismus der n-Alkohol-induzierten indirekten CFTR Aktivierung.	124

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer und ihre PCR Bedingungen.....	35
Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für die Ussing-Kammer Experimente mit den Lungen-Präparaten von <i>X. laevis</i> (in mM).....	47
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen zur Präparation und Kultivierung der Oocyten sowie für die Durchführung der TEVC Messungen (in mM).....	48
Tabelle 4: In den elektrophysiologischen Messungen verwendete Pharmaka, sowie Angaben über verwendete Lösungsmittel und in den Experimenten eingesetzte Appliakonzentrationen.....	49
Tabelle 5: Verwendete Abkürzungen und ihre Bedeutung	146
Tabelle 6: Spezifische Primer der RT-PCR, sowie die erwartete Amplicongröße.	150
Tabelle 7: Sequenzierungs-Ergebnisse der in RT-PCR Experimenten detektierten und ausgeschnittenen Banden.....	151
Tabelle 8: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien.....	152
Tabelle 9: Verwendete Größenordnungen.....	153

7.3 Verzeichnis der Abkürzungen

Tabelle 5: Verwendete Abkürzungen und ihre Bedeutung

Abkürzung	Bedeutung
[ATP] _e	Extrazelluläre ATP-Konzentration
[ATP] _i	Intrazelluläre ATP-Konzentration
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin5'-diphosphat
ALI	<i>acute lung injury</i>
ALF	<i>alveolar lining fluid</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
ASL	<i>alveolar surface liquid layer</i>
AT1	alveolare Zellen Typ 1
AT2	alveolare Zellen Typ 2
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
bp	Basenpaare (englisch: <i>base pairs</i>)
ca.	Zirka
CaCC	Ca ²⁺ -abhängige Cl ⁻ -Kanäle
cAMP	cyclisches Adenosinmonphosphat
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembran conductance Regulator</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonphosphat
CNG	<i>cyclic nucleotide-gated</i>

Abkürzung	Bedeutung
Cx	Connexin
ddH₂O	Doppelt destilliertes Wasser
DIDS	<i>4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene disulphonic acid</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ENaC	<i>epithelial sodium channel</i>
et al.	<i>et alteri</i> , lat.: und andere
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	fokalen Adhäsions Kinase
F-Aktin	filamentöses Aktin
g	Gramm
h	Stunde
HD	Hydrostatischer Druck
H₂O	Wasser
HAPE	<i>high-altitude pulmonary edema</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HEP	1-Heptanol
IP₃	Inositoltrisphosphat
I_{sc}	<i>short-circuit current</i> (Kurzschlußstrom)
JLU Gießen	Justus-Liebig-Universität Gießen
K_{ATP}-Kanäle	ATP-sensitive Kaliumkanäle
Kir	<i>K⁺ inwardly rectifying channel</i>

Abkürzung	Bedeutung
KulORi	Kultur Oocyten-Ringerlösung
l	Liter
m	Meter
M	Molar
MAP	Mitogen-aktivierte Kinase
min	Minute
n	Anzahl der durchgeführten Experimente
N	Anzahl der verwendeten Donore
Na⁺/K⁺-ATPase	Natrium-Kalium-Pumpe
NKCC	Na ⁺ /K ⁺ /Cl ₂ Co-Transporter
NMDG	N-Methyl-D-Glukamin
NPPB	<i>5-nitro-2-(3-phenylpropyl-amino)benzoic acid</i>
NRS	<i>normal Ringer's solution</i>
ns	nicht signifikant verschieden
ORi	Oocyten-Ringerlösung
OCT	1-Octanol
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , lat. (Wert für die Konzentration von Protonen)
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
Px	Pannexin
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sec	Sekunde

Abkürzung	Bedeutung
SUR	Sulphonyl Harnstoff Rezeptor
TEVC	<i>two-electrode voltage-clamp</i>
TRIZMA	Trishydroxymethylaminomethan
TRP Kanäle	<i>transient receptor potential</i> Kanäle
V	Volt
VILI	<i>ventilator induced lung injury</i>
vgl.	vergleiche
V_M	Membranpotential
V_T	transepitheliales Potential
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
z.B.	zum Beispiel

8. Anhang

Tabelle 6: Spezifische Primer der RT-PCR, sowie die erwartete Amplicongröße.

Ziel	Gen-Name	Primer Sequenz	Amplicongröße [bp]	Accession number
Kir6.1	kcnj8	For: acgtcttcaccaccttggtc Rev: atggctccaggttcttgatg	162	NM_001198883 ¹
Kir6.2	kcnj11	For: gccattctggaaggtgtgtg Rev: ttggctttgaatggttcca	247	XM_002940236 ¹
SUR1	abcc8	For: atgtccttggctttctgtgg Rev: cgaagaggaggatgaaggtg	250	ENSXETT0000004 1187 ²
SUR2	abcc9	For: gcaagtcctcctactgctg Rev: aaaggactcccgaaggtgat	229	ENSXETG0000000 0896.2 ²
Panx1	px1	For: ttctccgacttctcctctcaa Rev: gctgcccacagaaaagagtc	242	NM_001130256 ¹
Cx30	gjb1	For: gtccacaggagaagaccata Rev: ttgatgctctttgctgatgc	158	NM_001101749.1 ¹
Cx43	gja1	For: cgaccacagagaaaacct Rev: gcatatttaggggagccaca	194	NM_001085660.1 ¹

bp: Basenpaare (englisch: *base pairs*); For: *forward* Primer; Rev: *reverse* Primer;

¹: PubMed Transkript ID

²:Ensembl-databank Transkript ID

Die Tabelle wurde verändert nach Richter *et al.* 2014.

Tabelle 7: Sequenzierungs-Ergebnisse der in RT-PCR Experimenten detektierten und ausgeschnittenen Banden.

Ziel	Sequenzierungsergebnis	Anzahl der Nucleotide	Sequenz-Identität*
Kir6.1	TCTTCACCATGTCCTTCCTCTGCAGCTGGTTGCTCT TTGCCATGATGTGGTGGCTGGTGGCTTTTGCACATG GAGACATGGACATCAAGGACAACATCAAGAACCTGG AGCCATGG	115	100% ¹
SUR1	GGATAAGGGGGTTCCTGAACAACGGCTGCTTTGTAGA TGCCCTCAATGTGGTCCCCACGTATTCCTGCTCTT CATCACCTTCCCCATCCTCTTTATTGGATGGGGGAG CCAGAGCTCCAAAGTGCACATCCATCACAGCACGTG GCTGCACTTCCCGGGGCACAACCTGCGCTGGATTCT CACCTTCATCCTCCTCTTCG	208	95% ²
Panx1	CTGGGCTGCGGCTGGAGCTGGCGGTGGATAAGCTCG TGTCTGCATTGCCGTGGGGCTGCCCTTGCTGCTCA TTTCTCTGGCCTTCGCTCAGGAGATCACTCTGGGTT CCCAAATTAGCTGCTTTGCTCCCACTTCATTCTCAT GGCGCCAGGCTGCTTATGTCGACTCTTTCTGTTGGG CAGCCAT	186	99% ¹
Cx30	CGCCTCTGGGGTCTGCATCGTTCTGAATGTTGCTGA AGTATTCTTCCTGATTGCCAGGCCTGCACCAGAAG AGCCCGCCGCCACAGGGATTCTGGCAGCATCAGCAA AGAGCATCAAAATCTTTTCT	127	100% ¹
Cx43	GTATCTATAGTTTCTCTTGCCCTAAATATCATCGAG TTATTCTATGTCACCTACAAAAGTATCAAAGATGGC ATCAAAGGGAAAAAAGACCCATTTTCTGCAACAAAT GATGCTGTGATTTCTGGAAAGGAATGTGGCTCCCCT AAATATGCCACCTA	157	100% ¹

¹: Identität zu *Xenopus laevis* Nucleotiden

²: Identität zu *Xenopus tropicalis* Nucleotiden

*: Sequenzierungs-Ergebnisse generiert durch Eurofins MWG Operon; Überprüfung der Sequenz-Identitäten mittels des online BLAST Analyse Werkzeugs (<http://www.xenbase.org>).

Die Tabelle wurde teilweise verändert nach Richter *et al.* 2014.

Tabelle 8: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien.

Substanz	Bezugsquelle
Amilorid	Sigma
Barium (BaCl₂)	Riedel de Haen
CFTR_{Inh}-172	Sigma
DIDS	Sigma
DMSO	Sigma
Ethanol	Sigma
Glibenclamid	Sigma
1-Heptanol	Sigma
HMR1098	Sanofi Aventis
Lidocaine	Sigma
Mannitol	Sigma
MDL-12330A	Tocris
Meclofenamin-Säure	Sigma
NPPB	Tocris
Nystatin	Sigma
1-Octanol	Sigma
Probenecid	Sigma
XE991	Sigma
Tetrapentylammoniumchlorid	Sigma

Angaben der Firmensitze:

Riedel-de Haen: Seelze, Deutschland; **Tocris:** Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland; **Sanofi Aventis:** Damstadt, Deutschland; **Sigma:** Taufkirchen, Deutschland.

Tabelle 9: Verwendete Größenordnungen.

Symbol	Präfix	Faktor
n	nano	10^{-9}
μ	micro	10^{-6}
m	mili	10^{-3}
c	centi	10^{-2}

9. Curriculum Vitae

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen in der öffentlichen Version heraus gelöscht.

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen in der öffentlichen Version heraus gelöscht.

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen in der öffentlichen Version heraus gelöscht.

10. Danksagung

Abschließend ist es an der Zeit, nochmals denjenigen zu danken, die mich während meiner Doktorandenzeit sowie bei der Fertigung dieser Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Clauss möchte ich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes, die Überlassung des Themas und für die fachliche Hilfestellung danken. Zudem möchte ich mich für das Vertrauen, dass er in mich gesetzt hat bedanken, für die Unterstützung meiner Teilnahme an dem Doktorandenprogramm (GGL) sowie an diversen Kongressen.

Mein großer Dank gilt Frau Prof. Dr. Veronika Grau, die nicht nur meine Co-Betreuung beim GGL übernommen, sondern vielmehr meine fachliche, berufliche und persönliche Weiterentwicklung stets gefördert hat. Danke für das erfolgreiche Kooperationsprojekt, die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens, die inspirierenden fachlichen Diskussionen, die offenen Gespräche und vieles mehr.

Nicht weniger Dank gilt Dr. Martin Fronius, der mir auch auf der anderen Seite der Welt immer noch ein Mentor ist, der mir das wissenschaftliche Arbeiten und die diversen elektrophysiologischen Messmethoden beigebracht hat, immer zu kritischen, konstruktiven sowie inspirierenden Diskussionen bereit war und mir nicht zuletzt auch durch private Gespräche immer zur Seite gestanden hat.

Mein Dank gilt auch Dr. Mike Althaus, der mir schon seit meiner Diplomstudium-Zeit mit seinem Fachwissen, Ideen und Anregungen zur Seite steht, mit dem ich auf internationale Kongresse reisen konnte, und der mich immer unterstützt hat. Mahalo.

Prof. Dr. Lakes-Harlan möchte ich für die zahlreiche Unterstützung, Hilfestellung und die konstruktiven Diskussionen danken.

Ein herzliches Dankeschön auch an Dr. Johannes Strauß, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Ich danke meinen Kollegen Frau Eichelmann, Niko, Anja, Mirjam, Fenja, Christa, Joscha, Sarah, Jens, Benno, Kerstin, Sigi und Herrn Seehagen-Rabenau, die mich auf vielfache Weise unterstützt haben, mir seelisch und moralisch beigegeben haben und mich auch in angespannter und gestresster Laune ertrugen. Monika Hollenhorst und Constanze Vitzthum, was soll ich sagen außer: Danke einfach für alles.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Bruder, Familie, Freund und Freunden, die mir in allen Lebenslagen, Höhen und Tiefen, guten und schlechten Zeiten, immer beigegeben haben. Die mir meine Lauen verziehen haben und immer eine riesige Unterstützung waren und sind. Ohne euch wäre meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen, denn ihr macht mich zu dem was ich bin, DANKE.

11. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Thesis selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze gute wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Gemäß § 25 Abs. 6 der Allgemeinen Bestimmungen für modularisierte Studiengänge dulde ich eine Überprüfung der Thesis mittels Anti-Plagiatssoftware.

Gießen, den _____

Datum

Unterschrift