

Institut für Tierphysiologie
Prof. Dr. Wolfgang Clauss



**Charakterisierung Druck-induzierter Ionenströme am
Pulmonalepithel von *Xenopus laevis***

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

vorgelegt von Roman Bogdan

Gießen, 2007

Dekan: Prof. Dr. P. Schreiner

Gutachter: Prof. Dr. W. Clauss
Prof. Dr. M. Diener

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	1
I.2	Barriere und kontrollierter Austausch	1
I.3	Lungenepithel, pulmonaler Ionentransport und <i>airway surface liquid</i>	2
I.4	Überdruckbeatmung und <i>ventilator induced lung injury</i> : vom Barotrauma zum Biotrauma.....	4
I.5	Bearbeitete Fragestellung	6
II	MATERIAL UND METHODEN	8
II.1	Versuchstier	8
II.1.1	Tierhaltung.....	8
II.1.2	Präparation der Lungen.....	9
II.1.3	Entnahme und Vereinzelung der Oocyten.....	10
II.2	Molekularbiologische Methoden.....	11
II.2.1	RT-PCR zur Detektion von mRNA in Lungen von <i>Xenopus laevis</i> sowie in humanen Zelllinien	11
II.2.2	Klonierung des humanen epithelialen Na ⁺ -Kanals.....	14
II.2.3	<i>In vitro</i> Transkription und Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oocyten.....	21
II.3	Immunhistologie.....	23
II.4	Elektrophysiologische Methoden	25
II.4.1	Messprinzip <i>voltage clamp</i> und <i>current clamp</i>	25
II.4.2	Modifizierte Ussing-Kammer.....	26
II.4.3	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	29
II.4.4	<i>Patch Clamp</i>	32
II.5	Bestimmung von extrazellulärem ATP	36
II.6	Statistik und Datenverarbeitung	37
II.7	Medien, Puffer und Lösungen	38

III	ERGEBNISSE	43
III.1	Elektrophysiologische Charakterisierung der Lunge von <i>Xenopus laevis</i>	43
III.2	Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften durch Druckapplikation	44
III.2.1	Auswirkung auf den Kurzschlussstrom und den Widerstand.....	44
III.2.2	Auswirkung auf die transepitheliale Potenzialdifferenz.....	50
III.2.3	Auswirkung auf die Austauschoberfläche	51
III.2.4	Reproduzierbarkeit des Druckeffektes und Einfluss von Lösungsmitteln	53
III.3	Bestimmung von extrazellulärem ATP	54
III.4	Pharmakologische Charakterisierung der Druck-induzierten Änderung des Kurzschlussstroms	55
III.4.1	Einfluss von Natrium-Kanalblockern	56
III.4.2	Einfluss von Chlorid-Kanalblockern	59
III.4.3	Einfluss von Kalium-Kanalblockern	62
III.4.4	Wirkung $[Ca^{2+}]_i$ -modulierender Substanzen.....	74
III.4.5	Einfluss von Modulatoren der <i>transient receptor potential</i> Familie.....	80
III.5	Einfluss der Lösungsmolarität	82
III.6	mRNA und Proteinexpression verschiedener Ionenkanäle in der <i>Xenopus</i> Lunge und in humanen alveolaren Zelllinien	83
III.6.1	Expression von Ionenkanälen in der <i>Xenopus</i> Lunge.....	84
III.6.2	TRPC1 Expression in humanen alveolaren Zelllinien.....	89
III.7	Klonierung des humanen epithelialen Natrium-Kanals.....	90
III.8	Einfluss mechanischer Kräfte auf den epithelialen Na^+ -Kanal	91
IV	DISKUSSION	95
IV.1	Pulmonaler Ionentransport im Säugerepithel	95
IV.1.1	Alveolare Zelltypen	95
IV.1.2	Transportproteine.....	96
IV.2	Pulmonaler Ionentransport im Epithel von <i>Xenopus laevis</i> - ein Modellsystem?.....	97

IV.2.1	Morphologie	97
IV.2.2	Transportproteine.....	99
IV.3	Einfluss mechanischer Kräfte auf die Physiologie der Lunge.....	99
IV.4	Hydrostatischer Druck reduziert den Kurzschlussstrom und die Kapazität der <i>Xenopus</i> Lunge.....	101
IV.4.1	Kurzschlussstrom.....	101
IV.4.2	Widerstand.....	103
IV.4.3	Kapazität.....	104
IV.5	Hydrostatischer Druck führt zur Freisetzung von ATP.....	106
IV.6	Hydrostatischer Druck induziert die Sekretion von Kalium	109
IV.6.1	ATP-abhängige K ⁺ -Kanäle	110
IV.6.2	2-Poren-Domänen K ⁺ -Kanäle.....	113
IV.6.3	Ca ²⁺ -aktivierte K ⁺ -Kanäle.....	115
IV.7	Einfluss der Lösungsosmolarität - <i>regulatory volume decrease</i>	119
IV.8	Beteiligung mechanosensitiver Ionenkanäle	121
IV.9	Abhängigkeit des Druckeffekts von [Ca ²⁺] _i	125
IV.10	Mechanischer Stress aktiviert neben Kalium-Kanälen auch Natrium- und Chlorid-Leitfähigkeiten.....	127
IV.10.1	Scherkräfte aktivieren den humanen epithelialen Na ⁺ -Kanal.....	132
IV.11	Fazit	135
V	ZUSAMMENFASSUNG	136
VI	LITERATURVERZEICHNIS	140
VII	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	156
VIII	TABELLENVERZEICHNIS	160
IX	ANHANG	162

I Einleitung

I.2 Barriere und kontrollierter Austausch

Organismen sind offene Systeme, die in stetem Energie- und Stoffaustausch mit ihrer Umgebung stehen. Dabei liegt der wesentliche Unterschied zwischen den Lebewesen und der sie umgebenden abiotischen Materie in dem hohen Ordnungsgrad, der auf dem Niveau der Zelle stets aufrecht erhalten wird. Um eine Auflösung dieses Ordnungszustandes zu verhindern, sind Mechanismen notwendig, die den Stoff- und Energiefluss zwischen Organismus und Umwelt kontrollieren.

Auf zellulärem Niveau sind die beiden Funktionen „Barriere“ und „kontrollierter Austausch“ in Form der Zellmembran verwirklicht. Durch ihren Aufbau als Phospholipid-*Bilayer* bildet sie eine Diffusionsbarriere für hydrophile Substanzen, wobei der selektive Stoffaustausch durch integrale Proteine verwirklicht wird. Auf diese Weise wird ein abgeschlossener Reaktionsraum geschaffen, dessen Zusammensetzung kontrolliert und dynamisch verändert werden kann. Erst die Möglichkeit der flexiblen Änderung des internen Milieus gewährleistet grundlegende Zellfunktionen wie Erregung, Kommunikation, Stoffaufnahme, Energieerzeugung und anderes mehr.

Im Rahmen der Evolution multizellulärer Organismen trat eine Spezialisierung einzelner Zellverbände zu Geweben und Organen ein. Innerhalb dieser steht nur noch ein Teil der Zellen in direktem Kontakt zu dem Außenmedium. Diesem Abschlussgewebe obliegt damit die Kontrolle der Salz- und Flüssigkeitshomöostase. Auch auf Ebene des Organismus müssen die Prinzipien „Barriere“ und „kontrollierter Austausch“ gewahrt bleiben. Diese Funktionen werden hier von Epithelien übernommen. Die einzelnen Epithelzellen sind über *tight junction* Proteine miteinander verbunden. Ein parazellulärer Transport, welcher Ionen zwischen den Grenzen benachbarter Zellen hindurchschleust, kann auf Grund der abdichtenden Eigenschaften der *tight junctions* nur beschränkt erfolgen (Barriere). Ein kontrollierter Austausch gelöster Stoffe erfolgt transzellulär, also durch das Cytoplasma der Epithelzellen. Die Transporteigenschaften des Epithels werden dabei von der Ausstattung mit spezifischen Transportproteinen in der Zellmembran bestimmt.

I.3 Lungenepithel, pulmonaler Ionentransport und *airway surface liquid*

Auch das Lungenlumen wird von einer Schicht Epithelzellen bedeckt, die das Körperinnere gegen das Außenmedium abgrenzt. Da die Lunge luftatmender Vertebraten in direktem Kontakt zur Atemluft steht, kommt dieser Zellschicht eine Bedeutung beim Schutz vor inhalierten Pathogenen und Noxen zu. Neben dieser Schutzfunktion sind die Epithelzellen wesentlich am Transport von Salzen und Flüssigkeiten beteiligt. Durch vektoriellen Ionentransport der Zellen kommt es zur Ausbildung einer wässrigen Auflageschicht im Lungenlumen - dem sogenannten *airway surface liquid* (ASL). Dieser kann in unterschiedliche Komponenten unterteilt werden (Rubin 2002). In den mittleren bis oberen Atemwegen findet man bewimperte Zellen, die von einer Schicht pericilliärer Flüssigkeit bedeckt sind. Diesem Flüssigkeitsfilm ist eine *surfactant*-Schicht aufgelagert, welcher sich wiederum eine Mucus-Schicht anschließt. Die *surfactant*-Schicht besteht aus oberflächenaktiven Substanzen. Sie setzen die Oberflächenspannung des wässrigen Films herab und erhöhen auf diese Weise die Stabilität der respiratorischen Bereiche bei der Ausatmung (Daniels & Orgeig 2001). In der Mucusschicht findet man sekretierte Proteine (Mucine). Durch die dreidimensionale Vernetzung der Mucus-Proteine wirkt diese Schicht wie ein Filter, in dem sich diverse inhalierte Fremdstoffe wie Staub und Mikroorganismen verfangen. Durch eine koordinierte Aktivität der bewimperten Zellen wird der ASL in eine Fließbewegung versetzt, welche die Mucusschicht ständig in Richtung Trachea transportiert und damit eine Säuberung des Epithels gewährleistet. Zur Abwehr von Pathogenen findet man im ASL weiterhin Makrophagen, antimikrobielle Enzyme wie Lysozym und Lactoferrin sowie Signalmoleküle wie Purine und Cytokine (Tarran 2004).

Die Wirksamkeit der Pathogen-Abwehr ist eng an die Zusammensetzung des ASL gekoppelt. Für die antimikrobiellen Defensine, welche im ASL vorkommen, wurde bereits eine Inaktivierung bei zunehmender Salzkonzentration nachgewiesen (Goldman *et al.* 1997). Weiterhin muss die Viskosität des ASL streng reguliert werden. Die Schicht muss dünnflüssig sein, um den Abtransport der Mucusschicht zu gewährleisten. Andererseits darf dies nicht zu einer Erhöhung des Auflagefilms führen, da ansonsten der Gasaustausch in den respiratorischen Lungenbereichen beeinträchtigt wird. Eine Störung dieser Regulation bedingt pathophysiologische Zustände, wie sie beispielsweise beim Krankheitsbild der Mukoviszidose (hohe Viskosität) oder im Falle einer pulmonalen Ödembildung (hohe Auflageschicht) beobachtet werden. Der Mukoviszidose liegen Mutationen in einem Gen zugrunde, welches für den Chlorid-Kanal *cystic fibrosis transmembrane conductance*

regulator (CFTR) kodiert (Schwiebert *et al.* 1998). Es existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Mutationen (Kunzelmann *et al.* 2000: mehr als 800), wobei die $\Delta F508$ -Mutation mit einer Häufigkeit von etwa 50 % der Homozygoten die häufigste Veränderung darstellt (Hirche *et al.* 2005). Eine Deletion von drei Basenpaaren führt hier zu einer Modifikation der Tertiärstruktur des Proteins, die eine Degradation noch vor dem Einbau in die Zellmembran bewirkt. Dadurch werden sämtliche CFTR-exprimierenden Organsysteme wie bspw. Schweißdrüsen, Pankreas, Verdauungstrakt und Lunge in Mitleidenschaft gezogen. Speziell die pathophysiologischen Veränderungen in der Lunge bedingen die hohe Morbidität und Mortalität der Erbkrankheit (Hirche *et al.* 2005). Das Fehlen des CFTR hat zur Folge, dass die Viskosität des Mucus stark erhöht wird. Dadurch wird der Abtransport eingedrungener Mikroorganismen erschwert, welche in der verdickten Mukusschicht proliferieren (Boucher 2002). Die Folge sind chronische Entzündungsreaktionen und eine fortschreitende Fibrosierung des Lungengewebes, welche mit einem Verlust respiratorisch aktiver Areale einhergeht (Hirche *et al.* 2005).

Das andere Extrem, nämlich eine starke Erhöhung des Flüssigkeitsfilms in der Lunge, beobachtet man bei der Pathogenese pulmonaler Ödeme (Lecuona *et al.* 1999). Die vergrößerte Auflageschicht stellt eine verstärkte Diffusionsbarriere für die Atemgase dar, so dass eine Sauerstoffunterversorgung (Hypoxie) resultieren kann. Die Ursachen, welche zum Auftreten von Lungenödemen führen, sind vielschichtig. Man unterscheidet im Allgemeinen zwischen hydrostatischen Ödemen und Permeabilitäts-Ödemen. Hydrostatische Ödeme sind gekennzeichnet durch einen erhöhten Filtrationsdruck, bspw. durch eine Zunahme des Kapillardrucks aufgrund von Linksherzversagen (Ketaj & Godwin 1998). Bei Permeabilitäts-Ödemen ist die alveolar-endotheliale Barriere zerstört, was ein vermehrtes Einsickern von Flüssigkeit in das Lungenlumen zur Folge hat (Ketaj & Godwin 1998).

Während die Entstehungsmechanismen pulmonaler Ödeme unterschiedlich sein können, ist eine Linderung der Symptome immer eng an einen funktionierenden Ionentransport gekoppelt (Lecuona *et al.* 1999; Fang *et al.* 2002; Mutlu & Sznajder 2005). Hier kommt dem Alveolarepithel eine bedeutende Rolle zu. Einerseits werden 99 % der Lungenoberfläche durch alveolare Epithelzellen repräsentiert (Mutlu & Sznajder 2005), zum anderen besitzen diese Zellen (genauer die Alveolaren Typ I Zellen) aufgrund ihrer reichhaltigen Ausstattung mit Aquaporinen die höchste Wasserpermeabilität aller bis dato untersuchten Säugerzellen (Dobbs *et al.* 1998).

Neben der Regulation des ASL spielt der vektorielle Ionentransport eine bedeutende Rolle in der Lungenentwicklung. Die Lunge des Fetus ist während der Schwangerschaft

flüssigkeitsgefüllt. Dies bedingt, dass die im Lungenlumen vorhandene Flüssigkeit während des Geburtsvorgangs effektiv und in kurzer Zeit resorbiert werden muss. Haupttriebkraft für die Wasseraufnahme ist die Resorption von Na^+ , welche durch spezialisierte Ionenkanäle (epitheliale Na^+ -Kanäle, ENaCs) und Pumpen (Na^+ - K^+ -ATPase) stattfindet (Pitkanen & O'Brodovich 1998). Die Bedeutung dieser Na^+ -Resorption wurde von Hummler *et al.* (1996) demonstriert. *Knock-out* Mäuse, die keine funktionellen ENaCs mehr bilden konnten, starben innerhalb von 40 Stunden nach der Geburt. Autopsien zeigten, dass die *Knock-out* Tiere keine pathologischen Auffälligkeiten in anderen Organen als der Lunge zeigten. Auch hier entsprach zwar die Histologie den Wildtyp-Tieren, jedoch waren die Alveolen der *Knock-out* Mäuse flüssigkeitsgefüllt. Dies spricht dafür, dass eine mangelnde Na^+ -Resorption bedingt durch das Fehlen der ENaCs bereits wenige Stunden nach der Geburt zum Tod durch Ertrinken führt.

I.4 Überdruckbeatmung und ventilator induced lung injury: vom Barotrauma zum Biotrauma¹

Verschiedene Krankheitsbilder, die mit respiratorischer Insuffizienz einhergehen, machen eine mechanische Beatmung der Patienten notwendig. Man unterscheidet je nach Schwere der Erkrankung zwischen dem sogenannten ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) und der ALI (*acute lung injury*). Beide sind gekennzeichnet durch eine Schädigung der alveolar-endothelialen Barriere, dem Auftreten von Entzündungsreaktionen und der Akkumulation Protein-reicher Flüssigkeit im Lungenlumen (Vasudevan *et al.* 2004). ARDS stellt dabei die schwerere Form der ALI dar. Eine Diagnose stützt sich auf einen akuten Beginn, das Auftreten von Infiltraten in beiden Lungenflügeln sowie einen verminderten Sauerstoffpartialdruck des Blutes. Die Ursachen, die zum Auftreten von ARDS führen, sind mannigfaltig und reichen von pulmonalen Erkrankungen (Pneumonie, Säureaspiration, Inhalation toxischer Gase, Höhenkrankheit) bis zu Polytrauma oder ausgedehnten Verbrennungen (Müller *et al.* 2004). Die Mortalitätsrate bei ARDS und ALI wird in einer Veröffentlichung des *ARDS Network* mit 40 bis 50 % angegeben (The Acute Respiratory Distress Syndrome Network 2000). Die Haupttodesursache wird dabei im Auftreten von multiplem Organversagen gesehen (Dos Santos & Slutsky 2000).

¹ Die Alliteration findet sich bei Slutsky 2005.

Da Patienten mit ARDS bzw. ALI unter einem gestörten Gasaustausch leiden, ist der Einsatz künstlicher Beatmungssysteme unerlässlich. In den letzten Jahren kamen zunehmend Hinweise auf, dass es durch die mechanische Beatmung selbst zu einer Schädigung der Lunge kommen kann. Erste Beobachtungen wurden bereits in den 1950er Jahren gemacht. Dort kam es in der Folge von Polio-Epidemien zum vermehrten Einsatz der sogenannten „Eisernen Lungen“ - künstlichen Beatmungssystemen, bei denen ein in einem Stahl-Zylinder erzeugtes Vakuum die Bewegung des Brustkorbs ermöglichte. Dabei wurde festgestellt, dass die Lungen künstlich beatmeter Patienten auffällige Veränderungen aufwiesen. Dies äußerte sich im Auftreten von hyalinen Membranen, zellulären Infiltraten und Lungenödemen (Tremblay & Slutsky 2006). Als Ursache der schädigenden Wirkung wurde der erhöhte Druck gesehen, weshalb man fortan vom „Barotrauma“ sprach. Die Ansichten änderten sich, nachdem Dreyfuss *et al.* (1988) darstellten, dass die verwendeten Beatmungsvolumina eine stärkere Rolle spielten als der applizierte Druck. In der genannten Studie wurden Ratten verschiedenen Beatmungsstrategien unterworfen. In einer Versuchsgruppe wurde eine übermäßige Ausdehnung des Brustkorbs verhindert, indem den Tieren eine Art Korsett angelegt wurde. In dieser Gruppe kam es trotz der Verwendung erhöhter Drücke nicht zum Auftreten der typischen Lungenschädigungen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Begriff „Barotrauma“ vom „Volutrauma“ abgelöst. In weiteren Untersuchungen kristallisierte sich heraus, dass der Einsatz von positiven end-expiratorischen Drücken (PEEP, *positive end expiratory pressure*), zu einer Verminderung der Lungenschädigungen beitrug. Bislang verwendete man Beatmungsprotokolle, bei denen ein positiver inspiratorischer Druck (PIP, *positive inspiratory pressure*) während der Einatmungsphase aufgebaut wurde und während der Ausatmung komplett abgelassen wurde. Bei der Beatmung mit PEEP wurde nun auch während der Ausatmungsphase ein geringer Druck beibehalten. Dadurch wurde verhindert, dass es bei der Entspannung der Brustkorbs während der Ausatmung zu einem Kollabieren der Alveolen kommt - eine schädigende Wirkung, die mit dem Begriff „Atelectotrauma“ beschrieben wird. Die Bedeutung einer veränderten Beatmungsstrategie wurde im Jahr 2000 in einer Veröffentlichung des *ARDS Network* aufgezeigt (The Acute Respiratory Distress Syndrome Network 2000). In dieser großangelegten Studie wurden Gruppen von jeweils etwa 400 Personen entweder einer konventionellen Beatmung mit Tidalvolumina von 12 ml/kg Körpergewicht oder einer Beatmung mit reduziertem Volumen (6 ml/kg Körpergewicht) unterzogen. Die Studie wurde vorzeitig beendet, nachdem Zwischenergebnisse die eindeutigen Vorteile der Beatmung mit geringen Tidalvolumina aufzeigten. In dieser Gruppe

betrug die Mortalität circa 31 %, während sie in der Gruppe mit hohem Tidalvolumen bei circa 40 % lag.

Heute spricht man im Allgemeinen von der VILI (*ventilator induced lung injury*), wenn man die schädigenden Auswirkungen der mechanischen Beatmung beschreiben will. Die Mechanismen, welche ein Lungenversagen begünstigen, werden mittlerweile auch in der Beteiligung zellulärer Reaktionen gesehen. Das Auftreten diverser Entzündungsmediatoren wie bspw. $\text{TNF}\alpha$ (Tremblay *et al.* 1997) führten dazu, dass man die Ursache der VILI mittlerweile in einem sogenannten „Biotrauma“ sieht (Slutsky 2005). Der Integritätsverlust der Blut-Luft-Schranke und damit die systemische Verteilung von Bakterien und Entzündungsmediatoren hat vielfach den Tod durch multiples Organversagen zur Folge (Slutsky 2005).

I.5 Bearbeitete Fragestellung

Da die Einwirkung mechanischer Kräfte auf die Lunge in bestimmten Fällen zu pulmonalen Ödemen führen kann (VILI), und andererseits die Auflösung pulmonaler Ödeme eng an einen funktionierenden Ionentransport gekoppelt ist, stellt sich die Frage, welchen Einfluss mechanische Kräfte auf Transportmechanismen des Lungenepithels ausüben. Dos Santos & Slutsky (2000) unterscheiden zwischen drei Prinzipien, wie mechanische Deformationen in eine zelluläre Antwort übersetzt werden können: (A) durch eine direkte Konformationsänderung Membran-assoziiierter Moleküle und Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden, (B) durch Freisetzung para- oder autokriner Faktoren und (C) durch Beeinflussung mechanosensitiver Ionenkanäle.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss mechanischer Kräfte auf den Ionentransport untersucht. Es war dabei von besonderem Interesse, ob mechanische Stimuli eine kurzzeitige Wirkung auf den transepithelialen Ionenstrom haben. Weiterhin ist bislang nicht geklärt, welche Transportproteine beeinflusst werden.

Zur Untersuchung der beschriebenen Fragestellung wurde u.a. die Lunge des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* verwendet. Dieses Organ bietet den Vorteil, pulmonalen Ionentransport mittels Ussing-Kammermessungen in einem nativen Gewebe studieren zu können. Zwar ist ein solcher Ansatz prinzipiell auch mit Zellkulturen möglich, jedoch haben verschiedene Studien der letzten Jahre gezeigt, dass die Transporteigenschaften der Zellen stark von den Kulturbedingungen abhängen. Leroy *et al.* (2004) berichten, dass sowohl die Expression des Chlorid-Kanals CFTR als auch des Kalium-Kanals K_{ATP} in den

ersten Tagen nach Isolation primärer Alveolarer Typ II Zellen der Ratte rückgangig sind. Weiterhin beobachteten Jain *et al.* (2001), dass auch die elektrophysiologischen Eigenschaften epithelialer Na⁺ Kanäle (ENaC) durch die Kulturbedingungen verändert wurden. Der Zusatz von Steroidhormonen sowie die Form der Kultivierung (*air-liquid interface*) bedingte das Auftreten hochselektiver Kanäle mit geringer Amplitude, wohingegen in Abwesenheit der genannten Bedingungen wenig selektive Kanäle mit großer Amplitude beobachtet wurden. Weiterhin sind die Untersuchungen an Zellkulturen auf das Studium eines isolierten Zelltyps beschränkt. Das komplexe Zusammenspiel in einem Gewebeverband kann nicht simuliert werden. Demgegenüber ermöglicht die sackartige Morphologie der *Xenopus* Lunge die Verwendung eines kompletten Organs in der Ussing-Kammer - eine Methode, die aufgrund des schwammartigen Aufbaus der Säugerlunge dort nicht eingesetzt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit ermöglichte der Einsatz einer modifizierten Ussing-Kammer die Erhöhung des hydrostatischen Drucks bei gleichzeitiger Erfassung des kompletten transepithelialen Ionentransports. Auf diese Weise konnte der Einfluss mechanischer Kräfte auf den pulmonalen Ionentransport detektiert werden. Durch pharmakologische Untersuchungen konnte die Beteiligung verschiedener Ionenkanäle nachgewiesen werden, deren Anwesenheit in der *Xenopus* Lunge durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden bestätigt wurde. Schließlich wurde an einem klonierten und heterolog exprimierten Ionenkanal der Einfluss von Scherkräften untersucht.

II Material und Methoden

II.1 Versuchstier

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss mechanischer Kräfte auf Ionenströme studiert. Dazu wurden unter anderem die Lungen weiblicher Südafrikanischer Krallenfrösche (*Xenopus laevis* (Daudin, 1802)) mittels elektrophysiologischer Messungen untersucht. *Xenopus laevis* gehört zum Taxon der zungenlosen Froschlurche (*Pipidae*) (Hilken *et al.* 1997). Bislang wurden fünf Unterarten beschrieben (Hilken *et al.* 1997), die Unterschiede hinsichtlich Färbung, Körpergröße und Chromosomenzahl aufweisen. Das ursprüngliche Verbreitungsgebiet von *X. laevis* umfasst das südwestliche Afrika; als Neozoon ist die Art allerdings auch auf dem amerikanischen Kontinent sowie in Frankreich zu finden. Der Krallenfrosch bewohnt die Schlammschicht stehender Gewässer. Die aquatische Lebensweise der Tiere kommt in einigen morphologischen Anpassungen zum Ausdruck. So inserieren die Extremitäten seitlich des Körpers, die Augen sind auf der dorsalen Schädeldecke lokalisiert und es bleibt zeitlebens ein vollständig entwickeltes Seitenliniensystem bestehen. Das namensgebende Merkmal des Krallenfrosches sind die drei Krallen an den hinteren Phallangen. Zwar verbringen die Tiere den Großteil ihres Lebens im Wasser, jedoch können sie bei sich verschlechternden Umweltbedingungen das Habitat über den Landweg wechseln oder in der Schlammschicht überdauern. Seine einfache Zucht und Haltung macht den Krallenfrosch als Labortier interessant. Dies ist vor allem seiner Robustheit zu verdanken, die sich u.a. in seinem eurythermen Charakter sowie der Toleranz gegenüber pH-Schwankungen des Habitats zeigt (Hilken *et al.* 1997).

Die Lunge von *Xenopus laevis* (**Abb. II-1**) eignet sich aufgrund ihrer einfachen, sackartigen Morphologie für elektrophysiologische Messungen in der Ussing-Kammer (**Abb. II-6**). Dies macht es möglich, Ionentransportprozesse über komplette respiratorische Oberflächen zu untersuchen - ein Umstand, der in entsprechenden Säugergeweben bislang nicht realisiert werden konnte.

II.1.1 Tierhaltung

Die präsentierten Daten wurden ausschließlich an adulten Weibchen mit einer Rumpflänge > 10 cm erhoben. Die Tiere wurden von der Firma *KÄHLER* (Bedarf für Forschung und Lehre, Hamburg) geliefert. Es handelte sich dabei um Wildfänge, die aus

Südafrika importiert wurden. Die Tiere wurden in Gruppen von maximal 30 Individuen in 250 l Kunststoffbecken bei einer Wassertemperatur von 16 - 20°C gehalten. Die Becken verfügten über einen permanenten Durchfluss von frischem Leitungswasser. Weiterhin wurde das im Becken befindliche Wasser über Sprudelsteine mit Druckluft begast. Den Tieren standen halbierte Tontöpfe als Unterschlupf zur Verfügung. Die Fütterung erfolgte wöchentlich mit Forellen-Futter (Bezugsquelle: *KÄHLER*, Hamburg). Einen Tag nach der Fütterung wurde das Wasser der Becken ausgetauscht, um es von Exkrementen und Futterresten zu reinigen.

Für die Haltung, Fütterung und Tötung der Frösche lag eine Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen vor (V54—19c20-15(1) GI 15/7 Nr. 27/01 und II 25.3—19c20-15(1) GI 15/7 Nr.27/2001).

II.1.2 Präparation der Lungen

Die Versuchstiere wurden für circa 45 min in Eiswasser anästhesiert. Anschließend wurde das Gehirn mechanisch durch eine Stanze zerstört und das Rückenmark sondiert. Ventral wurden Haut- und Muskelschichten durchtrennt. Die dorsal liegenden Lungen wurden am distalen Ende mit einer Pinzette gefasst und vorsichtig von umgebendem Fettgewebe freigelegt. Die bindegewebigen Verwachsungsstellen zwischen Lungen und Körperwand sowie Leber wurden durchtrennt. Nach einem Schnitt zwischen Trachea und Bronchien konnte die Lunge entnommen werden. Anhaftende Blutreste wurden mit Normal-Ringerlösung (NRS, siehe **Tab. II-6**) abgespült, und die Lunge wurde in eine Wachsschale überführt. Zur Eröffnung des Organs führte man einen Scherenschenkel in den Bronchus ein. Anschließend wurde die Lunge von proximal nach distal aufgeschnitten und mittels Präpariernadeln aufgespannt, so dass sich ein flächiges Präparat ergab (**Abb. II-1**). Durch Aufsetzen von benadelten Kunststoffringen wurde das Präparat in der gespannten Form gehalten und konnte so in die Ussing-Kammer eingesetzt werden.

Aus einer Lunge erhielt man stets zwei Präparate: ein proximales, nahe der Trachea, sowie ein distales, welches die Lungenspitze umfasste. In den einzelnen Messreihen wurden sowohl Präparate mit distaler als auch mit proximaler Orientierung unterschiedlicher Donoren verwendet.

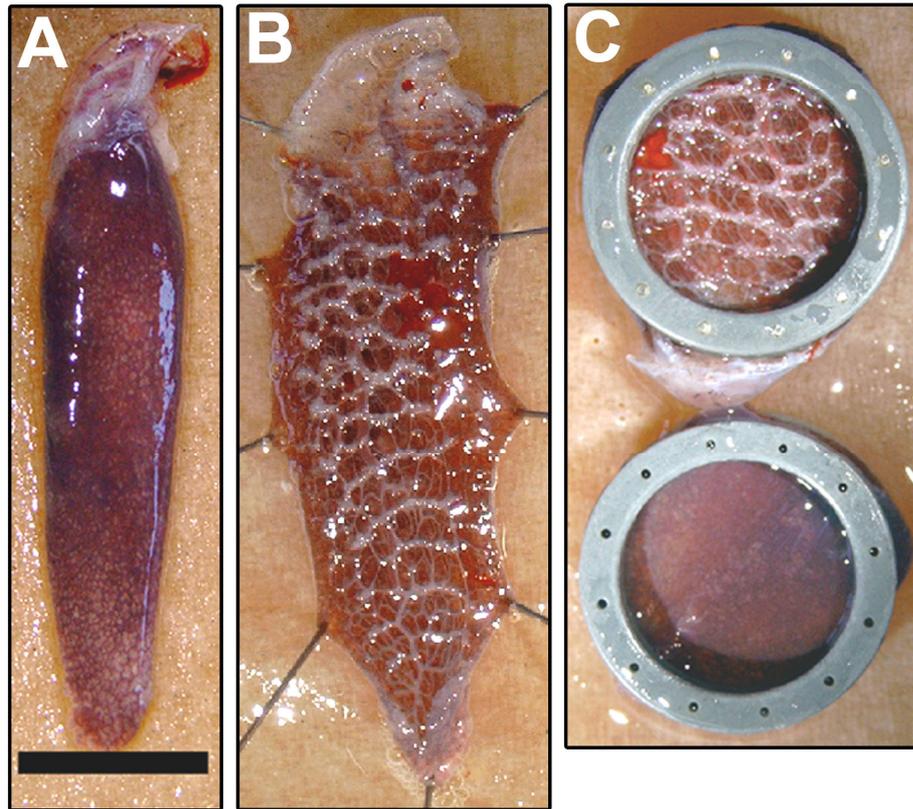


Abb. II-1: Lunge von *Xenopus laevis*.

(A) geschlossener und (B) eröffneter Zustand. (C) Aus einer Lunge konnten durch Aufspannen auf Plastikringe zwei Ussing-Kammer-Präparate erhalten werden. Das obere Präparat zeigt die apikale Seite, deren Oberfläche durch Septierung vergrößert ist. Im unteren Präparat ist die basolaterale Seite der Lunge zu erkennen. Maßstab (schwarzer Balken): 1 cm.

II.1.3 Entnahme und Vereinzeln der Oocyten

Neben Ussing-Kammer-Messungen wurden auch Experimente an heterolog exprimierten epithelialen Na^+ Kanälen (ENaC) durchgeführt. Die Expression der Membranproteine erfolgte in Oocyten von *Xenopus laevis*. Zur Entnahme der Zellen wurden ausschließlich tote Tiere herangezogen, deren Lungen für Ussing-Kammer-Versuche verwendet wurden.

Das Abdomen der Tiere wurde ventral eröffnet, so dass die Ovarien zugänglich waren. Teile der Ovarien wurden entnommen und in Oocyten-Ringerlösung (ORi, siehe **Tab. II-5**) aufbewahrt. Um die Oocyten von anhaftendem Bindegewebe und Follikelzellen zu befreien, wurden die Ovariallappen mittels Pinzetten in kleinere Stücke zerteilt und anschließend für 90 min in einer Kollagenaselösung (1,5 mg/ml) auf einem Schüttler² bewegt. Danach wurde mit ORi gewaschen. Es schloss sich eine zehnmünütige Inkubation in Ca^{2+} -freiem ORi an. Nach erneutem Waschen in ORi wurden vereinzelt Oocyten der Stadien V und VI (Dumont 1972) aussortiert. Diese Zellen besaßen einen Durchmesser von circa 1,0 bis 1,3 mm und

² Die verwendeten Geräte und Chemikalien sowie deren Bezugsquellen sind im Anhang aufgelistet.

waren optisch deutlich in einen dunklen vegetativen und einen hellen animalen Pol unterteilt. Es wurden lediglich solche Zellen verwendet, die eine gleichmäßige Pigmentierung des animalen Pols aufwiesen.

Bei einigen Oocyten konnte auch durch die oben beschriebene Behandlung keine Defollikulation erzielt werden. In diesen Fällen wurde die Follikelzellschicht mechanisch mittels Pinzetten von der Oocyte entfernt, was unter Zuhilfenahme eines Binokulars kontrolliert werden konnte.

II.2 Molekularbiologische Methoden

II.2.1 RT-PCR zur Detektion von mRNA in Lungen von *Xenopus laevis* sowie in humanen Zelllinien

Mittels RT-PCR wurde die Expression verschiedener Ionenkanäle in der Lunge von *Xenopus laevis* untersucht. Dazu wurde zunächst Gesamt-RNA aus kompletten Lungen der Tiere isoliert.

Extraktion von Gesamt-RNA

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus Lungen von *Xenopus laevis* erfolgte mittels des *RNeasy Midi Kits* von *QIAGEN*. Nach Dekapitierung wurden die Lungen entnommen und unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung bis zur RNA-Präparation (maximal 10 Tage) erfolgte ebenfalls in flüssigem Stickstoff.

Zunächst wurden die schockgefrorenen Lungen in flüssigem Stickstoff fein zermörsert. Anschließend wurden 100 mg des Gewebes mit 4 ml Puffer *RLT* versetzt, kurz gevortext und durch zehnmaliges Aufziehen und Ablassen durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,8 mm homogenisiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 3000 g wurde der Überstand abgenommen und mit 4 ml 70 % Ethanol versetzt und gevortext. Diese Lösung wurde durch die mitgelieferte Säule zentrifugiert (3000 g, 5 min). Das Zentrifugat wurde verworfen. Nach einem Waschschriff mit 2 ml des Puffers *RWI* und anschließender Zentrifugation (5 min, 3000 g), wurde die Säule für 15 min mit RNase-freier DNase I inkubiert (55 Units), um eventuell vorhandene Kontaminationen mit genomischer DNA zu entfernen. Die Säule wurde dann mit 2 ml Puffer *RWI* und zweimal mit je 2,5 ml Puffer *RPE* gewaschen, wobei nach jedem Waschschriff für 5 min bei 3000 g zentrifugiert wurde. Letztlich wurde die Gesamt-RNA durch Zugabe von 150 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Das Zentrifugat wurde noch einmal durch die Säule zentrifugiert, um die Konzentration der Gesamt-RNA zu erhöhen.

Es schloss sich eine photometrische Konzentrationsbestimmung der erhaltenen RNA an. Die RNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

Reverse Transkription

Die isolierte Gesamt-RNA wurde durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das *Omniscript* System von *QIAGEN* mit Oligo-(dT)₁₅ *Primern* verwendet. Es wurden folgende Komponenten pipettiert:

10x Puffer RT:	2 μl
5 mM dNTP-Mix:	2 μl
10 μM Oligo(dT) ₁₅ - <i>Primer</i> :	2 μl
RNase-Inhibitor (10 U/ μl):	1 μl
Reverse Transkriptase (4 U/ μl):	1 μl
Gesamt-RNA:	2 μg (1-2 μl)

Der Ansatz wurde mit RNase freiem Wasser auf 20 μl aufgefüllt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die entstandene cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

PCR

Die sich anschließende PCR wurde mit dem *GoTAQ*-System (*PROMEGA*) durchgeführt. Für einen 50 μl Ansatz wurden folgende Komponenten vereinigt:

5x GoTAQ-Puffer:	10 μl
10 mM dNTP-Mix :	1 μl
25 mM MgCl ₂ :	4 μl
<i>Primer</i> _{For} (100 μM):	1 μl
<i>Primer</i> _{Rev} (100 μM):	1 μl
cDNA aus Reverser Transkription:	2 μl
GoTaq DNA-Polymerase (5 U/ μl):	0,5 μl
ddH ₂ O:	30,5 μl

Die eingesetzten *Primer* sind im Anhang in **Tab. IX-1** aufgeführt.

Die *Primer*-Auswahl erfolgte mit dem Programm *Primer3* (Rozen & Skaletsky 2000). Die Mehrzahl der Oligonukleotide waren dabei gegen die in der Datenbank *ensembl* (<http://www.ensembl.org>, Version 38) verfügbaren Gensequenzen von *Xenopus tropicalis*

gerichtet. Ausnahmen bildeten die *Primer* gegen den epithelialen Na⁺-Kanal (ENaC, GenBank-Nummer U23535.1) und den *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR, GenBank-Nummer X65256), die anhand der NCBI Genbank Einträge von *Xenopus laevis* entworfen wurden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Alle *Primer* waren gegen proteinkodierende Sequenzen nahe des 3'-Endes gerichtet und umfassten einen Bereich von mindestens zwei putativen Exonen. Auf diese Weise konnte über die erhaltene Amplicongröße auf eine eventuelle Verunreinigung der Probe mit genomischer DNA zurückgeschlossen werden.

Die PCR wurde in einem *Thermocycler* nach folgendem Protokoll durchgeführt (**Abb. II-2**):

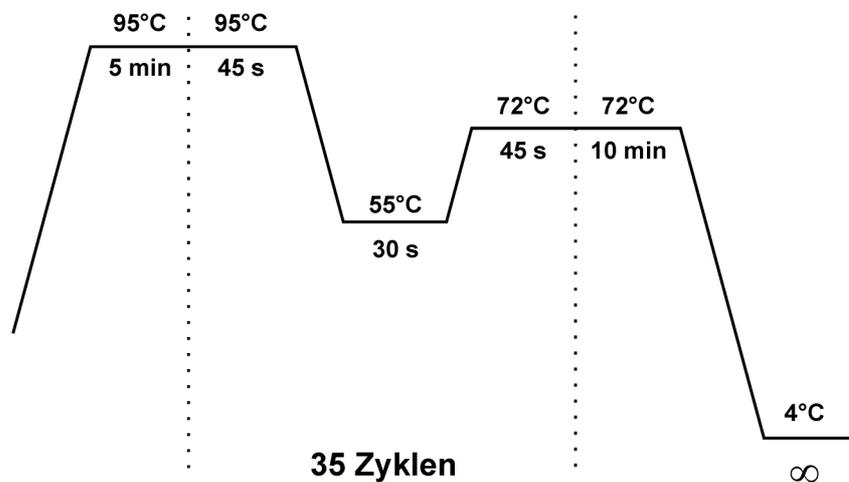


Abb. II-2: Zeit-Temperaturschema der PCR zur Detektion Ionenkanal-kodierender mRNA in *Xenopus* Lungen.

Der mRNA-Nachweis mittels RT-PCR wurde an Lungen von mindestens drei unterschiedlichen Donoren durchgeführt.

Analytische Agarosegelelektrophorese

Zur Visualisierung der Banden wurden 35 µl des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel (1,5 - 2,5 %, 1x TAE) aufgetragen und bei 10 V/cm Elektrodenabstand für 50 min aufgetrennt. Ein Längenstandard (100 bp oder 1 kb Leiter) wurde stets mitgeführt.

Sequenzierung

Die erhaltenen Banden wurden ausgeschnitten und entweder einer direkten Sequenzierung durch *QIAGEN Sequencing Services* (Hilden) zugeführt oder wie in Abschnitt 0 beschrieben aufgereinigt, in den Klonierungsvektor pGEMT-Easy (*PROMEGA*) ligiert und in *E. coli* Zellen

(*E. coli* K12 JM109) transformiert. Nach einer Plasmid-Präparation wurde die Plasmid-DNA sequenziert (ebenfalls durch *QIAGEN Genomic Services*).

RT-PCR mit humanen Zelllinien

Mit den humanen Lungenzelllinien H441 und A549 wurden ebenfalls RT-PCR Reaktionen durchgeführt. Die RNA-Extraktion, Reverse Transkription und PCR folgten dem bereits dargestellten Protokoll für *Xenopus laevis* Lungen. Die verwendeten *Primer* sind im Anhang in **Tab. IX-2** aufgeführt.

Die humanen Zellen wurden freundlicherweise von Mike Althaus (Institut für Tierphysiologie) bereitgestellt. H441 Zellen entstammten der 69. Passage und waren zu circa 80 % konfluent gewachsen. Sie wurden mittels Trypsin/EGTA gesplittet und wurden für 7 Tage in RPMI + L-Glutamin Medium kultiviert, dem Dexamethason (200 nM), ITS (5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Transferin, 5 ng/ml Natriumselenit), 10 % fetales Kälberserum sowie 1 % Antibiotika/Antimykotika-Mix und 1 % Natriumpyruvat zugesetzt waren.

A549 Zellen entstammten der 95. Passage und wurden 2 Tage kultiviert. Als Medium diente DMEM/F-12 + GlutaMax mit 10 % fetalem Kälberserum und 25 mM HEPES.

Die RNA-Extraktion erfolgte jeweils aus circa $0,5 \times 10^8$ Zellen.

II.2.2 Klonierung des humanen epithelialen Na⁺-Kanals

Die drei Untereinheiten α , β und γ des humanen epithelialen Na⁺-Kanals (hENaC) wurden aus RNA der Lunge kloniert und in *Xenopus laevis* Oocyten exprimiert, um den Einfluss mechanischer Scherkräfte auf die Kanäle untersuchen zu können.

Reverse Transkription

Als Ausgangsmaterial zur Klonierung der kompletten Protein-kodierenden Sequenz des hENaC wurde Gesamt-RNA der adulten humanen Lunge verwendet, die freundlicherweise von der Medizinischen Klinik II der Justus-Liebig-Universität zur Verfügung gestellt wurde.

Zunächst wurden 2 µg der Gesamt-RNA mittels des *M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus Point Mutant Kits (PROMEGA)* in die entsprechende cDNA überführt. Dazu wurde die RNA zusammen mit 10 µM der genspezifischen *Primer* (siehe **Tab. IX-3** im Anhang) mit ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt und für 5 min bei 70°C inkubiert, um etwaige Sekundärstrukturen aufzubrechen. Nach 5 minütiger Lagerung auf Eis wurden folgende Komponenten hinzupipettiert:

5x M-MLV Reaktionspuffer:	5 μ l
10 mM dNTP-Mix:	1,25 μ l
RNase-Inhibitor (10 U/ μ l):	1 μ l
Reverse Transkriptase (200 U/ μ l):	1 μ l
Gesamt-RNA:	2 μ g (1-2 μ l)

Der Ansatz wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 25 μ l aufgefüllt und für 60 min bei 42°C inkubiert. Letztlich wurde die Reverse Transkriptase durch 15 minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert.

PCR

Es schloss sich eine PCR mit den genspezifischen *Primern* aus **Tab. IX-3** an. Dazu wurde das *Platinum Pfx DNA Polymerase Kit (INVITROGEN)* verwendet. Pro Ansatz wurden folgende Komponenten vereinigt:

10x Pfx Amplifikationspuffer:	5 μ l
10 mM dNTP-Mix :	1,5 μ l
50 mM MgSO ₄ :	1 μ l
<i>Primer_{For}</i> (100 μ M):	1,5 μ l
<i>Primer_{Rev}</i> (100 μ M):	1,5 μ l
cDNA aus Reverser Transkription:	1,5 μ l
Platinum Pfx Polymerase (2,5 U/ μ l):	0,8 μ l

Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf 50 μ l aufgefüllt und nach folgendem Schema amplifiziert (**Abb. II-3**).

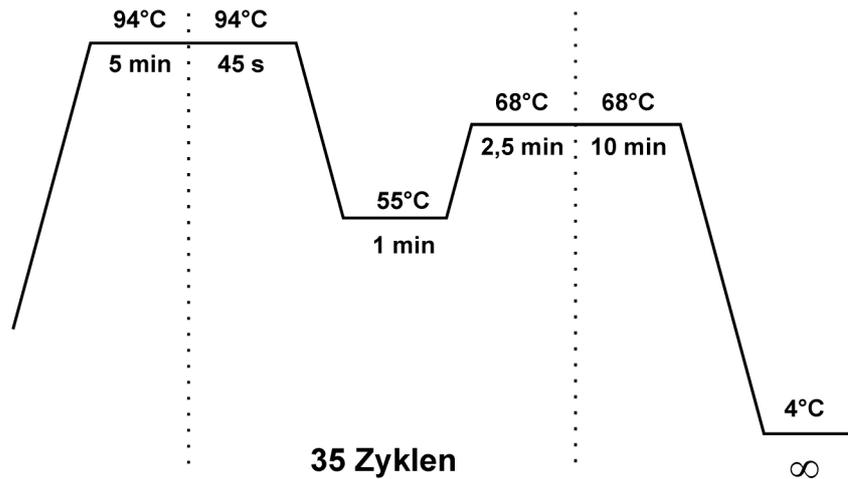


Abb. II-3: Zeit-Temperaturschema zur Amplifikation der kodierenden Sequenz der drei ENaC-Untereinheiten α , β und γ .

Präparative Agarosegelelektrophorese

Das PCR-Produkt wurde durch Elektrophorese auf einem 1 % Agarosegel (1x TAE Puffer) bei einer Spannung von 10 V/cm Elektrodenabstand für 50 min aufgetrennt.

Zur Visualisierung wurden dem Gel 5 μ l / 100 ml Ethidiumbromid-Lösung (10 μ g/ml) zugesetzt. Das Amplifikationsprodukt wurde mittels eines Transilluminators sichtbar gemacht. Die erhaltene Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einem zuvor gewogenen Reaktionsgefäß aufgenommen.

Gel-Extraktion

Das Amplicon wurde mittels des *MinElute Kits* (QIAGEN) aus dem Agarosegel isoliert. Dazu wurde das Gelstück mit der dreifachen Menge des Puffers *QG* versetzt. Nach Zugabe der Pufferlösung wurde bei 55°C inkubiert, bis das Gelstück vollständig gelöst war (circa 25 min). Auf die vom Hersteller empfohlene Zugabe von Isopropanol wurde verzichtet. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 min bei 10 000 g über eine *MinElute* Säule zentrifugiert. Nach erneuter Zugabe von 500 μ l des Puffers *QG* und Zentrifugation (10 000 g, 1 min) wurde die Säule mit 750 μ l des Puffers *PE* gewaschen und wiederum zentrifugiert. Nach erneutem Waschen wurde die Säule durch Zentrifugation getrocknet (10 000 g, 1 min). Die DNA wurde mit 50 μ l ddH₂O von der Säule gewaschen. Letztlich wurde dieses Volumen durch Eindampfen bei 60°C auf einem Schüttler auf 15 μ l eingengt.

A-Addition

Bei der Amplifizierung mit der *Pfx* DNA-Polymerase entsteht ein *blunt-end* Produkt. Die TA-Klonierung mit dem *pGEM-T-Easy* Vektor (*PROMEGA*) macht daher die nachträgliche A-Addition erforderlich. Dazu wurde das *A-Addition* Kit von *QIAGEN* benutzt. Es wurden 8 μl des gereinigten Amplicons mit 2 μl 5x A-Addition Master Mix versetzt und 2 *Units* Taq-Polymerase (*PROMEGA*) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde dann für 30 min bei 37°C inkubiert.

Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter Bakterien für die sich anschließende Plasmidtransformation erfolgte nach der Methode von Hanahan (Sambrook & Russell 2001). Dazu wurden zunächst Zellen des *Escherichia coli* Stammes K12 DH5 α in LB-Medium (Luria Broth) bei 37°C angezogen. Anschließend wurde 1 ml dieser Kultur in 100 ml SOB-Medium, welches 20 mM MgSO₄ enthielt, aufgenommen und bei 37°C und 250 rpm solange inkubiert, bis eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,35 erreicht war. Dann wurde der Ansatz in 50 ml Aliquots aufgeteilt und 10 min auf Eis gelagert. Nach zehnminütiger Zentrifugation mit 2700 g bei 4°C wurde das Medium dekantiert. Das Pellet wurde in 20 ml eiskaltem *frozen storage buffer* (FSB) resuspendiert und 10 min auf Eis gelagert. Nach erneuter Zentrifugation mit 2700 g bei 4°C wurde das FSB-Medium dekantiert und das Zellpellet in 4 ml frischem FSB resuspendiert. Der Ansatz wurde mit 140 μl DMSO versetzt. Nach 15 minütiger Lagerung auf Eis wurden noch einmal 140 μl DMSO hinzugefügt. Die Proben wurden in 500 μl Ansätzen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Ligation und Transformation

Das A-Additionsprodukt wurde nach den Herstellervorgaben mittels des *pGEM-T Easy Vector Kits* (*PROMEGA*) ligiert (**Abb. II-4**). Es wurden folgende Komponenten vereinigt:

2x Rapid Ligation Buffer:	5 μl
pGEM-T Easy Vektor (50 ng):	1 μl
A-Additionsprodukt:	3 μl
T4 DNA Ligase (3 U/ μl):	1 μl

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend in Zellen des *E. coli* Stamms K12 DH5 α transformiert. Dazu wurden 2 μl des Ligationsprodukts in 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und auf Eis gekühlt. Die bei -70°C gelagerten kompetenten Bakterien wurden aufgetaut. Unverzöglich nach dem Tauen wurden 50 μl der Bakteriensuspension vorsichtig mit dem Ligationsprodukt vermischt und für 20 min auf Eis

gelagert. Es folgte eine Hitzeschockbehandlung bei 42°C für 45 s. Der Reaktionsansatz wurde dann unverzüglich in Eiswasser abgekühlt und für weitere 2 min inkubiert. Dann wurden 950 µl LB Medium (Raumtemperatur) hinzugegeben. Nach 90 minütiger Inkubation bei 37°C wurden 100 µl der Suspension auf Agarplatten ausplattiert. Dazu wurden 12,5 g LB und 7,5 g Agar in 500 ml H₂O gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen auf circa 50°C wurden 50 µg/ml Ampicillin (aus einer Stammlösung von 50 mg/ml Ampicillin in H₂O) zugefügt. Um eine Blau-Weiß-Selektion durchführen zu können, wurden die Platten unmittelbar vor Gebrauch mit IPTG (50 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml) versetzt. Die Agarplatten wurden bei 37°C für 14 - 20 h inkubiert.

Falls die Transformationseffizienz nicht ausreichend war, wurde in einem weiteren Ansatz die verbleibende Suspension für 10 min bei 7000 g zentrifugiert. 800 µl des Überstandes wurden verworfen. Das Pellet wurde in der verbleibenden Lösung resuspendiert und auf eine weitere Agar-Platte ausgestrichen.

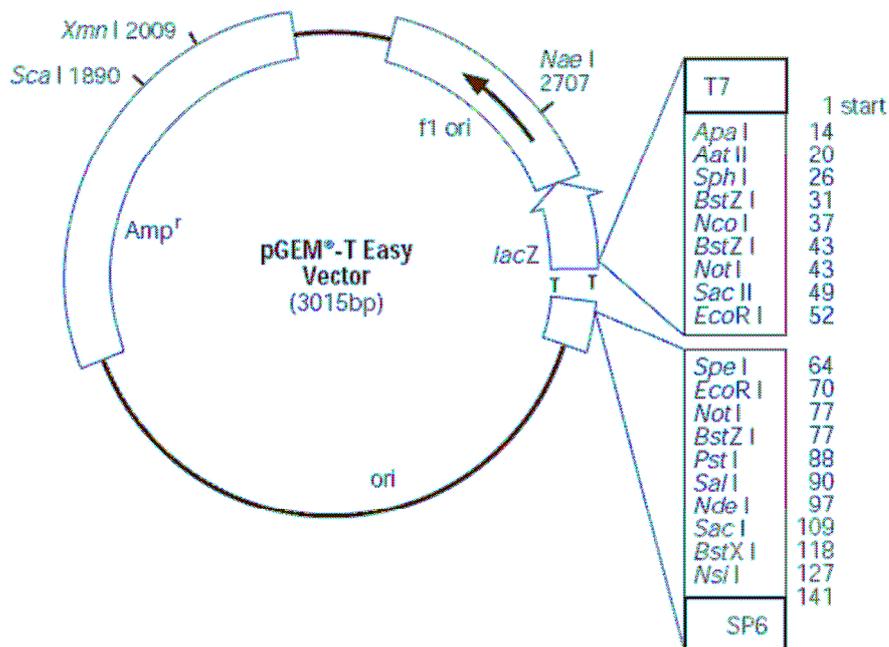


Abb. II-4: Plasmidkarte des TA-Klonierungsvektors pGEM-T Easy von PROMEGA.

Übernachtskultur und Plasmid-Präparation (Miniprep)

Klone, welche nach der Blau-Weiß-Selektion positiv ausfielen, wurden mit einer Pipettenspitze aufgenommen und über Nacht bei 37°C in Ampicillin-haltigem (50 µg/ml) LB-Medium angereichert. 1 ml der Übernachtskultur wurde mit 200 µl Glycerin versetzt und bei -

70°C gelagert (Glycerol-Stock). Die restliche Übernachtskultur wurde für 10 min bei 6500 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es schloss sich eine Plasmid-Präparation mit dem *Miniprep-Kit* (*QIAGEN*) an. Das Pellet wurde dazu in 250 µl des Puffers *P1* resuspendiert und mit 250 µl des Puffers *P2* versetzt. Nach Zugabe von 350 µl des Puffers *P3* wurde das Reaktionsgemisch vorsichtig geschüttelt und für 10 min bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Reinigungssäule dekantiert und für eine weitere Minute zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 500 µl des Puffers *PB* und erneuter Zentrifugation wurden 750 µl des Puffers *PE* hinzugegeben. Es schloss sich eine 1 minütige Zentrifugation zur Trocknung der Säule an, bevor die gebundene DNA letztlich mit 50 µl ddH₂O von der Säule gewaschen wurde.

Restriktionsverdau

Mit den isolierten Plasmiden wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dazu wurden die in der Plasmid-Präparation erhaltenen 50 µl mit 10 µl 10x Puffer, 7,5 µl Restriktionsenzym und 32,5 µl ddH₂O versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die α- und γ-ENaC tragenden Plasmide wurden mit EcoRI (12 U/µl) verdaut, die β-ENaC-tragenden Plasmide wurden mit NotI (10 U/µl) geschnitten.

Als Vektor für die Expression in *Xenopus* Oocyten diente *pTNT* (*PROMEGA*) (**Abb. II-5**). Dieses Plasmid ist aufgrund seiner 5'β-Globin-Sequenz sowie des integrierten Poly(A)-Schwanzes in speziellem Maße zur Oocyten-Expression geeignet (Jespersen *et al.* 2002). Der Vektor wurde mit EcoRI (für α- und γ-ENaC) bzw. NotI (für β-ENaC) geschnitten. Zur Unterdrückung der Selbstligation wurden die 5'-Enden des Vektors anschließend dephosphoryliert. Dazu wurde das geschnittene Plasmid für 60 min bei 37°C mit 1 µl alkalischer Phosphatase (1 U/µl) inkubiert.

Anschließend wurde der Restriktionsverdau auf ein 1 % Agarosegel (1x TAE) aufgetragen und bei 10 V/cm Elektrodenabstand für circa 50 min aufgetrennt. Die Banden der entsprechenden Größe (für die ENaC-Amplicons ~ 2 kb, für pTNT ~ 2,9 kb) wurden ausgeschnitten und die DNA mittels des *MinElute Kits* (*QIAGEN*) (siehe Seite 16) aufgereinigt.

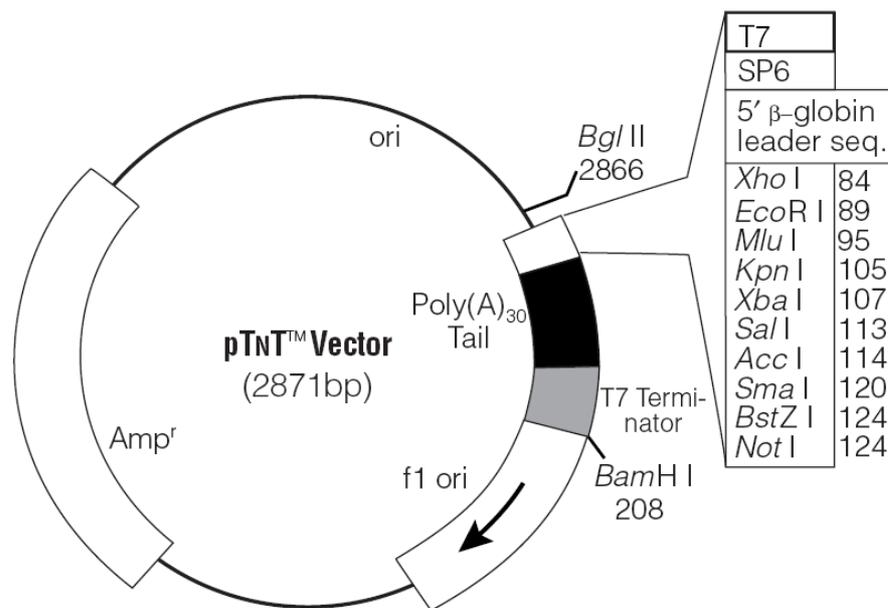


Abb. II-5: Plasmidkarte des Oocytenexpressionsvektors pTNT (PROMEGA). Zur Erhöhung der mRNA-Stabilität sowie der Translationseffizienz besitzt der Vektor eine 5'β-Globin-Sequenz sowie einen Poly(A)-Schwanz.

Ligation und Retransformation

Das Amplicon sowie der geschnittene, dephosphorylierte Vektor wurden wie oben beschrieben über Nacht ligiert. Abschließend wurde das Ligationsprodukt nach oben beschriebenem Protokoll in DH5α-Zellen transformiert und auf Ampicillin-Platten (50 µg/ml) ausgebracht. Da eine Blau-Weiß-Selektion aufgrund des Fehlens des LacZ-Gens in *pTNT* nicht möglich war, wurde auf die Zugabe von IPTG und X-Gal verzichtet. Nach Inkubation für 18 Stunden bei 37°C wurden einzelne Kolonien gepickt und damit eine Übernachtskultur angeimpft. Abschließend wurde eine Plasmid-Präparation durchgeführt.

Colony-PCR

Um bereits vor Durchführung der Plasmid-Präparation Aufschluss über den Klonierungserfolg zu erhalten, bediente man sich der Colony-PCR. Dazu wurde eine Einzelkolonie einer über Nacht inkubierten Agar-Platte gepickt und in 50 µl ddH₂O überführt. Nach dem Vortexen wurden 25 µl abgenommen und in 200 µl LB-Ampicillinmedium überführt. Dieser Ansatz diente zum Animpfen einer Übernachtskultur. Die verbleibenden 25 µl wurden für 5 min auf 100°C erhitzt und anschließend für 1 min bei 10 000 g

zentrifugiert. 10 μ l des Überstandes wurden als Template in der PCR (Bedingungen siehe Seite 15, Reaktionsvolumen: 25 μ l) eingesetzt.

Doppelverdau des Klonierungsproduktes

Die Orientierung des Amplicons im Expressionsvektor wurde durch einen Restriktionsverdau überprüft. Dazu wurden circa 0,25 μ g des aus der Miniprep erhaltenen Plasmids einem Doppelverdau unterzogen. Die α - und γ -Untereinheit wurden mit BamHI und SacI geschnitten, die β -Untereinheit mit BamHI und HindIII verdaut:

10x Puffer E:	2 μ l
BamHI (10 U/ μ l):	0,5 μ l
SacI bzw. HindIII (10 U/ μ l):	0,5 μ l
Plasmid:	0,25 μ g
100x BSA:	0,2 μ l

Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf 20 μ l aufgefüllt und über Nacht bei 37°C verdaut. Nach Auftrennung der Restriktionsprodukte auf einem 1 % Agarosegel (1 x TAE, 10 V/cm Elektrodenabstand, 50 min) wurde über den Klonierungserfolg entschieden und die entsprechenden Plasmide zur Sequenzierung (*QIAGEN Genomic Services*, Hilden) eingeschickt. Die Sequenzier-*Primer* sind im Anhang in **Tab. IX-4** aufgeführt.

II.2.3 *In vitro* Transkription und Expression in *Xenopus laevis* Oocyten

Zur elektrophysiologischen Untersuchung des hENaC wurde das Klonierungsprodukt in Oocyten von *Xenopus laevis* heterolog exprimiert. Dies machte es notwendig, die hENaC-kodierende Plasmid-DNA mittels *in vitro* Transkription in cRNA umzuschreiben. Das Expressionsplasmid verfügte dazu über einen viralen Promotor (T7 oder SP6), der als Startpunkt für eine DNA abhängige RNA-Polymerase diente. Um die Transkription hinter dem Poly(A)-Schwanz zu beenden, war es notwendig, das Plasmid an dieser Stelle mit einem Restriktionsenzym zu schneiden und damit zu linearisieren. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die entstehenden Transkripte lediglich den kompletten Proteinkodierenden Leserahmen sowie die Poly(A)-Sequenz enthielten. Zur Linearisierung wurden folgende Komponenten vereinigt:

10 x Reaktionspuffer:	5 μ l
Plasmid-DNA:	5 μ g
BamHI (10 U/ μ l):	2 μ l
100x BSA:	0,5 μ l

Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf 50 μ l aufgefüllt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1 μ l Proteinkinase K (1 μ g/ μ l) hinzugeben. Der Ansatz wurde durch Phenolisieren gereinigt. Dazu wurde zunächst mit ddH₂O auf 100 μ l aufgefüllt und dann ein äquivalenter Volumenteil Phenol/Chloroform zugegeben, für 30 s gevortext und anschließend bei 13 000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut phenolisiert. Durch Zugabe von 10 μ l eisgekühlter 3 M Na⁺-Acetatlösung sowie von 250 μ l eisgekühltem 100 % Ethanol wurde die DNA über Nacht bei -20°C ausgefällt. Danach wurde für 15 min bei 13 000 g zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstands wurde das Pellet mit 500 μ l eisgekühltem 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 15 min bei 13 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet im Exsikkator getrocknet und letztlich in 5,5 μ l TE für 30 min gelöst. Eine Menge von 0,5 μ l dieser Lösung diente zur Linearisierungskontrolle auf einem 1 % Agarosegel (1 x TAE, 10 V/cm Elektrodenabstand, 50 min).

Die restlichen 5 μ l wurden mit ddH₂O auf 42,5 μ l aufgefüllt und der folgende *in vitro* Transkriptionsansatz gemäß dem Herstellerprotokoll (*RiboMax*, *PROMEGA*) erstellt:

5x Transkriptionpuffer:	20	μ l
rATP, rUTP,CTP (25mM), rGTP (3mM):	20	μ l
DNA-Template (5-10 μ g in H ₂ O):	42,5	μ l
CAP-Analog (40 mM):	7,5	μ l
EnzymeMix (SP6-Polymerase):	10	μ l

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von RQ1 DNase (1 U/ μ g Template) und Inkubation für 15 min bei 37°C die Plasmid-DNA abgedaut. Das Gemisch wurde wie bereits beschrieben durch Phenolisieren gereinigt. Es schloss sich ein weiterer Reinigungsschritt an, in dem nicht eingebaute Nukleotide über eine Filtersäule (*QuickSpin Columns* mit einer Ausschlussgröße < 20 Basen, *ROCHE*) entfernt wurden. Abschließend wurde die RNA präzipitiert und in 6 μ l DEPC-H₂O

aufgenommen. Davon wurden 0,5 µl auf einem 1 % Agarosegel aufgetragen und weitere 0,5 µl wurden zur photometrischen RNA-Konzentrationsbestimmung herangezogen.

Die heterologe Expression erfolgte in *Xenopus laevis* Oocyten, die wie in Abschnitt II.1.3 (Seite 10) beschrieben, zunächst vereinzelt wurden. Es wurden circa 5 ng pro Untereinheit der *in vitro* transkribierten cRNA mittels einer Mikroinjektionspumpe in die Zellen injiziert. Dazu wurden auf einem Vertikal-Puller Glaskapillaren ausgezogen und diese luftblasenfrei mit Mineralöl befüllt. Die Kapillare wurde auf die Mikroinjektionspumpe aufgeschoben und arretiert. Die zugeschmolzene Kapillarenspitze wurde durch Abbrechen unter Verwendung einer Pinzette geöffnet. Ein Aliquot der cRNA wurde unter Mineralöl pipettiert und anschließend in die Mikrokapillare aufgenommen. Letztlich wurden Oocyten der Stadien V und VI (Dumont 1972) punktiert und cRNA-Volumina von 9,2 bis 41,4 nl injiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, denen lediglich das RNA-Lösungsmittel (DEPC-H₂O) injiziert wurde. Die Oocyten wurden in NMDG-Kultur-Oocytenringer bei 14°C aufbewahrt und innerhalb von sieben Tagen gemessen.

II.3 Immunhistologie

An Gefrierschnitten von *Xenopus laevis* Lungen wurden immunhistologische Färbungen durchgeführt, um die Lokalisation verschiedener, durch RT-PCR nachgewiesener Membranproteine zu untersuchen. Die Lungen weiblicher Krallenfrösche wurden dazu aus dem Abdomen herauspräpariert. Die Lungensäcke wurden aufgebläht, indem man eine 1:2 Mischung von *Tissue Tek* mit PBS (*phosphate buffered solution*) in das Lungenlumen injizierte und anschließend den Bronchus mit einer Ligatur verschloss. Das so behandelte Präparat wurde in *Tissue Tek* eingebettet und in Isopentan, welches mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, schockgefroren. Auf einem Kryostat wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen. Das Gewebe wurde mit einem der in **Tab. II-1** dargestellten Agenzien für 10 min fixiert und anschließend für 1 h bei Raumtempertur getrocknet.

Eine Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen erfolgte durch eine einstündige Inkubation mit Pferdeserum (1:2 mit PBS+S verdünnt) bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des Serums wurden die Proben über Nacht bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe **Tab. II-1**) inkubiert.

Tab. II-1: Primärantikörper zur immunhistologischen Detektion der Ionenkanäle TRPC1 und CFTR in der *Xenopus* Lunge.

Antigen	Antigen	Wirtsspezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Fixierung
CFTR	Human (AS 1-182)	Kaninchen	1:100	Santa Cruz	Methanol 4°C
TRPC1	Human (AS 557-571)	Kaninchen	1:100	Alomone Labs	Isopropanol 4°C

AS: Aminosäure.

Nachdem die Proben zweimal für je 10 min mit PBS gewaschen wurden, erfolgte eine Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (siehe **Tab. II-2**) für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurde wiederum zweimal für je 10 min mit PBS gewaschen. Es schloss sich eine Nachfixierung durch zehnmütige Inkubation mit 4 % para-Formaldehyd an. Nach einem erneuten Waschschrift (zweimal 10 min PBS) wurden die Schnitte in Glycerin eingedeckelt und bis zur Auswertung am Mikroskop bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die Immunfluoreszenz-Experimente wurden an mindestens drei Lungen verschiedener Donoren durchgeführt.

Tab. II-2: Sekundärantikörper zur immunhistologischen Detektion verschiedener Ionenkanäle in der *Xenopus* Lunge.

Reaktivität gegen	Wirtsspezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Fluorophor
Kaninchen	Esel	1:1000	Chemicon	Cy3
Ziege	Maus	1:400	Sigma Aldrich	FITC

II.4 Elektrophysiologische Methoden

Um den Einfluss mechanischer Kräfte auf pulmonale Epithelien und heterolog exprimierte Transportproteine funktionell untersuchen zu können, wurden elektrophysiologische Messungen mit der Ussing-Kammer sowie der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme und der *Patch Clamp* Technik durchgeführt.

II.4.1 Messprinzip *voltage clamp* und *current clamp*

In der vorliegenden Arbeit wurden Ionentransportprozesse mittels der *voltage clamp* (= Spannungsklemme) sowie der *current clamp* (= Stromklemme) Messmethode studiert.

Das Messprinzip der Spannungsklemme geht zurück auf die Untersuchungen von Hodgkin, Huxley und Katz am Axon des Tintenfischs (Hodgkin *et al.* 1952). Bei der Spannungsklemme wird ein Potenzial, welches sich durch Transportvorgänge über einer Membran oder einem Gewebe ausbildet, durch Anlegen eines äußeren Stromflusses auf einen festen Wert eingestellt und konstant gehalten. Das eingestellte Potenzial bezeichnet man dann als Klemmspannung oder Kommandospannung (U_K). Über eine Messeinrichtung wird das tatsächliche transepitheliale bzw. transmembrane Potenzial (U_M) ständig mit dem eingestellten Klemmpotenzial verglichen. Weichen beide Werte voneinander ab, so wird ein Kompensationsstrom appliziert, der das transepitheliale bzw. transmembrane Potenzial dem eingestellten Sollwert angleicht. Der Strom, der verabreicht werden muss, um die vorgegebene Spannung zu erzielen, entspricht dem Betrag nach demjenigen Strom, der durch den Ionentransport des zu untersuchenden Gewebes oder der Zelle hervorgerufen wurde. Bei Ussing-Kammer-Messungen wird in der Regel eine Klemmspannung von 0 V angelegt, um elektrische Triebkräfte zwischen beiden Kammerhälften zu verhindern. Da eine Potentialdifferenz von 0 V einem Kurzschluss über dem Gewebe entspricht, wird der resultierende Strom auch als Kurzschlussstrom (*short circuit current*, I_{SC}) bezeichnet. Für die durchgeführten Zwei-Elektroden-*Voltage-Clamp* Messungen an Oocyten (siehe Abschnitt II.4.3, Seite 29) wurde eine Klemmspannung von -60 mV angelegt. *Patch Clamp* Messungen in der *outside out* Konfiguration (siehe Abschnitt II.4.4, Seite 32) erfolgten bei -100 mV.

Im Gegensatz zur Spannungsklemme wird im *current clamp* Modus der Strom konstant gehalten und das transepitheliale Potenzial als variable Größe erfasst.

Beiden Messmethoden gemein ist die Möglichkeit der Berechnung des Widerstands. Über das Ohm'sche Gesetz (Gl. II-1) werden Spannung und Strom ins Verhältnis gesetzt und somit kann auf den Widerstand des Systems zurückgeschlossen werden.

$$\text{Gl. II-1:} \quad R = \frac{U}{I}$$

R: Widerstand [Ω]

U: Potenzial [V]

I: Strom [A]

II.4.2 Modifizierte Ussing-Kammer

Die wie in Abschnitt II.1.2 (Seite 9) beschrieben präparierten Gewebe wurden zur Messung in eine modifizierte Ussing-Kammer überführt (**Abb. II-6**). Diese war aus Plexiglas gefertigt und bestand aus einem apikalen und einem basolateralen Kompartiment, welches jeweils über einen Zu- und Ablauf verfügte. Somit war es möglich, während der Messung die Zusammensetzung der perfundierten Lösungen zu verändern. Die Perfusionslösungen wurden mit einer Flußrate von circa 10 ml/min über ein Schwerkraft-getriebenes Perfusionssystem in die Kammer geführt. Das Lungen-Präparat trennte beide Kammerhälften, so dass ein Stoffaustausch nur über das Gewebe hinweg erfolgen konnte. Zur Applikation von hydrostatischem Druck bestand die Möglichkeit, den Lösungsablauf der apikalen bzw. basolateralen Kammerhälfte in seiner Höhe zu verändern. Dazu war der Ablauf in Form eines Schornsteins ausgebildet, der zwei Abzweigungen in einem Abstand von 5 cm aufwies. Durch Verstopfen des unteren Abflusses auf einer Kammerseite konnte somit eine transepitheliale Druckdifferenz von 5 cm Wassersäule (entspricht ~ 490 Pa) angelegt werden.

Die Organfläche, welche für Ussing-Kammer-Messungen zugänglich war, betrug $0,5 \text{ cm}^2$.

Sämtliche Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

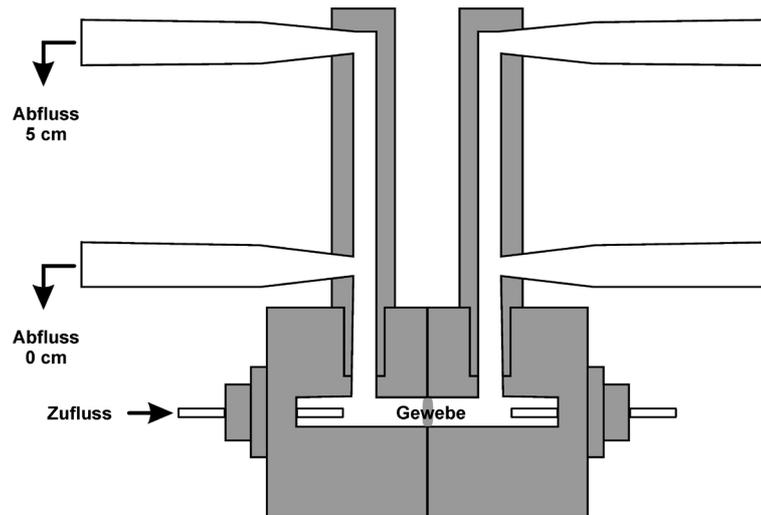


Abb. II-6: Schematische Darstellung der modifizierten Ussing-Kammer.

Das *Gewebe* trennte das apikale und das basolaterale Kammerkompartiment. Die Kompartimente wurden jeweils über einen *Zufluss* kontinuierlich mit Lösung perfundiert, welche über den jeweiligen *Abfluss 0 cm* austrat. Zur Applikation von hydrostatischem Druck konnte der *Abfluss 0 cm* mittels eines Gummistopfens verschlossen werden, so dass die Lösung im Schornstein emporstieg und über den *Abfluss 5 cm* abtropfen konnte. Dadurch ergab sich ein hydrostatischer Druck von 5 cm Wassersäule. Verändert nach Fronius (2003).

Ussing-Kammer-Elektroden

Um das Lungen-Präparat elektrisch leitend mit dem Messverstärker zu verbinden, wurden Silberchlorid-Elektroden angefertigt. Hierzu wurde 1 M KCl Lösung zur Verfestigung mit 3 % (w/V) Agar aufgekocht und anschließend in gekürzte 200 µl Pipettenspitzen gefüllt. Die so erhaltene Agarbrücke überschichtete man mit 1 M KCl Lösung. In diese Lösung tauchten Silberdrähte, die zuvor für circa 10 Sekunden in 0,1 M HCl bei einer Spannung von 5 V chloriert wurden. Es wurden ausschließlich Elektrodenpaare verwendet, die eine Potenzialdifferenz in NRS (siehe **Tab. II-6**) von weniger als 1,0 mV aufwiesen.

Experimenteller Aufbau

Die Elektroden wurden über einen Vorverstärker mit dem eigentlichen Messverstärker verbunden. Zur Archivierung der Daten wurden die Signale einerseits auf einem Schreiber aufgezeichnet. Die Laufgeschwindigkeit des Schreibers betrug 1 mm/min. Weiterhin erfolgte über einen Analog-Digital-(AD/DA) Wandler die Kommunikation mit einem Computer, der sowohl transepitheliale Ströme wie auch Potenziale mittels der Software *Chart* (Version 3.6.3, *MACLAB*) in Abhängigkeit der Zeit aufzeichnete. Die Signale wurden über einen Software-internen 50 Hz Filter gefiltert und mit einer *Sampling*-Rate von 2 Hz aufgezeichnet. Zur Erfassung der Widerstände wurden im *voltage clamp* Modus Spannungspulse von 2,5 mV für eine Dauer von 1 Sekunde appliziert. Mittels der resultierenden Stromauslenkung konnte

über das Ohm'sche Gesetz auf den Widerstand der Messeinheit geschlossen werden. Im *current clamp* Modus wurden Strompulse von 10 μA appliziert und die resultierende Spannungsänderung protokolliert, um so den Widerstand zu errechnen.

Zur Abschätzung der Geweboberfläche dienten Messungen der Kapazität (vgl. Fischer *et al.* 1989). Dazu wurden im *current clamp* Modus für jede Messung 6 Rechteck-Strompulse von 30 μA Höhe und 128 ms Dauer verabreicht und die resultierende Potenzialänderung gemessen. Die *Sampling*-Rate für die Kapazitätsmessungen lag bei 40 kHz. Die 6 Messungen wurden über eine *Software*-interne Funktion gemittelt (*Scope* Version 3.6.3, *MACLAB*). Nach Bildung des Mittelwerts wurde die Zeitkonstante τ bestimmt, zu welcher die Spannungsänderung 63 % ihres Maximalwertes erreicht hatte. Die Kapazität ergab sich, indem τ mit dem Widerstand der Messeinheit ins Verhältnis gesetzt wurde (Gl. II-2).

$$\text{Gl. II-2:} \quad C_T = \frac{\tau}{R}$$

C_T : Transepitheliale Kapazität [F]

τ : Zeitkonstante [s]

R: Widerstand [Ω]

Das System wurde auf seine Funktionsfähigkeit anhand eines elektrischen Äquivalentschaltkreises getestet, bei dem ein Widerstand von 500 Ω und ein Kondensator von 5 μF parallel geschaltet wurden.

Die Kapazitätswerte wurden in μF pro cm^2 Messfläche angegeben. Nach Kado (1993) entspricht eine Kapazität von 1 μF einer Membranoberfläche von circa 1 cm^2 .

Vorzeichenkonvention

Bei den durchgeführten Ussing-Kammer-Messungen diente die apikale Potzialelektrode als Referenzelektrode. Im Falle eines Na^+ -absorbierenden Epithels wie der *Xenopus* Lunge werden netto positive Ladungen von apikal nach basolateral transportiert, so dass eine lumenegative Potenzialdifferenz resultiert.

Unter *voltage clamp* Bedingungen wird ein Strom von Kationen von apikal nach basolateral (Kationenresorption) bzw. ein Strom von Anionen in entgegengesetzter Richtung (Anionensekretion) als positiver Strom bezeichnet und in Abbildungen als Ausschlag nach oben dargestellt. Eine Verschiebung dieses Stroms in Richtung negativer Werte kann begründet sein in: a) einer Verringerung der Kationenresorption bzw. Anionensekretion, b) einer gesteigerten Kationensekretion bzw. einer Anionenresorption.

II.4.3 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus* Oocyten erlaubte eine Aufzeichnung des Summenstroms sämtlicher in der Zelloberfläche befindlicher elektrogener Transportproteine. Nach heterologer Expression des epithelialen Na⁺-Kanals konnte der Einfluss von Scherkräften auf dieses pulmonale Membranprotein untersucht werden.

Mikroelektroden

Die Messelektroden wurden aus Borosilikatglas-Filamentkapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,7 mm und einem Außendurchmesser von 1,2 mm gefertigt und unter Verwendung eines Laser-Pullers ausgezogen. Anschließend wurden die Kapillaren luftblasenfrei mit einer 1 M KCl-Lösung befüllt. Der Silberdraht des Elektrodenhalters wurde für 10 Sekunden bei 2 V in einer 0,1 M HCl Lösung chloriert. Durch Aufschieben der Kapillare auf den Elektrodenhalter wurde die Elektrode fertiggestellt. Vor jeder Messung bestimmte man letztlich noch den Elektrodenwiderstand. Es wurden lediglich solche Elektroden verwendet, deren Widerstände im Bereich von 1 bis 5 MΩ lagen.

Als Referenzelektroden dienten Ag/AgCl-Pellets, die direkt in der Superfusionslösung gelagert waren.

Experimenteller Aufbau

Zur Messung wurde der in **Abb. II-7** verwendete Aufbau benutzt. Die in der Messkammer liegende Oocyte wurde über ein Schwerkraft-getriebenes Perfusionssystem ständig mit frischer Lösung umspült. Zusätzlich inserierte in einem Abstand von circa 1 mm von der Oocytenoberfläche eine Pasteur-Pipette (Öffnungsdurchmesser circa 1 mm) in die Badlösung, über welche ein separater Lösungsstrom auf die Zelle appliziert werden konnte. Eine am Kammerabfluss angeschlossene Saugpumpe sorgte für ein gleichbleibendes Lösungsvolumen in der Messkammer.

Die Potenzial- und Stromelektrode wurden unter optischer Kontrolle mittels Mikromanipulatoren an die Oocyte herangebracht und durch leichtes Antippen der Manipulatoren in die Zelle eingestochen. Danach konnte über die Potenzialelektrode das Membranpotenzial von einem *Voltage-Clamp*-Verstärker registriert werden. Über die Stromelektrode wurde der zur Aufrechterhaltung des Klemmpotenzials von -60 mV benötigte Kompensationsstrom appliziert. Das Stromsignal, welches bei 100 Hz Tiefpass-gefiltert wurde, konnte auf einem Multimeter abgelesen werden. Zusätzlich wurden Membranpotenzial und Kompensationsstrom kontinuierlich mittels eines Zweikanal-Schreibers protokolliert.

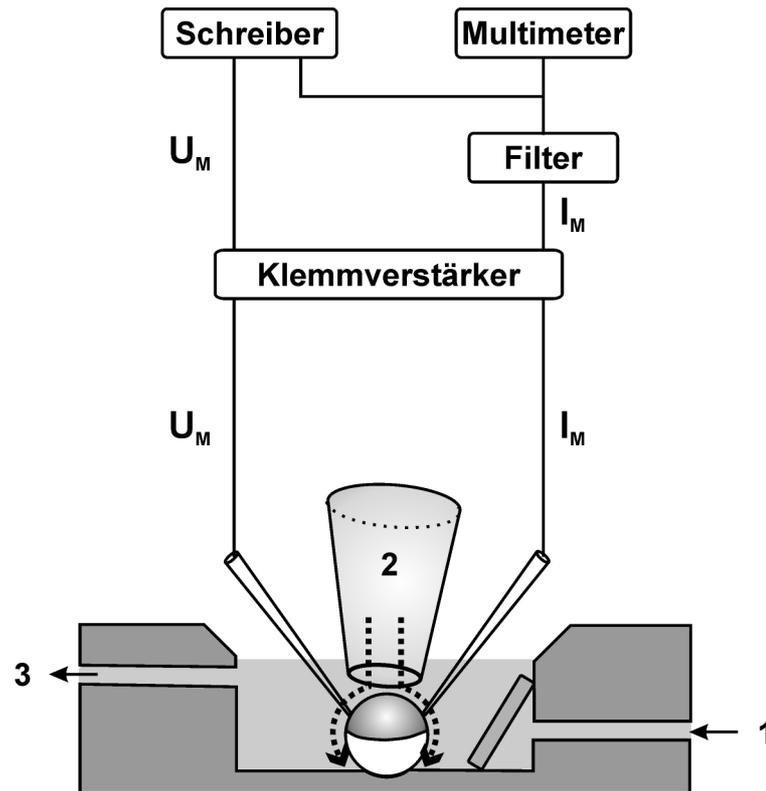


Abb. II-7: Aufbau der Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemme zur Untersuchung des Einflusses von Scherkräften auf heterolog exprimierte Ionenkanäle.

Die Zelle wurde über den Zulauf (1) kontinuierlich mit Lösung umspült. Zur Generation von Scherkräften konnte über eine Pasteur-Pipette (2) ein gerichteter Lösungsstrahl auf die Zelle appliziert werden. Überschüssige Lösung wurde über den Ablauf (3) abgesaugt. Das Membranpotenzial (U_M) wurde von einem Klemmverstärker registriert. Dieser generierte den transmembranen Strom (I_M), welcher zur Aufrechterhaltung eines Klemmpotenzials von -60 mV notwendig war. Der Strom wurde bei 100 Hz Tiefpass-gefiltert und auf einem Multimeter angezeigt. Strom und Spannung wurden weiterhin auf einem Schreiber aufgezeichnet. Verändert nach Althaus *et al.* (2007).

Bestimmung der Scherkräfte

Zur Bestimmung der Scherkräfte wurde zunächst die mittlere Strömungsgeschwindigkeit ermittelt:

$$\text{Gl. II-3: } \omega = \frac{V}{A}$$

ω : mittlere Strömungsgeschwindigkeit (m/s)

V : Volumenstrom (m^3/s)

A : Querschnittsfläche der durchströmten Kapillare (m^2)

Bei einem Volumenstrom von 3 ml/min und einem Kapillarendurchmesser von 1 mm ergibt sich eine mittlere Strömungsgeschwindigkeit von $\sim 0,064$ m/s.

Nun konnte die Reynolds Zahl berechnet werden, mit welcher abgeschätzt werden kann, ob eine Strömung turbulent oder laminar ist.

$$\text{Gl. II-4: } R_e = \frac{\rho \omega D}{\eta}$$

ω : mittlere Strömungsgeschwindigkeit (m/s)

ρ : Dichte (kg/m³) für Wasser bei 20°C = 998 kg/m³

D : Durchmesser der Kapillare (m)

η : dynamische Viskosität (Ns/m²) für Wasser bei 20°C = 0,001 Ns/m²

Daraus folgt eine R_e von ~ 64 . Nach Hoger *et al.* (2002) können Strömungen mit einer R_e von 14 - 80 als laminar betrachtet werden.

Mit Hilfe der Reynolds Zahl kann nun die auftretende Zugkraft errechnet werden.

$$\text{Gl. II-5: } F_{\text{Zug}} = 0,5 \rho A \omega^2 C_{\text{Zug}}$$

ρ : Dichte (kg/m³) für Wasser bei 20°C = 998 kg/m³

A : Querschnittsfläche des umströmten Bereichs (m²)

ω : mittlere Strömungsgeschwindigkeit (m/s)

C_{Zug} : Zugkraftkoeffizient (dimensionslos), nach Hoger *et al.* (2002) ~ 1

Für die Zwei-Elektroden-*Voltage-Clamp* Messungen ergibt sich eine Zugkraft von $1,6 \times 10^{-6}$ N.

Die resultierenden Zugkräfte werden letztlich mit der umströmten Oocytenoberfläche ins Verhältnis gesetzt:

$$\text{Gl. II-6: } F_{\text{Scher}} = \frac{F_{\text{Zug}}}{A}$$

F_{Scher} : Scherkraft (N/m²)

F_{Zug} : Zugkraft (N)

A : Oocytenoberfläche (m²)

Aus einem Oocytendurchmesser von 1 mm folgt eine Oberfläche von $3,1 \times 10^{-6}$ m². Damit ergibt sich eine Scherkraft von 5,1 dyn/cm² (entspricht einem Druck von 0,51 Pa).

Vorzeichenkonvention

Im Falle der Zwei-Elektroden-*Voltage-Clamp* Messungen an Oocyten wird eine Verlagerung positiver Ladungen vom umgebenden Medium in die Zelle hinein als Einwärtsstrom bezeichnet, erhält ein negatives Vorzeichen und wird in Abbildungen daher als Ausschlag nach unten dargestellt. Gleiches gilt für den Ausstrom negativer Ladungen aus der Zelle in das extrazelluläre Medium.

II.4.4 Patch Clamp

Die *Patch Clamp* Technik stellt ebenso wie die Methode der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme eine Anwendung des *voltage clamp* Prinzips dar. Die wichtigsten Unterschiede bestehen darin, dass eine Elektrode verwendet wird, die lediglich auf die Zellmembran aufgesetzt wird und diese nicht penetriert. Der Abdichtwiderstand, der sich zwischen Zellmembran und Glaskapillare ausbildet, liegt im Bereich von Giga-Ohm und wird deshalb auch als *G Ω -Seal* bezeichnet. Da somit das Hintergrundrauschen stark reduziert wird, ist es möglich, Ströme durch einzelne Ionenkanälen zu detektieren. Zudem können je nach Messkonfiguration Substanzen und Lösungen von extra- sowie intrazellulär appliziert werden. Die hier verwendete *outside-out* Konfiguration (siehe unten) erlaubte es zudem, den Einfluss von Scherkräften direkt an Einzelkanälen zu untersuchen.

Mikroelektroden und Messkonfigurationen

Die für die *Patch Clamp* Messungen verwendeten Borosilikatglas-Kapillaren (Außendurchmesser: 1,60 mm; Innendurchmesser: 1,28 mm) wurden auf einem Vertikal-Puller ausgezogen und anschließend feuerpoliert. Die resultierenden Pipettenwiderstände lagen zwischen 3 und 10 M Ω . Die jeweilige Pipettenlösung (siehe **Tab. II-5**) wurde luftblasenfrei eingefüllt und die Kapillare auf dem Elektrodenhalter montiert. Die Chlorierung des Silberdrahts erfolgte wie in Abschnitt II.4.3 beschrieben. Vor dem Eintauchen in die Badlösung wurde im Pipetteninneren ein Überdruck von circa 5 cm Wassersäule angelegt. Unter optischer Kontrolle wurde die Elektrode an die Zellmembran herangebracht. Anschließend wurde der Elektrodenwiderstand mittels eines Computers und der Messsoftware *Clampex* (Version 8.02.113, *AXON INSTRUMENTS*) ermittelt. Während der weiteren Annäherung an die Zellmembran wurde die Widerstandszunahme beobachtet. Zur Ausbildung eines Abdichtwiderstands im Giga-Ohm Bereich (*G Ω -Seal*) wurde der anliegende Überdruck abgelassen und ein Unterdruck von circa 10 cm Wassersäule appliziert. Von der nun hergestellten *cell-attached* Konfiguration (siehe **Abb. II-8**) gelangte man in die *whole-*

cell Konfiguration, indem man den Unterdruck im Pipetteninneren kontinuierlich steigerte. Dies resultierte in einem sprunghaften Rückgang des Systemwiderstands auf Werte im $M\Omega$ -Bereich. Wurde nun die Elektrode äußerst langsam von der Zelloberfläche zurückgezogen, bildete sich die *outside-out* Konfiguration aus. Dies war u.a. daran zu erkennen, dass der Systemwiderstand wieder Werte im $G\Omega$ -Bereich annahm.

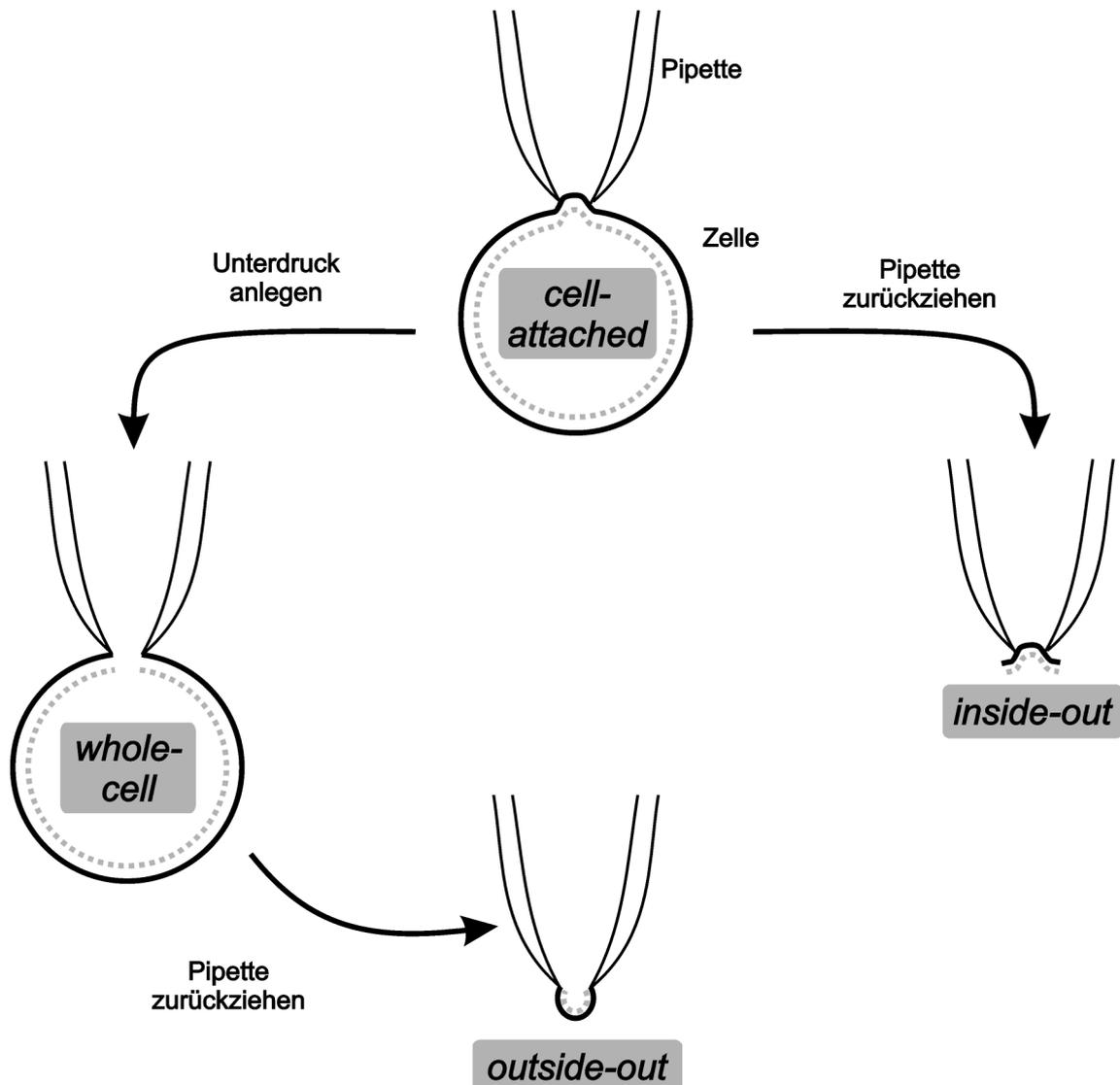


Abb. II-8: Patch Clamp Konfigurationen.

Nach Ausbildung eines $G\Omega$ -Seals in der *cell-attached* Konfiguration wurde der Unterdruck in der Pipette erhöht. Ein sprunghafter Abfall auf Werte im $M\Omega$ -Bereich zeigte an, dass der *patch* zerstört war und man sich nun in der *whole-cell* Konfiguration befand. Wurde dann die Pipette sehr langsam von der Zelloberfläche zurückgezogen, gelangte man in die *outside-out* Konfiguration und der Widerstand nahm wieder Werte im $G\Omega$ -Bereich an. Verändert nach Numberger & Draguhn (1996).

Experimenteller Aufbau und Datenauswertung

Da bei *Patch Clamp* Messungen über eine Elektrode sowohl die Membranspannung detektiert als auch der Kompensationsstrom appliziert wird, ist eine Modifikation des zuvor beschriebenen *voltage clamp* Aufbaus notwendig. Ermöglicht wird diese Art der Messung durch den Vorverstärker (die sogenannte *Headstage*, gepunkteter Kasten in **Abb. II-9**, Seite 35). Das Prinzip beruht darauf, dass das Membranpotenzial (Punkt a) mit dem Klemmpotenzial (U_K) über einen Operationsverstärker verrechnet wird. Weichen beide Werte voneinander ab, resultiert an Punkt b ein der Abweichung proportionales, jedoch verstärktes Potenzial. Dies bedingt, dass über den Widerstand R ein Strom fließt, der wiederum das Potenzial an Punkt a dem Klemmpotenzial angleicht. Die über dem Widerstand anliegende Spannung dient dann zur Berechnung des Kompensationsstroms.

Spannungs- und Stromwerte wurden vom Messverstärker über einen AD/DA-Wandler an einen Computer übertragen (**Abb. II-9**). Das verstärkte Stromsignal (200 mV/pA) wurde bei 100 Hz Tiefpass-gefiltert und mit 2 kHz gesampelt. Weiterhin konnte das Rauschen mittels eines 50 Hz Amplituden-Phasenmodulators reduziert werden.

Einzelkanalmessungen wurden in der *cell-attached* sowie in der *outside-out* Konfiguration durchgeführt. Die Applikation von Scherkräften erfolgte ausschließlich an *outside-out patches*. Dazu wurde der *patch* vor einer Kapillare (Öffnungsdurchmesser ~ 1 mm) positioniert. Diese war mit einem Perfusionssystem verbunden, welches über außerhalb des Messstands befindliche Magnetventile gesteuert werden konnte. Perfundierte wurde ORI, der auch als Badlösung Verwendung fand.

Die Berechnung der Scherkräfte erfolgte wie in Abschnitt II.4.3 beschrieben. Dabei fanden folgende Parameter Verwendung:

Volumenstrom:	0,3 ml/min
Öffnungsdurchmesser der Scherkapillare:	1 mm
Durchmesser der <i>Patch</i> -Pipettenspitze:	1 μ m
Umflossene <i>patch</i> -Oberfläche:	$7,9 \times 10^{-13}$ m ²

Die genannten Parameter resultierten in Scherkräften von $\sim 0,2$ dyn/cm² (entspricht $\sim 0,02$ Pa).

Zunächst wurde die Kanalaktivität für 1 min unter basalen Bedingungen (ohne Scherstress) aufgezeichnet. Anschließend wurde für 1 min laminarer Scherstress appliziert und schließlich 10 μ M Amilorid perfundiert. Ausgewertet wurde die Höhe der Einzelkanalamplitude sowie

die Kanalaktivität jeweils in An- und Abwesenheit von laminarem Scherstress. Zur Bestimmung der Leitfähigkeit (*chord conductance*) wurde die Amplitudenhöhe durch die Klemmspannung im Bereich von -100 bis -20 mV dividiert. Die Berechnung der Kanalaktivität (relative Offenwahrscheinlichkeit, NP_O) erfolgte nach Gl. II-7.

$$\text{Gl. II-7: } NP_O = \sum_{n=0}^N \frac{nt_n}{T}$$

NP_O : Kanalaktivität, relative Offenwahrscheinlichkeit

n: Kanal-Level

N: Gesamtzahl der sichtbaren Kanal-Levels

t_n : Aufenthaltsdauer im jeweiligen Level

T: Gesamtdauer der Messung

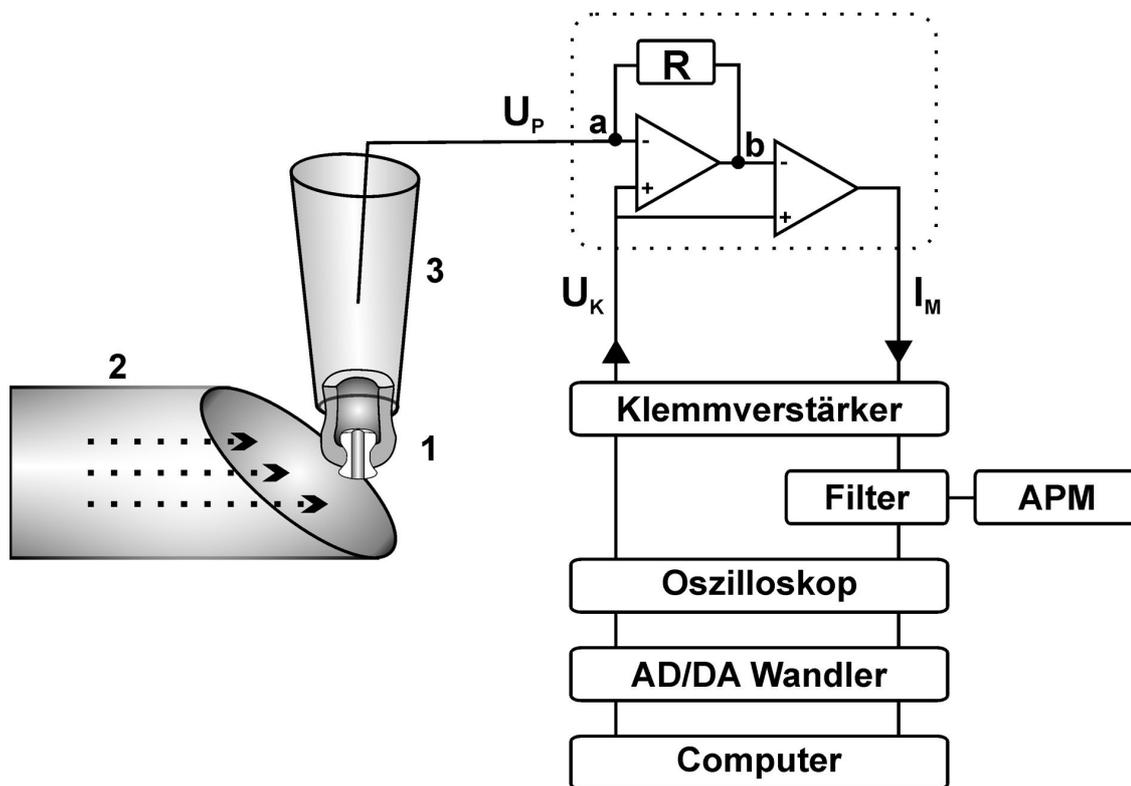


Abb. II-9: Aufbau des *Patch Clamp* Messstands zur Applikation von Scherstress auf Einzelkanäle. Die Messsignale wurden über den Vorverstärker (gepunkteter Kasten, Erläuterungen im Text) an den Klemmverstärker übertragen. Das Stromsignal wurde bei 100 Hz Tiefpass-gefiltert. Zur Reduktion des Hintergrundrauschens konnte ein 50 Hz Amplituden-Phasenmodulator (APM) zugeschaltet werden. Strom und Spannung wurden nach Wandlung über einen Analog-Digital-Wandler (AD/DA Wandler) auf einem Computer gespeichert. Scherkräfte wurden appliziert, indem der Membran-*patch* (1) in den Lösungsstrom eines separaten Perfusionskanals (2) gebracht wurde. (3) Patch Pipette. U_P : Pipettenpotenzial; U_K : Klemmpotenzial; I_M : Membranstrom; R: Widerstand. Verändert nach Althaus *et al.* (2007) und Numberger & Draguhn (1996).

Vorzeichenkonventionen

Die Vorzeichenkonvention für *Patch Clamp* Messungen richtet sich nach den Angaben von Numberger & Draguhn (1996).

Die bei *Patch Clamp* Messungen angegebene Membranspannung bezieht sich auf die cytoplasmatische Membranseite, die gegen die Referenzelektrode (Badelektrode) bestimmt wird. Ein Einwärtstrom stellt einen Strom von Kationen in die Zelle hinein dar (*outside-out*: vom Medium in die Pipette, *cell-attached*: von der Pipette in das Cytosol). Er wird als negativer Strom bezeichnet und ist in Abbildungen unabhängig von der Messkonfiguration als Auslenkung nach unten dargestellt.

II.5 Bestimmung von extrazellulärem ATP

Die Bestimmung extrazellulärer ATP-Konzentrationen wurde mit Hilfe des *ATPLite Kits* (*PERKIN ELMER*) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein bioluminometrisches Detektionsverfahren. Es basiert auf der Enzymreaktion von Luciferase mit Luciferin, bei welcher in Gegenwart von ATP und Sauerstoff Licht emittiert wird. Mit Hilfe eines Luminometers ist es möglich, diese geringen Lichtmengen als elektrische Potenzialdifferenzen zu detektieren.

Zur ATP-Bestimmung wurde Perfusionslösung herangezogen, die aus der Ussing-Kammer austrat. Diese wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und 100 µl davon mit 50 µl Zell-Lyse Puffer versetzt, welcher unter anderem den für die Luciferase-Reaktion benötigten pH-Wert gewährleistete. Nach 5 minütiger Inkubation wurde das Gemisch mit 50 µl Luciferase-Lösung versetzt und unverzüglich in das Luminometer überführt. Die Lichtemission wurde durch Integration über einen Zeitraum von 10 s detektiert. Da die Lichtemission der ATP-Reaktion je nach verwendetem Kit stark zeitabhängig ist, wurden die Proben nach zehnminütiger Inkubation im Dunkeln erneut gemessen. Damit konnte abgeschätzt werden, ob es durch nicht einheitliche Probenbehandlung zu einem Messfehler kommen konnte, der evtl. die Signalstärke überlagern würde.

Zur Abschätzung der in der Perfusionslösung enthaltenen ATP-Konzentration wurde eine Kalibrierungskurve mit Lösungen bekannter ATP-Konzentration erstellt. In doppelt logarithmischer Darstellung bestand eine lineare Abhängigkeit ($R^2 = 1,00$) zwischen den Lumineszenz-Messwerten (ausgegeben in mV Potenzialdifferenz) und der ATP-Konzentration im Bereich von 10^{-9} M bis 10^{-5} M ATP. Werte unterhalb dieser Konzentration flossen nicht in die Bestimmung der linearen Regression ein.

II.6 Statistik und Datenverarbeitung

Die dargestellten Werte sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*). Die Anzahl durchgeführter Versuche wird mit „n“ bezeichnet. Dies ist in den Ussing-Kammer-Experimenten gleichbedeutend mit der Anzahl der untersuchten Individuen. Bei den Techniken der *Patch Clamp* bzw. Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gibt „N“ die Anzahl der Oocytendonoren an, während „n“ die Zahl der Einzel-patches bzw. der untersuchten Oocyten beschreibt.

Die Angaben zu Strom-, Widerstands- und Kapazitätswerten der Ussing-Kammer-Messungen sind auf eine Messfläche von 1 cm² bezogen.

Die Mittelwerte wurden, wenn nicht anders angegeben, mit ANOVA (Varianzanalyse) bzw. gepaartem t-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Das Signifikanzniveau lag bei $p \leq 0,05$. Signifikant verschiedene Werte wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Auf eine weitere Differenzierung in „hoch signifikant“ usw. wurde verzichtet.

Die Datenaufzeichnung erfolgte bei Ussing-Kammer-Messungen mittels der Software *Chart* (Version 3.6.3, *MACLAB*). Die Kapazitätmessungen wurden mit *Scope* (Version 3.6.3, *MACLAB*) durchgeführt.

Die *Patch Clamp* Experimente wurden mit dem *pClamp* Softwarepaket (*pStat* Version 6.0.5.07, *fetchan* Version 6.0.6.01, *clampex* Version 8.0.2.113) von *AXON INSTRUMENTS* aufgezeichnet und ausgewertet.

Weiterhin wurden die Programme *Excel 2000* und *Word 2000* (*MICROSOFT*) sowie *Corel Draw* (Version 10), *Photoshop* (Version 7.0, *ADOBE*) und *Prism* (Version 4.03, *GRAPH PAD*) verwendet.

II.7 Medien, Puffer und Lösungen

Tab. II-3: Medien und Puffer

Medium	Substanz	Menge
LB	Trypton	10 g/l
	Hefe Extrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
LB Agar	Wie LB Medium + 15 g/l Agar	
SOB	Pepton	20 g/l
	Hefe Extrakt	5 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	KCl	2,5 mM
	MgSO ₄	20 mM
	(pH = 7 mit HCl)	
SOC	SOB + 20 mM Glucose	
FSB	KCl	100 mM
	K-Acetat	10 mM
	MnCl ₂	45 mM
	CoCl ₃	3 mM
	CaCl ₂	10 mM
	Glycerin	10 % (w/v)
	(pH = 6,4 mit HCl)	
TAE	Tris	48,5 g/l
	Na ₂ EDTA	3,7 g/l
	Essigsäure	12 g/l
PBS	NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	1,2 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	3,9 mM
	NaCl	22,4 g/l
PBS+S	Wie PBS + 22,4 g/l NaCl	

Tab. II-4: Lösungen zur Isolation von *Xenopus* Oocyten (Konzentrationen in mM).

	KuOri	NMDG-KuOri	Ca ²⁺ -freie Ori
NaCl	90	10	90
KCl	1	1	1
CaCl ₂	2	2	-
MgCl ₂	-	-	1
HEPES	5	5	5
Na ⁺ -Pyruvat	2,5	2,5	-
Penicillin G	0,06	0,06	-
Streptomycinsulfat	0,02	0,02	-
NMDG	-	80	-
EGTA	-	-	1
pH	7,4	7,4	7,4

KuOri: Kultur-Oocyten-Ringerlösung; Ori: Oocyten-Ringerlösung. Die Chlorid-Konzentration (und Osmolarität) der NMDG-haltigen Lösungen ergab sich durch Einstellen des pH-Werts mit HCl.

Tab. II-5: Lösungen für Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp und Patch Clamp Untersuchungen an *Xenopus* Oocyten (Konzentrationen in mM).

	Ori	Badlösung für <i>cell-attached</i> Messungen	Intrazelluläre Pipetten-Lösung für <i>outside-out</i> Messungen
NaCl	90	5	-
KCl	1	90	140
CaCl ₂	2	1	1
MgCl ₂	-	-	2
HEPES	5	5	10
EGTA	-	-	11
pH	7,4	7,4	7,2

In *cell-attached* Messungen wurde Ori als Pipettenlösung verwendet. In *outside-out* Lösungen wurde Ori als Badlösung verwendet. Ori: Oocyten-Ringerlösung. pH mit Trisma bzw. HCl.

Tab. II-6: Lösungen für Ussing-Kammer-Experimente an *Xenopus* Lungen I (Konzentrationen in mM).

	NRS	Na⁺-frei	Ca²⁺-frei	K⁺
NaCl	100	-	100	-
KCl	3	3	3	103
CaCl ₂	1	1	0	1
MgCl ₂	1	1	1	1
HEPES	5	5	5	5
Glucose	10	10	10	10
NMDG-Cl	-	100	-	-
Mannitol	-	-	3	-
Osmolarität [mosm/l]	227	227	227	227

Angaben in mM. pH = 7,4 mit Trisma bzw. HCl. NRS: Normal-Ringerlösung. Die Chlorid-Konzentration (und Osmolarität) der NMDG-haltigen Lösungen ergab sich durch Einstellen des pH-Werts mit HCl.

Tab. II-7: Lösungen für Ussing-Kammer-Experimente an *Xenopus* Lungen II (Konzentrationen in mM).

	Kontrolle hypoton	hypoton	50Na⁺	25Na⁺	Hoch K⁺
NaCl	50	50	50	25	50
KCl	3	3	3	3	53
CaCl ₂	1	1	1	1	1
MgCl ₂	1	1	1	1	1
HEPES	5	5	5	5	5
Glucose	10	10	10	10	10
Mannitol	100	-	-	-	-
NMDG	-	-	50	75	-
Osmolarität [mosm/l]	227	127	227	227	227

Angaben in mM. pH = 7,4 mit Trisma bzw. HCl. Die Chlorid-Konzentration (und Osmolarität) der NMDG-haltigen Lösungen ergab sich durch Einstellen des pH-Werts mit HCl.

Tab. II-8: Lösungen für Ussing-Kammer-Experimente an *Xenopus* Lungen III (Konzentrationen in mM).

	Cl ⁻ -frei
Na ⁺ -Gluconat	100
K ⁺ -Gluconat	3
CaSO ₄	1
MgSO ₄	1
HEPES	5
Glucose	10
Mannitol	2
Osmolarität [mosm/l]	227

Angaben in mM. pH = 7,4 mit Trisma bzw. Gluconsäure.

Tab. II-9: Verwendete Stammlösungen.

Substanz	Lösungsmittel	Stammlösung [mM]
Amilorid	ddH ₂ O	10
Apamin	ddH ₂ O	1
BAPTA/AM	DMSO	100
Charybdotoxin	ddH ₂ O	0,1
Chlorzoxazon	DMSO	500
Clofilium-Tosylat	ddH ₂ O	20
Clotrimazol	Methanol	50
Econazol	DMSO	50
GdCl ₃	ddH ₂ O	300 bzw. 10
Glibenclamid	DMSO	100
Ionomycin	DMSO	10
LaCl ₃	ddH ₂ O	100
NFA	1 M NaOH	500
Quinin	Methanol	500
Tamoxifen	DMSO	50
Thapsigargin	DMSO	5
TRAM-34	DMSO	50

ddH₂O: doppelt destilliertes Wasser; DMSO: Dimethylsulfoxid.

III Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss mechanischer Kräfte auf den pulmonalen Ionentransport untersucht. Als Untersuchungsobjekte dienten einerseits native Lungenpräparate von *Xenopus laevis* an denen eine mechanische Reizung durch Erhöhung des hydrostatischen Drucks hervorgerufen wurde. In weiteren Experimenten an heterolog exprimierten humanen epithelialen Natriumkanälen (hENaCs), welche aus Lungengewebe kloniert wurden, konnte die Auswirkung von Scherkräften auf die Funktionsweise eines isolierten Transportproteins beleuchtet werden.

III.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der Lunge von *Xenopus laevis*

Die nativen Lungenpräparate von *Xenopus laevis* wurden zur Untersuchung des transepithelialen Ionenstroms in modifizierte Ussing-Kammern (siehe **Abb. II-6**, Seite 27) eingesetzt und von beiden Seiten mit normaler Ringer-Lösung (*normal Ringer's solution*, NRS) perfundiert. Zunächst wurde im *open circuit* Modus die spontane transepitheliale Potenzialdifferenz protokolliert, die sich innerhalb einiger Minuten einem Plateauwert annäherte (**Tab. III-1**). Anschließend wurde das transepitheliale Potenzial auf 0 V geklemmt und der resultierende Kurzschlussstrom (*short circuit current*, I_{SC}) in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet. Wie bereits von Fronius (2003) beschrieben, sank der I_{SC} direkt nach dem Start der Messung zunächst ab, stabilisierte sich jedoch innerhalb eines Zeitraums von bis zu vier Stunden auf einem Plateauwert. Experimentelle Modifikationen wie Druck- oder Pharmaka-Applikation wurden, wenn nicht anders vermerkt, erst nach Erreichen des Plateauwerts vorgenommen.

Tab. III-1: Elektrophysiologische Parameter der untersuchten Lungen von *Xenopus laevis*.

V_t [mV]	I_{SC} [$\mu\text{A} \times \text{cm}^{-2}$]	R_t [$\Omega \times \text{cm}^2$]
$-14,82 \pm 0,37$ (n = 307)	$40,32 \pm 0,92$ (n = 216)	331 ± 6 (n = 216)

Native Lungenpräparate wurden in Ussing-Kammern kontinuierlich mit normaler Ringerlösung (NRS, siehe **Tab. II-6**, Seite 39) perfundiert. V_t : transepitheliale Potenzialdifferenz. I_{SC} : Kurzschlussstrom. R_t : transepithelialer Widerstand. Die Parameter I_{SC} und R_t wurden nach Erreichen eines Stromplateaus aufgenommen. V_t wurde unmittelbar nach Einspannen der Präparate in die Ussing-Kammer protokolliert.

III.2 Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften durch Druckapplikation

III.2.1 Auswirkung auf den Kurzschlussstrom und den Widerstand

Nach Einstellung eines konstanten Stromwertes wurde der Einfluss mechanischer Kräfte auf den transepithelialen Ionenstrom untersucht. Dazu wurde der hydrostatische Druck, der auf dem Präparat lastete, durch Veränderung der Wassersäulenhöhe modifiziert. Eine Erhöhung der Wassersäule um 5 cm auf der apikalen Seite des Präparats bewirkte einen Rückgang des Kurzschlussstroms (I_{SC}) auf circa 80 % des Ausgangswerts (**Abb. III-1, Tab. III-2**). Der zeitliche Verlauf der Druck-induzierten Strominhibition kann durch drei Typen kategorisiert werden (**Abb. III-2**): (A) eine schnelle Inhibition innerhalb weniger Sekunden gefolgt von einem langsameren Stromrückgang; (B) eine schnelle Strominhibition gefolgt von einer transienten Stimulation; (C) eine initiale kurzzeitige Stromstimulation, die allerdings innerhalb einiger Minuten in eine Netto-Inhibition übergeht. In 21 von 342 Versuchen (entspricht 6 %) war eine Netto-Stimulation des I_{SC} nach Druckapplikation zu beobachten. Diese Messungen wurden nicht zur Auswertung herangezogen. Nach circa 10 Minuten erreichte die Druck-induzierte Strominhibition ihre größte Auslenkung und die Erhöhung der Wassersäule um 5 cm wurde rückgängig gemacht. Daraufhin stellte sich ein neuer Plateauwert ein, der mit circa 120 % signifikant über dem Wert vor Druckapplikation lag. Zusammengefasst hatte die Erhöhung des hydrostatischen Drucks also einen dualen Effekt: als direkte Folge der mechanischen Reizung war ein Rückgang des I_{SC} zu verzeichnen, während sich nach Wegnahme des transepithelialen Druckgradienten eine Stromstimulation ergab.

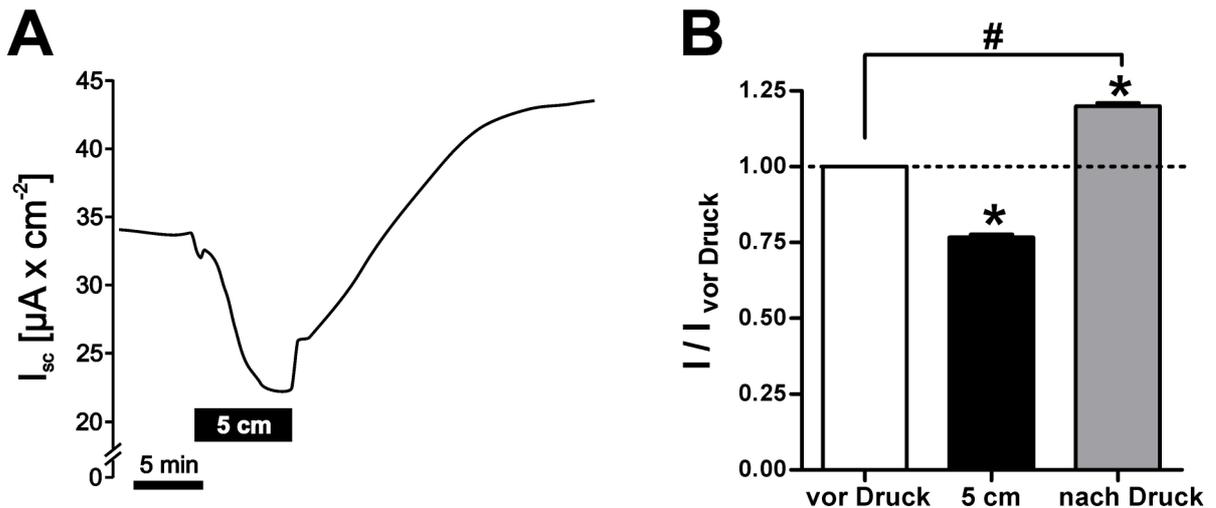


Abb. III-1: Druck-induzierte Strominhibition.

(A) Eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks um 5 cm Wassersäule (schwarzer Balken, 5 cm) auf der apikalen Gewebsseite resultierte in einer Verminderung des Kurzschlussstroms (I_{SC}). Nach Beendigung der Druckeinwirkung stieg der I_{SC} an und erreichte Werte, welche signifikant über dem Ausgangsplateau (vor Druck) lagen. (B) Statistische Auswertung von 216 Experimenten, wie in Abbildung A gezeigt. Dargestellt ist das Verhältnis des jeweiligen Stroms (I) in Bezug zum Stromwert unmittelbar vor Druckeinwirkung (vor Druck). 5 cm: Strom während mechanischer Reizung durch Erhöhung des hydrostatischen Drucks auf 5 cm Wassersäule. Nach Druck: Stromwert nach Beendigung der Druckeinwirkung und Erreichen eines Plateaus. *: signifikant verschieden vom vorherigen Wert; #: signifikant verschieden.

Tab. III-2: Druck-induzierte Änderung des Kurzschlussstroms (I_{SC}).

	vor Druck	5 cm	nach Druck
$I_{SC} [\mu A \times cm^{-2}]$	$40,32 \pm 0,92$	$31,74 \pm 0,84^*$	$48,10 \pm 1,00^{*\#}$

Eine Erhöhung der hydrostatischen Wassersäule auf der apikalen Gewebsseite um 5 cm reduzierte den I_{SC} . Nach Beendigung der Druckeinwirkung stieg der I_{SC} signifikant über den Wert vor Druckgabe an. *: signifikant verschieden vom vorherigen Wert; #: signifikant verschieden vom Ausgangswert vor Druck. n = 216.

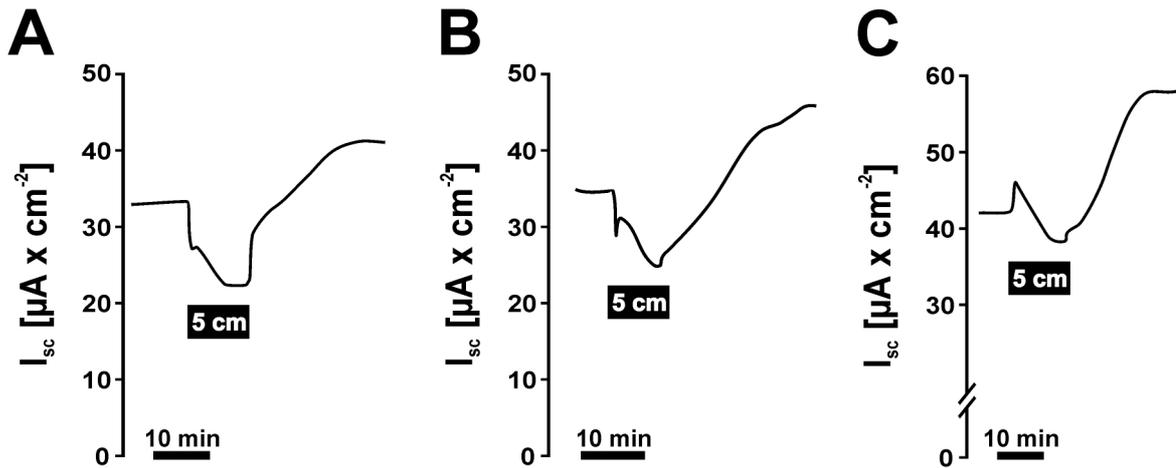


Abb. III-2: Unterschiedliche Ausprägung der Druck-induzierten Strominhibition.

Die Abbildungen zeigen die Reaktion des Kurzschlussstroms (I_{sc}) auf eine Erhöhung der apikalen Wassersäule um 5 cm (schwarzer Balken, 5 cm). In allen Fällen war eine Reduktion des transepithelialen Stroms zu erkennen, die in (A) aus einer schnellen sowie einer langsamen Komponente besteht. In (B) und (C) trat zusätzlich eine transiente Stromstimulation auf. In (C) fällt diese sogar so stark aus, dass die in (A) und (B) zu beobachtende schnelle Inhibition zunächst überlagert wird.

Ein ähnliches Ergebnis konnte beobachtet werden, wenn die Druckapplikation von der basolateralen Seite erfolgte: auch hier war zunächst eine Reduktion des I_{sc} auf circa 70 % zu verzeichnen. Nach Beendigung der Druckeinwirkung stieg der Strom ähnlich der apikalen Applikation auf circa 120 % des Ausgangswertes. Wie in **Abb. III-3** zu erkennen ist, war bei basolateraler Reizung in einigen Messungen ein oszillierender Stromverlauf nach Beendigung der Druckeinwirkung festzustellen.

Eine weitere Messreihe, in der Druck zunächst nur von apikal und später nur von basolateral appliziert wurde, ergab keinen signifikanten Unterschied in der Druck-induzierten Strominhibition (**Abb. III-3**).

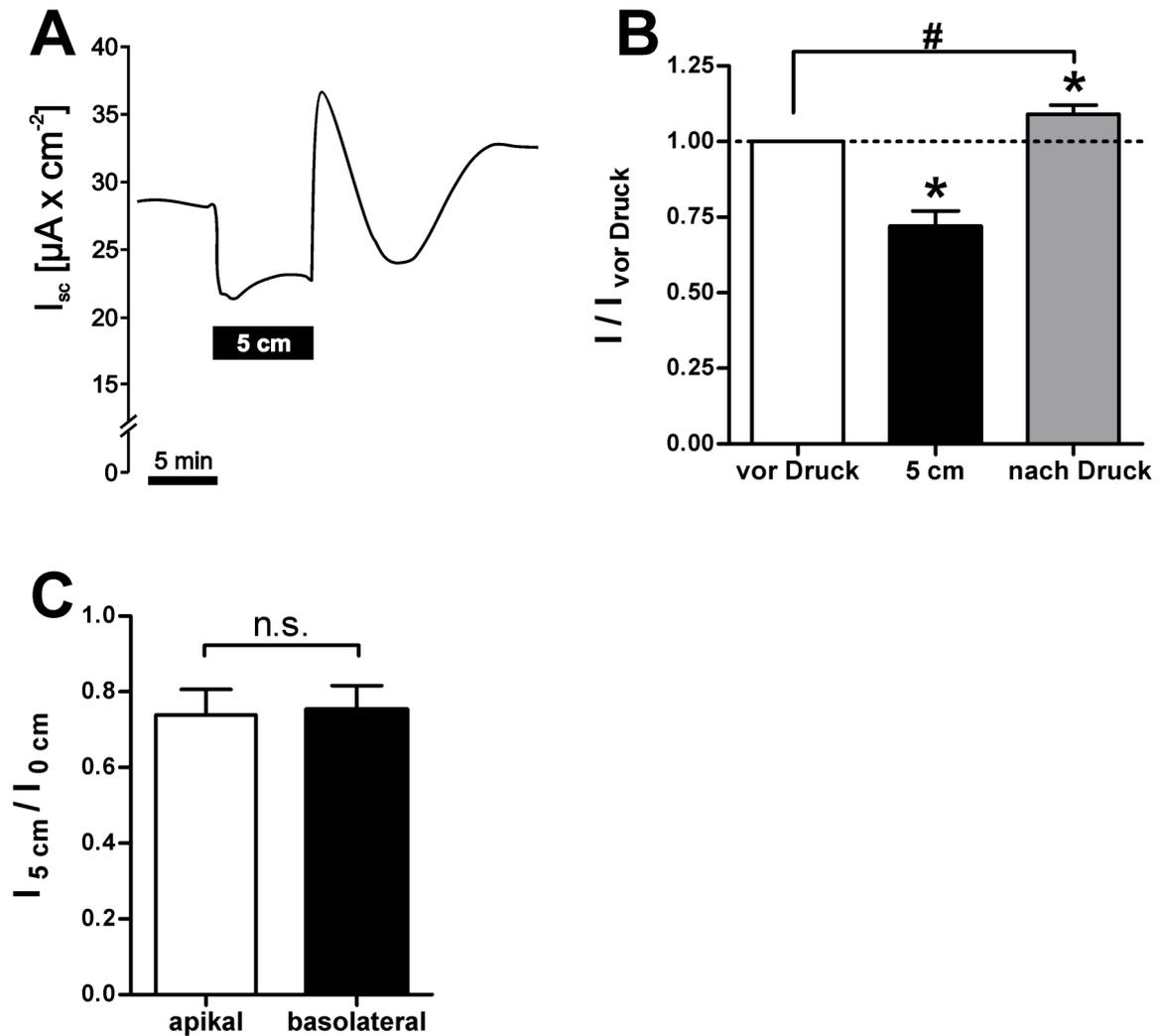


Abb. III-3: Druck-induzierte Strominhibition nach basolateraler Erhöhung des hydrostatischen Drucks. (A) Eine Druckapplikation (5 cm) von der basolateralen Seite resultierte in einem Stromrückgang. Nach Entfernung des mechanischen Stimulus stieg der Strom signifikant über das Ausgangsniveau an. Im Gegensatz zu Experimenten mit apikaler Druckapplikation folgte in einigen Messungen auf die Druckwegnahme ein oszillierender Stromverlauf. (B) Statistische Auswertung von 9 Messungen. (C) Statistische Auswertung einer Messreihe, in der Druck zunächst nur von apikal und anschließend nur von basolateral appliziert wurde ($n = 7$). Die Höhe der Druck-induzierten Strominhibition war unabhängig von der stimulierten Gewebseite. *: signifikant verschieden vom vorherigen Wert; #: signifikant verschieden; n.s.: nicht signifikant verschieden.

Der beobachtete Druckeffekt könnte einerseits durch eine Stauchung der Zellen eingeleitet werden, die durch die Erhöhung des hydrostatischen Drucks hervorgerufen wird. Andererseits könnte es aber auch zu einer Dehnung der Membran kommen, wenn die Druckapplikation eine Aufblähung des Präparats bedingt. Um diese beiden Möglichkeiten zu eruieren, wurden Messungen durchgeführt, in denen ein Aufblähen des Präparats unterbunden werden sollte. Dies erfolgte zum einen durch eine Abstützung des Gewebes mit Hilfe eines Nylonnetzes und zum anderen durch eine gleichzeitige Erhöhung des Drucks auf der apikalen sowie der

basolateralen Seite. In beiden Versuchsreihen unterblieb die Druck-induzierte Strominhibition (Abb. III-4, Abb. III-5). Während eine beidseitige Erhöhung der Wassersäule den I_{SC} nicht signifikant veränderte, konnte bei apikaler Druckapplikation in Verbindung mit einer Abstützung des Gewebes durch ein Nylonnetz eine Stromstimulation verzeichnet werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks um 5 cm Wassersäule nur dann zu einer Inhibition des I_{SC} führt, wenn es zu einer Ausbildung eines transepithelialen Druckgradienten kommt, und sich das Gewebe ausdehnen kann.

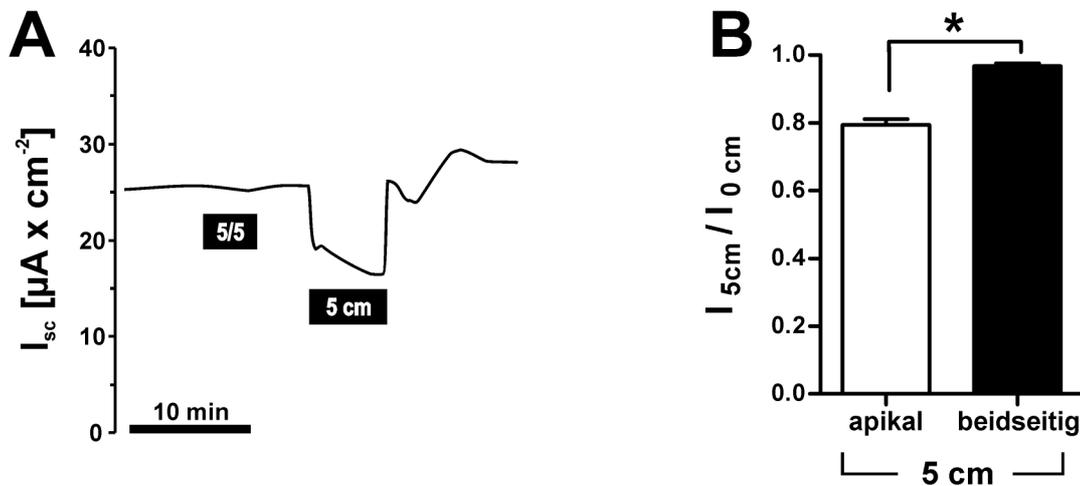


Abb. III-4: Beeinflussung des Kurzschlussstroms (I_{SC}) durch beidseitige Erhöhung der Wassersäule. Eine gleichzeitige Erhöhung der Wassersäule auf der apikalen sowie der basolateralen Gewebsseite um jeweils 5 cm Wassersäule (5/5) veränderte den I_{SC} nicht, wohingegen eine mechanische Stimulation von der apikalen Seite allein (5 cm) den Strom verminderte. (B) Statistische Auswertung von 7 Experimenten. Angegeben ist das Verhältnis des Stroms während mechanischer Reizung (I_{5cm}) zum Strom vor Druck-applikation (I_{0cm}). *: signifikant verschieden.

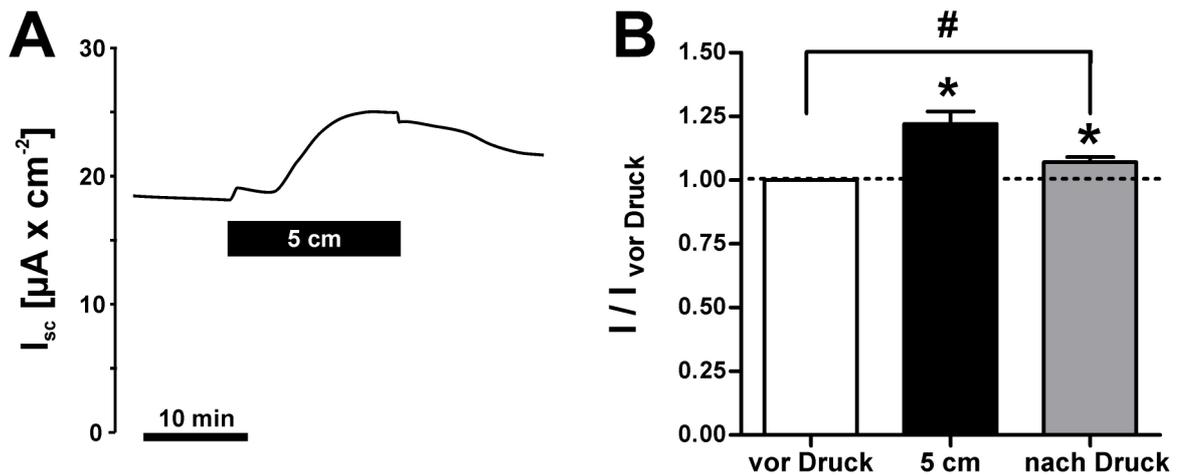


Abb. III-5: Eine Gewebsabstützung mittels eines Nylonnetzes verhinderte die Inhibition des Kurzschlussstroms (I_{sc}) während der Erhöhung des hydrostatischen Drucks. (A) Eine Druckapplikation (5 cm) führte nach einer Latenzzeit von einigen Minuten zu einer Stimulation des I_{sc} . (B) Statistische Auswertung von 6 Messungen. *: signifikant verschieden vom vorherigen Wert; #: signifikant verschieden.

Neben dem Kurzschlussstrom wurde auch der Gewebswiderstand während der apikalen Erhöhung der Wassersäule betrachtet (**Abb. III-6**). Dieser reduzierte sich unter Druckeinwirkung von $331 \pm 6 \Omega \times cm^2$ auf $304 \pm 7 \Omega \times cm^2$, was einer Verringerung von $8 \pm 1 \%$ ($n = 216$) entspricht. Auch nach Beendigung der Druckeinwirkung und Einstellung eines neuen Stromplateaus blieb der Widerstand unverändert bei $304 \pm 6 \Omega \times cm^2$ ($n = 216$). Eine Reduktion des Widerstandswertes tritt im Verlauf der Messungen allerdings auch ohne den Einfluss von hydrostatischem Druck auf. Vergleicht man den Wert zu Messbeginn mit demjenigen direkt vor Druckapplikation, so ist auch hier eine Reduktion des Widerstands um $6 \pm 1 \%$ zu verzeichnen (**Abb. III-6**).

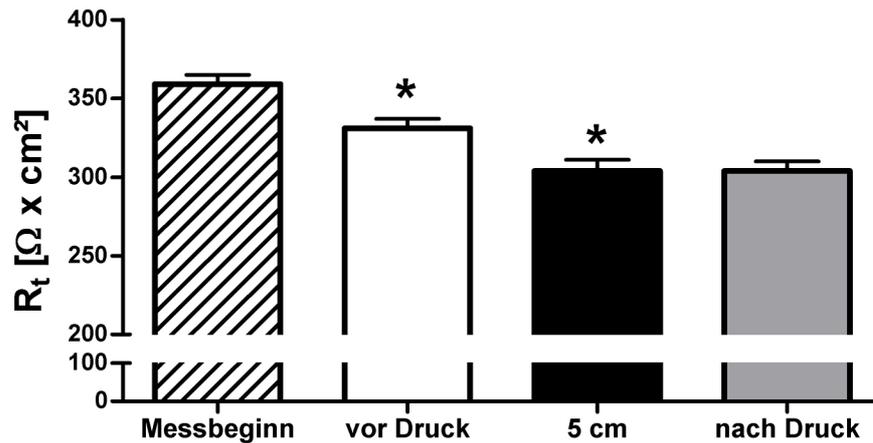


Abb. III-6: Auftragung des Widerstands zu verschiedenen Messzeitpunkten.

Der Widerstand verringert sich im Laufe der Messung. Sowohl während der Equilibrierungsphase vom Messbeginn bis unmittelbar vor Druckapplikation (vor Druck) als auch während der Druckapplikation (5 cm) ist eine signifikante Reduktion des Widerstands zu beobachten. Nach Beendigung der Druckeinwirkung (nach Druck) verändert sich der Widerstandswert nicht mehr signifikant. *: signifikant verschieden vom vorherigen Wert.

III.2.2 Auswirkung auf die transepitheliale Potenzialdifferenz

Neben Messungen des Kurzschlussstroms im *voltage clamp* Modus wurden auch Potenzialmessungen im *current clamp* Modus durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die transepitheliale Potenzialdifferenz (V_t) durch Druckeinwirkung auf circa 75 % des Ausgangswertes vermindert wurde (**Abb. III-7, Tab. III-3**). Nach Beendigung der Druckeinwirkung stieg V_t auf Werte, die tendenziell größer waren als diejenigen vor Druckapplikation ($104 \pm 2\%$; $p = 0,068$; bei 2 von 14 Versuchen wurde der Ausgangswert nicht mehr erreicht). Im Gegensatz zu *voltage clamp* Messungen, in denen nach Druckwegnahme eine deutliche Stromstimulation über das Ausgangsniveau hinaus zu verzeichnen war, trat ein stimulatorischer Effekt auf V_t bei *current clamp* Messungen also nur sehr viel schwächer auf.

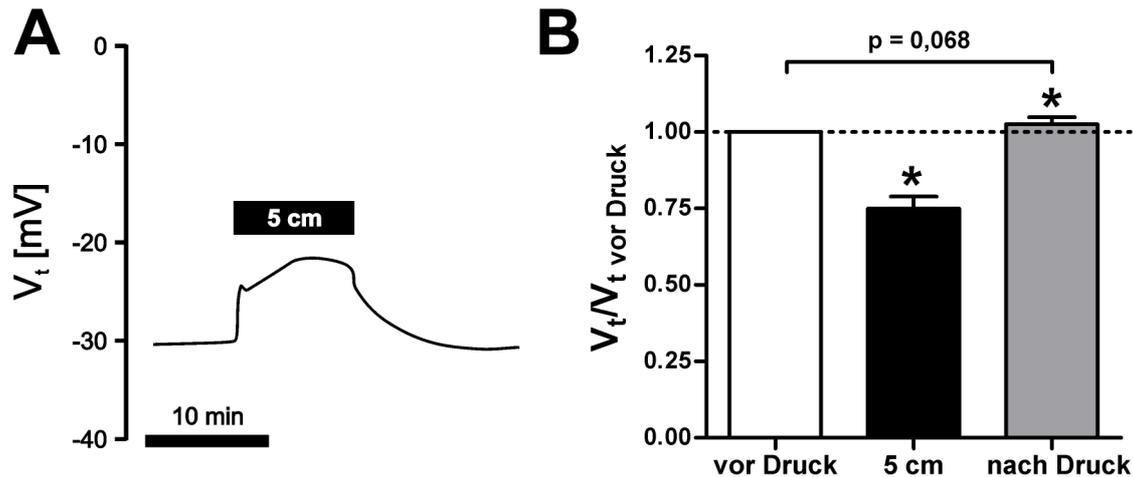


Abb. III-7: Auswirkung einer mechanischen Stimulation auf die transepitheliale Potenzial-differenz (V_t).

Eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks um 5 cm Wassersäule auf der apikalen Gewebseite (5 cm) reduzierte die transepitheliale Potenzialdifferenz (V_t). (B) Statistische Auswertung von 14 Versuchen. Die Werte vor Druck und nach Druck unterschieden sich tendenziell ($p = 0,068$). *: signifikant verschieden vom vorherigen Wert.

Tab. III-3: Änderung der transepithelialen Potenzialdifferenz durch Druckeinwirkung.

	vor Druck	5 cm	nach Druck
V_t [mV]	$-22,89 \pm 2,29$	$-17,59 \pm 2,05^*$	$-23,68 \pm 2,43$

Die lumennegative Potenzialdifferenz (V_t) reduzierte sich nach Erhöhung des hydrostatischen Drucks auf der apikalen Gewebseite (5 cm). Nach Beendigung der Druckeinwirkung stieg V_t tendenziell an ($p = 0,068$). *signifikant verschieden vom Wert vor Druckapplikation. $n = 14$.

III.2.3 Auswirkung auf die Austauschoberfläche

Die morphologische Gliederung der Amphibienlunge in sogenannte „Luftsäcke“ (*air sacs*, Meban 1973) könnte bedingen, dass es während der Druckapplikation zum Verschluss von Teilen dieser Strukturen kommt. Dies würde eine Reduktion in der Ionenaustauschoberfläche hervorrufen und könnte damit ursächlich für die beobachtete Stromreduktion sein. Weiterhin konnte von Lewis & de Moura (1982) nachgewiesen werden, dass eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks an der Harnblase zu einer Fusion von submembranen Vesikeln führte, was eine Vergrößerung der Membranoberfläche nach sich zog. Diese Vesikel enthielten präformierte Kanalproteine, so dass sich die Leitfähigkeit des Gewebes änderte. Dieser Umstand wiederum könnte die in der vorliegenden Arbeit beobachtete langfristige Stimulation des I_{SC} im Anschluss an die Druckapplikation erklären.

Sowohl dem Verschluss der „Luftsäcke“ wie auch der Fusion submembraner Vesikel ist eine Veränderung der epithelialen Membranoberfläche gemeinsam. Um zu überprüfen, ob eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks zu einer Veränderung der Austauschoberfläche führte, wurden Kapazitätmessungen durchgeführt. Dabei wurde die Kapazität vor, während und nach Druckapplikation bestimmt. Die Kapazitätssmessung nach Druck erfolgte bei Erreichen eines Stromplateaus (circa 10 - 20 Minuten nach Druckwegnahme). Die in **Tab. III-4** und **Abb. III-8** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Membranoberfläche lediglich für die Dauer der Druckeinwirkung um circa $16 \pm 6 \%$ ($n = 9$) erhöht war und anschließend auf das Ausgangsniveau zurückkehrte.

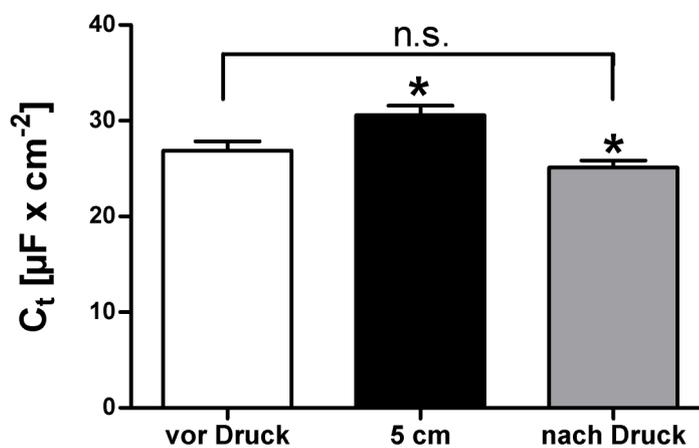


Abb. III-8: Veränderung der transepithelialen Kapazität (C_t) als Folge einer Erhöhung des hydrostatischen Drucks auf der apikalen Gewebssseite. Während der Druckeinwirkung (5 cm) nahm die Kapazität zu, erreichte nach Beendigung der mechanischen Reizung und Einstellung eines Stromplateaus (nach Druck) jedoch wieder das Ausgangsniveau ($n = 9$).

Tab. III-4: Änderung der transepithelialen Kapazität (C_t) durch Druckeinwirkung.

	vor Druck	5 cm	nach Druck
C_t [$\mu\text{F} \times \text{cm}^{-2}$]	$26,89 \pm 2,90$	$30,58 \pm 3,05^*$	$25,13 \pm 2,18$

Die Kapazität wurde als Maß für die Membranoberfläche bestimmt. Eine Druckapplikation (5 cm) hatte eine geringe Zunahme der Kapazität zur Folge. Nach Beendigung der Druckeinwirkung und Einstellung eines Stromplateaus (nach Druck) kehrte die Kapazität auf das Ausgangsniveau zurück. *: signifikant verschieden vom Wert vor Druckapplikation. $n = 9$.

III.2.4 Reproduzierbarkeit des Druckeffektes und Einfluss von Lösungsmitteln

Zur späteren pharmakologischen Charakterisierung des Druckeffekts (siehe III.4) musste untersucht werden, ob die Größe der Druck-induzierten Strominhibition durch zweimalige Applikation von mechanischem Stress allein signifikant verändert wurde. Zu diesem Zweck wurde eine Messreihe durchgeführt, in welcher die Lungenpräparate zweimal dem Einfluss von hydrostatischem Druck ausgesetzt wurden (**Abb. III-9**). Die erste Druckapplikation resultierte in einer Strominhibition auf $71 \pm 5 \%$ ($n = 11$) des Ausgangswertes. Nach Beendigung des mechanischen Reizes equilibrierte sich der I_{SC} , so dass die Wassersäule auf der apikalen Kammerseite erneut um 5 cm erhöht werden konnte. Dies bewirkte ein erneutes Absinken des Kurzschlussstroms auf $73 \pm 4 \%$ des Wertes vor Druckapplikation. Ein Vergleich der beiden Werte mit dem gepaarten t-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied. Es kann daher festgehalten werden, dass die Druck-induzierte Strominhibition reproduzierbar war und die Größe des Effekts bei Wiederholung nicht verändert wurde.

Da einige der in späteren Versuchen verwendeten Pharmaka in Methanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst waren, wurde in einer weiteren Messreihe der Einfluss dieser Lösungsvermittler allein auf den Druckeffekt untersucht. Weder die Applikation von 0,1 % Methanol noch diejenige von 0,1 % DMSO hatte einen Einfluss auf die Höhe des Druck-induzierten Stroms (**Abb. III-9**).

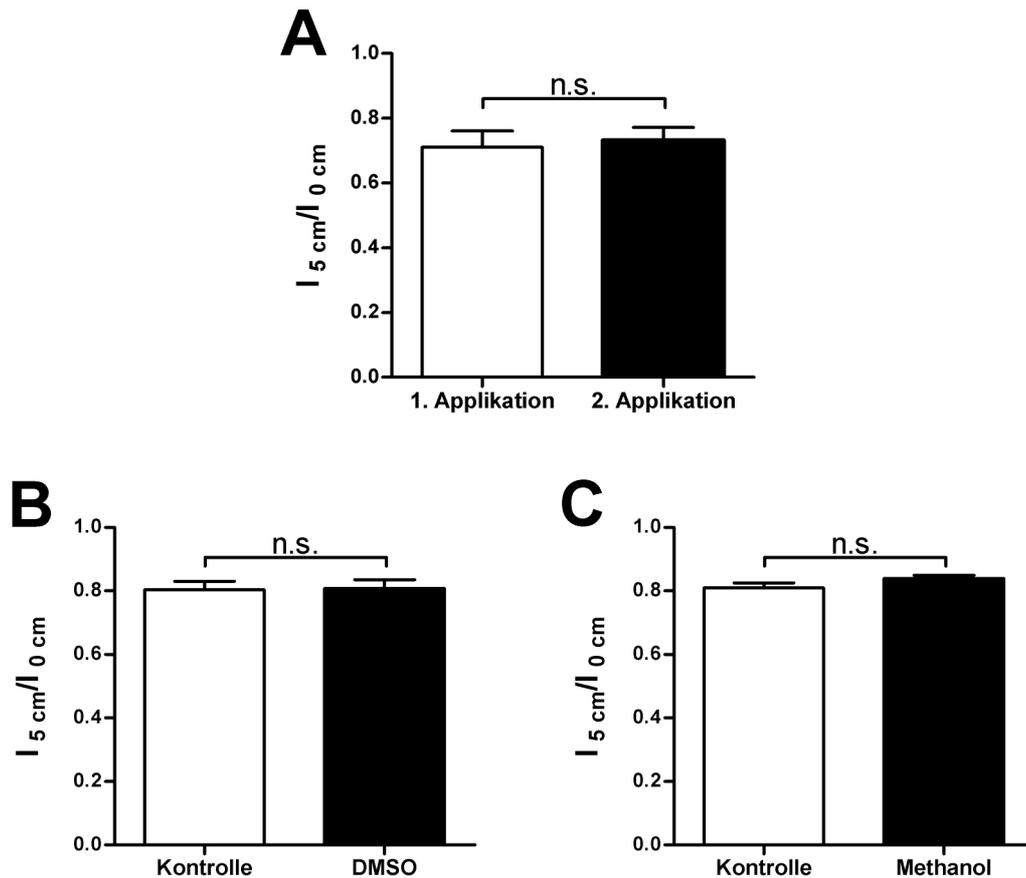


Abb. III-9: Wiederholbarkeit des Druckeffekts und Einfluss von Lösungsmitteln.

Dargestellt ist das Verhältnis des Stroms unter Druck ($I_{5\text{ cm}}$) in Bezug zum Ausgangsplateau vor Druckeinwirkung ($I_{0\text{ cm}}$). (A) Die Druck-induzierte Strominhibition erwies sich als wiederholbar. Die Größe der Strominhibition änderte sich nach zweimaliger Applikation nicht ($n = 11$). Die Lösungsmittel (B) Dimethylsulfoxid (DMSO, $n = 5$) und (C) Methanol ($n = 7$) hatten keinen Einfluss auf die Höhe des Druckeffekts. Kontrolle: ohne Lösungsmittel.

III.3 Bestimmung von extrazellulärem ATP

In diversen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass eine mechanische Stimulation von Zellen oder Geweben zu einer Freisetzung von ATP führt (Homolya *et al.* 2000; Maroto & Hamill 2001; Knight *et al.* 2002; Patel *et al.* 2005). Da Fronius *et al.* (2004) zeigen konnten, dass extrazelluläre Nukleotide regulatorisch auf den Ionentransport an der *Xenopus* Lunge wirken, sollte in den folgenden Versuchen der Frage nachgegangen werden, ob Druckapplikation auch an der Froschlunge eine ATP Freisetzung bedingte. Extrazelluläres ATP wurde dazu mittels eines bioluminometrischen Assays nachgewiesen. Hier machte man sich die Enzymreaktion von Luciferase mit Luciferin zu nutze, die nur in Gegenwart von ATP abläuft und dann zu einer Lichtemission führt. Dazu wurde die ATP-Konzentration in der aus der Kammer austretenden Perfusionslösung vor, während und nach Druckapplikation erfasst

(**Abb. III-10**). Unmittelbar nach mechanischer Reizung konnte ein Anstieg des ATP Gehalts in der apikalen Perfusionslösung detektiert werden. Es handelte sich dabei um einen transienten Effekt, der noch während der Druckeinwirkung ausklang. Die ATP-Konzentration der apikalen Perfusionslösung stieg dabei von einem Basiswert von 6 ± 2 nM auf 41 ± 17 nM an. Nach Beendigung der mechanischen Reizung und dem Einstellen eines erneuten Stromplateaus kehrte die ATP-Konzentration auf Werte zurück, die nicht signifikant verschieden waren von denjenigen vor Druckapplikation (4 ± 1 nM).

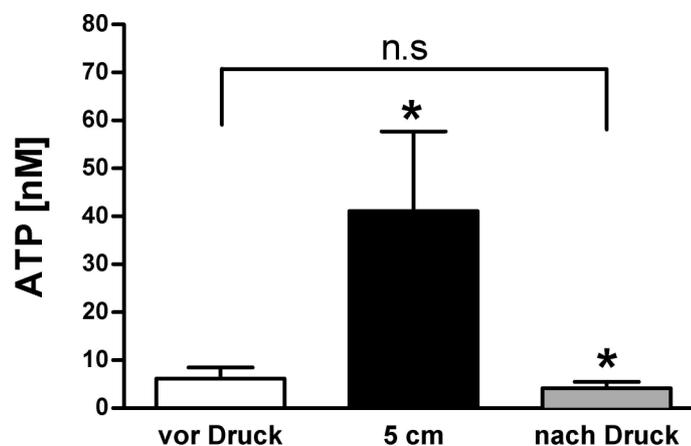


Abb. III-10: Mechanische Stimulation führte zu einer transienten Freisetzung von ATP. Unmittelbar nach Erhöhung des hydrostatischen Drucks auf der apikalen Gewebsseite (5 cm) konnte ein Anstieg der ATP-Konzentration in der apikalen Perfusionslösung festgestellt werden. Nach Wegnahme des Druckgradienten und Einstellen eines neuen Stromplateaus (nach Druck) erreichte die ATP-Konzentration wieder die Ausgangswerte ($n = 18$). *:signifikant verschieden vom vorherigen Wert; n.s.: nicht signifikant verschieden.

III.4 Pharmakologische Charakterisierung der Druck-induzierten Änderung des Kurschlussstroms

Die schnelle Reaktion auf mechanische Reizung in Form einer Änderung der elektrischen Eigenschaften des Gewebes machen eine Beteiligung von Ionenkanälen wahrscheinlich. Daher wurde in den folgenden Versuchsreihen der Einfluss unterschiedlicher Ionenkanal-Modulatoren auf den Druckeffekt untersucht. Die Messungen folgten dabei einem ähnlichen Protokoll. Zunächst wurde die Höhe der Druck-induzierten Strominhibition unter Kontrollbedingungen (NRS, wenn nicht anders vermerkt) bestimmt. Danach erfolgte eine Änderung der Versuchsbedingungen in Form von Pharmaka-Applikation oder Veränderung

der ionalen bzw. osmotischen Lösungszusammensetzung und der Druckeffekt wurde erneut bestimmt. Auf diese Weise wurden Wertepaare erhalten, die mit dem gepaarten t-Test hinsichtlich ihrer Signifikanz verglichen werden konnten.

III.4.1 Einfluss von Natrium-Kanalblockern

In verschiedenen Arbeiten wurde bereits beschrieben, dass der größte Teil des transepithelialen Stroms an der *Xenopus* Lunge Amilorid-sensitiv ist und damit als Strom durch apikale epitheliale Natriumkanäle (ENaCs) interpretiert werden kann (Fischer *et al.* 1989; Fischer & Clauss 1990; Kim 1990; Puoti *et al.* 1995; Baxendale-Cox 1999; Fronius *et al.* 2003; Fronius *et al.* 2004; Berk *et al.* 2004). Damit lag es nahe, zunächst die Beteiligung von Na⁺-Kanälen an der Druck-induzierten Strominhibition zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde in einer ersten Versuchsreihe die Perfusionslösung auf beiden Gewebseiten gegen eine Na⁺-freie Lösung (Na⁺ äquimolar substituiert durch NMDG⁺) ausgetauscht (**Abb. III-11**). Ein weiterer Ansatz war die Blockade apikaler epithelialer Na⁺ Kanäle durch den spezifischen Blocker Amilorid (10 µM). In beiden Fällen ergab sich zunächst eine deutliche Reduktion des Kurzschlussstroms. Wurde der Druckeffekt unter diesen Bedingungen mit demjenigen aus Kontrollmessungen verglichen, zeigte sich, dass die absolute Druck-induzierte Strominhibition deutlich geringer ausfiel. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der Druckeffekt von der Höhe des Ausgangsstroms (0 cm Wassersäule) abhängig sein kann. Das bedeutet, dass die Druck-induzierte Strominhibition umso kleiner ausfällt, je geringer der Ausgangstrom ist. Um diesen Überlegungen Rechnung zu tragen, wurde die Druck-induzierte Hemmung (I_{SC} bei 5 cm Wassersäule) mit dem Ausgangstrom unmittelbar vor der jeweiligen Druckapplikation (I_{SC} bei 0 cm Wassersäule) ins Verhältnis gesetzt. Ein Vergleich der prozentualen Inhibitionen ergab für die Applikation von 10 µM Amilorid keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Kontrollmessungen unter NRS. Ein ähnliches Resultat ergaben die Messungen mit Na⁺-freier Ringerlösung: auch hier war zwar die absolute Höhe der Druck-induzierten Strominhibition verringert. Wurde diese jedoch mit dem Ausgangstrom (0 cm Wassersäule) ins Verhältnis gesetzt, konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Kontrollmessungen unter NRS festgestellt werden.

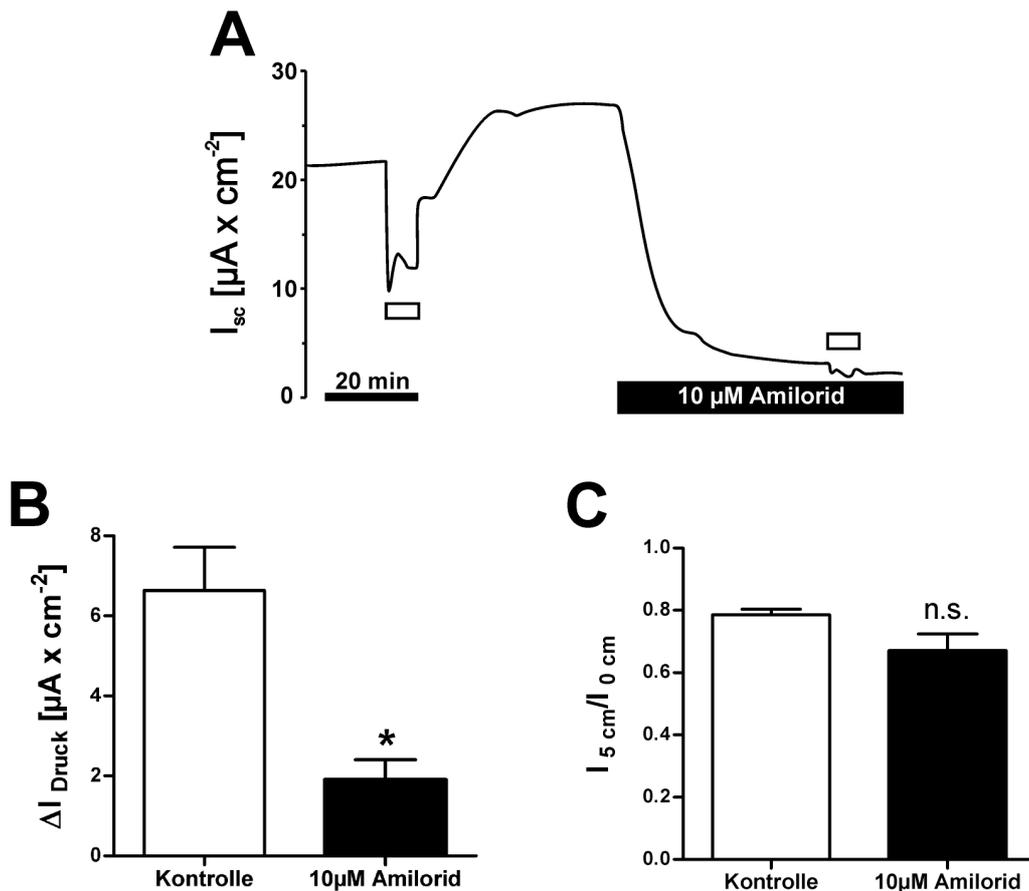


Abb. III-11: Einfluss von 10 μM Amilorid auf den Druckeffekt.

(A) In Gegenwart von 10 μM Amilorid (apikal) verändert eine Druckapplikation (weißer Balken) den Kurzschlussstrom (I_{sc}) weniger stark als unter Kontrollbedingungen. (B) Statistische Auswertung von 7 Versuchen. Aufgetragen ist die absolute Änderung des Stroms durch Erhöhung der apikalen Wassersäule auf 5 cm (ΔI_{Druck}). (C) Im Gegensatz zu (B) wurden hier die relativen Stromänderungen betrachtet. Der Strom während Druckapplikation (I_{5cm}) wurde dabei zum Strom unmittelbar vor Druckapplikation (I_{0cm}) ins Verhältnis gesetzt. Die relative Druck-induzierte Strominhibition wurde durch 10 μM Amilorid nicht beeinflusst. *: signifikant verschieden; n.s.: nicht signifikant verschieden.

Aufgrund mehrfacher Hinweise in der Literatur (Leffert *et al.* 1982; Briggman *et al.* 1983; Davis & Czech 1985; Kleyman & Cragoe 1988; David *et al.* 1993) wurde im Folgenden untersucht, ob eine Blockade der ENaCs Auswirkungen auf weitere Leitfähigkeiten mit sich bringt. Dazu wurde die Wirkung des Chlorid-Kanalblockers DIDS in An- und Abwesenheit von 10 μM Amilorid studiert. Es zeigte sich, dass die apikale Perfusion von 500 μM DIDS den I_{sc} in Abwesenheit von Amilorid signifikant um $5,81 \pm 0,80 \mu A$ ($n = 9$) inhibierte. Wurde das Gewebe jedoch zunächst mit 10 μM Amilorid perfundiert, resultierte die zusätzliche Applikation von DIDS in einer signifikant geringeren Strominhibition von lediglich $0,49 \pm 0,22 \mu A$ ($n = 6$, $p < 0,01$). Dies legt den Schluss nahe, dass die Behandlung mit 10 μM Amilorid nicht allein die Na^+ -Resorption durch ENaCs reduziert, sondern auch weitere Leitfähigkeiten im Lungenepithel von *Xenopus laevis* indirekt beeinflusst.

Eine anschließende Versuchsreihe zielte daher darauf ab, den ENaC-getragenen Stromfluss zu vermindern, ohne ihn jedoch komplett zu unterbinden. Experimente, bei denen die Na^+ -Konzentration der Perfusionslösung beidseitig von 100 mM Na^+ (Kontrollbedingungen) auf 25 bzw. 50 mM Na^+ reduziert wurde, zeigten eine deutlich verstärkte Druck-induzierte Strominhibition (**Abb. III-12**). Ein ähnliches Resultat zeigte sich nach apikaler Perfusion von 1 μM Amilorid. Auch hier war der Druckeffekt im Vergleich zu Kontrollmessungen (ohne Amilorid) stark vergrößert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Erhöhung des hydrostatischen Drucks die Na^+ -Reabsorption durch epitheliale Na^+ -Kanäle beeinflusst. Allerdings ist die Druck-induzierte Netto-Inhibition nicht auf den Rückgang der Na^+ -Reabsorption zurückzuführen, da ansonsten unter Amilorid-Perfusion ein Rückgang des Effekts zu erwarten gewesen wäre. Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich die Druck-induzierte Inhibition aus mehreren Komponenten zusammensetzt: neben Reaktionen, die offensichtlich zu einer Hemmung des I_{SC} führen, tritt auch eine Stimulation von ENaCs auf, die der hemmenden Komponente entgegenwirkt. Wird die ENaC-Stimulation durch 1 μM Amilorid partiell unterbunden, tritt die hemmende Komponente noch prominenter in Erscheinung.

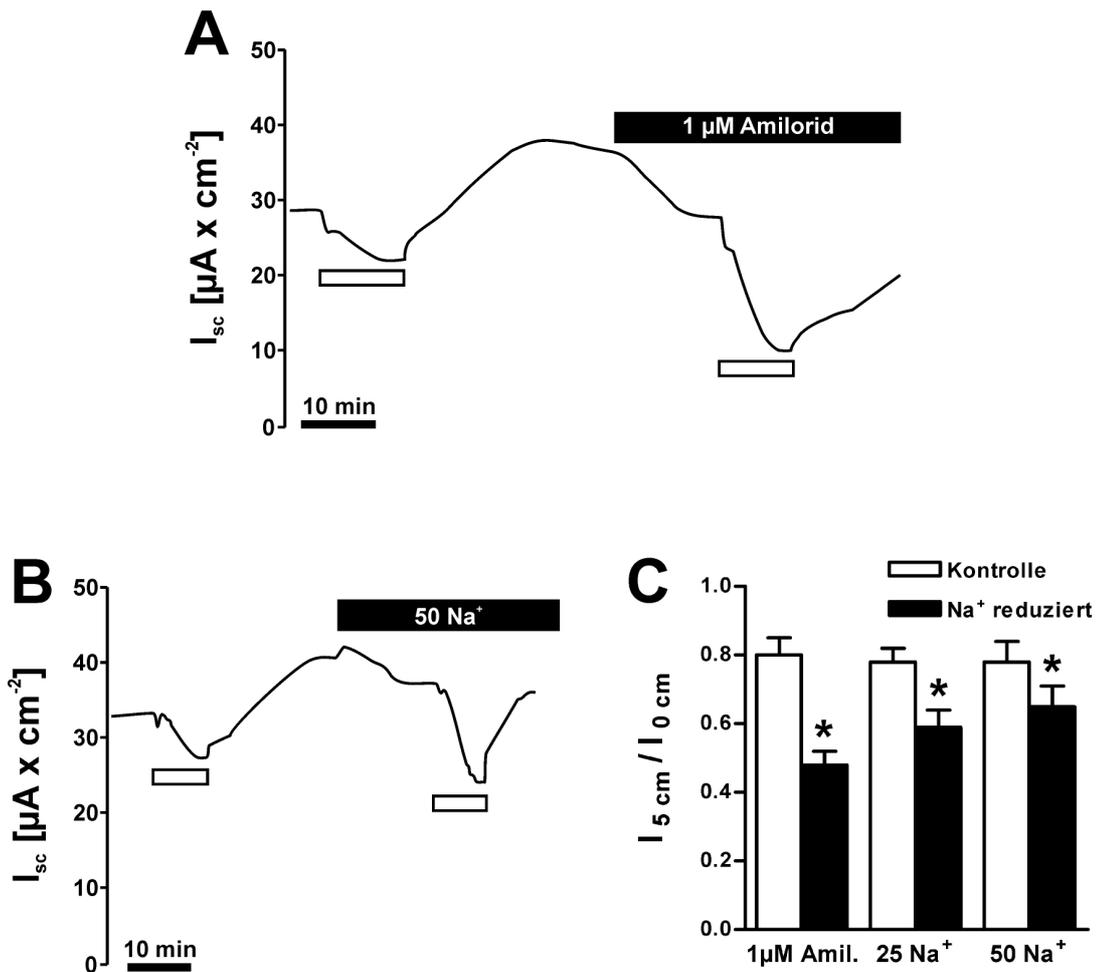


Abb. III-12: Einfluss einer reduzierten Na^+ -Leitfähigkeit auf den Druckeffekt.

(A) Die apikale Perfusion von 1 μM Amilorid inhibierte den Kurzschlussstrom um circa 50 %. Die Druck-induzierte Strominhibition (weißer Balken) fiel unter diesen Bedingungen deutlich stärker aus als unter Kontrollbedingungen (ohne Amilorid). (B) Eine Na^+ -reduzierte Perfusionslösung (50 Na^+) zeigte ein ähnliches Bild wie die Verwendung von 1 μM Amilorid. (C) Statistische Auswertung von 7 (1 μM Amilo sowie 25 Na^+) bzw. 8 (50 Na^+) Experimenten. 50 Na^+ = 50 mM Na^+ , 25 Na^+ = 25 mM Na^+ . Na^+ wurde äquimolar durch $NMDG^+$ substituiert. *: signifikant verschieden von den jeweiligen Kontrollmessungen.

III.4.2 Einfluss von Chlorid-Kanalblockern

Untersuchungen an Na^+ -Leitfähigkeiten zeigten, dass es durch mechanische Reizung zu einer verstärkten Na^+ -Resorption kam. Eine Erhöhung der Na^+ -Resorption alleine würde sich allerdings als Stromstimulation bemerkbar machen. Damit können Na^+ -Kanäle nicht ursächlich für die beobachtete Druck-induzierte Strominhibition sein. Neben einer ausgeprägten Na^+ -Leitfähigkeit verfügt die *Xenopus* Lunge desweiteren über Cl^- sekretierende Eigenschaften (Fronius *et al.* 2004; Sommer *et al.* 2007). Da sich eine Verminderung der Chlorid-Sekretion in einer Hemmung des I_{SC} auswirken würde, wurde in den folgenden

Experimenten eine Beteiligung von Chlorid-Kanälen an der Vermittlung des Druckeffekts untersucht. In Gegenwart der Chlorid-Kanalblocker NFA (250 μM bzw. 500 μM) und DIDS (500 μM) im apikalen Kammerkompartiment fiel die Druck-induzierte Strominhibition deutlich stärker aus als unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmaka) (**Abb. III-13, Abb. III-14**). Damit kann die Hemmung des I_{SC} während der Druckapplikation nicht auf einen Rückgang der Chlorid-Sekretion zurückgeführt werden. Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine mechanische Reizung des Epithels zu einer verstärkten Sekretion von Chlorid - und damit zu einer Stimulation des I_{SC} - führt. Wird die stimulatorische Chlorid-Sekretion geblockt, so fällt die Strominhibition stärker aus als unter Kontrollbedingungen.

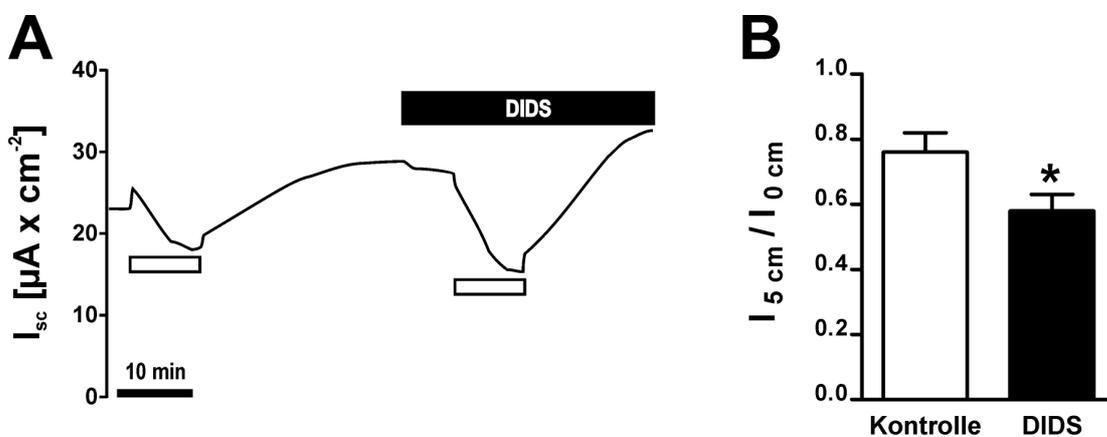


Abb. III-13: Die apikale Perfusion von 500 μM DIDS vergrößert den Druckeffekt.

(A) Die Applikation von DIDS bewirkte eine Hemmung des Kurzschlussstroms (I_{SC}). Eine darauffolgende Erhöhung des hydrostatischen Drucks in der apikalen Kammerhälfte um 5 cm ließ den I_{SC} stärker sinken als unter Kontrollbedingungen (ohne DIDS). (B) Statistische Auswertung von 7 Experimenten. *: signifikant verschieden von den Kontrollen.

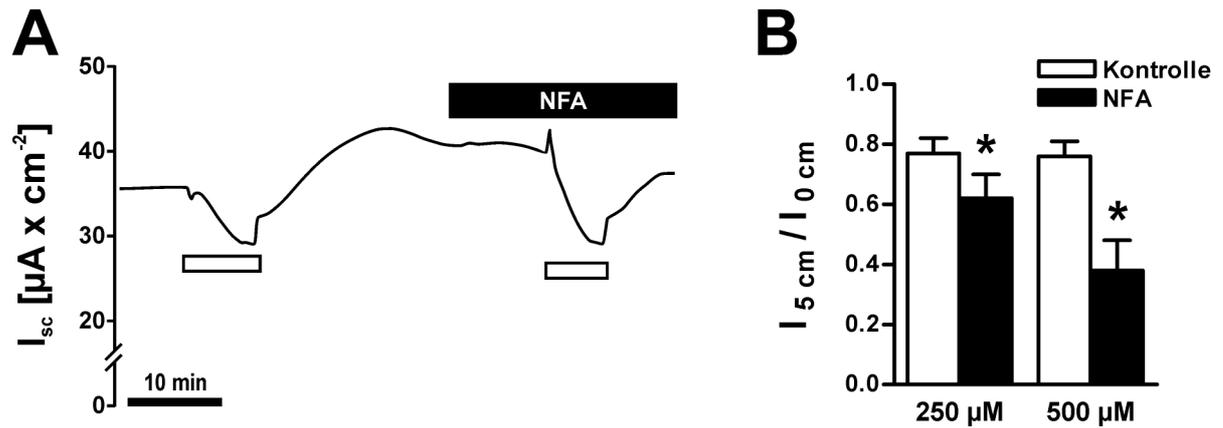


Abb. III-14: Einfluss einer apikalen Perfusion des Chlorid-Kanalblockers NFA auf den Druckeffekt. (A) Die Applikation von 250 μM NFA inhibierte den Kurzschlussstrom (I_{sc}) und führte zu einer Verstärkung des Druckeffekts (weißer Balken) im Vergleich zu Kontrollbedingungen. (B) Statistische Auswertung von 9 (250 μM) bzw. 4 (500 μM) Versuchen. *: signifikant verschieden von den jeweiligen Kontrollversuchen.

Zur weiteren Überprüfung eines Chloridausstroms wurden Versuche mit Chlorid-freier apikaler Perfusionslösung durchgeführt (**Abb. III-15**, Cl^- äquimolar substituiert durch Gluconat). Es zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen die Hemmung des I_{sc} durch mechanische Reizung geringer ausfiel als in den Kontrollen (Cl^- haltige Perfusionslösung). Dies bekräftigt die bisherigen Ergebnisse, dass es durch Druckeinwirkung unter anderem zu einer Aktivierung apikaler Chlorid-Leitfähigkeiten kommt: unter Chlorid-freien Bedingungen wird die elektrochemische Triebkraft für einen Chlorid-Ausstrom erhöht. Kommt es durch Druckapplikation zu einer Aktivierung apikaler Chlorid-Leitfähigkeiten, so strömt unter Chlorid-freien Bedingungen mehr Chlorid aus als in den Kontrollversuchen (Chlorid-haltige Lösung). Da die Sekretion von Chlorid eine Stimulation des I_{sc} bedingt, wird die Druck-induzierte Strominhibition auf diese Weise abgeschwächt.

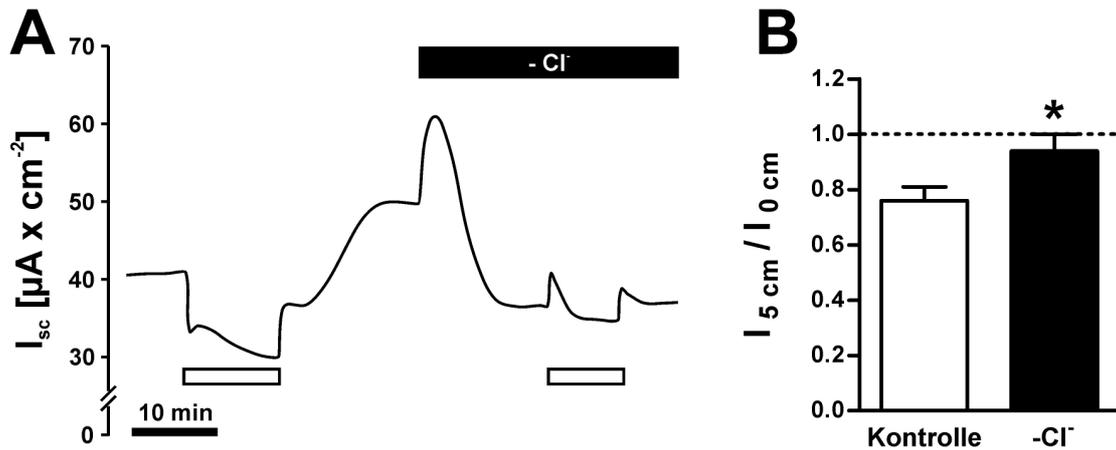


Abb. III-15: Die apikale Substitution von Chlorid durch Gluconat verminderte den Druckeffekt. (A) Der Kurzschlussstrom (I_{sc}) wurde durch Druckerhöhung (weißer Balken) in apikal Chlorid-freier Perfusionslösung (-Cl⁻) weniger stark inhibiert als in Chlorid-haltiger Lösung. (B) Statistische Auswertung von 6 Experimenten. *: signifikant verschieden von den Kontrollversuchen.

Zur weiteren Spezifizierung der beteiligten Chlorid-Kanäle wurden Versuche mit dem Inhibitor Tamoxifen durchgeführt, der von einigen Arbeitsgruppen als Blocker von Volumensensitiven Chlorid-Leitfähigkeiten beschrieben wurde (Voets *et al.* 1995; Chen *et al.* 2004; Coelho *et al.* 2004). Eine Applikation von 50 μM Tamoxifen, was der maximal löslichen Konzentration in NRS mit 0,1 % DMSO entsprach, zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf den Druckeffekt. Die Erhöhung des hydrostatischen Drucks hemmte den I_{sc} in Kontrollversuchen auf 80 ± 3 %, während es in Gegenwart von Tamoxifen zu einer Hemmung auf 85 ± 3 % kam ($n = 5$; $p = 0,29$).

III.4.3 Einfluss von Kalium-Kanalblockern

Da die Verminderung des I_{sc} unter Druckeinwirkung weder durch die Inhibition von Na^+ -Leitfähigkeiten noch durch die von Chlorid-Kanälen erklärt werden konnte, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob es zu einer Aktivierung apikaler K^+ -Kanäle kam. Eine Sekretion von Kalium über die apikale Membran würde einen Rückgang des I_{sc} bedingen und könnte damit die Netto-Inhibition des Stroms unter Druckeinwirkung erklären.

Eine zusammenfassende Auflistung der Einflüsse der untersuchten K^+ -Kanalmodulatoren ist in **Tab. III-5** (Seite 74) dargestellt.

Ba²⁺

Zunächst wurde Barium als unspezifischer K^+ -Kanalblocker eingesetzt. Diverse Arbeiten zeigen, dass die hemmende Wirkung von Ba^{2+} auf K^+ -Kanäle lediglich bei sehr hohen

Konzentrationen auftritt (Segal & Reuss 1990; Ridge *et al.* 1997). In den folgenden Versuchen wurden daher 10 mM $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ eingesetzt (**Abb. III-16**). Da dies mit einer deutlichen Erhöhung der Lösungsosmolarität einhergeht, wurde der Druckeffekt unter Kontrollbedingungen in Gegenwart von 30 mM Mannitol gemessen. Der Druckeffekt fiel unter diesen Kontrollbedingungen (30 mM Mannitol) mit einer Hemmung auf $55 \pm 5 \%$ ($n = 11$) des Ausgangsstroms sehr hoch aus (siehe dazu auch Abschnitt III.5: Einfluss der Lösungsosmolarität, Seite 82). Eine darauffolgende Applikation von 10 mM $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ auf der apikalen Seite beeinflusste den Strom nicht signifikant. Dabei ist allerdings festzuhalten, dass es durch Ba^{2+} -Perfusion in jedem der elf durchgeführten Experimente zunächst zu einer Stromstimulation kam, die allerdings in vier Experimenten lediglich transient war und daher ein p-Wert von 0,176 resultierte. Der Druckeffekt in Gegenwart von Ba^{2+} fiel mit $98 \pm 7 \%$ jedoch signifikant geringer aus als in den osmotisch kompensierten Kontrollversuchen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Druck-induzierte Hemmung des I_{SC} durch eine apikale K^+ -Sekretion hervorgerufen wird.

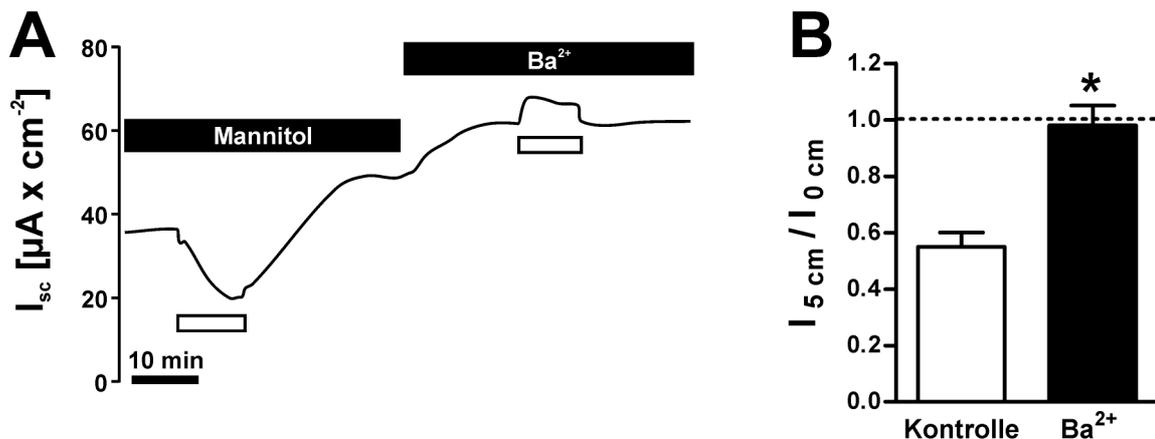


Abb. III-16: Druckeffekt während Ba^{2+} Applikation.

Die apikale Perfusion von 10 mM Ba^{2+} führte zu einer starken Beeinflussung des Druckeffekts im Vergleich zu Kontrollmessungen, in denen $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ durch 30 mM Mannitol substituiert wurde. Durch die Substitution wurde eine gleichbleibende Osmolarität gewährleistet. (B) Statistische Auswertung von 11 Experimenten. *: signifikant verschieden von den Kontrollversuchen.

Hoch- K^+ -Bedingungen und Permeabilisierung der apikalen Membran

Um die Hypothese eines apikalen K^+ -Ausstroms weiter zu eruieren wurden Versuche durchgeführt, in denen die K^+ -Konzentration der apikalen Perfusionslösung erhöht wurde (**Abb. III-17**). Dadurch wurde die elektrochemische Triebkraft für eine K^+ -Sekretion

vermindert, was in einem verringerten Druckeffekt resultieren sollte. Die Höhe der Druck-induzierten Strominhibition wurde dazu unter Hoch-K⁺ Lösung gemessen, bei der 50 mM Na⁺ gegen K⁺ ausgetauscht wurden. Da eine Reduktion in der Na⁺-Konzentration die Höhe des Druckeffekts beeinflusst (siehe Abschnitt III.4.1 (Seite 56)), wurde als Perfusionslösung für die Kontrollmessungen 50 Na⁺ (siehe **Tab. II-7**, Seite 40) verwendet. Mit dieser Versuchsanordnung wurde gewährleistet, dass die K⁺-Konzentration den einzigen veränderten Parameter im Vergleich zu den Kontrollen darstellte.

Wie zu erwarten wurde in dieser Versuchsanordnung der Strom durch Druckeinwirkung unter Kontrollbedingungen zunächst stark inhibiert (auf 67 ± 5 % des Ausgangswertes, $n = 5$). Eine anschließende Perfusion von Hoch-K⁺ Lösung und die darauffolgende Erhöhung der Wassersäule resultierte jedoch nicht, wie unter Kontrollbedingungen, in einer Inhibition des I_{SC} , sondern stimulierte den Strom signifikant auf 110 ± 3 % des Ausgangswertes. Da Hoch-K⁺ Lösung lediglich apikal perfundiert wurde, wäre es möglich, dass es unter Druck zu einer vermehrten parazellulären Durchlässigkeit des Epithels kommt und K⁺ damit passiv dem Diffusionsgradienten folgt. Um diese Möglichkeit weiter zu beleuchten wurde in den beschriebenen Versuchen Hoch-K⁺ auch beidseitig perfundiert. Eine anschließende Druckapplikation resultierte allerdings erneut, wie bereits unter apikalen Hoch-K⁺-Bedingungen, in einer Stimulation des I_{SC} .

Die erhaltenen Ergebnisse sprechen für eine Erhöhung der transzellulären K⁺-Leitfähigkeit und einer damit einhergehenden apikalen K⁺ Sekretion als Folge der Druckeinwirkung.

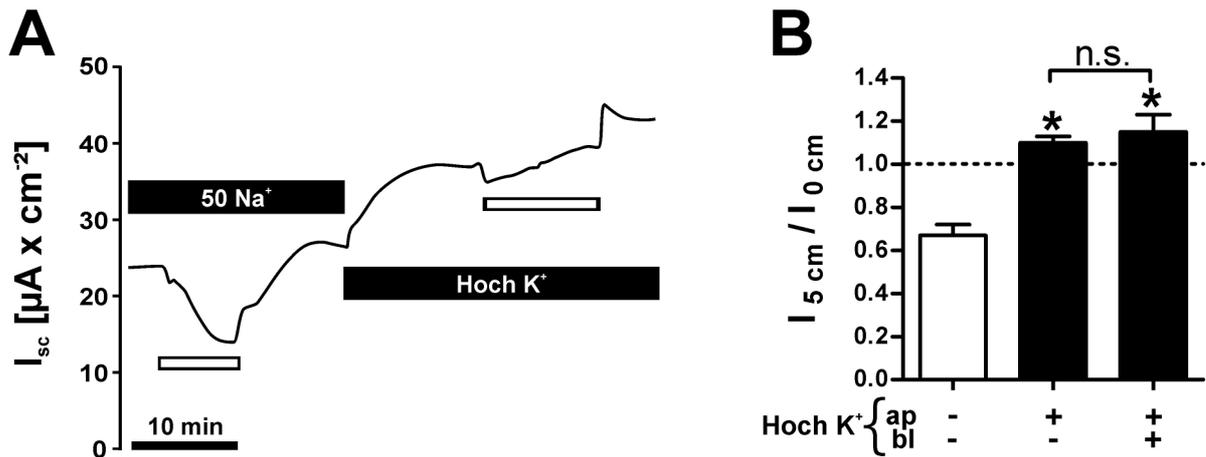


Abb. III-17: Druckeffekt unter Hoch-K⁺ Bedingungen.

(A) Wurde das Gewebe apikal mit einer 53 mM K⁺ haltigen Lösung (Hoch-K⁺) perfundiert, so fiel der Druckeffekt (weißer Balken) deutlich geringer aus als in den jeweiligen Kontrollmessungen (50 Na⁺). Für die Kontrollen wurde eine Lösung von 50 mM Na⁺, 50 mM NMDG⁺ und 3 mM K⁺ verwendet. In der Hoch-K⁺ Lösung wurde NMDG⁺ durch K⁺ substituiert, so dass die Na⁺-Konzentration und die Osmolarität im Vergleich zu den Kontrollen unverändert blieben. (B) Statistische Auswertung von fünf Experimenten. Um die Möglichkeit eines gesteigerten parazellulären K⁺ Transports zu untersuchen, wurde die Hoch-K⁺ Lösung sowohl apikal als auch beidseitig des Gewebes appliziert und der Druckeffekt bestimmt. Es zeigte sich, dass eine beidseitige Applikation den Druckeffekt im Vergleich zu einer apikalen Gabe nicht weiter veränderte. (ap: apikal; bl: basolateral). *: signifikant verschieden von den Kontrollversuchen (50 Na⁺).

Weitere Hinweise bezüglich einer Druck-induzierten Öffnung von K⁺-Kanälen wurden erhalten, in dem die apikale Membran des Lungenpräparats durch den Porenbildner Nystatin permeabilisiert wurde und anschließend ein K⁺-Gradient (apikal K⁺-Lösung, bei der Na⁺ äquimolar durch K⁺ substituiert wurde; basolateral NRS) angelegt wurde (**Abb. III-18**). Die Permeabilisierung des Epithels bewirkte, dass K⁺ ungehindert die apikale Membran passieren konnte. Somit ist es möglich, die basolaterale Membran isoliert zu untersuchen, da sie nach Permeabilisierung die hauptsächliche Barriere für den transepithelialen K⁺-Strom darstellt (Illek *et al.* 1990). Erwartungsgemäß war nach der Permeabilisierung und dem Anlegen eines K⁺-Konzentrationsgradienten über dem Epithel ein starker Anstieg des I_{SC} zu verzeichnen. Dies steht im Einklang mit einem K⁺-Strom von apikal nach basolateral. Wurde nun unter diesen Bedingungen der hydrostatische Druck erhöht, war eine tendenzielle Stimulation des I_{SC} auf 138 ± 17 % zu beobachten (p = 0,053, n = 10, Einstichproben t-Test). Das Ergebnis lässt sich mit der Stimulation basolateraler K⁺-Kanäle oder mit der Stimulation einer Chlorid-Sekretion erklären. Zur Überprüfung wurde in fünf Versuchen Ba²⁺ perfundiert. Entgegen der Erwartungen wurde der Großteil des I_{SC} bereits nach apikaler Gabe des K⁺-Kanalbrowsers gehemmt. Eine zusätzliche basolaterale Applikation reduzierte den Kurzschlussstrom nur noch minimal. Dies legt nahe, dass Ba²⁺ auch bei apikaler Applikation basolaterale

K^+ -Leitfähigkeiten beeinflussen kann: entweder erreicht es seinen Wirkort durch parazelluläre Permeation, oder das Ion ist membrangängig und wirkt von intrazellulär. Unabhängig von ihrem Zustandekommen wirkte sich die Blockade basolateraler K^+ -Kanäle auf den Druckeffekt aus. In Anwesenheit von Ba^{2+} war die Druck-induzierte Stromstimulation nicht mehr zu beobachten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch hydrostatischen Druck neben apikalen auch basolaterale K^+ -Kanäle stimuliert werden.

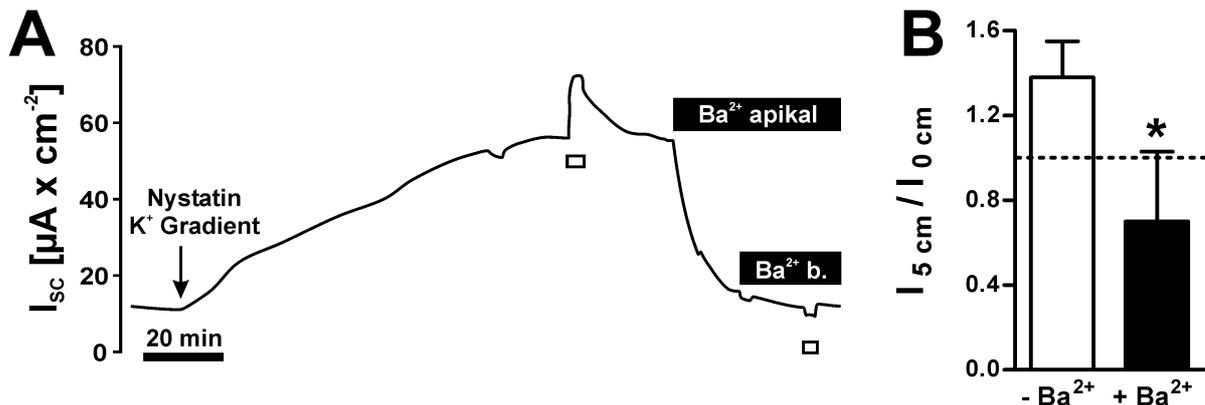


Abb. III-18: Druckeffekt nach Permeabilisierung der apikalen Membran durch Nystatin und Anlegen eines transepithelialen K^+ Gradienten.

(A) Unter den genannten Bedingungen war durch Druckapplikation (weißer Balken) eine Netto-Stimulation des Kurzschlussstroms (I_{sc}) zu verzeichnen. Eine nachfolgende apikale Gabe von 5 mM $Ba(NO_3)_2$ resultierte in einer starken Strominhibition, die durch die nachfolgende beidseitige Ba^{2+} Applikation nur noch gering verstärkt wurde. Erfolgte unter diesen Bedingungen eine mechanische Reizung des Gewebes, war keine Stromstimulation (wie in Abwesenheit von Ba^{2+}) mehr zu verzeichnen. (B) Statistische Auswertung von zehn ($- Ba^{2+}$) bzw. fünf ($+ Ba^{2+}$) Messungen. K^+ Gradient: apikal K^+ -Lösung, basolateral NRS; b.: basolateral; *signifikant verschieden von den Kontrollversuchen ($- Ba^{2+}$).

Blocker von 2-Poren-Domänen- K^+ -Kanälen

Aus den bislang geschilderten Ergebnissen kann auf eine Druck-induzierte Stimulation von K^+ -Kanälen geschlossen werden. In diversen Arbeiten wurde bereits die Existenz mechanisch regulierter K^+ -Kanäle nachgewiesen, welche zur Familie der 2-Poren-Domänen- K^+ -Kanäle (2P- K^+ -Kanäle) gehören (Maingret *et al.* 1999; Maingret *et al.* 2000; O'Connell *et al.* 2002; Takahira *et al.* 2005). Innerhalb dieser Genfamilie sind einige Vertreter direkt mechanisch aktivierbar (TREK: Bang *et al.* 2000 und TRAAK: Maingret *et al.* 1999), andere gelten als osmotisch reguliert (TASK2: Niemeyer *et al.* 2001). Zur Untersuchung dieser Kanäle wurden die Pharmaka Quinin sowie Clofilium und Bupivacain eingesetzt (Davis & Cowley 2006). Letzteres gilt in der Literatur als spezifischer Inhibitor von 2P- K^+ -Kanälen (O'Connell *et al.* 2002; Davis & Cowley 2006; Inglis *et al.* 2007).

Nach apikaler Applikation von Quinin und Bupivacain kam es zunächst zu einer deutlichen Verringerung des I_{SC} (**Abb. III-19**). Die Perfusion von Clofilium zeigte eine uneinheitliche Auswirkung auf den Kurzschlussstrom: in einigen Messungen war auch hier ein Stromrückgang zu verzeichnen, der sich allerdings im Mittel als statistisch nicht signifikant erwies ($p = 0,19$; $n = 6$). Allen drei Versuchsreihen gemeinsam war jedoch, dass eine Druckapplikation unter Pharmaka-Einfluss zu einer Strominhibition führte, die jeweils größer ausfiel als in den gepaarten Kontrollmessungen. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass $2P-K^+$ -Kanäle am Druckeffekt beteiligt sind, jedoch nicht die apikale K^+ -Sekretion vermitteln, welche für die Strominhibition ursächlich ist. Vielmehr könnten $2P-K^+$ -Kanäle basolateral lokalisiert sein und dort K^+ in das basolaterale Kompartiment leiten. Da der basolaterale K^+ -Ausstrom eine wichtige Triebkraft für die apikale Chlorid-Sekretion darstellt (Cowley & Linsdell 2002), könnte die Blockade von basolateralen $2P-K^+$ -Kanälen in einer verminderten apikalen Chlorid-Leitfähigkeit resultieren.

Diese Überlegung wird durch Versuche gestützt, in denen der Effekt von Bupivacain auf den Chlorid-Strom untersucht wurde. Die apikale Perfusion von $500 \mu M$ des Chlorid-Kanalblocker DIDS allein hemmte den I_{SC} signifikant (auf $88 \pm 2 \%$, $n = 7$). Wurde jedoch zunächst 1 mM Bupivacain apikal perfundiert, konnte durch die zusätzliche Applikation von DIDS kein signifikanter Effekt mehr erzielt werden ($94 \pm 6 \%$, $p = 0,44$; $n = 4$). Die Ergebnisse zeigen, dass der apikale Chlorid-Ausstrom durch Bupivacain gehemmt wird.

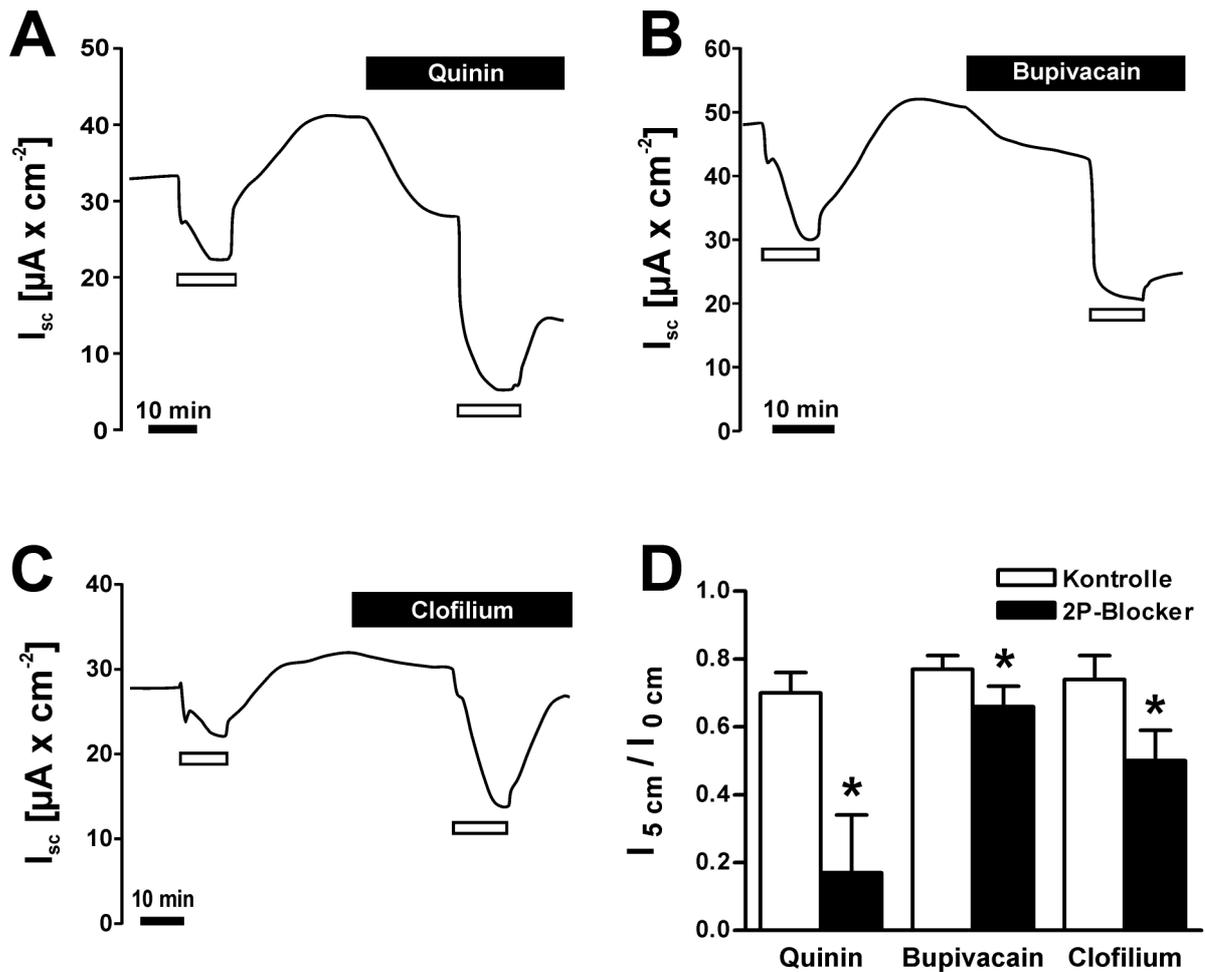


Abb. III-19: Verstärkung der Druck-induzierten Strominhibition nach Blockade von 2-Poren-Domänen K⁺-Kanälen (2-P).

Sowohl die apikale Applikation von 500 μM Quinin (A) als auch diejenige von 1 mM Bupivacain (B) und 200 μM Clofilium (C) führten zu einem stärkeren Druckeffekt (weißer Balken) als unter Kontrollbedingungen. (D) Statistische Auswertung von 7 (Quinin), 8 (Bupivacain) bzw. 6 (Clofilium) Experimenten. *: signifikant verschieden vom jeweiligen Kontrollwert.

Einfluss Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanäle

Nachdem festgestellt wurde, dass Inhibitoren von 2P-K⁺-Kanälen die Druck-induzierte Strominhibition nicht hemmten sondern verstärkten, wurde der Fokus auf Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle gelegt. Es ist bekannt, dass eine mechanische Stimulation in verschiedenen Zellen und Geweben zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) führt (Hansen *et al.* 1993; Boitano *et al.* 1994; Felix *et al.* 1998; Saitou *et al.* 2000). Dies bewirkt in einem nächsten Schritt die Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Kanäle, darunter auch K⁺-Kanäle. Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle sind ubiquitär verbreitet. Bislang wurden 5 Mitglieder beschrieben, die sich hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit sowie ihrer Ca²⁺-Sensitivität unterscheiden lassen. In Epithelien findet man vorwiegend KCNN4, auch bekannt als IK (*intermediate conductance*

Ca^{2+} activated K^+ channel) (Joiner *et al.* 1997; Jensen *et al.* 2001; Wang *et al.* 2003b). Ein selektiver Blocker von KCNN4 ist Clotrimazol (Alvarez *et al.* 1992; Wulff *et al.* 2001; Wilson *et al.* 2006). Die apikale Perfusion von 50 μ M Clotrimazol reduzierte die Druck-induzierte Strominhibition von $75 \pm 4 \%$ ($n = 9$) in Kontrollmessungen (ohne Clotrimazol) auf $92 \pm 3 \%$ in Gegenwart des Pharmakons (**Abb. III-20**). Dies spricht dafür, dass es durch mechanische Reizung zu einer Aktivierung von apikal lokalisierten Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen kommt, die unter basalen Bedingungen geschlossen sind.

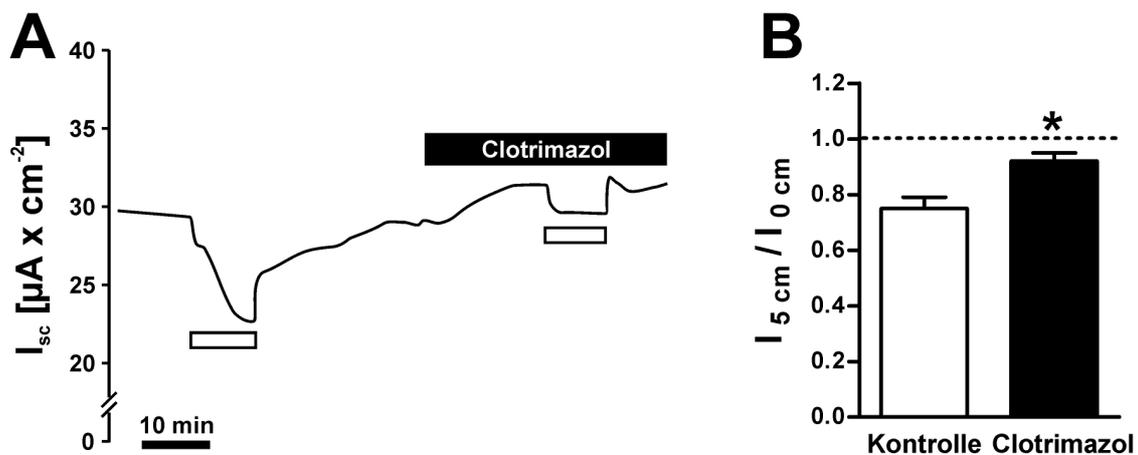


Abb. III-20: Verminderung der Druck-induzierten Inhibition des Kurzschlussstroms (I_{sc}) durch Clotrimazol.

(A) 50 μ M Clotrimazol in der apikalen Perfusionslösung verminderten die Druck-induzierte Strominhibition (weißer Balken) im Vergleich zu Kontrollmessungen. (B) Statistische Auswertung von 9 Versuchen. *: signifikant verschieden von den Kontrollmessungen.

Messungen im *current clamp* Modus konnten dieses Ergebnis bestätigen (**Abb. III-21**). Hier zeigte sich, dass eine Druck-Applikation unter Kontrollbedingungen (ohne Clotrimazol) die transepitheliale Potenzialdifferenz auf $70 \pm 6 \%$ ($n = 6$) des Ausgangswertes verminderte. In Anwesenheit von Clotrimazol hatte eine mechanische Reizung einen signifikant geringeren Einfluss und verminderte V_t auf lediglich $89 \pm 4 \%$ des Wertes vor Druckapplikation.

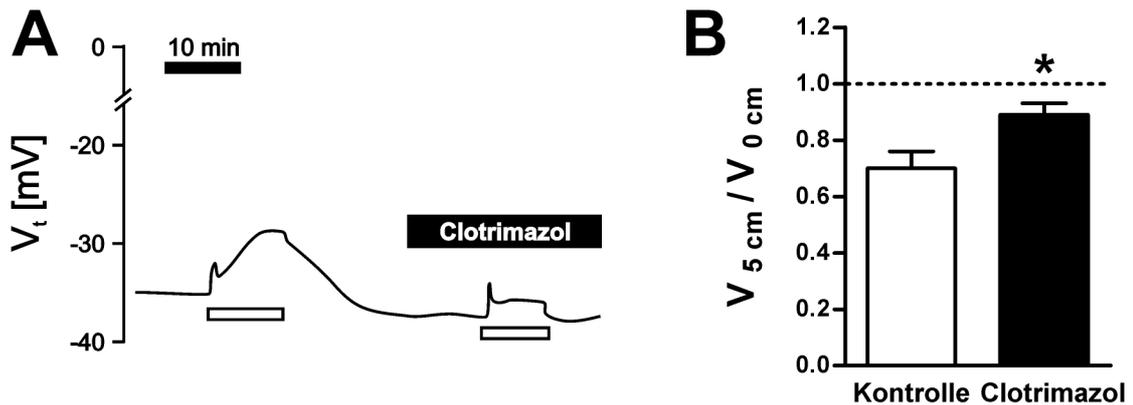


Abb. III-21: Inhibition des Druckeffekts durch Clotrimazol unter *current clamp* Bedingungen. (A) Die Erhöhung des hydrostatischen Drucks (weißer Balken) in der apikalen Kammerhälfte führte zu einer Verminderung der transepithelialen Potenzialdifferenz. Dieser Effekt war in Gegenwart von 50 μM Clotrimazol auf der apikalen Gewebssseite deutlich schwächer ausgeprägt. (B) Statistische Auswertung von 6 Versuchen. *: signifikant verschieden von den Kontrollmessungen.

Clotrimazol gehört zur Wirkstoffgruppe der Imidazole. Weitere Vertreter dieser Substanzklasse, wie Econazol und TRAM-34, wurden ebenfalls als Blocker Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle beschrieben (Alvarez *et al.* 1992) und daher auch in dieser Arbeit verwendet. Im Gegensatz zu Clotrimazol konnte der Druckeffekt weder durch Applikation von 50 μM Econazol noch von 50 μM TRAM-34 beeinflusst werden (Abb. III-22).

Um weitere Hinweise auf die Beteiligung Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle zu erlangen, wurden Versuche mit Peptid-Inhibitoren durchgeführt. Für K^+ -Kanäle sind einige hochspezifische Toxine bekannt, die aus Giften von Skorpionen, Bienen oder Schlangen isoliert wurden und bereits in nanomolaren Konzentrationen wirksam sind. In dieser Arbeit wurden Apamin als Blocker von SK1, SK2 und SK3 (Grunnet *et al.* 2001) sowie Charybdotoxin als Blocker von IK und BK (Vergara *et al.* 1998) eingesetzt. Die apikale Perfusion von 1 μM Apamin zeigte weder einen Einfluss auf den Grundstrom noch auf die Höhe der Druck-induzierten Strominhibition. Auch bei Charybdotoxin (200 nM) konnte keine signifikante Wirkung festgestellt werden (Abb. III-22).

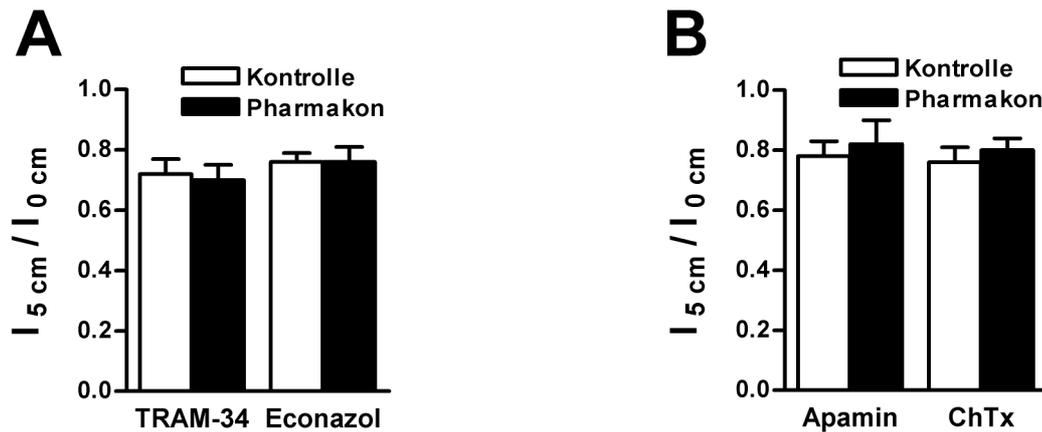


Abb. III-22: Einfluss von Blockern Ca^{2+} aktivierter K^+ -Kanäle.

(A) Die Peptidblocker Apamin ($1 \mu\text{M}$) und Charybdotoxin (ChTx, 200 nM) hatten keinen Einfluss auf die Größe der Druck-induzierten Strominhibition (jeweils $n = 5$). (B) Auch die Clotrimazol-Analoga TRAM-34 ($50 \mu\text{M}$) und Econazol ($50 \mu\text{M}$) konnten den Druckeffekt im Vergleich zu Kontrollmessungen nicht verändern ($n = 5$ für TRAM 34; $n = 6$ für Econazol).

Letztlich wurden Versuche unternommen, den Druckeffekt durch gezielte pharmakologische Aktivierung Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle zu beeinflussen. Dazu wurde das Gewebe apikal mit $500 \mu\text{M}$ Chlorzoxazon behandelt, welches bereits als Aktivator von KCNN4 beschrieben wurde (Singh *et al.* 2000; Syme *et al.* 2000; Jensen *et al.* 2001). Unter Chlorzoxazon allein kam es zunächst zu einer Stromstimulation auf $131 \pm 6 \%$ ($n = 7$) des Ausgangswertes (**Abb. III-23**). Wurde dann zusätzlich Druck appliziert, so zeigte sich keine signifikante Änderung im I_{SC} ($101 \pm 5 \%$ des Ausgangswertes), wohingegen unter Kontrollbedingungen (ohne Chlorzoxazon) eine Strominhibition auf $69 \pm 5 \%$ zu verzeichnen war. Wenn also Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle bereits durch Chlorzoxazon aktiviert wurden, so kann durch Druckapplikation keine zusätzliche Aktivierung erfolgen.

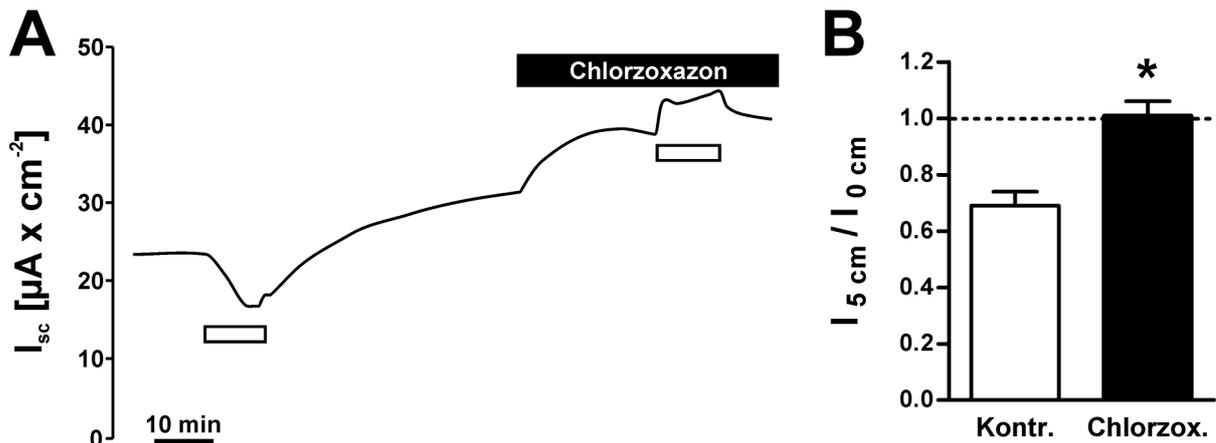


Abb. III-23: Einfluss von Chlorzoxazon auf den Druckeffekt.

(A) Die apikale Perfusion von 500 μM Chlorzoxazon beeinflusste die Druck-induzierte Strominhibition (weißer Balken). In dem dargestellten Beispiel folgte auf Druckapplikation unter Chlorzoxazon eine Nettostimulation des Kurzschlussstroms (I_{sc}). (B) Statistische Auswertung von 7 Experimenten. Kontr.: Kontrolle; Chlorzox.: Chlorzoxazon. *: signifikant verschieden von den Kontrollmessungen.

Zusammengenommen ergibt sich für die Untersuchung Ca^{2+} -aktivierter K^{+} -Kanäle ein heterogenes Bild: während die Druck-induzierte Strominhibition eindeutig durch Applikation von Clotrimazol und Chlorzoxazon verringert werden konnte, zeigten andere Imidazol-Derivate (Econazole, TRAM-34) sowie Peptid-Blocker (Apamin, Charybdotoxin) keine signifikante Wirkung.

Glibenclamid als Blocker ATP abhängiger K^{+} -Kanäle

Leroy *et al.* (2004) beschrieben die Existenz von ATP abhängigen K^{+} -Kanälen in Primärkulturen Alveolarer Typ II Zellen der Ratte. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Beteiligung dieser Kanäle am Auftreten des Druckeffekts mittels des Blockers Glibenclamid überprüft (**Abb. III-24**). Zunächst wurde dazu der Druckeffekt unter Kontrollbedingungen bestimmt. Da als Lösungsmittel für Glibenclamid 0,2 % DMSO eingesetzt wurden, erfolgte die Messung unter Kontrollbedingungen ebenfalls in Gegenwart von 0,2 % des Lösungsvermittlers. Unter diesen Bedingungen verursachte hydrostatischer Druck einen Stromabfall auf $83 \pm 3 \%$ ($n = 11$) des Ausgangswertes. Eine apikale Perfusion von Glibenclamid (100 μM) veränderte den Kurzschlussstrom nicht signifikant, jedoch wurde die Druck-induzierte Strominhibition deutlich abgeschwächt ($99 \pm 6 \%$). Dieses Ergebnis spricht für eine Druck-induzierte Aktivierung ATP abhängiger K^{+} -Kanäle.

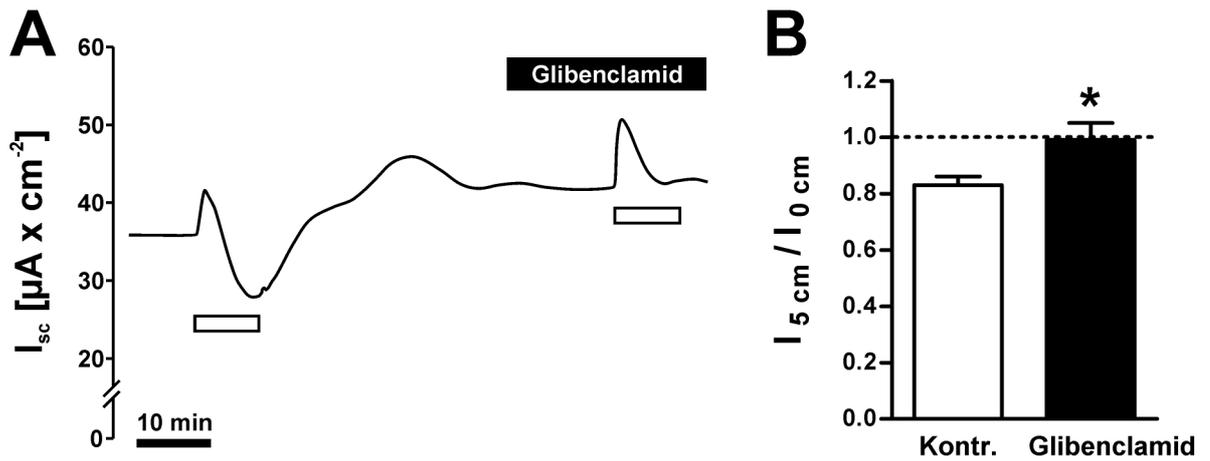


Abb. III-24: Druckeffekt während Glibenclamid-Applikation.

Eine apikale Perfusion von 100 μM Glibenclamid verhinderte die Netto-Strominhibition, die unter Kontrollbedingungen (ohne Glibenclamid) zu beobachten war. Die transiente Stromstimulation, die in einigen Versuchen unter Kontrollbedingungen auftrat, wurde durch Glibenclamid nicht inhibiert. (B) Statistische Auswertung von 11 Versuchen. *: signifikant verschieden von den Kontrollmessungen.

Tab. III-5: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses diverser K⁺-Kanalmotoren auf den Druckeffekt.

Pharmakon	Konzentration	I _{5 cm} / I _{0 cm} [%]		n
		Kontrolle	Pharmakon	
Ba ²⁺	10 mM	55 ± 5	98 ± 7 *	11
Hoch-K ⁺	50 mM	67 ± 5	110 ± 3 *	5
Quinin	500 µM	70 ± 6	17 ± 14 *	7
Bupivacain	1 mM	77 ± 4	66 ± 6 *	8
Clofilium	200 µM	74 ± 7	50 ± 9 *	6
Clotrimazol	50 µM	75 ± 4	92 ± 3 *	9
TRAM-34	50 µM	72 ± 5	70 ± 5	5
Econazol	50 µM	76 ± 3	76 ± 5	6
Apamin	1 µM	78 ± 5	82 ± 8	5
Charybdotoxin	200 nM	76 ± 5	80 ± 4	5
Chlorzoxazon	500 µM	69 ± 5	101 ± 5 *	7
Glibenclamid	100 µM	83 ± 3	99 ± 6 *	11

Die Kontrollmessungen wurden in normaler Ringer Lösung in Abwesenheit der Pharmaka durchgeführt. Ausnahmen: In der Messreihe „Ba²⁺“ waren unter Kontrollbedingungen 30 mM Mannitol zugesetzt. Die Kontrollen der Messreihe „Hoch-K⁺“ wurden in 50 Na⁺ Lösung durchgeführt. In der Messreihe „Glibenclamid“ wurden die Kontrollen in 0,2 % DMSO gemessen. *: signifikant verschieden vom jeweiligen Kontrollwert.

III.4.4 Wirkung [Ca²⁺]_i-modulierender Substanzen

Ca²⁺-freie Bedingungen

Es ist bekannt, dass die mechanische Reizung von Zellen zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) führt (Hansen *et al.* 1993; Boitano *et al.* 1994; Felix *et al.* 1998; Saitou *et al.* 2000). Da die [Ca²⁺]_i regulatorisch auf viele zelluläre Prozesse wirkt und unter anderem die Leitfähigkeit von Ionenkanälen beeinflusst, wurde in den folgenden Messreihen der Einfluss [Ca²⁺]_i-modulierender Substanzen auf die Druck-induzierte Strominhibition untersucht. In **Tab. III-6** (Seite 79) ist eine Zusammenfassung der Wirkung [Ca²⁺]_i-modulierender Substanzen auf den Druckeffekt dargestellt.

Zunächst wurden Versuche durchgeführt, bei denen der Druckeffekt in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} studiert wurde (**Abb. III-25**). Dazu wurde das in der Normal-Ringerlösung enthaltene CaCl_2 äquimolar durch Mannitol substituiert und die Lösung außerdem mit 1 mM EGTA versetzt. Zusätzlich wurde die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration durch Verwendung von 100 μM BAPTA/AM gepuffert. Während diese Versuchsbedingungen allein zunächst keinen Einfluss auf den I_{SC} hatten, zeigte sich, dass eine mechanische Reizung unter Ca^{2+} -freien Bedingungen eine drastische Reduktion des Kurzschlussstroms und des Widerstands zur Folge hatte. Weiterhin war auffällig, dass beide Größen nach Beendigung der Druckapplikation nur in sehr geringem Maße wieder zunahmen. Dies deutet daraufhin, dass eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks unter Ca^{2+} -freien Bedingungen zu irreversiblen Veränderungen des Gewebes führt.

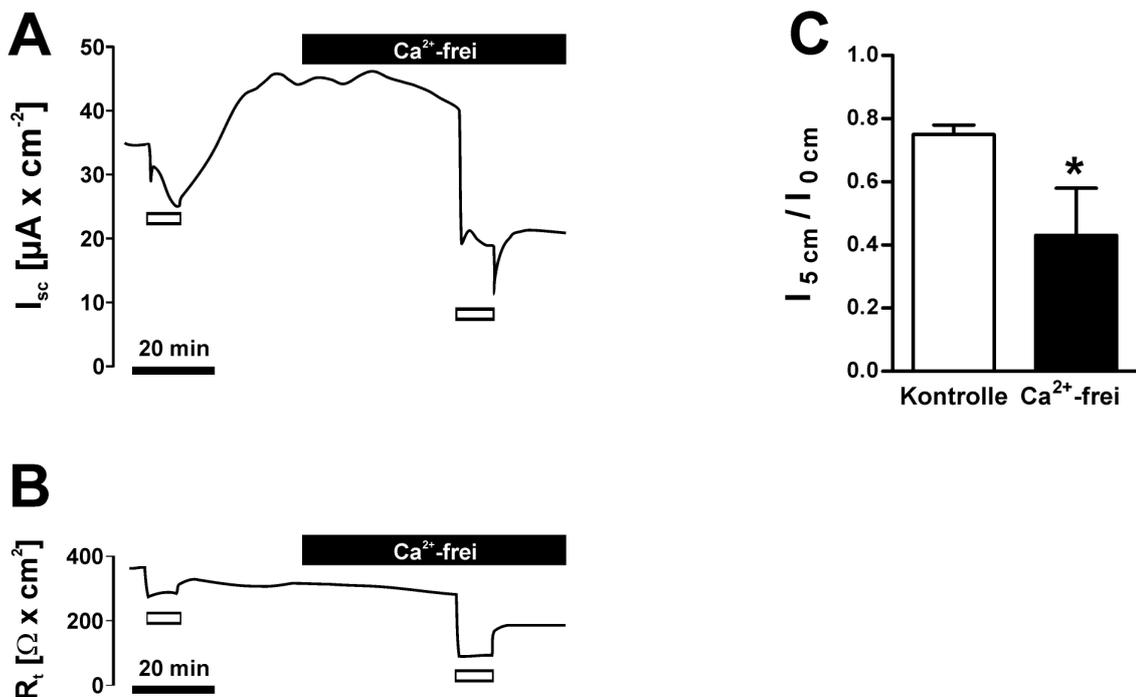


Abb. III-25: Auswirkung Ca^{2+} -freier Bedingungen auf den Druckeffekt.

(A) Nach Perfusion Ca^{2+} freier Lösung (0 mM extrazelluläres Ca^{2+} , 1 mM EGTA, 100 μM BAPTA/AM) induzierte eine mechanische Reizung (weißer Balken) einen starken Stromabfall. Nach Beendigung der Druckapplikation nahm der Kurzschlussstrom (I_{SC}) nicht mehr zu. (B) Während die Perfusion Ca^{2+} freier Lösung allein den Widerstand des Gewebes kaum veränderte, bewirkte die additive Applikation von hydrostatischem Druck einen starken Rückgang des Gewebswiderstands. Nach Beendigung der Druckeinwirkung nahm der Widerstand nur gering zu. (C) Statistische Auswertung der Druckinduzierten Strominhibition von 6 Experimenten. *: signifikant verschieden von den Kontrollmessungen.

Hoch-Ca²⁺ Bedingungen

Da eine Untersuchung mechanischer Reizung unter Ca²⁺-freien Bedingungen von einer sehr starken Verminderung des Widerstands begleitet war, konnte eine irreversible Schädigung des Gewebes nicht ausgeschlossen werden. Daher kamen alternative Versuchsprotokolle zum Einsatz, die ebenfalls auf eine Modulation des Ca²⁺-Einstroms bzw. der [Ca²⁺]_i abzielten.

In einer Messreihe wurde die elektrochemische Triebkraft für einen potenziellen Ca²⁺-Einstrom erhöht, indem die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration von 1 mM auf 10 mM gesteigert wurde (**Abb. III-26**). Die Kontrollmessungen (1 mM extrazelluläres Ca²⁺) fanden dabei in Gegenwart von 27 mM Mannitol statt. Es zeigte sich, dass es durch die veränderte Ca²⁺-Konzentration zu einer kleinen, jedoch signifikanten Änderung des Druckeffekts kam: unter Kontrollbedingungen (1 mM Ca²⁺) führte mechanische Reizung zu einem Abfall des I_{SC} auf 80 ± 2 % (n = 8), während der Strom in Gegenwart von 10 mM extrazellulärem Ca²⁺ nur auf 86 ± 3 % sank.

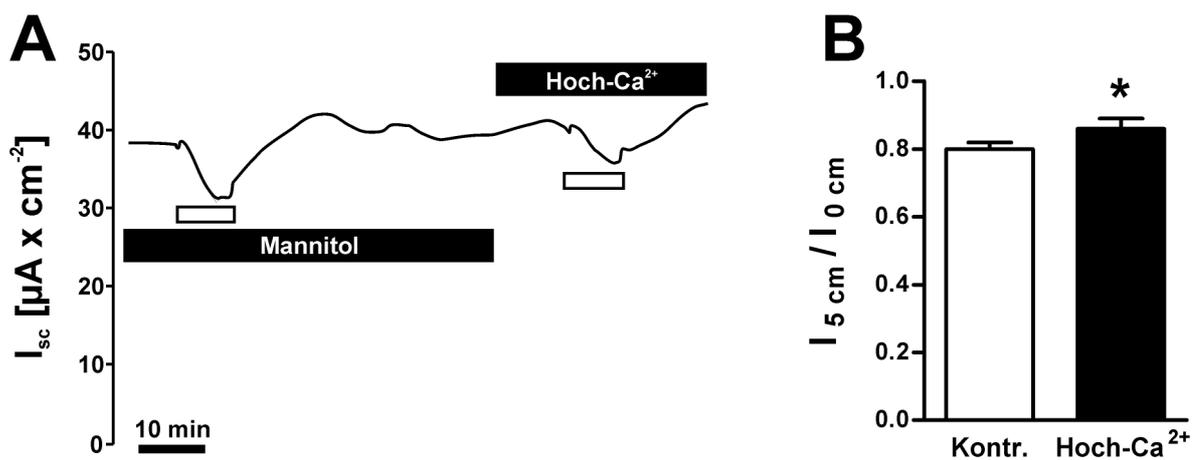


Abb. III-26: Auswirkung einer Erhöhung der extrazellulären Ca²⁺ Konzentration.

(A) Die unter Kontrollbedingungen (Kontr., 1 mM Ca²⁺/27 mM Mannitol) beobachtete Druck-induzierte Strominhibition (weißer Balken) wurde in Gegenwart von 10 mM Ca²⁺-Gluconat verringert. (B) Statistische Auswertung von 8 Experimenten. *: signifikant verschieden von den Kontrollmessungen.

Thapsigargin

Ein ähnliches Bild wie unter Hoch-Ca²⁺ Bedingungen ergab sich, wenn die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration durch Thapsigargin erhöht wurde. Thapsigargin wurde beschrieben als Blocker der sarkoplasmatischen Ca²⁺-ATPase (Cowley & Linsdell 2002; Wilson *et al.* 2006). Durch Inhibition dieses Transportproteins wird die Ca²⁺-Aufnahme aus dem Cytoplasma in das sarkoplasmatische Reticulum (bzw. endoplasmatische Reticulum) verhindert. Dies

wiederum öffnet sogenannte *store operated channels* (SOCs) in der Plasmamembran, die einen Ca^{2+} -Einstrom vermitteln. Beide Mechanismen führen letztlich zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Eine apikale Perfusion von 500 nM Thapsigargin blieb zunächst ohne Effekt auf den I_{SC} (Abb. III-27). Die Druck-induzierte Strominhibition fiel jedoch signifikant kleiner aus als unter Kontrollbedingungen (ohne Thapsigargin).

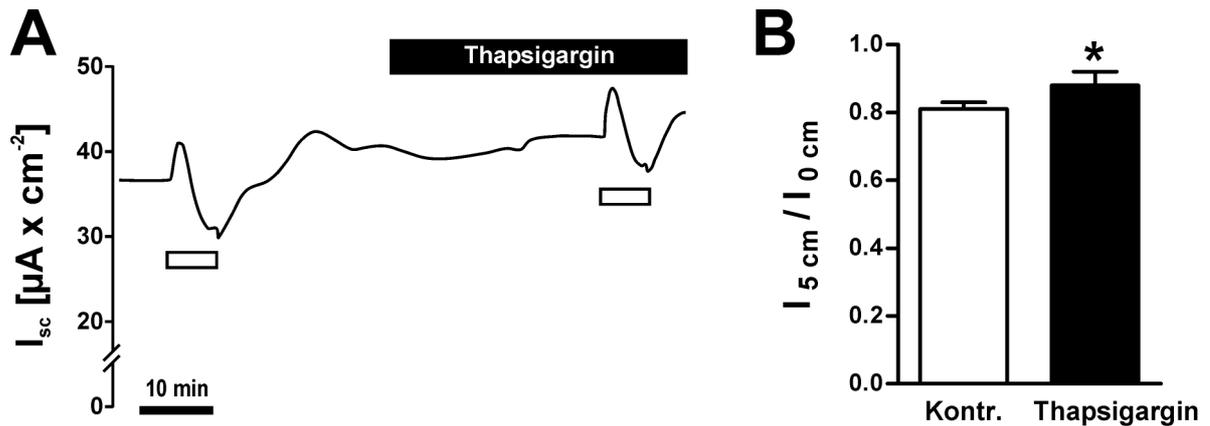


Abb. III-27: Der Druckeffekt wurde durch Thapsigargin abgeschwächt.

(A) Die apikale Perfusion von 500 nM Thapsigargin verminderte die Druck-induzierte Strominhibition (weißer Balken). (B) Statistische Auswertung von 5 Experimenten. *: signifikant verschieden von den Kontrollmessungen.

Ionomycin

Eine weitere Möglichkeit, die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu beeinflussen, ist die Verwendung von Ca^{2+} -permeablen Porenbildnern wie Ionomycin. In dieser Arbeit wurden zunächst 5 μM Ionomycin apikal perfundiert, was in einer circa 20 %igen Inhibition des Stroms resultierte (Abb. III-28). Außerdem verringerte sich der Widerstand um mehr als 30 % des Ausgangswertes. Wurde unter diesen Bedingungen der hydrostatische Druck erhöht, so sank der I_{SC} stärker ab als dies in den gepaarten Kontrollmessungen (ohne Ionomycin) der Fall war. Auffällig war, dass die Druck-induzierte Strominhibition kaum reversibel war. Diese Beobachtung in Kombination mit der starken Abnahme des Widerstands, könnte auf eine irreversible Schädigung des Gewebes durch verstärkten Ca^{2+} -Einstrom hindeuten.

Um eine mögliche Schädigung zu vermeiden, wurde in einer weiteren Versuchsreihe lediglich 1 μM Ionomycin perfundiert (Abb. III-28). Hier zeigte sich zunächst kein signifikanter Einfluss auf den I_{SC} . Auch die Änderungen im Widerstand fielen mit circa 9 % wesentlich geringer aus als bei der höheren Ionomycin-Konzentration. Die Druck-induzierte

Strominhibition wurde im Vergleich zu Kontrollbedingungen (NRS) abgeschwächt. Daraus lässt sich schließen, dass die Forcierung eines moderaten Ca^{2+} -Einstroms (durch $1 \mu\text{M}$ Ionomycin) den Druckeffekt verringert.

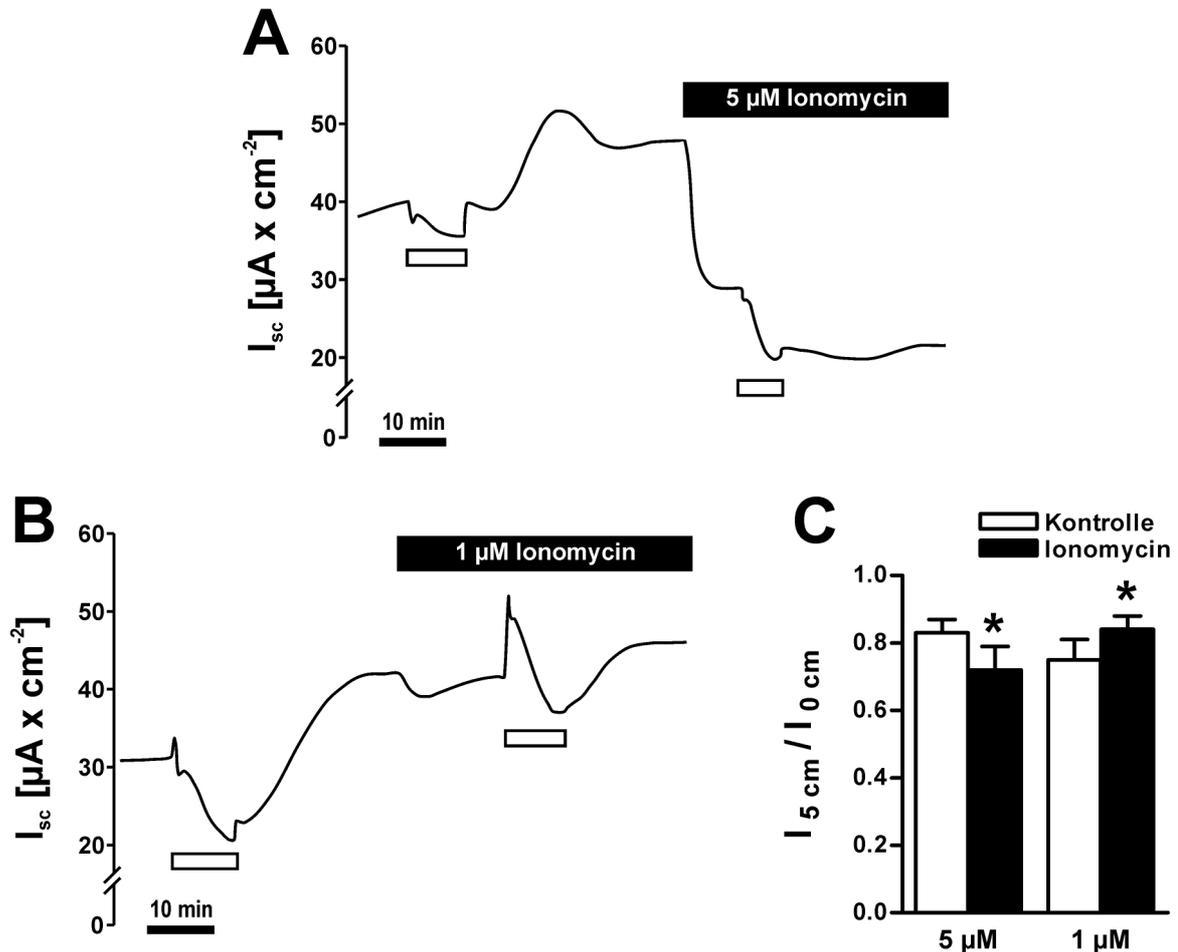


Abb. III-28: Einfluss des Ca^{2+} -permeablen Porenbildners Ionomycin auf den Druckeffekt.

(A) Die apikale Perfusion von $5 \mu\text{M}$ Ionomycin führte zu einer starken Inhibition des Kurzschlussstroms (I_{sc}). Der Druckeffekt (weißer Balken) fiel unter diesen Bedingungen stärker aus als unter Kontrollbedingungen. (B) Wurde Ionomycin lediglich $1 \mu\text{M}$ perfundiert, war der Einfluss auf den I_{sc} nicht signifikant. Die Applikation von hydrostatischem Druck resultierte in einer signifikant verringerten Inhibition im Vergleich zu Kontrollmessungen. (C) Statistische Auswertung von 8 ($5 \mu\text{M}$ Ionomycin) bzw. 7 ($1 \mu\text{M}$ Ionomycin) Experimenten. *: signifikant verschieden vom jeweiligen Kontrollwert.

BAPTA/AM

Eine letzte Versuchsreihe zielte darauf ab, einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, welcher auf mechanischen Stress folgen könnte, zu verhindern (**Abb. III-29**). Dazu wurde das Gewebe für 30 min unter apikal Ca^{2+} -freien Bedingungen inkubiert (0 mM Ca^{2+} , 1 mM EGTA, 100 μM BAPTA/AM). BAPTA/AM ist ein membrangängiger Ca^{2+} -Chelator und wird intrazellulär

durch eine Enzymreaktion modifiziert, so dass eine Diffusion aus der Zelle heraus verhindert wird. Nachdem das Gewebe auf diese Weise behandelt wurde, perfundierte man für 10 min Ca^{2+} -haltige Lösung (NRS) und bestimmte letztlich erneut den Druckeffekt. Es zeigte sich, dass diese signifikant höher ausfiel als in den Kontrollmessungen.

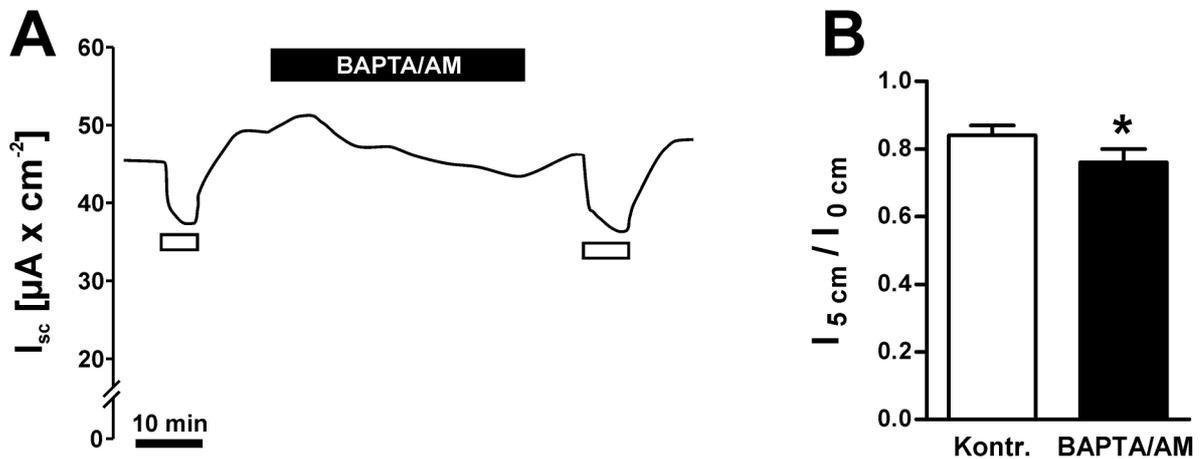


Abb. III-29: Druckeffekt nach Chelatisierung intrazellulären Calciums.

(A) Nach Bestimmung des Druckeffekts (weißer Balken) unter Kontrollbedingungen wurde für 30 min mit Ca^{2+} -freier Lösung perfundiert (0 mM Ca^{2+} , 1 mM EGTA, 100 μM BAPTA/AM). Anschließend erfolgte eine 10 minütige Perfusion von Normal-Ringerlösung (1 mM Ca^{2+}) und die erneute Druckapplikation. (B) Die statistische Auswertung ergab, dass der Druckeffekt nach BAPTA/AM Inkubation signifikant größer war als unter Kontrollbedingungen ($n = 10$).

Tab. III-6: Wirkung $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -modulierender Substanzen.

Bedingung	$I_{5\text{ cm}} / I_{10\text{ cm}}$		n
	Kontrolle	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ -moduliert	
Ca^{2+} -frei	75 ± 3	$43 \pm 15^*$	6
Hoch- Ca^{2+}	80 ± 2	$86 \pm 3^*$	8
Thapsigargin	81 ± 2	$88 \pm 4^*$	5
Ionomycin (1 μM)	75 ± 6	$84 \pm 4^*$	7
BAPTA/AM	84 ± 3	$76 \pm 4^*$	10

Eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Hoch- Ca^{2+} , Thapsigargin und Ionomycin bewirkte eine Verminderung der Druck-induzierten Strominhibition. Wurde dagegen ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verhindert (Ca^{2+} -frei, BAPTA/AM), war eine Vergrößerung des Druckeffekts die Folge. Die Kontrollmessungen wurden in normaler Ringer Lösung in Abwesenheit der Pharmaka durchgeführt. Ausnahme: In der Messreihe „Hoch- Ca^{2+} “ waren unter Kontrollbedingungen 27 mM Mannitol zugesetzt.

III.4.5 Einfluss von Modulatoren der *transient receptor potential* Familie

Neben den mechanisch aktivierbaren K^+ -Kanälen aus der 2P- K^+ -Kanal-Gruppe findet man weiterhin direkt mechanosensitive Ionenkanäle innerhalb der Proteinfamilie der *transient receptor potential* (TRP) Kanäle. Bereits in den 1980er Jahren beschrieben Methfessel *et al.* (1986) sowie Yang & Sachs (1989) die Expression endogener mechanosensitiver Transportproteine in Oocyten von *Xenopus laevis*. Maroto *et al.* (2005) konnten zeigen, dass es sich dabei um ein Homolog des bei Säugern nachgewiesenen Kanals TRPC1 handelte. Da dieser Kanal Ca^{2+} permeabel ist, könnte eine mechanische Stimulation zu einem Ca^{2+} -Einstrom führen, der wiederum andere Ca^{2+} regulierte Leitfähigkeiten aktiviert. In den folgenden Experimenten wurde daher untersucht, ob eine Modifikation mechanosensitiver Ca^{2+} -permeabler Kanäle einen Einfluss auf den Druckeffekt ausübt. Als Blocker wurden die Metallkationen Gd^{3+} und La^{3+} verwendet. Gadolinium wurde in Konzentrationen von 300 μM und 10 μM eingesetzt, Lanthan wurde 100 μM appliziert. In allen drei Versuchsreihen (**Abb. III-30, Abb. III-31**) zeigte sich nach Perfusion der Lanthanoide eine Stimulation des Kurzschlussstroms, wie sie auch bereits von Fronius *et al.* (2003) beschrieben wurde. Bei Verwendung von 300 μM Gd^{3+} handelte es sich dabei um einen transienten Effekt, während die Stimulation bei den geringeren Konzentration dauerhaft war. Wurde der hydrostatische Druck in Gegenwart der Lanthanoide erhöht, so fiel die Druck-induzierte Strominhibition in allen drei Versuchsreihen geringer aus als in den jeweiligen gepaarten Kontrollmessungen.

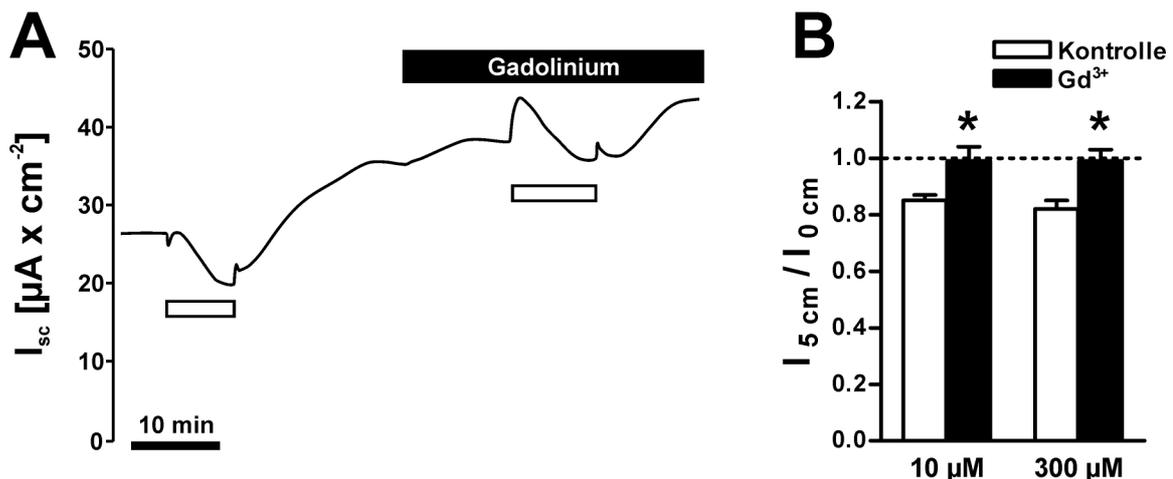


Abb. III-30: Gadolinium, ein Blocker mechanosensitiver Ionenkanäle, hemmt den Druckeffekt.

(A) Die apikale Perfusion von 10 μM Gd^{3+} führte zu einer Stimulation des Kurzschlussstroms (I_{sc}) sowie zu einer Verringerung der Druck-induzierten Strominhibition (weißer Balken). (B) Sowohl 10 μM ($n = 9$) als auch 300 μM Gd^{3+} ($n = 9$) verminderten den Druckeffekt. *: signifikant verschieden von den jeweiligen Kontrollexperimenten.

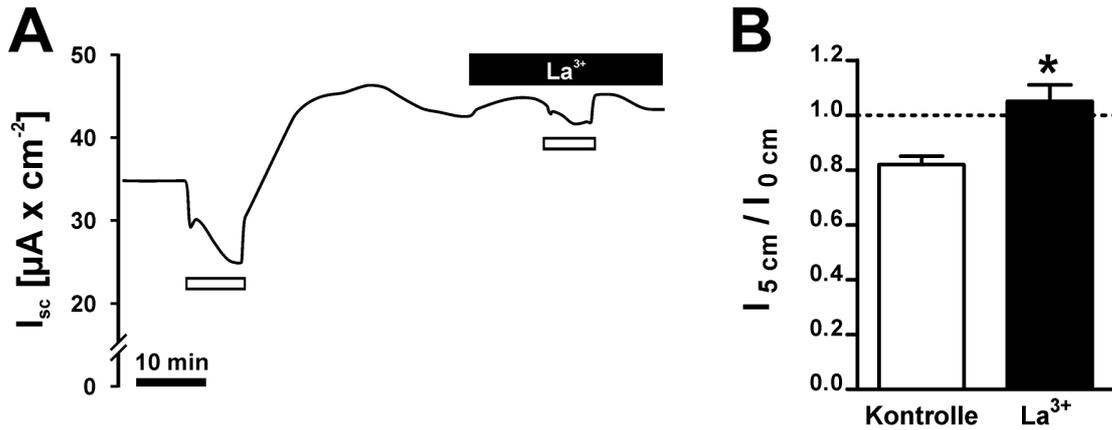


Abb. III-31: Wirkung von La^{3+} auf die Druck-induzierte Inhibition des Kurzschlussstroms (I_{sc}). (A) Die apikale Perfusion von 100 μM La^{3+} resultierte in einem Anstieg des Kurzschlussstroms (I_{sc}) sowie in einer Verringerung der Druck-induzierten Strominhibition (weißer Balken). (B) Statistische Auswertung von 7 Experimenten. *: signifikant verschieden.

Neben dem direkt mechanosensitiven TRPC1 gilt der Kanal TRPV4 als osmosensitiv. Damit könnte auch dieser Kanal zur Regulation des Zellvolumens beitragen (Becker *et al.* 2005). Zur Untersuchung von TRPV4 wurde der Inhibitor Ruthenium Rot sowie der Stimulator 4α -PDD verwendet. Im Gegensatz zur Applikation von Lanthanoiden hatte die Verwendung des TRPV4 Blockers Ruthenium Rot (250 μM) keinen Einfluss auf den I_{sc} (Abb. III-32). Auch die Druck-induzierte Strominhibition konnte nicht beeinflusst werden. Weiterhin konnte der Druckeffekt durch den TRPV4-Agonisten 4α -PDD nicht verändert werden. Dieses Ergebnis spricht gegen eine Beteiligung von TRPV4 am Druckeffekt.

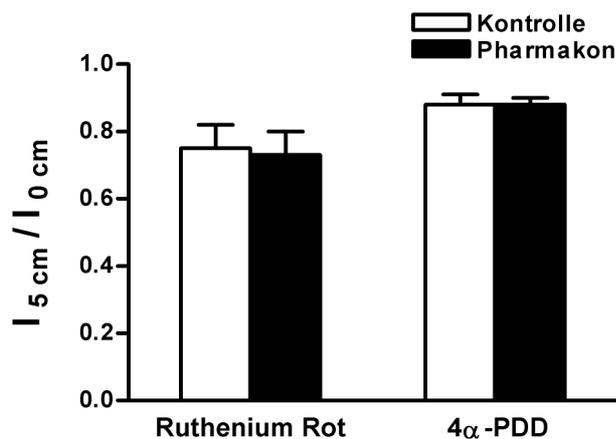


Abb. III-32: Weder eine Inhibition des TRPV4 durch Ruthenium Rot noch eine Aktivierung des Kanals durch 4α -PDD bewirkte eine Veränderung der Druck-induzierten Strominhibition (n = 4 für Ruthenium Rot, n = 7 für 4α -PDD).

III.5 Einfluss der Lösungsosmolarität

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen eine Aktivierung von K^+ und Cl^- Leitfähigkeiten durch mechanischen Stress. Bereits 1987 postulierte Christensen, dass ein K^+ und Cl^- Ausstrom zur Volumenregulation der Zelle genutzt werden kann. Ausgehend von der Hypothese, dass die Erhöhung des hydrostatischen Drucks am Epithel eine Volumenregulationsreaktion hervorrufen könnte, wurden Experimente durchgeführt, in denen durch Veränderung der Lösungsosmolarität eine Zellschwellung bzw. Zellschrumpfung induziert wurde (**Abb. III-33**). Eine Reduktion der Lösungsosmolarität von 227 mosm/l (Kontrollbedingungen) auf 127 mosm/l durch den Entzug von 100 mM Mannitol resultierte in einer weitgehenden Aufhebung der Druck-induzierten Strominhibition. Unter isoomotischen Bedingungen (227 mosm/l) wurde der I_{SC} durch Druckapplikation auf $57 \pm 4 \%$ des Ausgangswertes reduziert, während die Reduktion unter hypotonen Bedingungen (127 mosm/l) lediglich $87 \pm 7 \%$ betrug. Die Kontrollmessungen für diese Versuchsreihe wurden in hypotoner Lösung durchgeführt (siehe **Tab. II-7**, Seite 40), der 100 mM Mannitol zugesetzt wurden. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass sich lediglich die osmotische, nicht jedoch die ionale Zusammensetzung veränderte.

Das umgekehrte Bild zeigte sich in Messungen mit hypertonem Medium: die Erhöhung der Lösungsosmolarität durch Zugabe von 50 mM Mannitol führte zu einer Vergrößerung des Druckeffekts ($63 \pm 6 \%$ des Ausgangswertes) im Vergleich zu Kontrollbedingungen ($87 \pm 7 \%$; NRS mit 227 mosm/l).

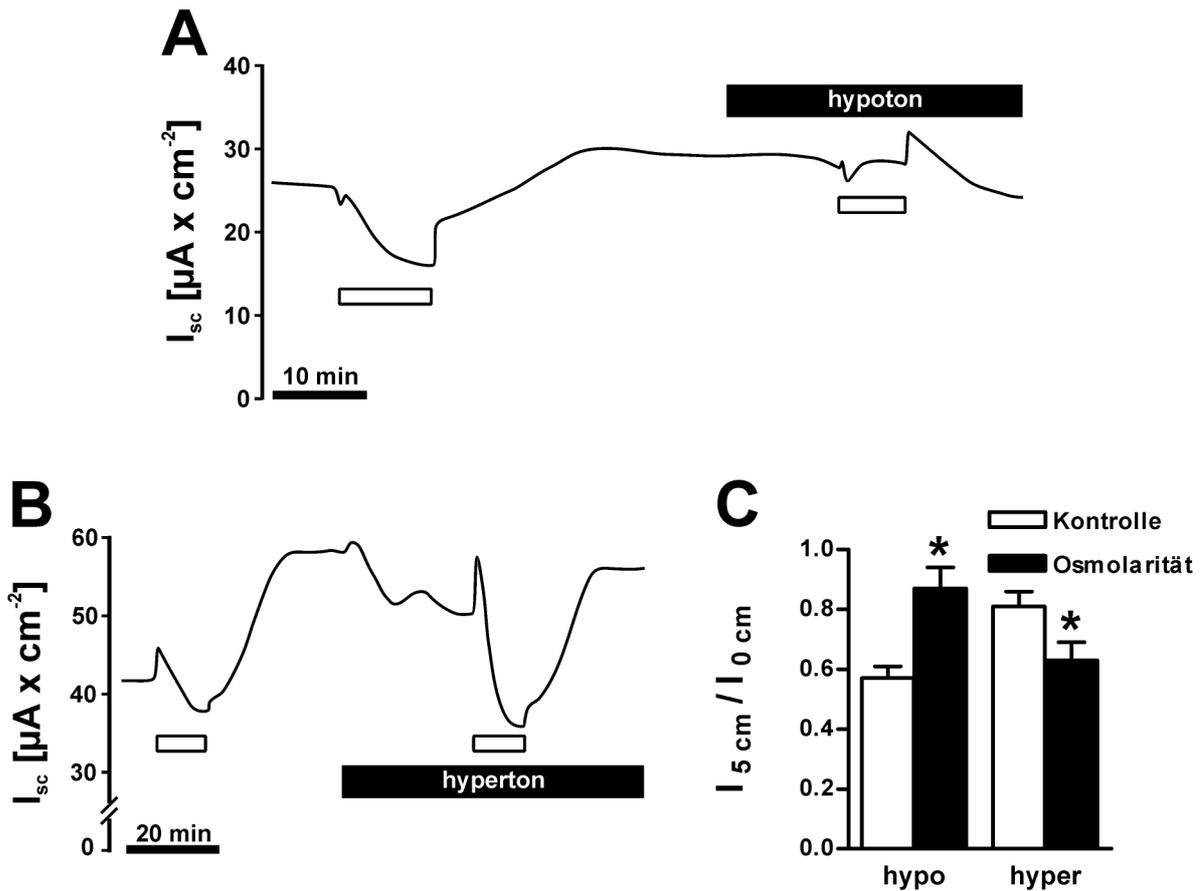


Abb. III-33: Einfluss der Lösungsmolarität auf die Druck-induzierte Strominhibition. (A) Nach Entzug von 100 mM Mannitol (hypoton) wurde der Druckeffekt (weißer Balken) deutlich verringert. (B) Die Applikation von hyperosmotischer Lösung (hyperton) resultierte in einer Verstärkung des Druckeffekts. (C) Statistische Auswertung von 7 (hypo: hypotones Medium) bzw. 6 (hyper: hypertones Medium) Experimenten. *: signifikant verschieden vom jeweiligen Kontrollwert.

III.6 mRNA und Proteinexpression verschiedener Ionenkanäle in der *Xenopus* Lunge und in humanen alveolaren Zelllinien

Die oben beschriebenen Ussing-Kammer-Untersuchungen zeigten, dass die Druck-induzierte Strominhibition pharmakologisch beeinflussbar war. Die Applikation verschiedener K^+ -Kanalblocker sowie die Verwendung klassischer Inhibitoren mechanosensitiver Ca^{2+} -permeabler Kanäle resultierte in einer deutlichen Verringerung des Druckeffekts. Im Folgenden wurden molekularbiologische Techniken benutzt, um die Expression der in den pharmakologischen Studien identifizierten Kanäle weiter zu charakterisieren.

III.6.1 Expression von Ionenkanälen in der *Xenopus* Lunge

Während bereits in einigen Studien die Existenz verschiedener Ionenkanäle in der *Xenopus* Lunge anhand von Blockerprofilen postuliert wurde (Fischer *et al.* 1989; Fischer & Clauss 1990; Kim 1990; Puoti *et al.* 1995; Baxendale-Cox 1999; Fronius *et al.* 2003; Fronius *et al.* 2004; Berk *et al.* 2004), ist bislang lediglich eine Arbeit bekannt, in denen ein Transportprotein molekularbiologisch nachgewiesen wurde (Puoti *et al.* 1995). Im Folgenden wurde daher die Expression diverser Ionenkanal-kodierender mRNAs in Homogenaten der *Xenopus* Lunge mittels RT-PCR detektiert. Weiterhin wurde die Lokalisation einiger Ionenkanäle durch immunhistologische Färbungen untersucht.

Epithelialer Na⁺-Kanal (ENaC) und cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)

In einem ersten Schritt wurde die Präsenz des epithelialen Na⁺-Kanals (ENaC) sowie des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) überprüft. In diversen elektrophysiologischen Arbeiten an pulmonalen Säuger- wie auch Amphibienepithelien wurde eine Amilorid-sensitive Komponente des I_{SC} beschrieben (Fischer *et al.* 1989; Fischer & Clauss 1990; Kim 1990; Puoti *et al.* 1995; Baxendale-Cox 1999; Fronius *et al.* 2003; Fronius *et al.* 2004; Berk *et al.* 2004). Dieser durch den ENaC getragene Strom trägt maßgeblich zur Entstehung eines lumennegativen, transepithelialen Potenzials bei. Ein kleinerer Teil dieser Potentialdifferenz wird dem Cl⁻-Transport mittels des CFTR zugeschrieben. Die RT-PCR zeigte, dass mRNA für beide Ionenkanäle in Homogenaten der *Xenopus* Lunge zu finden war (**Abb. III-34**). Im nächsten Schritt wurde die Lokalisation des CFTR untersucht. Dazu wurden immunhistologische Studien an Gefrierschnitten von *Xenopus* Lungen durchgeführt. Wie in **Abb. III-35** dargestellt, ergab die Behandlung mit einem kommerziellen Antikörper, der gegen die Aminosäuren 1 - 182 des humanen CFTR gerichtet war, eine Färbung der apikalen Seite des Gewebes. Dies deckt sich mit den Erwartungen einer apikalen Lokalisation des CFTR in den Epithelzellen. Weiterhin wurde beobachtet, dass auch glatte Muskelzellen der Blutgefäße angefärbt wurden.

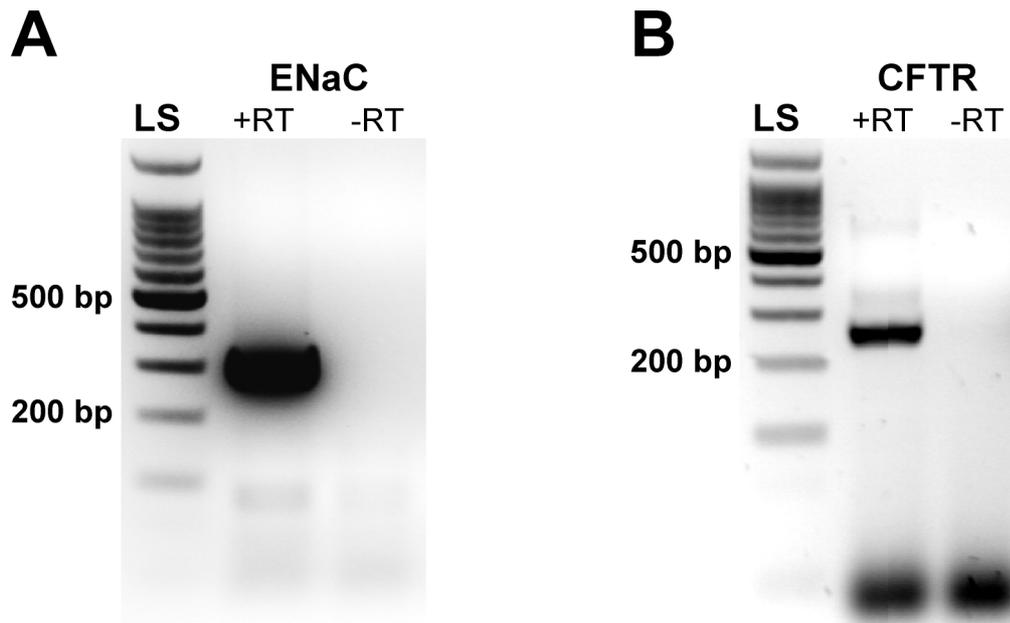


Abb. III-34: Nachweis der mRNA des (A) epithelialen Na^+ -Kanals (ENaC) bzw. des (B) *cystic fibrosis transmembrane conductance regulators* (CFTR) in Homogenaten der *Xenopus* Lunge. Die Banden wurden isoliert und sequenziert. Das Experiment wurde mit RNA-Isolaten zweier weiterer Donoren wiederholt. LS: Längenstandard; +RT: mit Reverse Transcriptase; -RT: ohne Reverse Transcriptase.

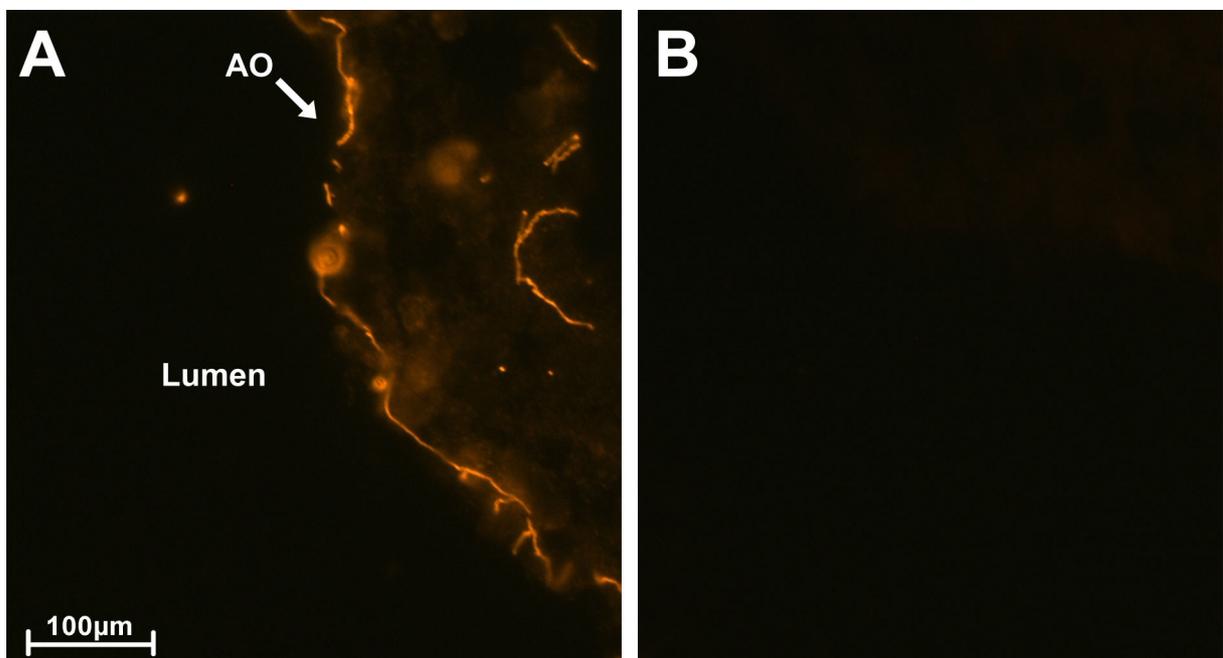


Abb. III-35: Immunfluoreszenzfärbung der *Xenopus* Lunge mit α -CFTR Antikörpern. (A) zeigt ein Fluoreszenzsignal von apikal gelegenen Zellen. (B) Kontrolle ohne Primärantikörper. Das Experiment wurde mit Präparaten zweier weiterer Donoren wiederholt. AO: apikale Oberfläche.

Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle und 2 Poren-Domänen-K⁺-Kanäle

Da die pharmakologischen Untersuchungen auf eine starke Beteiligung von K⁺-Kanälen am Druckeffekt hindeuteten, wurde die Existenz verschiedener K⁺-Kanäle mittels RT-PCR untersucht. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle und 2-Poren-Domänen K⁺-Kanäle (2P-K⁺-Kanäle) gelegt. Bei letzteren wurden bereits mechanosensitive sowie osmotisch regulierte Mitglieder beschrieben (Maingret *et al.* 1999; Maingret *et al.* 2000; Niemeyer *et al.* 2001; O'Connell *et al.* 2002; Takahira *et al.* 2005).

Die Sequenzierung der PCR Banden ergab, dass mRNA für die Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanäle IK und BK (*KCNN4* und *KCNMA1*) in *Xenopus* Lungen vorhanden war (**Abb. III-36**). Weiterhin konnten Signale für die 2P-K⁺-Kanäle TASK2 und TWIK2 (*KCNK5* und *KCNK6*) detektiert werden (**Abb. III-37**). Eine Expression der mechanosensitiven Kanäle TREK1, TREK2 und TRAAK sowie der Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanäle SK1 und SK2 auf mRNA-Ebene konnte mit den hier verwendeten Primern nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.

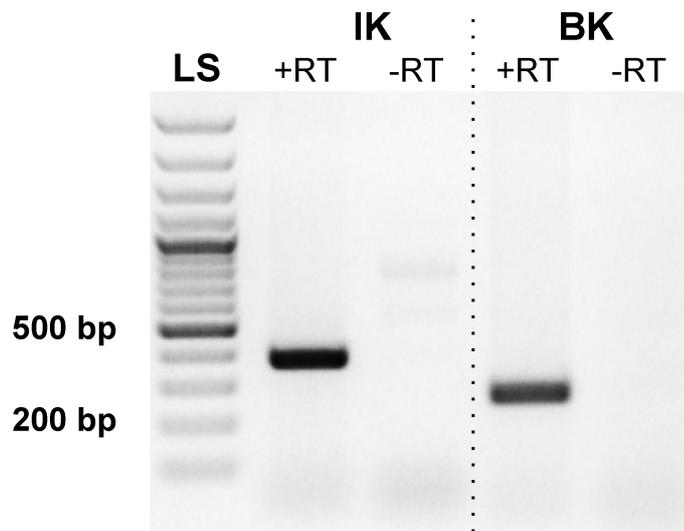


Abb. III-36: Nachweis der mRNA der Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanäle IK und BK in Homogenaten der *Xenopus* Lunge.

Die Banden wurden isoliert und sequenziert. Das Experiment wurde mit zwei weiteren Donoren wiederholt. LS: Längenstandard; +RT: mit Reverser Transkriptase; -RT: ohne Reverse Transkriptase.

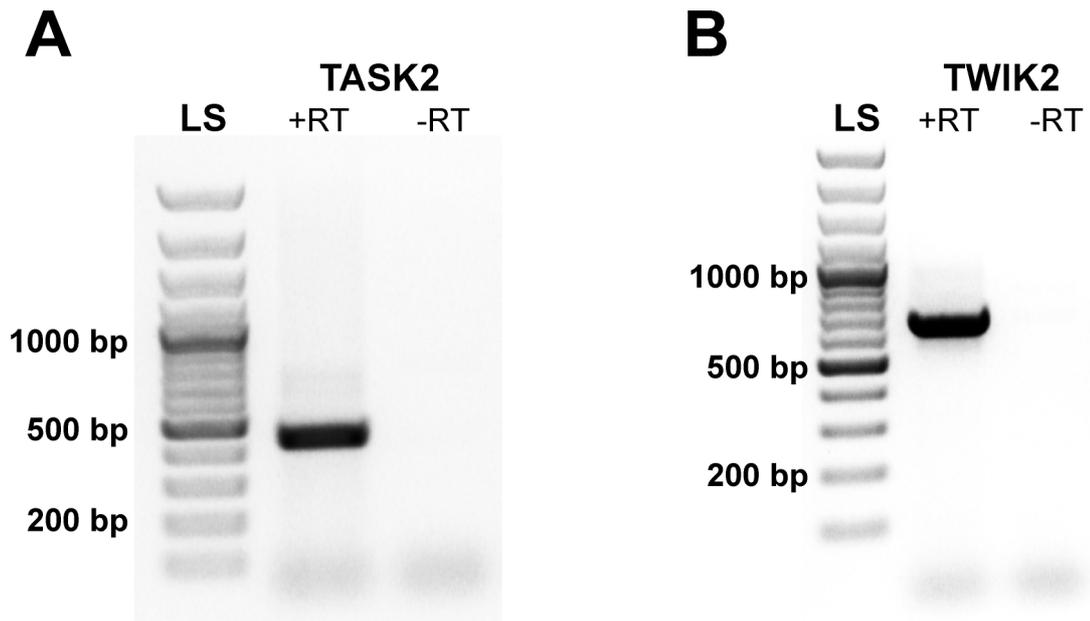


Abb. III-37: Nachweis der mRNA der 2-Poren-K⁺-Kanäle TASK2 und TWIK2 in Homogenaten der *Xenopus* Lunge.

Die Banden wurden isoliert und sequenziert. Das Experiment wurde mit zwei weiteren Donoren wiederholt. LS: Längenstandard; +RT: mit Reverser Transkriptase; -RT: ohne Reverse Transkriptase.

Kanäle der transient receptor potential Familie

Die Ussing-Kammer-Messungen zeigten, dass die Druck-induzierte Strominhibition durch Lanthanoide als klassische Blocker mechanosensitiver Ionenkanäle stark unterdrückt werden konnte. Da Mitglieder der *transient receptor potential* (TRP) Familie bereits als mechanosensitiv beschrieben wurden und durch Gd³⁺ und La³⁺ hemmbar sind (Rychkov & Barritt 2007), wurde im Folgenden die Expression von TRPC1 (direkt mechanosensitiv) und TRPV4 (osmosensitiv) untersucht. Wie **Abb. III-38** zeigt, konnten beide Mitglieder auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

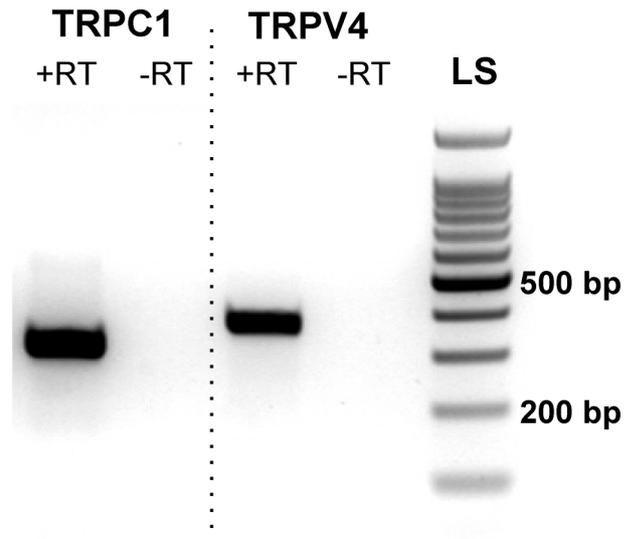


Abb. III-38: Nachweis der mRNA mechanosensitiver Ionenkanäle der *transient receptor potential* (TRP) Familie in Homogenaten der *Xenopus* Lunge.

Die Banden wurden isoliert und sequenziert. Das Experiment wurde mit zwei weiteren Donoren wiederholt. LS: Längenstandard; +RT: mit Reverse Transkriptase; -RT: ohne Reverse Transkriptase.

Darüber hinaus wurde die TRPC1-Proteinexpression mittels Immunfluoreszenz untersucht. Dazu wurden zunächst Färbungen an *Xenopus* Oocyten durchgeführt, da an diesen Zellen eine TRPC1 Expression beschrieben wurde (Maroto *et al.* 2005). **Abb. III-39** zeigt, dass nach α -TRPC1 Antikörperbindung eine Färbung im Bereich der Zellmembran festgestellt werden konnte. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete α -TRPC-1 Antikörper wurde auch in der Studie von Maroto *et al.* (2005) erfolgreich eingesetzt. Im Weiteren wurden Immunfluoreszenzfärbungen an *Xenopus* Lungen durchgeführt (**Abb. III-40**). Auch hier konnte mit dem verwendeten Antikörper eine Färbung von Zellen nahe der luminalen Oberfläche detektiert werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass im Lungenepithel von *Xenopus laevis* mechanosensitive Ca^{2+} -permeable Ionenkanäle der *transient receptor potential* Familie exprimiert werden.

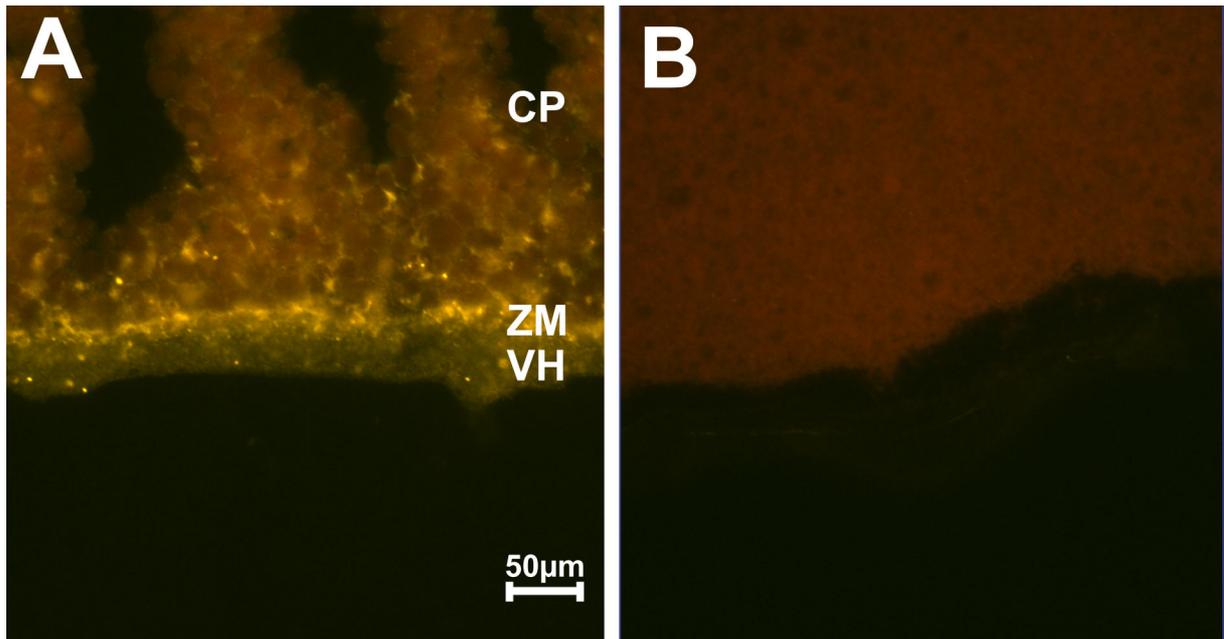


Abb. III-39: Immunfluoreszenzfärbung mit α -TRPC1 Antikörpern an *Xenopus laevis* Oocyten. (A) zeigt eine Färbung im Bereich der Zellmembran (ZM), die in der Negativkontrolle (B) (ohne Primärantikörper) nicht auftritt. CP: Cytoplasma; VH: Vitellinhülle.

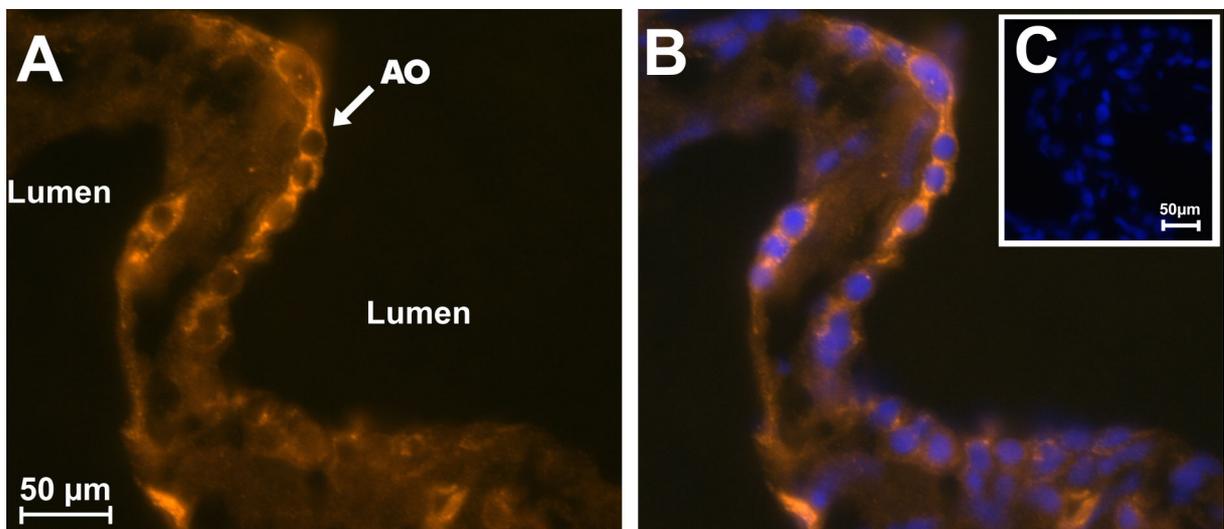


Abb. III-40: Immunfluoreszenzfärbung der *Xenopus* Lunge mit α -TRPC1 Antikörpern. (A) zeigt ein Fluoreszenzsignal von Zellen nahe der apikalen Oberfläche (Pfeil, AO). (B) Zusätzlich sind hier Zellkerne mit DAPI angefärbt. (C) Kontrolle ohne Primärantikörper.

III.6.2 TRPC1 Expression in humanen alveolaren Zelllinien

Neben Lungengewebe von *Xenopus laevis* wurden auch die humanen Zellkulturen H441 und A549 auf die Expression von TRP-Kanälen untersucht. Es zeigte sich, dass beide Zelltypen

mRNA für TRPC1 aufwiesen. TRPV4-kodierende mRNA konnte mit den hier verwendeten *Primern* nicht nachgewiesen werden.

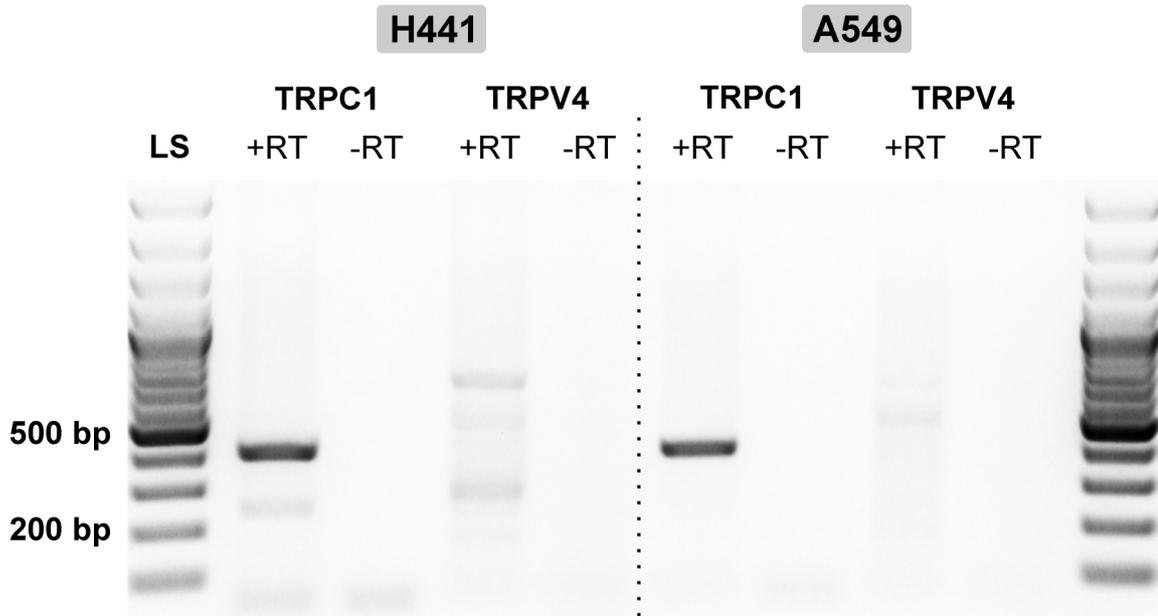


Abb. III-41: Nachweis der mRNA-Expression des mechanosensitiven Ionenkanals TRPC1 in Zellen der humanen pulmonalen Zelllinien H441 und A549. Die Banden wurde isoliert und sequenziert. LS: Längenstandard; +RT: mit Reverse Transkriptase; -RT: ohne Reverse Transkriptase. Die mRNA für den osmosensitiven Ionenkanal TRPV4 konnte nicht detektiert werden.

III.7 Klonierung des humanen epithelialen Natrium-Kanals

Der epitheliale Na^+ -Kanal (ENaC) gehört zur DEG/ENaC-Genfamilie, der auch die mechanosensitiven Degenerine an gehören. Aufgrund dieser Verwandtschaft wurde eine potenzielle Mechanosensitivität des ENaCs bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (Ji *et al.* 1998; Awayda & Subramanyam 1998; Satlin *et al.* 2001; Carattino *et al.* 2004). Die erlangten Ergebnisse fielen heterogen aus: während in einigen Studien eine Mechanosensitivität gezeigt werden konnte, kamen andere Arbeiten zu einem gegenteiligen Schluss (Rossier 1998). Unserer Arbeitsgruppe gelang es, eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit durch mechanische Reizung in Einzelkanalmessungen zu zeigen (Althaus *et al.* 2007). Dazu wurden ENaCs von *Rattus norvegicus* und *Xenopus laevis* durch laminaren Scherstress stimuliert. Eine Aktivierung durch mechanische Kräfte an humanen ENaCs konnte bisher nicht dargestellt werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der

humane ENaC aus Lungengewebe kloniert und heterolog in Oocyten exprimiert. Dies ermöglichte es, das Verhalten nach Reizung durch laminaren Scherstress zu untersuchen.

Die Klonierung des hENaC erstreckte sich auf die α , β und γ -Untereinheit. Die Sequenzierung der Klonierungsprodukte ergab, dass die β - und γ -Untereinheit auf Proteinebene der jeweiligen Referenzsequenz entsprach. Die α -Untereinheit wies zwei Aminosäureaustausche im Vergleich zur Referenzsequenz (**Tab. III-7**). Bei beiden Austauschungen handelte es sich um bereits beschriebene *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Das in der vorliegenden Arbeit gefundene Alanin an Position 663 stellt zwar im Vergleich zur Referenzsequenz einen SNP dar, ist jedoch die in der Population stärker verbreitete Variante und wird daher von Tong *et al.* (2006) als Wildtyp-Form betrachtet. Der Austausch A334T hat keine Auswirkung auf die Kanalaktivität (Tong *et al.* 2006). Ein *alignment* der Nukleotidsequenzen mit den jeweiligen Referenzsequenzen ist im Anhang (**Abb. IX-1**, **Abb. IX-2** und **Abb. IX-3**) dargestellt.

Tab. III-7: Klonierung des humanen epithelialen Na⁺-Kanals (ENaC).

ENaC-Untereinheit	Referenzsequenz aus GenBank (RefSeq)	AS-Austausche des Klonierungsprodukts im Vergleich zur RefSeq*	Zugangsnummer für SNP-Datenbank
α	NP_001029	A334T T663A	rs11542844 rs2228576
β	NP_000327	-	rs238547
γ	NP_001030	-	-

Anhand der jeweiligen Referenzsequenz aus *GenBank* wurden *Primer* hergestellt. Das PCR-Amplifikat wurde in einen Oocytenexpressionsvektor ligiert und sequenziert. Dabei zeigte sich, dass die α ENaC-Untereinheit zwei Aminosäureaustausche im Vergleich zur Referenzsequenz aufwies. Beide Mutationen waren bereits beschriebene *single nucleotide polymorphism* (SNP), welche in der SNP-Datenbank von NCBI unter der angegebenen Nummer gefunden werden konnten. *Der in der vorliegenden Arbeit gefundene SNP T663A stellt die in der Population am häufigsten auftretende Variante dar und wird deshalb von Tong *et al.* (2006) als Wildtyp-Form betrachtet. Der SNP A334T hat keine Auswirkung auf die Kanalaktivität (Tong *et al.* 2006).

III.8 Einfluss mechanischer Kräfte auf den epithelialen Na⁺-Kanal

Die gemeinsame Expression der drei Klonierungsprodukte in *Xenopus* Oocyten resultierte im Auftreten eines Amilorid-sensitiven Transmembranstroms. Eine mechanische Reizung der exprimierenden Zellen erfolgte durch die Applikation von laminarem Scherstress. Dieser Stimulus wurde bereits erfolgreich an ENaCs von Ratte, Maus und *Xenopus* eingesetzt (Satlin *et al.* 2001; Althaus *et al.* 2007). Wurde die hENaC-exprimierende Zelle laminaren Scherkräften ausgesetzt, so hatte dies eine Stromstimulation auf $110 \pm 3 \%$ ($n = 22$, $N = 8$) des Ausgangsniveaus zur Folge (**Abb. III-42**).

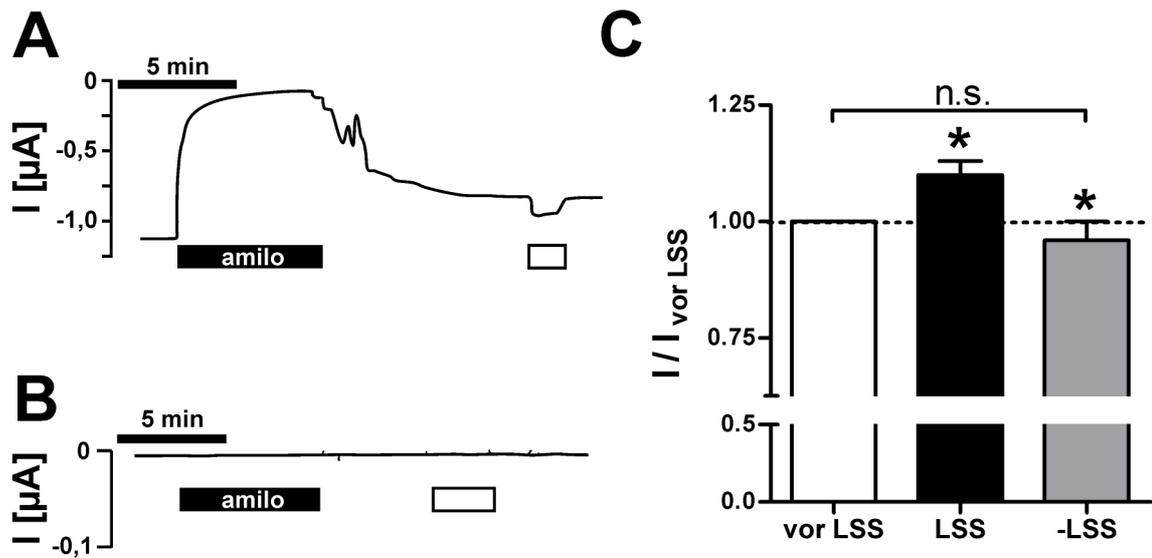


Abb. III-42: Aktivierung des heterolog exprimierten humanen epithelialen Na⁺-Kanals durch Scherkräfte.

(A) Die α , β , und γ Untereinheit des epithelialen Na⁺-Kanals wurde aus RNA der Lunge kloniert und heterolog in *Xenopus* Oocyten exprimiert. Bei einer Klemmspannung von -60 mV resultierte ein starker Einwärtsstrom, der durch Superfusion von 10 μ M Amilorid (amilo) gehemmt werden konnte. Wurde die Zelle Scherkräften ausgesetzt (weißer Balken), so vergrößerte sich der Einwärtsstrom. (B) Aufzeichnung des Transmembranstroms einer Oocyte, welcher lediglich äquivalente Mengen des RNA-Lösungsmittels (DEPC-H₂O) injiziert wurde. Hier konnte kein Amilorid-sensitiver Strom gemessen werden. Auch die Applikation von Scherkräften hatte keine Veränderung des Membranstroms zur Folge. (C) Statistische Auswertung von Experimenten, wie sie in Teilabbildung A dargestellt sind (n = 22, N = 8). LSS: laminarer Scherstress. *: signifikant verschieden vom vorherigen Wert, n.s.: nicht signifikant verschieden.

Die Scherstress-induzierte Stromstimulation trat ebenfalls an Zellen auf, die den Ratten-ENaC exprimierten. Carattino *et al.* (2004) postulieren, dass die beobachtete Stromstimulation durch eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit vermittelt wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Experimente durchgeführt, in denen Oocyten, welche den ENaC der Ratte (rENaC) exprimierten, in 10 μ M Zn²⁺ inkubiert wurden (**Abb. III-43**). Zink-Ionen erhöhen die Offenwahrscheinlichkeit des ENaC durch Beeinflussung des sogenannten Selbstinhibitionsmechanismus (Sheng *et al.* 2004). Es zeigte sich, dass eine anschließende Scherstress-Exposition den Membranstrom nicht mehr signifikant veränderte. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass laminarer Scherstress die Offenwahrscheinlichkeit des ENaC erhöht.

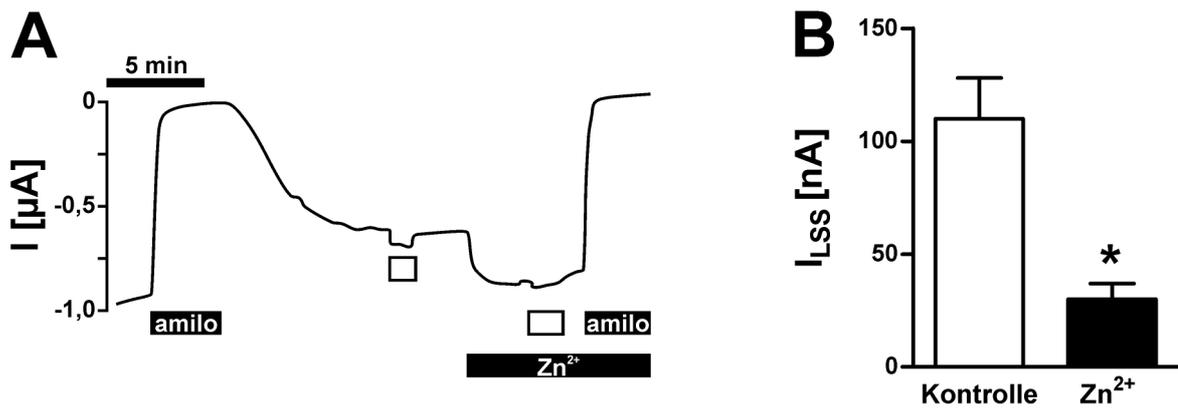


Abb. III-43: Zn^{2+} ($10 \mu\text{M}$) vermindert die Scherstress-induzierte Stromstimulation an rENaC-exprimierenden Oocyten.

(A) Der Transmembranstrom wird in Abwesenheit von Zn^{2+} durch laminaren Scherstress (weißer Balken) stimuliert. Die Superfusion von Zn^{2+} verursacht eine Zunahme des Membranstroms. Werden unter diesen Bedingungen erneut Scherkräfte appliziert, hat dies eine geringere Änderung des Stroms zur Folge. (B) Statistische Auswertung von 12 Versuchen dreier unterschiedlicher Donoren. Unter Kontrollbedingungen (ohne Zn^{2+}) verursacht der Einfluss von Scherkräften eine Stromstimulation von $110 \pm 18 \text{ nA}$. In Gegenwart von Zn^{2+} fällt die Stimulation mit $30 \pm 7 \text{ nA}$ signifikant geringer aus. I_{LSS} : Scherstress-induzierte Stromstimulation; amilo: $10 \mu\text{M}$ Amilorid; rENaC: ENaC der Ratte. Klemmpotenzial = -60 mV .

Zur weiteren Charakterisierung des klonierten humanen Na^+ -Kanals schlossen sich *Patch Clamp* Experimente an. In einem Spannungsbereich von -100 bis -20 mV wurde die Leitfähigkeit (*chord conductance*) bestimmt, indem die Kanalamplituden gegen die angelegte Spannung aufgetragen wurden. Es ergab sich eine Leitfähigkeit von $3,3 \text{ pS}$ in der *outside-out* Konfiguration und von $4,5 \text{ pS}$ in *cell-attached* Messungen ($n = 6 - 8$, $N = 2$).

Um den Einfluss von LSS auf Einzelkanalebene zu untersuchen, wurden die Kanalproteine in der *outside-out* Konfiguration einem Lösungsfluss exponiert. Dazu wurde der *patch* in einen Perfusionskanal verbracht, der separat mit Lösung durchspült werden konnte. Es wurde zunächst für eine Minute die Grundaktivität der Kanäle ohne LSS aufgenommen. Anschließend wurde für eine Minute LSS appliziert und letztlich für eine weitere Minute zusätzlich Amilorid perfundiert. Die Kanalamplitude bei -100 mV änderte sich durch LSS nicht signifikant (ohne LSS: $0,40 \pm 0,02$; mit LSS: $0,39 \pm 0,01$; $n = 5$, $N = 5$). Allerdings zeigte sich, dass LSS in 3 von 5 Messungen die relative Offenwahrscheinlichkeit (NP_0) des hENaCs modulierte (**Abb. III-44**). Im statistischen Mittel lag NP_0 in Abwesenheit der Scherkräfte bei $0,49 \pm 0,13$, während sie unter LSS auf $0,68 \pm 0,06$ anstieg ($p = 0,21$; $n = 5$, $N = 5$).

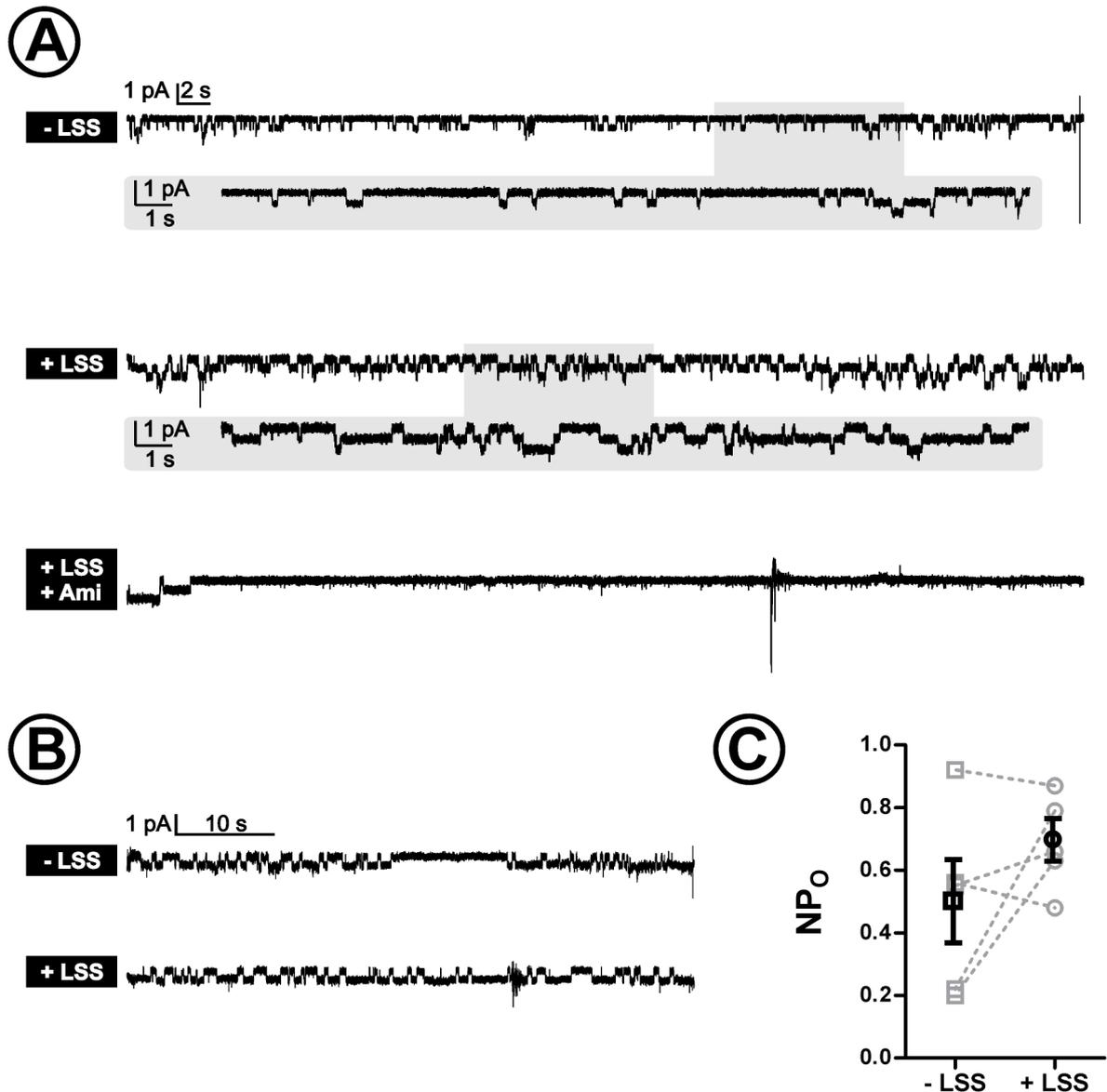


Abb. III-44: Einfluss von laminarem Scherstress (LSS) auf den humanen epithelialen Na⁺-Kanal in *outside-out Patch Clamp* Messungen.

(A) Dargestellt ist eine kontinuierliche Stromaufzeichnung in Abwesenheit von LSS (-LSS), während LSS (+LSS) sowie während LSS und gleichzeitiger Applikation von 10 μ M Amilorid (+LSS + Ami). Die Öffnung eines Kanals ist in der Abbildung als Ausschlag nach unten dargestellt. Die grau hinterlegten Stromaufzeichnungen stellen Ausschnittsvergrößerung dar. In 3 von 5 Messungen war eine sichtbare Erhöhung der Kanalaktivität (NP₀) festzustellen. (B) Im Gegensatz zu (A) konnte in 2 von 5 Experimenten keine Zunahme der Kanalaktivität durch LSS festgestellt werden. (C) Statistische Auswertung von 5 Messungen. Ohne LSS betrug die Kanalaktivität (NP₀) im Mittel $0,49 \pm 0,13$, während der Applikation von LSS lag NP₀ bei $0,68 \pm 0,06$ ($p = 0,21$). Die hellgrauen Datenpunkte zeigen den Verlauf der Einzelmessungen, die Mittelwerte \pm Standardfehler sind in schwarz dargestellt. Klemmpotenzial = -100 mV.

IV Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von mechanischem Stress auf den pulmonalen Ionentransport analysiert. Dabei fanden zwei unterschiedliche Untersuchungssysteme Verwendung: einerseits wurde der Einfluss von hydrostatischem Druck auf ein natives Lungenpräparat von *Xenopus laevis* studiert. Andererseits wurde der in der Lunge vorkommende humane epitheliale Na⁺-Kanal (hENaC) kloniert, heterolog in Oocyten exprimiert und die Beeinflussung durch Scherkräfte untersucht.

In der Diskussion wird zunächst die Bedeutung des pulmonalen Ionentransports anhand der Funktion in Säugerepithelien dargestellt. Anschließend wird der bisherige Kenntnisstand bzgl. Ionentransportmechanismen an Amphibienlungen aufgeführt und vor diesem Hintergrund die erhaltenen Ergebnisse diskutiert.

IV.1 Pulmonaler Ionentransport im Säugerepithel

Die Lunge der Säuger entstand in der Phylogenese aus Strukturen des Kiemendarms (Hyatt *et al.* 2007). Sie stellt eine *Pool*-Lunge dar, also ein Hohlraumssystem, bei welchem die Atemgase über dieselbe Öffnung sowohl hinein- als auch wieder hinausgelangen (Jurgens & Gros 2002). Die Atemgase erreichen über die Trachea und die Stammbronchien die beiden Lungenflügel. Über mehrfache Verzweigungen (Bronchien, Bronchiolen, respiratorische Bronchiolen) gelangen sie schließlich in blind-endende Alveolen, wo der Großteil des Gasaustauschs stattfindet. Beim Menschen liegen zwischen der Trachea und den Alveolen 23 bifurcale Verzweigungen; der Gasaustausch findet dabei über Strukturen statt, die sich durch die letzten 7 Verzweigungen ergeben (Fuchs *et al.* 2002).

IV.1.1 Alveolare Zelltypen

Die luftleitenden sowie respiratorischen Bereiche der Lunge werden von Epithelzellen bedeckt. Während in der Trachea und in den Bronchien noch bewimperte Zellen vorkommen, findet man in den Alveolen hauptsächlich unbewimperte Zellen, welche man als Alveolare Typ I (AT I) und Typ II (AT II) Zellen bezeichnet. Beide Zelltypen unterscheiden sich sowohl in morphologischer als auch in funktioneller Hinsicht. Alveolare Typ I Zellen sind mit circa 30 % zahlenmäßig zwar weniger prominent, bedecken aber aufgrund ihrer flachen und weitauslaufenden Form (durchschnittliche Zelldicke 0,4 µm) etwa 90 % der alveolaren Oberfläche (Fuchs *et al.* 2002). Ihnen wird in erster Linie eine Bedeutung für den

Gasaustausch zugeschrieben. Neuere Arbeiten liefern allerdings auch Hinweise auf einen vektoriellen Ionentransport durch AT I Zellen (Johnson *et al.* 2002; Johnson *et al.* 2006; Johnson 2007). Alveolare Typ II Zellen besitzen eine kuboide Form (durchschnittliche Zelldicke 10 μm) und sind mit circa 70 % der am stärksten vertretene Zelltyp im Alveolarepithel (Fuchs *et al.* 2002). Auffallend ist die starke Granulierung des Cytoplasmas. Sie ist auf sogenannte *lamellar bodies* zurückzuführen, welche der Sekretion von *surfactant* dienen (Daniels & Orgeig 2001). Als *surfactant* bezeichnet man oberflächenaktive Substanzen, die hauptsächlich aus Lipiden und circa 10 % Proteinen bestehen (Hyatt *et al.* 2007). Neben der Ausschüttung dieser oberflächenaktiven Substanzen wird die Hauptaufgabe der AT II Zellen im Transport von Ionen gesehen.

IV.1.2 Transportproteine

Die Epithelzellen der Lunge sind von einem dünnen Flüssigkeitsfilm (*airway surface liquid*, ASL) bedeckt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wirkt sich die Konsistenz des ASL direkt auf die Funktion der Lunge aus: eine Verdickung des ASL behindert die zur Reinigung des Epithels notwendige Bewegung der Cilien, während eine Volumenzunahme des ASL durch Verdünnung den Gasaustausch erschwert.

Die Viskosität und Höhe des ASL wird durch Ionentransportmechanismen der pulmonalen Epithelzellen bestimmt. Die Vorstellungen über vektoriellen epithelialen Ionentransport gehen zurück auf die sogenannte „Zwei-Membranen-Hypothese“ (*two membrane hypothesis*) von Hans Ussing (Koefoed-Johnsen & Ussing 1958; Reuss 2001). Die Haupttriebkraft besteht dabei in einer transepithelialen Aufnahme von Na^+ . In einem ersten Schritt tritt Na^+ über die apikale Membran durch epitheliale Na^+ -Kanäle (ENaCs) in die Zelle ein. Die Kanäle bestehen aus den drei Untereinheiten α , β und γ , welche vermutlich zu einem Heterotrimer assemblieren (Jasti *et al.* 2007). Neben diesen hochselektiven Na^+ -Kanälen (HSC = *highly Na⁺ selective channels*) werden in Zellkultur-Experimenten weitere Leitfähigkeiten beobachtet, die eine geringere Na^+ -Selektivität aufweisen (NSC = *nonselective cation channels*, Jain *et al.* 2001). Bei diesen handelt es sich wahrscheinlich um Kanäle, die nicht aus allen drei Untereinheiten zusammengesetzt sind, sondern lediglich aus der α - und evtl. einer weiteren Untereinheit bestehen (Jain *et al.* 2001). Weiterhin wurden Kanäle beschrieben, deren *gating* direkt von cyclischen Nukleotiden wie cAMP und cGMP abhängt (*cyclic nucleotide gated cation channels*, CNGs: Schwiebert *et al.* 1997; Xu *et al.* 1999; Kemp *et al.* 2001). Alle diese Transportproteine leiten, entsprechend der elektrochemischen Triebkraft, Na^+ über die apikale Membran ins Zellinnere. Auf der basolateralen Seite wird Na^+ im

Austausch gegen K^+ durch die Na^+-K^+ -ATPase aus der Zelle ausgeschleust, so dass eine niedrige intrazelluläre Na^+ -Konzentration erhalten bleibt. Das dafür aufgenommene K^+ verlässt über sogenannte „Sickerkanäle“ (*leak channels*), die ebenfalls basolateral lokalisiert sind, die Zelle. Man spricht hier auch von einem *pump leak* Mechanismus. Die elektrochemische Triebkraft für einen Na^+ -Einstrom energetisiert weiterhin einen basolateralen $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Cotransporter (NKCC). Dieser katalysiert in einem Symport den Eintrom von Na^+ , K^+ sowie 2 Chlorid-Ionen. Das aufgenommene Cl^- kann über den apikal lokalisierten Chlorid-Kanal CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) sekretiert werden. Einige Arbeitsgruppen postulieren allerdings auch eine resorbierende Funktion des CFTRs (Uyekubo *et al.* 1998). Neben der Cl^- Sekretion spielt der CFTR auch eine bedeutende Rolle für die Regulation des ENaC. Coexpressionsstudien zeigten, dass die Anwesenheit eines funktionellen CFTR-Proteins die Aktivität des ENaC hemmt (Briel *et al.* 1998). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die Abwesenheit des CFTR, bspw. in Mukoviszidose-Patienten, eine verstärkte Na^+ -Resorption verursacht (Kunzelmann *et al.* 2000). Neben der Beeinflussung der ENaC-Aktivität werden dem CFTR weitere regulatorische Einflüsse auf diverse Ionentransportproteine zugeschrieben (Übersicht in Kunzelmann *et al.* 2000).

Bedingt durch die klinische Relevanz pulmonaler Erkrankungen wie beispielsweise der Mukoviszidose liegt der Fokus der meisten Studien auf dem CFTR sowie dem ENaC. Es können jedoch weitere Transportproteine am pulmonalen Ionentransport beteiligt sein, deren Bedeutung allerdings wesentlich weniger gut erforscht ist. Auf eine induzierbare K^+ -Sekretion durch apikale K^+ -Kanäle wird von Basset *et al.* (1988), Saumon *et al.* (1989), Boucher (1994), Clarke *et al.* (1997) sowie Lee *et al.* (2003) hingewiesen.

IV.2 Pulmonaler Ionentransport im Epithel von *Xenopus laevis* - ein Modellsystem?

Nachdem die Bedeutung des pulmonalen Ionentransports sowie einige der beteiligten Transportproteine in der Säugerlunge dargestellt wurden, sollen nun die entsprechenden Eigenschaften der Amphibienlunge beleuchtet werden.

IV.2.1 Morphologie

Lungen der Amphibien *Xenopus*, *Bufo* und *Rana* wurden bereits in mehreren Arbeiten zur Untersuchung des pulmonalen Ionentransports verwendet. In den 1960er und 1970er Jahren

wurden vorwiegend morphologische Studien durchgeführt (Okada *et al.* 1962; Czopek 1965; Meban 1973; Dierichs 1975). Amphibienlungen verfügen im Vergleich zu Säugerlungen über einen weit einfacheren anatomischen Aufbau. Während die Säugerlunge durch eine schwammartige Gewebestruktur gekennzeichnet ist, sind die Lungen der Amphibien eher sackartig ausgebildet. Eine Oberflächenvergrößerung erfolgt über eine Septierung, die jedoch nicht das komplette Lungenlumen durchzieht, sondern auf die Randbereiche beschränkt bleibt. Die Septen formen Räume, in denen der Gasaustausch stattfindet und die in Anlehnung an die entsprechenden Strukturen bei Säugern auch als „primitive Alveoli“ (Okada *et al.* 1962) bezeichnet werden. Weiterhin ragen die Septen in das Lungenlumen hinein und sind dort pilzförmig ausgebildet. Sie treten zu einer Struktur zusammen, die man auch als „Vorbronchus“ (Okada *et al.* 1962) bezeichnet. Die Epithelzellen tragen in diesem Abschnitt Cilien - homolog den Verhältnissen in Säugerbronchien. In den „primitiven Alveolen“ von *Rana nigromaculata* und *Bufo vulgaris japonicus* wurden von Okada *et al.* (1962) zwei unterschiedliche Zelltypen postuliert. Eine Population bedeckt vorrangig die äußere Oberfläche der Kapillaren und verfügt über flache Zellkerne, wie sie auch bei AT I Zellen zu finden sind. Der zweite Zelltyp kommt hauptsächlich in den Zwischenräumen benachbarter Kapillaren vor und ähnelt aufgrund seiner kuboiden Form den AT II Zellen. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Säugern zeigen jedoch beide Zelltypen weitauslaufende Cytoplasmastränge sowie das Auftreten osmiophiler Vesikel. Die Zellmorphologie in den „primitiven Alveolen“ scheint allerdings abhängig von der Art zu sein. In Lungen von *Xenopus* konnten Fischer *et al.* (1989) und Meban (1973) nur einen Zelltyp feststellen. Dieser verfügte über morphologische Charakteristika von AT I Zellen (flache Form) gepaart mit dem Auftreten von *lamellar bodies*, also osmiophiler Vesikel, welche in AT II Zellen der *surfactant*-Sekretion dienen.

Die Dicke der amphibischen Blut-Luft-Schranke, bestehend aus Endothel, Basalmembran und Epithel, wird mit 0,3 bis 0,7 μm angegeben (Okada *et al.* 1962). Die Bedeutung des Gasaustauschs über die Lungen scheint bei Amphibien recht unterschiedlich zu sein, da sowohl Haut- als auch Mundhöhlenatmung auftreten. Für *Xenopus laevis* geht man davon aus, dass der überwiegende Teil der Atmung über die Lungen stattfindet (Graaf 1957). Dies wird unterstützt durch den Befund, dass der pulmonale Blutfluss den systemischen überwiegt (Czopek 1965).

Ähnlichkeiten zwischen Säugerlungen und der *Xenopus* Lunge lassen sich auch im *surfactant*-System erkennen. Die Expression von *surfactant*-Protein B und C beginnt bei *Xenopus* zeitgleich mit Ausbildung der Lungen im Embryo. Im Gegensatz zur Säugerlunge

werden die Proteine jedoch nicht nur in distalen Bereichen exprimiert, sondern verteilen sich über die gesamte Lungenoberfläche. Aus diesem Befund folgern Hyatt *et al.* (2007), dass auch der Gasaustausch bei *Xenopus* über das gesamte pulmonale Epithel stattfinden könnte.

IV.2.2 Transportproteine

Diverse Arbeiten haben sich bereits mit dem Ionentransport in Amphibienlungen beschäftigt. Die Mehrzahl der Studien basiert auf elektrophysiologischen Experimenten oder radioaktiven Flux-Messungen, während bislang wenig molekularbiologische oder immunhistologische Nachweise geführt wurden. In den 1970er Jahren begann die Forschung an der Lunge des Ochsenfroschs (*Rana catesbeiana*). Diese weist als Haupttransportmechanismus eine Chlorid-Sekretion auf (Gatzky 1975; Gatzky 1976) - Verhältnisse, wie sie auch aus der Trachea des Hundes (Welsh *et al.* 1982) oder der fetalen humanen Lunge (Pitkanen & O'Brodivich 1998) bekannt sind. Fischer *et al.* (1989) untersuchten anschließend die Lunge von *Xenopus* und postulierten die Anwesenheit apikaler Na⁺ Kanäle. Nach Blockade mit mikromolaren Konzentrationen von Amilorid, einem spezifischen ENaC-Inhibitor, wurden 60 - 99 % des Kurzschlussstroms gehemmt. Die Anwesenheit eines Amilorid-hemmbareren Stroms wurde im Anschluss mehrfach gezeigt (Kim 1990; Fronius *et al.* 2003; Fronius *et al.* 2004; Berk *et al.* 2004). Puoti *et al.* (1995) gelang der molekularbiologische Nachweis der ENaC-Untereinheiten α , β und γ in der *Xenopus* Lunge. Weiterhin wurde gezeigt, dass die basolaterale Applikation von Ouabain den Kurzschlussstrom vollständig inhibierte (Fischer *et al.* 1989). Daraus kann geschlossen werden, dass der elektrogene Transport über dem Epithel durch eine basolateral lokalisierte Na⁺-K⁺-ATPase energetisiert wird. Dem „Zwei-Membranen-Modell“ folgend, benötigt der vektorielle Na⁺-Transport über ENaC und Na⁺-K⁺-ATPase basolateral lokalisierte K⁺-Sickerkanäle. Funktionelle Hinweise auf deren Anwesenheit wurden von Illek *et al.* (1990) erbracht.

Die Ähnlichkeiten hinsichtlich Morphologie und Transporteigenschaften zwischen Säuglerlunge und der Lunge von *Xenopus* rechtfertigen also ihren Einsatz als Modellsystem zur Erforschung grundlegender Fragestellungen des pulmonalen Ionentransports.

IV.3 Einfluss mechanischer Kräfte auf die Physiologie der Lunge

Physikalische Kräfte spielen eine bedeutende Rolle für die Funktion der Lunge. Während jedes Atemzuges wirken positive und negative Drücke auf das Lungengewebe ein. Brown & Mitzner (2003) ahmten eine tiefe Einatmung nach, indem sie anästhesierte Hunde künstlich

beatmeten. Als Resultat stellten sie in Abhängigkeit des verwendeten Drucks eine Ausdehnung der Atemwege auf Werte von 125 bis 180 % fest (Brown & Mitzner 2001; Brown & Mitzner 2003). Eine ähnliche Vergrößerung der Atemwegsoberfläche bei tiefer Einatmung wurde in spontan-atmenden Menschen nachgewiesen (Brown *et al.* 2001). Die mit der Ausdehnung der Oberfläche verbundenen Kräfte regulieren Parameter wie die Produktion von *surfactant* oder die Apoptose pulmonaler Epithelzellen (Edwards 2001).

Neben der Beanspruchung während des Atemprozesses sind mechanische Kräfte auch bei der Lungenentwicklung von Bedeutung. Bereits während der fetalen Entwicklung werden Atembewegungen durchgeführt und somit mechanische Stimuli verursacht. Diese beeinflussen unter anderem die Differenzierung der alveolaren Zellen in AT I und AT II Zellen (Wirtz & Dobbs 2000; Dobbs & Gutierrez 2001) sowie eine verstärkte Proliferation der Epithelzellen (Chess *et al.* 2000).

Auch auf zellulärer Ebene wurden Studien zum Einfluss mechanischer Kräfte durchgeführt. Einige Arbeiten beschrieben dabei den Langzeiteffekt von mechanischem Stress. Fisher & Margulies (2002) fanden, dass nach einstündiger zyklischer Exposition eines Dehnungsreizes die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Aktivität in primären Alveolarzellen zunahm. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Waters *et al.* (1999): auch hier wurde nach 30 bis 60 minütiger zyklischer Dehnung von Alveolarzellen eine Zunahme der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Aktivität beobachtet. Die Autoren führen die Aktivitätszunahme auf ein erhöhtes *trafficking* zwischen intrazellulären Speichern und der basolateralen Membran zurück, welches in einem verstärkten Einbau von Membranproteinen resultierte. In beiden Arbeiten konnte der Effekt durch die Applikation von Gadolinium, einem Inhibitor mechanosensitiver Kanäle, vermindert werden.

Neben einem Einfluss auf Ionentransportmechanismen werden durch mechanischen Stress an alveolaren Epithelien auch andere Parameter beeinflusst. Cavanaugh *et al.* (2001) beobachteten eine Abnahme der Expression des *tight junction* Proteins Occludin sowie eine Verringerung der Zell-Zell-Verknüpfungen als Antwort auf einen einstündigen, zyklischen Dehnungsreiz. Weiterhin konnte durch Vlahakis *et al.* (1999) gezeigt werden, dass es nach mechanischer Stimulation zu einer vermehrten Gentranskription und Ausschüttung von Interleukin-8 kam.

Die bisher aufgeführten Arbeiten untersuchten die Auswirkung mechanischer Kräfte auf zelluläre Prozesse meist erst eine Stunde nach Einsetzen des Stimulus. Es sind vergleichsweise wenige Arbeiten bekannt, die auch die kurzzeitigen Effekte beleuchten. Durch Vlahakis *et al.* (2001) wurde beobachtet, dass eine mechanische Deformation alveolarer Epithelzellen innerhalb von 60 bis 90 Sekunden zu einem Einbau von

Membranlipiden aus vesikulären Speichern führte und damit eine Oberflächenvergrößerung der Zelle bedingte. Die Autoren interpretieren dies als einen Schutzmechanismus, mit dem die Zelle die Spannung auf ihrer Oberfläche verringert und entstandene Membranverletzungen repariert. Fisher *et al.* (2004) konnten durch Kapazitätsmessungen ebenfalls eine Zunahme der Membranfläche innerhalb eines Zeitraums von 5 Minuten nach mechanischer Deformation feststellen. Ein weiterer kurzzeitiger Effekt besteht in der Verringerung der Prostaglandin-Synthese, die bereits wenige Minuten nach mechanischer Reizung messbar wird (Savla *et al.* 1997) und von den Autoren auf eine Hemmung der Cyclooxygenase zurückgeführt wird.

IV.4 Hydrostatischer Druck reduziert den Kurzschlussstrom und die Kapazität der *Xenopus* Lunge

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der kurzzeitigen Wirkung mechanischer Kräfte auf den pulmonalen Ionentransport. Dabei konnte gezeigt werden, dass hydrostatischer Druck in der Lage ist, Ionentransportmechanismen über einem nativen Lungenpräparat von *Xenopus laevis* innerhalb eines Zeitraums von wenigen Minuten zu beeinflussen.

IV.4.1 Kurzschlussstrom

Die einseitige Erhöhung des hydrostatischen Drucks um 5 cm Wassersäule führte innerhalb weniger Minuten zu einer Reduktion des Kurzschlussstroms (I_{SC}). Nach Beendigung der Druckapplikation stieg der I_{SC} innerhalb von 10 – 20 Minuten auf Werte an, die signifikant über dem Ausgangsniveau (vor Druck) lagen. Der Effekt trat nur dann auf, wenn über dem Gewebe ein Druckgradient anlag und das Gewebe die Möglichkeit hatte, sich auszudehnen. Dabei war es nicht von Bedeutung, ob man den Druck von apikal oder basolateral applizierte. Wurde eine Verformung des eingespannten Präparats durch die Abstützung des Gewebes mittels eines Nylonnetzes verhindert, so war keine Druck-induzierte Strominhibition mehr zu verzeichnen. Dies deutet darauf hin, dass der initiale Stimulus zur Hemmung des I_{SC} in einer Dehnung der Zellmembran besteht, welche sich durch ein Aufblähen des Präparats ergeben könnte. Ein Resultat, welches diese Hypothese stützt, zeigte sich bei einer simultanen Erhöhung der Wassersäule auf beiden Gewebsseiten. Hier wurde zwar der hydrostatische Druck auf die Epithelzellen erhöht, jedoch wurde ein Aufblähen der Lunge und damit eine Dehnung der Epithelzellschicht verhindert. Die Ausdehnung des Epithels könnte durch mechanosensitive Ionenkanäle detektiert werden. Von diesen ist bekannt, dass sie in den

meisten Fällen durch eine Dehnung der Membran aktiviert werden und nicht durch senkrecht auf die Membran wirkenden Druck (Hamill & Martinac 2001).

Auch die schädigende Wirkung einer Überdruckbeatmung, wie sie bei Patienten mit eingeschränkter Lungenfunktion angewendet wird, scheint eher auf das Aufblähen der Lunge und der damit verbundenen Volumenzunahme als auf den erhöhten Druck zurückführbar zu sein. In der Studie von Dreyfuss *et al.* (1988) wurden unterschiedliche Ventilationsbedingungen hinsichtlich ihrer Lungen-schädigenden Wirkung verglichen. Dabei zeigte sich, dass eine Beatmung mit hohem Druck keine negative Auswirkung auf die Lungenstruktur hatte, wenn eine überstarke Volumenzunahme durch ein den Brustkorb umfassendes Korsett verhindert wurde.

Das Absinken des I_{SC} , welches in der vorliegenden Arbeit nach Druckapplikation auftrat, kann durch unterschiedliche Ereignisse verursacht werden. Um das Verständnis zu erleichtern, ist die Auswirkung einer transepithelialen Ionenbewegung in Abhängigkeit von Richtung und Ladung in **Abb. IV-1** dargestellt. Eine Druck-induzierte Inhibition des I_{SC} , kann begründet sein in (A) einer verstärkten Kationensekretion, (B) einer verstärkten Anionenresorption, (C) einer verminderten Kationenresorption oder (D) einer verminderten Anionensekretion. Letztlich bleibt zu bedenken, dass der gemessene I_{SC} den Summenstrom sämtlicher über dem Epithel stattfindender Transportprozesse darstellt. Eine gleichzeitige Beeinflussung verschiedener Leitfähigkeiten muss also berücksichtigt werden.

Prinzipiell wäre es auch möglich, dass ein Absterben von Zellen den Stromrückgang unter Druckeinwirkung erklären könnte. Allerdings ist dieser Umstand wenig wahrscheinlich, da der I_{SC} nach Beendigung des Drucks stark anstieg und schließlich ein Plateau erreichte, welches über den Ausgangswerten (vor Druck) lag. Die Reversibilität des Druckeffekts zeigt, dass die Transporteigenschaften des Epithels erhalten bleiben, was funktionsfähige Zellen voraussetzt.

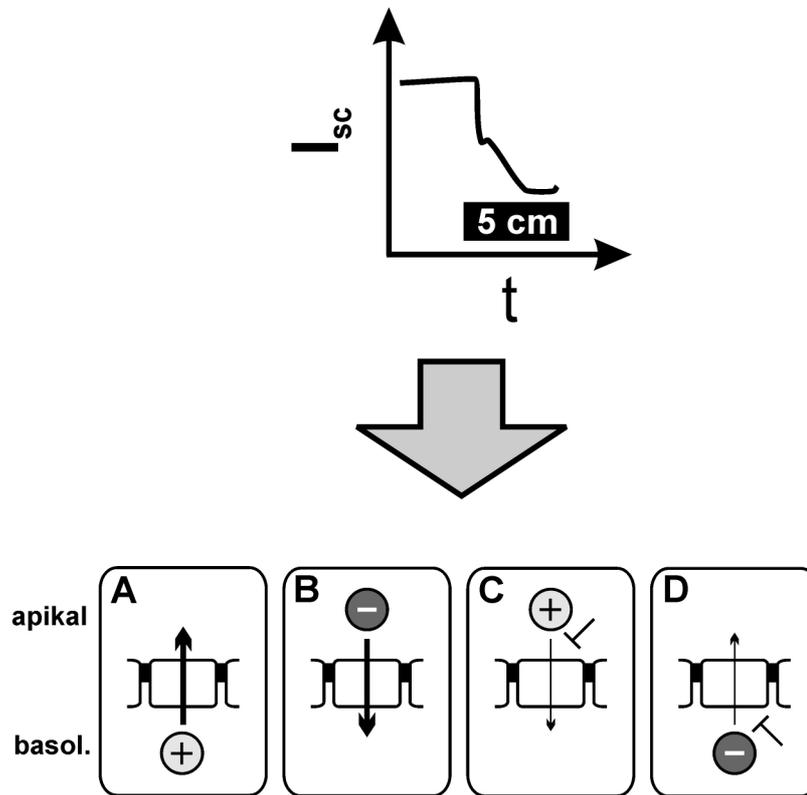


Abb. IV-1: Auswirkung des transepithelialen Ionentransports auf den Kurzschlussstrom (I_{sc}). Die im oberen Bildabschnitt dargestellte Druck-induzierte Inhibition (5 cm) des I_{sc} kann verursacht werden durch: (A) Kationensekretion, (B) Anionenresorption, (C) verminderte Kationenresorption oder (D) verminderte Anionensekretion. basol.: basolateral, t: Zeit. +: Kation, -: Anion.

IV.4.2 Widerstand

Neben dem Kurzschlussstrom wurde auch der elektrische Widerstand erfasst. Parallel zum Rückgang des I_{sc} war eine Verminderung des transepithelialen Widerstands zu verzeichnen. Betrachtet man allerdings den Verlauf über die gesamte Messdauer, also vom Einspannen des Gewebes in die Kammer über die Stromequilibrierungsphase bis zum Zeitpunkt vor Druckapplikation, so fällt auf, dass der Wert bereits vor Druckapplikation in gleichem Maße abnimmt. Somit kann nicht entschieden werden, ob die beobachtete Widerstandsänderung während Druckapplikation allein auf die Einwirkung des mechanischen Reizes zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit eintretenden geringfügigen Änderung wurde von anderen Autoren ein stärkerer Einfluss von mechanischen Kräften auf den Gewebswiderstand festgestellt. Dafür kommen im Wesentlichen zwei mögliche Erklärungen in Betracht: eine Schädigung der Gewebe-Integrität oder eine Aktivierung von Leitfähigkeiten.

Eine Schädigung der Gewebe-Integrität kann sich in einer erhöhten Durchlässigkeit der *tight junctions* manifestieren. Eine verringerte Expression des *tight junction* Proteins Occludin wurde nach einem einstündigen Dehnungsreiz in primären Alveolarzellen beschrieben (Cavanaugh *et al.* 2001). Eine mögliche Erklärung besteht in einer Druck-induzierten Veränderung des Cytoskeletts, mit welchem die *tight junction* Proteine wechselwirken. Es bleibt allerdings fraglich, inwieweit diese Daten mit denjenigen der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind, da die betrachteten Zeiträume stark differieren.

Eine Druck-induzierte Halbierung des Widerstands wurde von Wang *et al.* (2003a) am Blasenepithel des Kaninchens beobachtet. Der Effekt war nach Beendigung der Druckeinwirkung reversibel und wurde von den Autoren auf eine Aktivierung von Transportproteinen zurückgeführt.

Zusammengenommen kann festgehalten werden, dass die Erhöhung des hydrostatischen Drucks an der *Xenopus* Lunge nicht zu drastischen Änderungen des Gewebswiderstands führte. Eine physikalische Zerstörung des Epithelverbandes kann zwar nicht ausgeschlossen werden, spielt aber aufgrund der geringen Widerstandsänderungen eine untergeordnete Rolle. Die Sensitivität der Druck-induzierten Strominhibition gegenüber verschiedenen Ionenkanalblockern (siehe Abschnitt IV.6) legt allerdings nahe, dass es durch mechanische Stimulation zur Aktivierung unterschiedlicher Leitfähigkeiten kommt, was die Verminderung des Gewebswiderstands erklärt.

IV.4.3 Kapazität

Das Gewebe reagierte auf die Erhöhung des hydrostatischen Drucks mit einer Verminderung des I_{SC} . Nach Beendigung der Druckapplikation wurde ein Stromanstieg festgestellt. Die erzielten Stromwerte lagen dabei signifikant über dem Ausgangsniveau (vor Druck). Dieser Anstieg könnte die Folge eines Einbaus zusätzlicher Membranlipide sein, welche präformierte Ionenkanäle enthalten. Die dadurch bedingte Vergrößerung der Membranoberfläche kann als Kapazitätsänderung nachgewiesen werden. Daher wurde die Kapazität vor, während und nach Druckapplikation erfasst. Es zeigte sich, dass die Erhöhung des hydrostatischen Drucks zu einer Zunahme der Membrankapazität führte. Nach Beendigung der Druckeinwirkung und Einstellen eines Stromplateaus ging die Kapazität wieder auf die Ausgangswerte (vor Druck) zurück.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit verschiedenen anderen Arbeiten. Fisher *et al.* (2004) beschrieben eine Zunahme der Membranoberfläche (nachgewiesen mittels Kapazitätmessung) in primären AT II Zellen wenige Minuten nach Perzeption eines Dehnungsreizes. Vlahakis *et*

al. (2001) detektierten eine vergrößerte Membranoberfläche durch mechanische Stimuli mittels optischer Methoden in einer pulmonalen Zelllinie. Beide Autorengruppen vermuteten, dass der durch mechanische Stimulation ausgelöste Lipid-Einbau Teil eines zellulären Schutzmechanismus ist, der darauf abzielt, den mechanischen Stress zu minimieren. Biologische Membranen können lediglich zu 2 - 3 % gedehnt werden, bevor Membranbrüche auftreten (Apodaca 2002; Fisher *et al.* 2004). Um dies zu verhindern, wird die Zelloberfläche zunächst durch eine Glättung von Membraneinstülpungen oder Mikrovilli vergrößert. Ist dies nicht ausreichend, um den mechanischen Stress zu reduzieren, so erfolgt in einem weiteren Schritt der Einbau von Lipiden. Als Quelle der Membranlipide können submembrane Vesikel dienen (Lewis & de Moura 1982). Diese Vesikel stellen präformierte Membranteile dar, in die bereits Transportproteine eingelagert sein können. Auf diese Weise würde eine Vesikelfusion auch mit einer Erhöhung der Transporteigenschaften des Epithels einhergehen. Die Arbeit von Fisher *et al.* (2004) zeigte, dass das sogenannte Membran-remodelling, also der Ein- und Ausbau von Lipiden, innerhalb kurzer Zeiträume ablaufen kann: bereits 5 Minuten nach Ende der Druckapplikation war die ursprüngliche Zelloberfläche (Oberfläche vor Druck) wieder hergestellt. Dabei ist zu erwähnen, dass aufgrund des experimentellen Aufbaus keine Messwerte für kürzere Zeiträume aufgenommen werden konnten. Somit ist nicht auszuschließen, dass die Restrukturierung der Zelloberfläche innerhalb noch kürzerer Zeiten erfolgen kann. Die Prozesse des Membran-remodellings laufen meist über Endo- und Exocytose (Apodaca 2002). Eine alternative Vorstellung wird von Lewis & de Moura (1984) aufgebracht. Auch diese Autoren beobachteten eine Zunahme der Membrankapazität durch hydrostatischen Druck, welche kurze Zeit nach Beendigung der Druckeinwirkung reversibel war. Die schnelle Reversibilität wurde von den Autoren darauf zurückgeführt, dass die inkorporierten Vesikel an Mikrofilamenten verankert sind. Durch Druckeinfluss wird die Zellmembran eingedrückt, so dass ein Verschmelzen von Vesikeln mit der Membran stattfinden kann. Bei Beendigung der Druckeinwirkung kehrt die Zellmembran wieder in ihre Ausgangsposition zurück, wobei die an Mikrofilamenten befestigten Vesikel wieder aus der Membran „herausgezogen“ werden.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Kapazitätsänderung nach Druckeinwirkung kann also durch die Fusion submembraner Vesikel bedingt sein. Der biphasische Verlauf des Isc (kurzzeitige Hemmung während Druck, langfristige Stimulation nach Druck) lässt sich allerdings nur bedingt durch den Einbau Ionenkanal-haltiger Vesikel erklären. Die bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, dass der Druck-induzierte Effekt ein Zusammenspiel

verschiedener zellulärer Antwortreaktionen darstellt, an dem auch die Fusion submembraner Vesikel beteiligt sein kann.

IV.5 Hydrostatischer Druck führt zur Freisetzung von ATP

Neben der Erfassung des Kurzschlussstroms und der Kapazität wurde in der vorliegenden Arbeit auch die ATP-Konzentration in der Perfusionslösung untersucht, welche aus der Ussing-Kammer austrat. Es zeigte sich, dass bereits unter basalen Bedingungen (Abwesenheit von mechanischem Stress) eine geringe ATP-Konzentration im apikalen Kammerkompartiment nachweisbar war. Die Einwirkung hydrostatischen Drucks hatte einen reversiblen Anstieg der gemessenen ATP-Konzentration zur Folge.

Die Freisetzung des Nukleotids durch mechanische Stimulation konnte in jedem bislang untersuchten Zelltyp nachgewiesen werden (Aleu *et al.* 2003), wobei die Art des Stimulus durchaus unterschiedlich sein kann. Sowohl Scherkräfte (Tarran *et al.* 2006) als auch Zellschwellung in hypotonem Medium (Boudreault & Grygorczyk 2002) oder Zellschrumpfung in hypertoner Lösung (Aleu *et al.* 2003) führten zu einem Ausstoß von ATP. Unabhängig vom Stimulus wirkt das Nukleotid als auto- und parakriner Regulator. Die Wirkung bleibt auf das direkte Umfeld der sekretierenden Zelle beschränkt, da ATP im extrazellulären Medium innerhalb von Sekunden durch Nucleotidasen und Hydrolyse abgebaut wird (Fitz 2007).

Die physiologischen Aufgaben, die der Signalübertragung durch ATP zukommen, sind vielfältig. Im Rahmen dieser Arbeit ist von Interesse, dass die ATP-Freisetzung auch für volumenregulatorische Prozesse bedeutsam ist. Wang *et al.* (1996) demonstrierten, dass ATP als Folge einer Zellschwellung in hypotonem Medium ausgeschüttet wurde. Parallel dazu war ein Anstieg der Chlorid-Leitfähigkeit sowie eine Volumenregulation zu verzeichnen. Die Autoren folgerten, dass die ATP-Sekretion einen autokrinen Stimulus darstellt, über den das Zellvolumen reduziert werden kann.

Während zur Wahrnehmung extrazellulären ATPs weitreichende Erkenntnisse vorliegen, besteht über die Art und Weise, wie das ATP die Zelle verlässt, weiterhin Unklarheit (Fitz 2007).

Eine ATP Freisetzung kann durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen werden:

- (A) durch ATP Sekretion mittels Transportproteinen,
- (B) durch Fusion ATP angereicherter submembraner Vesikel oder
- (C) durch Ausstrom von Cytoplasma nach Beschädigung der Zellmembran.

Als ATP-sekretierendes Transportprotein ist u.a. der Chlorid-Kanal CFTR in der Diskussion (Schwiebert *et al.* 1995; Jiang *et al.* 1998). Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass die *Xenopus* Lunge über Chlorid-sekretierende Eigenschaften verfügt. Weiterhin konnten wir den molekularen und funktionellen Nachweis einer CFTR-Expression in der *Xenopus* Lunge erbringen (Sommer *et al.* 2007). Damit ist es möglich, dass die Druck-induzierte ATP-Freisetzung eine Sekretion des Nukleotids durch den CFTR darstellt.

Andere Arbeiten kommen allerdings zu dem Schluss, dass der CFTR selbst kein ATP leiten kann (Reddy *et al.* 1996), jedoch als Regulator auf ein ATP-permeables Transportprotein wirkt (Braunstein *et al.* 2001) oder indirekt die Exocytose des Nukleotids kontrolliert (Aleu *et al.* 2003).

Neben dem CFTR werden weitere Ionenkanäle mit der Freisetzung von ATP in Verbindung gebracht. Eine aktuelle Arbeit postuliert eine Rolle des ENaCs bei der Mechanotransduktion und der darauffolgenden ATP-Freisetzung (Du *et al.* 2007). Durch Amilorid-Applikation konnte eine mechanisch-induzierte ATP-Ausschüttung aus Blasenepithelzellen verhindert werden. Ein möglicher Mechanismus, der den Zusammenhang zwischen einer Mechanotransduktion über den ENaC und der ATP-Freisetzung erklären kann, wird von den Autoren jedoch nicht aufgestellt.

Auch andere mechanosensitive Kanäle wurden als Kandidaten für die ATP-Freisetzung in Betracht gezogen. Dies gründete im Wesentlichen auf dem Ergebnis, dass eine mechanisch induzierte ATP-Ausschüttung durch Gadolinium, einem Blocker mechanosensitiver Ionenkanäle, inhibiert werden konnte (Taylor *et al.* 1998; Roman *et al.* 1999; Braunstein *et al.* 2001). Als mögliche Kandidaten werden auswärts-gleichrichtende Chlorid-Kanäle (ORCCs, *outwardly rectifying chloride channels*) genannt (Braunstein *et al.* 2001), die durch Dehnung der Zellmembran aktiviert werden können (Solc & Wine 1991). ORCCs sind allerdings bislang nur funktionell beschrieben und auf molekularer Ebene nicht identifiziert (Jentsch *et al.* 2002; Nilius & Droogmans 2003), so dass das Vorkommen dieser Proteine in der *Xenopus* Lunge nicht näher untersucht werden konnte.

Ein weiterer Freisetzungsmechanismus für ATP besteht in der Fusion submembraner Vesikel. Diese enthalten, wie bereits in Abschnitt IV.4.3 dargestellt, präformierte Membranproteine. Die ATP-Konzentration innerhalb dieser Vesikel kann durch einen ATP-Transporter im Vergleich zur cytoplasmatischen Konzentration (etwa 3 - 5 mM, Fitz 2007) stark erhöht sein (Maroto & Hamill 2001). Dies ist von Bedeutung, da die eingelagerten Membranproteine auf dem Transportweg vom Golgi-Apparat in die Membran durch ATP-abhängige Enzyme posttranslational modifiziert werden. Maroto & Hamill (2001) konnten nachweisen, dass eine

mechanische Stimulation von *Xenopus* Oocyten zu einem Anstieg der ATP-Freisetzung im Perfusionsmedium führte. Diese konnte durch Brefeldin A, einem Inhibitor vesikulären Transports, geblockt werden. Für die Fusion solcher Vesikel in der hier vorliegenden Arbeit spricht die Erhöhung der Kapazität. Daher kann der Anstieg der extrazellulären ATP-Konzentration auch durch eine Vesikelfusion erklärt werden.

Weiterhin kann es auch zu einer Verkettung unterschiedlicher Freisetzungsmechanismen kommen. Die Arbeit von Aleu *et al.* (2003) zeigte, dass eine ATP-Ausschüttung durch *Xenopus* Oocyten in hypertoner Lösung in zwei Phasen erfolgte. Die Autoren folgerten, dass es während der ersten Phase vorwiegend zu Exocytose-Ereignissen kam, während in der zweiten Phase das Nukleotid durch ein Transportprotein ausgeschleust wurde.

Letztlich bleibt zu erwähnen, dass auch der Austritt von Cytoplasma durch eine Zerstörung der Zellmembran nach Druckeinwirkung einen Anstieg der extrazellulären ATP-Sekretion zur Folge hat.

Zusammengenommen kann die hier beobachtete ATP-Freisetzung also sowohl durch Vesikelfusion (Kapazitätsänderung) als auch durch Transportproteine (CFTR) vermittelt werden.

Unabhängig vom Freisetzungsmechanismus wird ATP durch purinerge Rezeptoren detektiert. Diese lassen sich unterschiedlichen Subtypen zuordnen, von denen ein Teil über G-Proteine an Effektorproteine gekoppelt ist (metabotrope Rezeptoren, P1 und P2Y), während andere selbst als Ionenkanäle fungieren (ionotrope Rezeptoren, P2X) (Fitz 2007). P1-Rezeptoren werden am stärksten durch Adenosin stimuliert und modulieren die Aktivität der Adenylatzyklase. Das Substratspektrum der P2Y-Rezeptoren umfasst ADP, ATP und UTP. Diese Rezeptoren sind vorrangig an Phospholipasen gebunden. Die Aktivierung von P2X-Rezeptoren führt dagegen direkt zur Öffnung von Membranporen, durch welche Na⁺ und Ca²⁺ aus dem Extrazellulärraum einströmen.

Die Konzentrationen für die halbmaximale Aktivierung purinergere Rezeptoren liegen typischerweise im Bereich von 3 bis 500 nM (Fitz 2007). Die an der *Xenopus* Lunge detektierte ATP-Konzentration stieg von circa 6 nM unter basalen Bedingungen auf circa 40 nM nach mechanischem Stress. Eine Druck-induzierte ATP-Sekretion in ähnlicher Größe wurde auch an Epithelzellen des Harnleiters (Knight *et al.* 2002) sowie an alveolaren Epithelzellen (Patel *et al.* 2005) gemessen. Eine Aktivierung purinergere Rezeptoren durch freigesetztes ATP ist also prinzipiell möglich, zumal die Anwesenheit von P1- und P2-Rezeptoren in der *Xenopus* Lunge bereits postuliert wurde (Fronius *et al.* 2004). Die halbmaximale Aktivierung wurde dort allerdings bei 96 µM extrazellulärem ATP festgestellt.

Daher bleibt fraglich, ob der in der vorliegenden Arbeit detektierte geringe ATP-Anstieg für eine Aktivierung ausreicht. Es muss allerdings bedacht werden, dass die Konzentration in der austretenden Perfusionslösung bestimmt wurde. In direkter Nähe zur Zelloberfläche kann der ATP Gehalt durchaus höher liegen. Von Sorensen & Novak (2001) werden Konzentrationen von 9 μM berichtet. Weiterhin ist ein Abbau von sekretiertem ATP durch Ekto-ATPasen nicht auszuschliessen, wie es bereits für folliculierte *Xenopus* Oocyten gezeigt wurde (Ziganshin *et al.* 1995). Die Beteiligung purinerner Rezeptoren am Druckeffekt kann also nicht ausgeschlossen werden. In einer parallel laufenden Diplomarbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Blockade von P-Rezeptoren durch den Inhibitor Suramin den Druckeffekt nicht signifikant veränderte (Veith 2007). Neben der Bindung an P-Rezeptoren besteht eine weitere Möglichkeit der Signaltransduktion durch ATP. Ein starker ATP-Ausstrom führt zur Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration. Dies wiederum beeinflusst das *gating* ATP abhängiger Ionenkanäle. Einen möglichen Kandidaten für einen Ionenkanal, der auf eine Verminderung der intrazellulären ATP-Konzentration mit einer Erhöhung der Leitfähigkeit reagiert ist der K^+ -Kanal K_{ATP} (siehe Abschnitt IV.6.1).

IV.6 Hydrostatischer Druck induziert die Sekretion von Kalium

Wie in Abschnitt IV.4.1 dargestellt, besteht ein möglicher Erklärungsmechanismus für die Druck-induzierte Strominhibition in einer Sekretion von Kationen. Eine Kationensekretion ergibt sich, wenn apikal lokalisierte Kanäle Kalium entsprechend der elektrochemischen Triebkraft in das Lungenlumen hinein leiten. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden Versuche durchgeführt, die auf eine pharmakologische Inhibition eines K^+ -Ausstroms oder eine Verringerung der elektrochemischen Triebkraft abzielten. Sowohl die Blockade apikaler K^+ -Kanäle durch Ba^{2+} als auch die apikale Perfusion einer Hoch- K^+ Lösung resultierten in einer Abschwächung des Druckeffekts. Diese Ergebnisse sprechen für eine maßgebliche Beteiligung dieser Leitfähigkeiten am Auftreten der Druck-induzierten Strominhibition. Zwar zeichnen sich pulmonale Epithelzellen vor allem durch Na^+ und Cl^- transportierende Eigenschaften aus, jedoch liefern verschiedene Arbeiten Hinweise auf die Existenz apikaler K^+ -Kanäle in diesen Zellen. Basset *et al.* (1988), Saumon *et al.* (1989), Clarke *et al.* (1997) und Wu *et al.* (2004) postulieren eine apikale Lokalisation von K^+ -Kanälen in pulmonalen Epithelzellen, über welche eine K^+ Sekretion erfolgen kann. Auch O'Grady & Lee (2003) führen an, dass die K^+ -Konzentration im *airway surface liquid* höher ist als jene im Blutplasma. Dies macht es wahrscheinlich, dass es unter physiologischen Bedingungen zu

einer K^+ -Sekretion kommt. O'Grady & Lee (2003) führen dies auf einen K^+ -Ausstrom durch spannungsabhängige K^+ -Kanäle zurück.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf eine Identifizierung der am Druck-Effekt beteiligten K^+ -Kanäle gelegt. Die Genfamilie der K^+ -Kanäle umfasst circa 100 Mitglieder (Miller 2000). Man geht davon aus, dass diese Ionenkanäle evolutiv bereits früh entstanden, da alle bisher bekannten Genome von Eukaryoten, Prokaryoten und Archaeen Gene für mindestens einen K^+ -Kanal aufweisen (Miller 2000).

Man teilt die Kanalfamilie in Subklassen ein, die sich in der Anzahl ihrer Transmembrandomänen und Porenregionen unterscheiden. Weiterhin sind die Stimuli, welche das *gating* der Kanäle beeinflussen, divers. Eine funktionelle und strukturelle Unterteilung erfolgt laut Coetzee *et al.* (1999) in:

- (A) die spannungs- (K_v) und Ca^{2+} -abhängigen (K_{Ca2+}) Kanäle mit 6 Transmembrandomänen (TM) und einer Poren-Region,
- (B) die einwärtsgerichtenden Kanäle (K_{ir} , K^+ *inward rectifier*) mit 2 TM und einer Poren-Region,
- (C) die 2-Poren-Regionen- K^+ -Kanäle (2-P), bei welchen die Poren-Region als Tandem ausgebildet ist und die weiterhin über 4 TMs verfügen.

Generell besitzen K^+ -Kanäle im funktionellen Zustand eine vierfache Symmetrie der Porenregion. Dies hat zu Folge, dass diejenigen Subfamilien mit einer Porenregion (K_v , K_{Ca2+} , K_{ir}) als Tetramere assemblieren, wohingegen die 2P-Kanäle als Dimere vorliegen.

Die Assoziation der Kanäle mit verschiedenen Untereinheiten (*auxiliary subunits*) macht eine weitere Modifikation der Eigenschaften möglich. So entsteht durch die funktionelle Wechselwirkung zwischen K_{ir} und dem Sulfonylharnstoffrezeptor die Gruppe der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle (K_{ATP}).

IV.6.1 ATP-abhängige K^+ -Kanäle

Zur Subfamilie mit 2 Transmembrandomänen und 1 Porenregion (2TM 1P) gehören die Vertreter der einwärtsgerichtenden Kanäle K_{ir} . Die einwärtsgerichtende Funktion ergibt sich daraus, dass die Kanäle bei Membranspannungen aktiviert werden, die negativer sein können als das K^+ -Gleichgewichtspotenzial. Dies hat zur Folge, dass K^+ -Ionen auch in das Zellinnere geleitet werden können. Durch eine Assemblierung der K_{ir} mit dem Sulfonylharnstoffrezeptor (*SUR*), entsteht die Klasse der ATP abhängigen K^+ -Kanäle (K_{ATP}). Diese detektieren die intrazelluläre ATP-Konzentration und sind somit mit dem metabolischen Zustand der Zelle gekoppelt. Ein Absinken des intrazellulären ATP Gehalts

führt zur Öffnung der Kanäle (Baukrowitz & Fakler 2000). Eine mögliche Bedeutung dieser Kanäle für die Funktion von Epithelzellen zeigen Tsuchiya *et al.* (1992) auf. Die Autoren stellen in ihrer Arbeit die Hypothese auf, dass ATP die Kopplung zwischen der Na^+ - K^+ -ATPase und K^+ -Kanälen ermöglicht. Eine steigende Aktivität der Na^+ - K^+ -ATPase geht einher mit einer Anhäufung von K^+ im Cytoplasma sowie mit dem Verbrauch intrazellulären ATPs. ATP abhängige K^+ -Kanäle können das Absinken der intrazellulären ATP-Konzentration detektieren und somit einen vermehrten K^+ -Ausstrom gewährleisten. Mit der Kopplung zwischen der Aktivität der Na^+ - K^+ -ATPase und einem K^+ -Ausstrom wird die Aufrechterhaltung des Membranpotenzials und des Zellvolumens ermöglicht (Welling 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung von K_{ATP} am Auftreten der Druck-induzierten Strominhibition durch den Einsatz des K_{ATP} -Blockers Glibenclamid geprüft. Die Selektivität von Glibenclamid ist stark abhängig von der eingesetzten Konzentration. In niedrigen Dosen wird das Pharmakon als K_{ATP} -Blocker eingesetzt (Leroy *et al.* 2004), während höhere Konzentrationen zur Inhibition des CFTR verwendet werden. Da beide Transportproteine zur Familie der ABC-Transporter gehören (bei K_{ATP} durch den Sulfonylharnstoffrezeptor), könnte der Einfluss des Pharmakons auf einer Wechselwirkung mit der ATP-bindenden Kasette beruhen (Yamazaki & Hume 1997). Wie in einer Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde (Sommer *et al.* 2007), führte Glibenclamid in Konzentrationen $< 500 \mu\text{M}$ zu einer Stimulation des I_{SC} an der Lunge von *Xenopus*, während sich höhere Konzentrationen in einer Hemmung bemerkbar machten (IC_{50} für die Strominhibition $748 \mu\text{M}$). Dieses Resultat steht im Einklang mit der Annahme, dass das Pharmakon in niedrigen Konzentrationen apikal lokalisierte K_{ATP} blockieren kann (Stimulation des I_{SC}), während bei hohen Konzentrationen die Inhibition des CFTR überwiegt (Inhibition des I_{SC}). In der vorliegenden Arbeit wurde $100 \mu\text{M}$ Glibenclamid eingesetzt. Diese Konzentration wurde auch bereits in anderen Arbeiten zur Blockade von K_{ATP} verwendet (Sakuma *et al.* 1998; Leroy *et al.* 2004). Es zeigte sich, dass die apikale Perfusion von Glibenclamid in der Lage war, den Druckeffekt signifikant abzuschwächen. Dies deutet darauf hin, dass eine mechanische Stimulation der *Xenopus* Lunge zu einer Aktivierung von K_{ATP} führt. Ein möglicher Mechanismus der Aktivierung könnte eine verminderte intrazelluläre ATP-Konzentration darstellen. Unter Druckeinfluss war ein ATP-Anstieg in der apikalen Perfusionslösung feststellbar. Dies könnte mit einem Absinken der intrazellulären ATP-Konzentration einhergehen, welche eine Öffnung von K_{ATP} zur Folge hat. Die intrazelluläre ATP-Konzentration liegt im Bereich von $3 - 5 \text{ mM}$ (Fitz 2007), wohingegen K_{ATP} -Kanäle in *Patch Clamp* Experimenten bereits durch $100 \mu\text{M}$ ATP inhibiert werden (Van

Wagoner 1993). Eine Aktivierung von K_{ATP} müsste also einen immensen Rückgang der ATP-Konzentration voraussetzen. Dass mechanischer Stress die intrazelluläre ATP-Konzentration tatsächlich stark beeinflusst, wird von Cavanaugh *et al.* (2001) beschrieben. Die Autoren zeigten, dass es nach einer einstündigen Exposition gegenüber zyklischer Dehnung zu einer Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration um 40 - 75 % (je nach Stärke des Dehnungsreizes) kam. Weiterhin muss bedacht werden, dass die Abnahme der ATP-Konzentration in unmittelbarer Nähe der Zellmembran größer sein kann als die Reduktion des gesamten zellulären ATP-Gehalts. Ein ähnlicher Gedanke findet sich bei Mironov & Richter (2000), die hervorheben, dass ein Rückgang der oxidativen Phosphorylierung in Kombination mit dem ATP-Verbrauch durch Ionenpumpen sich auf die ATP-Konzentration nahe der Zellmembran auswirken. Da die Messung des intrazellulären ATP-Gehalts während mechanischer Stimulation in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war, kann hier keine abschließende Aussage über die Aktivierung von K_{ATP} durch diesen Mechanismus getroffen werden. Was allerdings gegen eine derartige Aktivierung von K_{ATP} spricht, ist die Tatsache, dass der Kurzschlussstrom nach Druckwegnahme in einigen Messungen sehr schnell wieder zunahm (vgl. **Abb. III-11**, Seite 57). Es bleibt fraglich, ob die intrazelluläre ATP-Konzentration in dieser kurzen Zeit wiederhergestellt werden kann.

Ein weiterer Aktivierungsmechanismus von K_{ATP} wird von einigen Autoren in einer direkten Mechanosensitivität gesehen, die über Kopplung mit dem Cytoskelett erreicht wird. Von Van Wagoner (1993) wird berichtet, dass Kanäle in Cardiomyocyten in *Patch Clamp* Experimenten durch Anlegen eines Unterdrucks oder durch Inkubation in hypoosmotischer Lösung aktiviert werden konnten. Die Selektivität für K^+ sowie die Hemmbarkeit durch ATP und Sulfonylharnstoffe deuten darauf hin, dass es sich bei den Leitfähigkeiten um K_{ATP} -Kanäle handelt. Auch Mironov & Richter (2000) beobachteten eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit von K_{ATP} durch Unterdruck in der *Patch*-Pipette oder Applikation hypoosmotischer Lösung. Weiterhin erhöht sich die Aktivität der Kanäle, wenn das Mikrofilament-Netzwerk durch Applikation von Cytochalasin B depolymerisiert wird (Terzic & Kurachi 1996; Mironov & Richter 2000), was einen Hinweis auf eine Wechselwirkung zwischen K_{ATP} und dem Cytoskelett gibt.

Die Expression von K_{ATP} in der Lunge wurde sowohl für Endothelzellen (Chatterjee *et al.* 2006) als auch für alveolare Typ II Zellen (Leroy *et al.* 2004; Trinh *et al.* 2007) bestätigt. In AT II Zellen der Ratte setzten sich die Kanäle aus den Untereinheiten *Kir6.1* und *SUR2B* zusammen. Sakuma *et al.* (1998) stellten fest, dass eine Aktivierung von K_{ATP} Kanälen zu

einer Steigerung der K^+ -Sekretion in den Alveolarraum führte, was zudem auf eine apikale Lokalisation der Kanäle schließen lässt.

Zusammengenommen kann also festgehalten werden, dass die Erhöhung des hydrostatischen Drucks an der *Xenopus* Lunge zu einer Aktivierung von K_{ATP} führt, wobei die auslösenden Mechanismen bislang nicht geklärt sind.

IV.6.2.2-Poren-Domänen K^+ -Kanäle

Neben den ATP-abhängigen K^+ -Kanälen kommen in Lungenepithelien weitere K^+ -Leitfähigkeiten vor. Diese gehören zu den drei Subfamilien der spannungsabhängigen, Ca^{2+} -aktivierten und 2-Poren-Domänen K^+ -Kanäle (Leroy *et al.* 2004). Innerhalb der 2-Poren-Domänen K^+ -Kanal-Subfamilie (2-P- K^+ -Kanäle) findet man auch mechanosensitive Mitglieder. Es handelt sich dabei um die Proteine TREK-1, TREK-2 und TRAAK sowie TASK-2. Die ersten drei aufgeführten Vertreter wurden vorrangig in neuronalen Geweben identifiziert, jedoch findet man auch eine Expression beim Menschen in Ovar und Verdauungstrakt (TREK-1), Plazenta (TREK-2, TRAAK) sowie in der Niere (TREK-2) (Patel *et al.* 2001). Während TREK-1, TREK-2 und TRAAK als direkt mechanosensitiv angesehen werden, gilt TASK-2 als osmotisch reguliert.

Die Beteiligung der 2-P- K^+ -Kanäle am Druckeffekt wurde mittels der Pharmaka Quinin, Clofilium und Bupivacain untersucht. Während Quinin und Clofilium in der Literatur bereits zur Blockade verschiedener K^+ -Kanaltypen eingesetzt wurden, gilt Bupivacain als spezifischer Inhibitor der 2-P- K^+ -Kanäle (O'Connell *et al.* 2002; Davis & Cowley 2006; Inglis *et al.* 2007). Die Druck-induzierte Strominhibition bei apikaler Perfusion der Pharmaka war signifikant größer als dies unter Kontrollbedingungen (ohne Pharmaka) der Fall war. Daraus kann gefolgert werden, dass 2-P- K^+ -Kanäle durch Druckeinwirkung beeinflusst werden. Allerdings vermitteln diese Leitfähigkeiten nicht die Netto- K^+ -Sekretion in das apikale Kompartiment, da sonst eine Verminderung des Druckeffekts unter Bupivacain zu erwarten wäre. Das Ergebnis deutet eher darauf hin, dass die Sekretion von Kalium durch 2-P- K^+ -Kanäle nicht in das apikale sondern in das basolaterale Kompartiment erfolgt. In einer Versuchsreihe wurde daraufhin die Beteiligung basolateraler K^+ -Kanäle am Druckeffekt untersucht. Dazu wurde zunächst ein K^+ -Gradient angelegt (apikal K^+ -Ringer, basolateral NRS). Nachdem die apikale Membran durch Nystatin permeabilisiert worden war, stieg der I_{SC} stark an. Die basolaterale Membran verfügt also über eine deutlich höhere K^+ -Leitfähigkeit als die apikale. Wurde unter dieser Bedingung der hydrostatische Druck erhöht, war keine Inhibition sondern eine Stimulation des I_{SC} zu beobachten, die durch Ba^{2+}

geblockt werden konnte. Dies macht es wahrscheinlich, dass der mechanische Stress auch zur Aktivierung basolateraler K^+ -Kanäle führt. Zwar werden 2-P- K^+ -Kanäle im Allgemeinen als Ba^{2+} -insensitiv betrachtet (Inglis *et al.* 2007), allerdings zeigt die Arbeit von Reyes *et al.* (1998) das circa 20 % des TASK-2 getragenen Stroms durch 1 mM Ba^{2+} inhibiert werden konnten (die Inhibition durch 1 mM Bupivacain betrug 80 %). TASK-4 wiederum wird durch Ba^{2+} (83 % Inhibition bei 2 mM) sogar stärker inhibiert als durch Bupivacain (Decher *et al.* 2001).

Einige Studien sprechen dafür, dass es sich bei den 2-P- K^+ -Kanälen um die basolateral lokalisierten „*leak channels*“ handelt (Coetzee *et al.* 1999; Goldstein *et al.* 2001; Davis & Cowley 2006). Diese Kanäle leiten Kalium, welches über die Na^+K^+ -ATPase in das Zellinnere transportiert wurde, wieder zurück in das basolaterale Kompartiment und sind durch dieses Kalium-*Recycling* maßgeblich an der Aufrechterhaltung des Membranpotenzials beteiligt. Eine Blockade basolateraler K^+ -Kanäle führt zu einer Depolarisation der basolateralen Membran, welche sich jedoch auch auf die apikale Zellseite auswirken kann (Cowley & Linsdell 2002). Gerade in Zellen mit äußerst flacher Morphologie, wie man sie bei alveolaren Zellen findet, sollte sich diese Wechselwirkung verstärkt bemerkbar machen. Über die Beeinflussung des Membranpotenzials wirkt sich daher eine Hemmung basolateraler K^+ -Kanäle auch auf andere Leitfähigkeiten aus. Dies hat zu Folge, dass die elektrochemische Triebkraft für eine apikale Chlorid-Sekretion verringert wird (Davis & Cowley 2006). Zusammengenommen sollte also die Blockade basolateraler K^+ -Kanäle den gleichen Effekt auf den I_{sc} haben wie die Hemmung apikaler Chlorid-Kanäle. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Wirkung des Chlorid-Kanalblockers DIDS in An- und Abwesenheit von Bupivacain untersucht. Es zeigte sich, dass DIDS den Strom an der *Xenopus* Lunge inhibierte. Wurde jedoch zunächst Bupivacain appliziert, so hatte DIDS keine additive Wirkung. Dies deutet daraufhin, dass sowohl Bupivacain als auch DIDS die Chlorid-Sekretion an der *Xenopus* Lunge beeinflussen. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Chlorid-Kanalblockern auf den Druckeffekt untersucht (siehe Abschnitt IV.10, Seite 127)). Es zeigte sich für diese Versuchsreihe tatsächlich das gleiche Bild wie bei Verwendung der 2-P- K^+ -Kanalblocker. Auch der zeitliche Verlauf des Druckeffekts zeigt erstaunliche Ähnlichkeiten zwischen beiden Versuchsreihen. Wie bereits beschrieben (vgl. **Abb. III-2**, Seite 46), konnten unter Kontrollbedingungen unterschiedliche Formen der Druck-induzierten Strominhibition beobachtet werden. Dabei kam es bei einem Typ zu einer schnellen Inhibition gefolgt von einer transienten Stimulation. Auffällig war, dass die transiente Stimulation in Gegenwart von 2-P- K^+ -Kanalblockern oder Chlorid-

Kanalinhhibitoren nicht mehr zu beobachten war, auch wenn sie zuvor unter Kontrollbedingungen auftrat. Dies legt den Schluss nahe, dass (A) sich der Druckeffekt aus einer Modulation verschiedener Leitfähigkeiten zusammensetzt, (B) die transiente Stromstimulation auf eine Chlorid-Sekretion zurückzuführen ist und (C) die Applikation von 2-Poren-Domänen K^+ -Kanalblockern eine verminderte Chloridleitfähigkeit zur Folge hat.

Ob die apikale Applikation von Bupivacain die Blockade von K^+ -Kanälen in der basolateralen Membran bewirken kann, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht werden. Davis & Cowley (2006) postulieren eine vorwiegend apikale Lokalisation der 2-P- K^+ -Kanäle in Calu-3 Zellen und stellen auch hier die Bedeutung dieser Kanäle für die Anionensekretion heraus. Wie in der vorliegenden Arbeit führte auch in der zitierten Studie die apikale Applikation von Bupivacain zu einer Inhibition des Kurzschlussstroms. Allerdings reduzierte auch die basolaterale Gabe von Bupivacain den I_{SC} , weshalb sich Applikationsort und Wirkort durchaus unterscheiden können. Als Gründe können eine erhöhte transmembrane und/oder parazelluläre Permeabilität des Pharmakons angesehen werden. Auch von Ribeiro *et al.* (2001) wurde eine Inhibition basolateraler K^+ -Kanäle durch die apikale Applikation des Blockers Quinin an Darmepithelzellen beobachtet. Die Autoren vermuten, dass die Lipophilie des Pharmakons eine Diffusion durch die Zelle ermöglicht.

Um die pharmakologischen Daten zur Beteiligung von 2-P- K^+ -Kanälen abzusichern, wurden RT-PCR Experimente durchgeführt. Hier konnte die mRNA-Expression für TWIK2 und TASK2 in der *Xenopus* Lunge nachgewiesen werden. Die Daten stehen im Einklang mit der Studie von Davis & Cowley (2006), in der die Expression von TREK-1, TWIK-2 und TASK-2 in der pulmonalen Zelllinie Calu-3 bestätigt wurde. Auch Inglis *et al.* (2007) wiesen diverse 2-Poren-Domänen K^+ -Kanäle in der pulmonalen Zelllinie H441 nach. Abweichend zu den zitierten Publikationen konnte in der vorliegenden Arbeit trotz mehrfacher Versuche keine konsistente Expression von TREK-1, TREK-2 und TRAAK in der *Xenopus* Lunge gefunden werden.

IV.6.3 Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle

Innerhalb der Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle wurden bislang fünf Mitglieder identifiziert, die sich bezüglich ihrer Leitfähigkeit, Ca^{2+} -Sensitivität und Spannungsabhängigkeit unterscheiden. Die Proteine KCNN1, KCNN2, und KCNN3 werden auch als SK-Gruppe zusammengefasst (SK = *small conductance K^+ channels*) und verfügen über eine Leitfähigkeit im Bereich von 4 - 14 pS (Vergara *et al.* 1998). Auf der anderen Seite der Skala findet man KCNMA1, welcher aufgrund seiner großen Leitfähigkeit von ~ 250 pS (Vergara *et*

al. 1998) auch als BK (*big conductance K⁺ channel*) bezeichnet wird. Außer durch die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) wird der Kanal auch durch das Membranpotenzial reguliert. Während die SK und BK Kanäle recht ubiquitär exprimiert werden, findet man in Epithelzellen vorrangig KCNN4 (Jensen *et al.* 2001) - auch bekannt als IK (*intermediate conductance K⁺ channel*) mit einer Leitfähigkeit von 20 - 80 pS (Vergara *et al.* 1998). Die stärkste Expression im Menschen findet sich in der Speicheldrüse, gefolgt von Lunge, Trachea und Placenta (Jensen *et al.* 2001). Auch Joiner *et al.* (1997) konnten eine IK-Expression in der humanen Lunge nachweisen. Vazquez *et al.* (2001) und Wilson *et al.* (2006) fanden IK-Transkripte in verschiedenen pulmonalen Epithelzelllinien.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anwesenheit Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanäle in der *Xenopus* Lunge mittels RT-PCR studiert. Positive Signale wurden für IK und BK (α -Untereinheit KCNMA1) erhalten. Die Expression von SK1 und SK2 konnte nicht konsistent nachgewiesen werden.

Der IK-Blocker Clotrimazol hemmt den Druckeffekt

Ein selektiver Inhibitor von IK ist Clotrimazol (Alvarez *et al.* 1992; Wulff *et al.* 2001). Die Applikation des Pharmakons führte zu einer signifikanten Abschwächung des Druck-induzierten Effektes. Dies legt eine Beteiligung des Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanals IK am Auftreten des Druckeffekts nahe. Die Tatsache, dass Clotrimazol den I_{SC} lediglich unter Druck-Einwirkung beeinflusste, spricht dafür, dass IK in der *Xenopus* Lunge im Grundzustand nicht aktiv ist. Erst die mechanische Stimulation führt zur Öffnung des Kanals und einer damit einhergehenden K⁺-Sekretion. Auch die Studien von Wilson *et al.* (2006) und Barfod *et al.* (2007) kommen zu dem Schluss, dass IK in unstimulierten Zellen nicht aktiv ist. Nachdem Clotrimazol den Druckeffekt beeinflusste, wurden weitere IK-Inhibitoren getestet. Allerdings konnte weder durch TRAM-34 noch durch Econazol eine Verringerung des Druckeffekts festgestellt werden. Die Ergebnisse überraschen, da TRAM-34 lediglich geringe chemische Modifikationen im Vergleich zu Clotrimazol aufweist. Laut Wulff *et al.* (2001) beruht die Wechselwirkung von Clotrimazol wie auch von TRAM-34 auf einer intrazellulären Bindung an IK. Eine mögliche Erklärung hinsichtlich der Wirk-Unterschiede könnte demzufolge in der veränderten Membranpermeabilität liegen. Sollte TRAM-34 weniger membrangängig sein als Clotrimazol, so könnte dies erklären, dass in den hier durchgeführten Versuchen TRAM-34 ohne Wirkung blieb. In der Arbeit von Wulff *et al.* (2000) wurde allerdings festgestellt, dass TRAM-34 stärker lipophil und somit besser membrangängig ist als Clotrimazol.

Eine veränderte Membranpermeabilität kann also nicht zur Erklärung der Wirkunterschiede herangezogen werden. Weiterhin sind die molekularen Bindestellen, über die Clotrimazol und TRAM-34 mit IK wechselwirken, identisch. Sie werden von Wulff *et al.* (2001) und Nguyen *et al.* (2007) als die Aminosäuren Thr²⁵⁰ und Val²⁷⁵ angegeben. Die Autoren vermuten, dass diese Stellen mit den Phenylringen des TRAM-34 wechselwirken und somit das Pharmakon in einem Hohlraum direkt unterhalb des Selektivitätsfilters festhalten. Die betreffenden Aminosäuren sind auch in der Sequenz von *Xenopus* konserviert (**Abb. IX-4**, Seite 177). Mutationen, die unmittelbar an die Porenregion angrenzen, reduzieren jedoch die Sensitivität gegenüber dem Blocker (Wulff *et al.* 2001). Der Austausch G259H, M261Y sowie W262C führte zu einer sechsfachen Verringerung der Wirkung von TRAM auf IK. Untersucht man die putative Aminosäuresequenz von *Xenopus*, so fällt auf, dass die Porenregion zwar stark konserviert ist, die Positionen 259, 261 und 262 jedoch andere Aminosäuren aufweisen als dies bei den untersuchten Säugersequenzen der Fall ist. Damit ist es wahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete konträre Wirkung von Clotrimazol und TRAM-34 auf Sequenzunterschiede zurückführbar ist.

Letztlich wurde der Versuch unternommen, IK pharmakologisch zu aktivieren. Dazu wurde Chlorzoxazon benutzt, welches die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals erhöht (Syme *et al.* 2000). Die Autoren gehen davon aus, dass das Pharmakon die Wechselwirkung zwischen Kanal-gebundenem Calmodulin und intrazellulären Komponenten wie Proteinkinase A oder CAM-Kinase erhöht. Für den humanen IK wurde eine halbmaximale Stimulation bei 98 μM festgestellt (Syme *et al.* 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde der I_{SC} durch eine apikale Perfusion von 500 μM Chlorzoxazon stimuliert. Dieses Phänomen kann nicht mit einer Aktivierung von apikal lokalisiertem IK erklärt werden, da dann eine Strominhibition zu erwarten gewesen wäre. Neben einer Aktivierung von IK wirkt das Pharmakon allerdings auch stimulierend auf den CFTR (Syme *et al.* 2000), was zu einer Chlorid-Sekretion und damit zu einem Netto-Stromanstieg an der *Xenopus* Lunge führt (Sommer *et al.* 2007). Man kann dieses Ergebnis also derart interpretieren, dass durch Chlorzoxazon IK zwar aktiviert wird, der Effekt auf den I_{SC} allerdings von einer CFTR-Stimulation überlagert wird. Eine Stimulation des I_{SC} nach Applikation eines chemischen Derivats von Chlorzoxazon (EBIO) wurde auch von Wilson *et al.* (2006) beobachtet. Die Autoren führen den Effekt darauf zurück, dass eine Aktivierung von IK zu einer Hyperpolarisation der Zelle führt, die wiederum die Na^+ -Resorption erhöht. Weiterhin könnte eine Hyperpolarisation auch eine gesteigerte apikale Chlorid-Sekretion nach sich ziehen (Hamilton *et al.* 1999).

Wichtiger als der Effekt auf den Grundstrom war allerdings der Einfluss von Chlorzoxazon auf den Druckeffekt. Hier wurde beobachtet, dass der Druckeffekt in Gegenwart des Pharmakons stark abgeschwächt wurde. Wenn IK also bereits durch Chlorzoxazon stimuliert war, konnte die Applikation des mechanischen Stimulus keine zusätzliche Aktivierung verursachen.

Um die Beteiligung von Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen der SK-Gruppe zu untersuchen, wurde der Peptid-Blocker Apamin eingesetzt (Grunnet *et al.* 2001; Wang *et al.* 2003b; Blank *et al.* 2004). Die apikale Perfusion von 1 μM Apamin konnte den Druckeffekt nicht signifikant beeinflussen. Dies spricht gegen eine Beteiligung von SK-Kanälen. Weiterhin wurde Charybdotoxin verwendet, welches als Inhibitor von IK und BK angesehen wird (Vergara *et al.* 1998; Jensen *et al.* 2001). Auch dieses Toxin hatte keinen Einfluss auf den Druckeffekt. Das Ergebnis überrascht, da die inhibierende Wirkung von Charybdotoxin auf IK in vielen Studien belegt wurde (Brugnara *et al.* 1993; Jensen *et al.* 1998; Ohya *et al.* 2000; Jensen *et al.* 2001). Allerdings ist zu bemerken, dass die Charybdotoxin-Insensitivität eines IK-ähnlichen Kanals auch bereits in anderen Arbeiten festgestellt wurde. Castillo *et al.* (2005) identifizierten Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle in olfaktorischen Zellen der Ratte, die eine Leitfähigkeit von 30 - 60 pS aufwiesen und durch Clotrimazol geblockt werden konnten - beides Merkmale des IK. Die Kanäle konnten jedoch nicht durch die Applikation von Charybdotoxin inhibiert werden.

Weiterhin ist zu bedenken, dass es sich bei Apamin und Charybdotoxin um biologisch evolvierte Toxine handelt, die ursprünglich aus den Giften von Bienen und Skorpionen gewonnen wurden. Die Substanzen sind hochaffin (IC_{50} -Werte für die Bindung von Charybdotoxin an IK liegen zwischen 2 und 28 nM, Jensen *et al.* 2001), was u.a. der exakten sterischen Einlagerung in die Kanalpore zugeschrieben wird (Naini *et al.* 1996). Damit ist es möglich, dass bereits geringe Veränderungen in der Tertiärstruktur des Zielkanals die Bindungsaffinität stark beeinflussen. Die inhibierende Wirkung der Peptid-Blocker wurde vorrangig an Säugerzellen untersucht. Zwar sind Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle recht stark konserviert, jedoch könnten die Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen Säugern und *Xenopus* ausreichend sein, um die Bindung des Peptid-Blockers an den Kanal zu verhindern. Als maßgebliche Bindungsstelle von Charybdotoxin an IK gilt die Asparaginsäure an Position 239 der humanen Sequenz (Nguyen *et al.* 2007). Diese Stelle ist innerhalb der untersuchten Säuger (Mensch, Ratte, Maus, Schwein, Hund, Meerschweinchen) identisch. Vergleicht man die putative Sequenz des IK von *Xenopus* (**Abb. IX-4**, Seite 177) mit denjenigen der angegebenen Säuger, so findet man zwar eine äußerst hohe Homologie in der

nachfolgenden Porenregion, an Stelle der Asparaginsäure²³⁹ wird jedoch bei *Xenopus* ein Asparagin eingebaut. Dies ist ein möglicher Hinweis darauf, dass die Insensitivität des IK von *Xenopus* gegenüber Charybdotoxin auf Veränderungen in der Tertiärstruktur und damit auf eine Modifikation der Charybdotoxin-Bindestelle zurückführbar ist.

Die Untersuchung Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle lässt den Schluss zu, dass der Kanal IK maßgeblich an der Entstehung des Druckeffekts beteiligt ist. Dafür können folgende Hinweise angeführt werden: (A) die Applikation von Clotrimazol schwächte den Druckeffekt stark ab - die Unwirksamkeit der weiteren verwendeten Blocker TRAM-34 und Charybdotoxin lässt sich auf speziesspezifische Sequenzunterschiede zwischen Säugern und *Xenopus* zurückführen; (B) der Kanal konnte mittels RT-PCR in der *Xenopus* Lunge nachgewiesen werden; (C) der Druckeffekt konnte durch den IK-Agonisten Chlorzoxazon inhibiert werden; (D) der Druckeffekt konnte nicht durch Apamin beeinflusst werden.

Der Verlauf des Kurzschlussstroms legt nahe, dass die Aktivierung durch mechanischen Stress zu einer Sekretion von Kalium in das luminale Kammerkompartiment führt. Dies bedingt eine apikale Lokalisation des IK in den Epithelzellen. Eine weitere Aufklärung dieser Fragestellung, beispielsweise mittels Immuno-Gold-Labeling oder Co-Lokalisation mit *surfactant*-Protein, bleibt zukünftigen Studien vorbehalten.

IV.7 Einfluss der Lösungsmolarität - *regulatory volume decrease*

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der Mechanismus untersucht, der zu einer Aktivierung von IK führen könnte. Der Stimulus, welcher sich letztlich auf das *gating* des Kanals auswirkt, kann eine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) sein. Das Prinzip eines Ca^{2+} -Einstroms gefolgt von einer Aktivierung von K^+ - und Chlorid-Leitfähigkeiten ist in der Literatur als *regulatory volume decrease* (RVD) bekannt (Pasantes-Morales & Morales 2000). Darunter versteht man einen Mechanismus zur zellulären Volumenregulation. Bringt man eine Zelle in hypotones Medium ein, so folgt eine osmotische Wasseraufnahme und damit eine Vergrößerung des Zellvolumens. Dies bewirkt einen Dehnungsreiz an der Membran, welchem eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ folgt. Dadurch kommt es zur Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger K^+ - und Chlorid-Kanäle, welche die entsprechenden Ionen in den Extrazellulärraum abgeben. Den Ionen folgt osmotisch Wasser nach, so dass letztlich das ursprüngliche Zellvolumen entsprechend dem Zustand vor der Schwellung wieder hergestellt wird. Den umgekehrten Fall der Volumenreaktion, also eine Zunahme des Zellvolumens nach vorangegangener Schrumpfung bezeichnet man als *regulatory volume*

increase (Sarkadi & Parker 1991; Lytle 1997). Auch dieser Mechanismus wird über Ionentransportprozesse erreicht. Eine Inkubation in hypertonem Medium bewirkt zunächst den osmotischen Verlust von Wasser und damit eine Abnahme des Zellvolumens. Um diesen Prozess zu kompensieren, wird die Aktivität von Cotransportern wie dem $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporters oder dem Na^+/H^+ -Austauscher gesteigert (Sarkadi & Parker 1991). Dies bedingt eine Aufnahme von Osmolyten und damit eine Wiederherstellung des ursprünglichen Zellvolumens.

Neben der Zellschwellung durch Hypotonizität ist die Volumenregulation speziell für Epithelzellen bei Ionentransportvorgängen von immenser Bedeutung. Beispielsweise kann es durch Aufnahme von Nährstoffen im Dünndarmepithel zur osmotischen Schwellung der Zellen kommen, was eine Volumenregulation erforderlich macht (Wang *et al.* 2003b).

Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen wird eine bedeutende Rolle bei der RVD zugewiesen. Aus einigen Arbeiten ist bekannt, dass der Kanal KCNMA1 (BK) durch Verbringen in hypotones Medium aktiviert wird (Christensen 1987; Fernandez-Fernandez *et al.* 2002). Auch auf die volumenregulierende Funktion von IK in Epithelzellen wurde bereits hingewiesen (Wang *et al.* 2003b; Barfod *et al.* 2007). Die Autoren zeigten, dass eine intestinale Zelllinie nach Inkubation in hypotonem Medium zunächst mit einem Anstieg des Zellvolumens reagiert, welches sich jedoch innerhalb von 15 Minuten dem ursprünglichen Volumen wieder annähert. Die RVD konnte durch Clotrimazol vermindert werden. Weiterhin wurde in *whole cell* und *excised patch* Messungen ein Clotrimazol-sensitiver und Schwellungs-induzierter Strom gemessen, der durch Chelatisierung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inhibiert wurde. Die Resultate zeigen also, dass volumenregulatorische Prozesse durch die Aktivierung von IK herbeigeführt werden können. Neben einer direkten Aktivierung durch einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ besteht ein weiterer Einfluss der Lösungsosmolarität auf die Funktion von IK in einer veränderten Oberflächenexpression. Die Inkubation einer Leberzelllinie in hypoosmotischer Lösung führte zu einer verstärkten Coexpression von IK mit *lipid rafts* in der Zellmembran (Barfod *et al.* 2007). Wenn die Bildung von *lipid rafts* verhindert wurde, änderte sich auch die Volumenregulation der Zelle. Die Autoren schließen, dass es durch Zellschwellung zur Bildung eines volumenregulatorischen Komplexes kommt, der in *lipid rafts* organisiert ist.

Um die Beteiligung von volumenregulatorischen Prozessen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Abhängigkeit der Druck-induzierten Strominhibition von der Lösungsosmolarität überprüft. Wurde das Gewebe in hypotoner Perfusionslösung inkubiert, so reduzierte sich die Stärke des Druckeffekts, während eine Applikation in hypertoner Lösung die gegenteilige Auswirkung hatte. Die Ergebnisse zeigen, dass die Ausprägung des

Druckeffekts stark von der Osmolarität der Perfusionslösung abhängt. Experimentelle Bedingungen, die eine RVD auslösen, schwächen den Druckeffekt ab. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Regulationsprozesse, welche die Zelle zur Kompensation der Schwellung einleitet, ähnlich denjenigen sind, die durch Erhöhung des hydrostatischen Drucks induziert werden. Letztlich handelt es sich bei beiden Stimuli um eine Dehnung der Membran. Wenn eine volumenregulatorische K^+ - und Chlorid-Sekretion bereits durch Hypoosmolarität induziert wurde, so kann der Einfluss von hydrostatischem Druck keine zusätzliche Aktivierung erzielen - der Druckeffekt wird also verringert.

IV.8 Beteiligung mechanosensitiver Ionenkanäle

Die Fähigkeit, auf mechanische Reize zu reagieren, ist nahezu in allen Zelltypen verwirklicht (Poirier & Iglesias 2007). Man nimmt an, dass die Mechanotransduktion zu den ältesten physiologischen Prozessen gehört, die sich in Organismen entwickelt haben (Kloda & Martinac 2002). Eine Möglichkeit der Transduktion mechanischer Reize in eine zelluläre Reaktion besteht in der Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle. Heute sind mechanosensitive Vertreter in nahezu allen Gruppen von Ionenkanälen bekannt: K^+ - (Maingret *et al.* 1999), Na^+ - (Althaus *et al.* 2007), Ca^{2+} - (Barritt & Rychkov 2005) und Chlorid-Kanäle (Grunder *et al.* 1992) wurden als mechanisch aktivierbar beschrieben. Weiterhin findet man mechanisch aktivierbare Leitfähigkeiten, die weitgehend unselektiv für Kationen sind (Silberberg & Magleby 1997; Reifarth *et al.* 1999). Ungeachtet der hohen Diversität spricht die Tatsache, dass mechanosensitive Ionenkanäle von Bakterien und Archaeen eine monophyletische Gruppe bilden, für die frühe Entstehung innerhalb der Evolution (Kloda & Martinac 2002).

Bei der Betrachtung der Mechanosensitivität von Ionenkanälen muss unterschieden werden zwischen denjenigen Transportproteinen, deren *gating* direkt durch mechanische Stimuli beeinflusst wird, und anderen, welche im Rahmen einer mechanisch-induzierten, zellulären Signalkaskade aktiviert werden. Ein Beispiel, welches beide Mechanismen vereint, kann in der RVD gesehen werden. Der Ausstrom von K^+ und Cl^- kann wie bereits beschrieben als Folge der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auftreten. Damit wird die Aktivität der entsprechenden Kanäle zwar nach mechanischer Stimulation erhöht. Das *gating* wird allerdings durch in die Zelle strömendes Ca^{2+} und nicht durch den mechanischen Reiz an sich verändert. Im Unterschied dazu kann der Ca^{2+} -Einstrom jedoch über direkt mechanosensitive Ca^{2+} -Kanäle erfolgen

(Christensen 1987; Pasantes-Morales & Morales 2000; Chen & Barritt 2003; Arniges *et al.* 2004).

Für den Mechanismus, welcher zur Öffnung direkt mechanosensitiver Ionenkanäle führt, werden zwei Modelle diskutiert. Das erste Modell, welches als „*bilayer model*“ (Hamill & Martinac 2001) oder „*membrane model*“ (Christensen & Corey 2007) bezeichnet wird, geht davon aus, dass ein mechanischer Reiz zunächst von der Zellmembran aufgenommen wird. Eine Dehnung der Membran führt dann zur Öffnung der Kanalpore. Als Beispiel für diesen Typ kann der Ionenkanal MscL (*mechanosensitive channel of large conductance*) genannt werden, der in *E.coli* als unselektive Leitfähigkeit der Osmoregulation dient (Hamill & Martinac 2001). Werden diese prokaryotischen Zellen hypotonem Medium ausgesetzt, so leitet MscL (und andere mechanosensitive Vertreter wie MscS) Osmolyte in den Extrazellulärraum, um das Platzen der Zelle zu verhindern (Kloda & Martinac 2002).

Ein möglicher Mechanismus, wie eine Membrandehnung zur Öffnung der Ionenkanäle führt, wird von Kung (2005) und Kloda & Martinac (2002) beschrieben. In dieser Vorstellung kommt der Grenzschicht zwischen Plasmamembran und Kanalprotein eine bedeutende Rolle zu. In Abwesenheit mechanischer Stimuli begünstigt die Wechselwirkung zwischen Membran und Kanal die geschlossene Konformation. Unter Einwirkung mechanischer Kräfte, beispielsweise einer Zugspannung durch Membrandehnung, kann es zu einer Abflachung der Membran kommen. Dies bedingt, dass hydrophobe Kanalbereiche, die vormals von der Zellmembran umgeben waren, nun an das wässrige intra- bzw. extrazelluläre Medium grenzen. Da damit ein erhöhter Energiezustand einhergeht, ist der Wechsel in die offene Konformation begünstigt, in der die hydrophoben Kanalregionen wieder vollends von der Zellmembran umschlossen werden. Ein experimenteller Hinweis auf die Richtigkeit dieser Annahme findet sich in Kloda & Martinac (2002). Die Autoren untersuchten mechanosensitive Kanäle in künstlichen Lipid-Schichten unterschiedlicher Dicke. Sie fanden, dass die Aktivierungsenergie, und damit die Energie, welche für einen Konformationswechsel benötigt wird, in dünneren Bilayern vermindert und in dickeren Lipid-Schichten erhöht war.

Das zweite Modell ist bekannt als „*tethered model*“ (*tether*: Spannseil). Hier geht man davon aus, dass Ionenkanäle mit Ankerproteinen verbunden sind, die als eine Art molekulare Feder dienen. Diese Ankerproteine können intrazelluläre Elemente des Cytoskeletts sein oder auch der Verknüpfung mit der extrazellulären Matrix dienen. Diese Art der Mechanoperzeption findet man beispielsweise bei Kanälen in den Haarsinneszellen des auditorischen Systems. Als möglicher molekularer Kandidat ist der Kationenkanal TRPA1 in der Diskussion (Poirier & Iglesias 2007).

TRPA1 gehört zur Familie der *transient receptor potential* (TRP) Kanäle. Diese Transportproteine wurden erstmals bei einer Drosophila-Linie mit einer Mutation im Photorezeptor beschrieben. Der Name *transient receptor potential* beschreibt das rasche Abklingen des Photorezeptorpotentials, welches im Wildtyp nicht auftrat (Hardie & Minke 1992). Mittlerweile wurden TRP-Kanäle in diversen Taxa gefunden. Allein innerhalb der Säuger existieren 33 verschiedene Gene (Christensen & Corey 2007). Man teilt die Vertreter aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in sieben Subfamilien ein (A, N, M, C, V, P, ML, Christensen & Corey 2007). Gemeinsam ist den Mitgliedern die Organisation in sechs Transmembrandomänen und einer Porenregion sowie die unspezifische Leitfähigkeit für Kationen (Poirier & Iglesias 2007). Entsprechend der elektrochemischen Triebkraft resultiert als physiologisch bedeutendes Signal ein Ca^{2+} -Einstrom, weshalb die TRP-Kanäle in der Literatur auch häufig als Ca^{2+} -Kanäle angesehen werden. Innerhalb der TRP-Familie werden verschiedene Vertreter mit der Wahrnehmung mechanischer Reize in Zusammenhang gebracht.

Für den Kanal TRPC1 ist die Mechanosensitivität recht gut belegt. Maroto *et al.* (2005) konnten zeigen, dass es sich bei dem Kanal SAC (*stretch activated channel*), welcher zuerst in *Xenopus laevis* Oocyten beschrieben wurde (Methfessel *et al.* 1986; Yang & Sachs 1989), um TRPC1 handelte. Die Latenzzeit, welche zwischen der Reizapplikation und dem Auftreten des Kanal-Stroms vergeht, liegt bei 5 ms – einer Zeitspanne, welche als zu kurz betrachtet wird, um Signalkaskaden zu beinhalten (Christensen & Corey 2007). Die Expression des Proteins in künstlichen Lipidschichten zeigte, dass der Kanal auch in Abwesenheit akzessorischer Moleküle durch Druck aktiviert werden konnte. Damit wurde ein Hinweis erbracht, dass das *gating* von TRPC1 dem oben beschriebenen „*membrane model*“ folgt.

Ein weiteres TRP-Mitglied, welches in Verbindung mit der Mechanoperzeption gebracht wird, ist TRPV4. Dieser Kanal dient nach heutigen Erkenntnissen zu urteilen als Osmosensor (Becker *et al.* 2005; Liedtke 2005).

Als genereller Blocker mechanosensitiver Ionenkanäle wird das Metall-Kation Gadolinium eingesetzt (Hamill & McBride 1996; Caldwell *et al.* 1998). Diese Substanz ist in der Lage, im submillimolaren Bereich mechanosensitive Kanäle sowohl von Eukaryoten als auch von Bakterien und Archaeen zu inhibieren (Kloda & Martinac 2002) – ein Fakt, der die starke Konservierung der Gd^{3+} -Bindestelle hervorhebt. Weiterhin wird das chemisch sehr ähnliche Lanthan verwendet, welches jedoch eine geringere Wirksamkeit besitzt. Der Mechanismus, der die inhibierende Wirkung der Lanthanoide vermittelt, ist bislang nicht aufgeklärt. Auffällig ist die Ähnlichkeit mit Ca^{2+} hinsichtlich der chemischen Eigenschaften

(Ionenradius, Bindung, Koordinationsgeometrie) (Hamill & McBride 1996). Allerdings heben die Autoren auch die starke Wechselwirkung von Gd^{3+} mit Lipid-Bilayern hervor, was zu einer Änderung der Membraneigenschaften im Umfeld der zu blockenden Ionenkanäle führen könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden Gd^{3+} und La^{3+} als Blocker für mechanosensitive Ionenkanäle eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Applikation der Lanthanoide zu einer signifikanten Hemmung des Druckeffekts führte. Dieses Ergebnis trat selbst bei Konzentrationen von $10 \mu M Gd^{3+}$ auf. Zwar wirkt Gd^{3+} auch auf andere Membranleitfähigkeiten. Studien unserer Arbeitsgruppe sowie eine weitere Arbeit zeigten, dass Gd^{3+} den ENaC von *Xenopus* stimuliert (Friis & Nielsen 2001; Fronius *et al.* 2003). Die angegebenen EC_{50} -Werte liegen jedoch bei $\sim 23 \mu M$. In der vorliegenden Arbeit konnte die Druck-induzierte Hemmung sowohl durch Applikation von $10 \mu M Gd^{3+}$ als auch von $300 \mu M Gd^{3+}$ nahezu vollständig gehemmt werden. Dies legt nahe, dass die Wirkung des Lanthanoids bei $10 \mu M$ bereits gesättigt ist. Somit ist es wahrscheinlich, dass die beobachtete Wirkung von Gd^{3+} und La^{3+} auf die Inhibition mechanosensitiver Kanäle zurückzuführen ist und nicht durch eine Stimulation des ENaC hervorgerufen wird.

Um die Expression der TRP-Kanäle TRPC1 und TRPV4 in der *Xenopus* Lunge zu untersuchen, wurden zunächst RT-PCR Experimente durchgeführt. Die mRNA beider Kanäle konnte in RNA-Isolaten nachgewiesen werden. Darüberhinaus wurde auch eine mRNA-Expression von TRPC1 in den humanen Epithelzelllinien H441 und A549 festgestellt. Weiterhin wurde die Lokalisation von TRPC1 in der *Xenopus* Lunge untersucht. In Immunfluoreszenzaufnahmen war ein deutliches Signal in Zellen nahe der luminalen Oberfläche festzustellen. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass TRPC1 in Lungenzellen exprimiert wird (*Xenopus* Lunge, H441 sowie A549). Dort könnte der Kanal an der Perzeption mechanischer Reize beteiligt sein.

Zur näheren Untersuchung von TRPV4 wurde der Blocker Ruthenium Rot sowie der Agonist 4α -PDD eingesetzt. Beide Pharmaka konnten den Druckeffekt nicht beeinflussen. Zwar war die Größe der Druck-induzierten Strominhibition von der Lösungsosmolarität abhängig, jedoch scheint diese Beeinflussung unabhängig von dem osmotisch regulierten Kanal TRPV4 zu erfolgen.

Die bisher dargestellten Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass es durch Druckeinwirkung zu einer Öffnung mechanosensitiver Kanäle kommt. Der Zusammenhang zwischen einer Aktivierung dieser Kanäle und der beobachteten Erhöhung der K^+ -Leitfähigkeit kann mehrere Ursachen haben. Einerseits kann die Freisetzung von ATP und die damit verbundene Wirkung

auf diverse Leitfähigkeiten an einen mechanosensitiven Ionenkanal gekoppelt sein. Es ist bekannt, dass Prokaryoten während eines osmotischen Schocks ATP ausschütten und dieser Vorgang durch die Applikation von Gd^{3+} unterbunden werden kann (Kloda & Martinac 2002). Andererseits kann eine K^+ -Sekretion direkt durch den mechanosensitiven Kanal erfolgen, wie es bereits von Wang *et al.* (2003a) beschrieben wurde. Letztlich kann durch mechanosensitive Kanäle ein Ca^{2+} -Einstrom bewirkt werden, der im Weiteren zu einer Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Ionenkanäle führt.

IV.9 Abhängigkeit des Druckeffekts von $[Ca^{2+}]_i$

Die bisher dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks am Lungenepithel von *Xenopus laevis* zu einer Freisetzung von ATP sowie zu einer Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle führt. Sowohl die Aktivierung mechanosensitiver Ca^{2+} -permeabler Ionenkanäle als auch die Aktivierung purinerger Rezeptoren durch Freisetzung von Nukleotiden wie ATP oder UTP kann zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führen (Hede *et al.* 2005). Nachfolgend kann daraus die Stimulation Ca^{2+} -abhängiger K^+ - und Chlorid-Kanäle resultieren.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde in verschiedenen Versuchsreihen die Bedeutung der $[Ca^{2+}]_i$ für den Druckeffekt untersucht. Die Versuche lassen sich in zwei Gruppen einteilen: (A) Maßnahmen, die eine Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ verhindern sollten; (B) Maßnahmen, die eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ bereist vor Druckapplikation zur Folge hatten.

Eine Verhinderung des Anstiegs intrazellulären Ca^{2+} sollte erzielt werden, indem Ca^{2+} -freie Perfusionslösung verwendet wurde, der zusätzlich EGTA und BAPTA/AM zugesetzt war. Die Perfusion dieser Lösung veränderte den Kurzschlussstrom an der *Xenopus* Lunge zunächst nicht. Wurde jedoch zusätzlich hydrostatischer Druck appliziert, war eine im Vergleich zu Kontrollmessungen deutlich stärkere Druck-induzierte Inhibition zu beobachten. Weiterhin sank der Widerstand rapide ab. Nach Beendigung der Druckapplikation veränderten sich beide Größen nur noch minimal. Das macht es wahrscheinlich, dass der kombinierte Einfluss von mechanischem Stress unter Ca^{2+} -freien Bedingungen zu irreversiblen Veränderungen der elektrischen Eigenschaften des Lungengewebes führte. Der starke Rückgang des Widerstands könnte darauf zugeführt werden, dass die Abdichteigenschaften des sogenannten *junctional complex* vermindert wurden. Epithelzellen werden von einem Gürtel verschiedener Proteine umschlossen, welche den mechanischen Zusammenhalt des Zellverbandes gewährleisten. Apikal gelegen findet man die aus Occludin-

und Claudin-Proteinen gebildeten *tight junctions*, welche den größten Anteil am parazellulären Widerstand tragen (Denker & Nigam 1998). In Richtung der basolateralen Gewebsseite folgen die *adherens junctions* und schließlich die Desmosomen. Der mechanische Zusammenhalt des *junctional complex* ist in starkem Maße abhängig von Ca^{2+} . Der Entzug von Ca^{2+} in der Perfusionslösung führt innerhalb weniger Minuten zu einer Verringerung des transepithelialen Widerstandes, welcher durch eine Verminderung des Abdichtwiderstandes der *tight junctions* hervorgerufen wird (Lacaz-Vieira 1997; Riesen *et al.* 2002; Rothen-Rutishauser *et al.* 2002). Dem Ca^{2+} -bindenden Protein E-Cadherin kommt dabei eine besondere Rolle bei der Formation des *junctional complex* zu (Lacaz-Vieira 1997; Rothen-Rutishauser *et al.* 2002).

Um einen schädigenden Einfluss des Ca^{2+} -Entzugs auf die Gewebs-Integrität zu verhindern, wurden die Zellen in einer weiteren Versuchsreihe mit BAPTA/AM aufgeladen, wobei die Druckapplikation jedoch in Ca^{2+} -haltiger Ringerlösung stattfand. Hierbei zeigte sich, dass es im Vergleich zu Kontrollmessungen (ohne BAPTA/AM) zu einer signifikanten Verstärkung des Druckeffekts kam. Dieses Ergebnis spricht zunächst nicht dafür, dass Druck vorrangig zu einer Aktivierung apikaler Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle führt, da ansonsten eine Inhibition des Effekts zu erwarten wäre. Es ist allerdings vereinbar mit der Annahme, dass es unter Druckeinfluss zu einer Chlorid-Sekretion über Ca^{2+} -abhängige Chlorid-Kanäle kommt (siehe Abschnitt IV.10, Seite 127).

Weitere Hinweise zur Bedeutung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lieferten Versuche, in denen eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ forciert wurde. Dies geschah unter Verwendung von Hoch- Ca^{2+} Lösung, Ionomycin oder Thapsigargin.

Unabhängig vom Mechanismus war in allen drei beschriebenen Versuchsansätzen eine Verminderung des Druckeffekts festzustellen. Damit hat eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ genau die gegenteilige Wirkung zur Ca^{2+} -Chelatisierung mittels BAPTA/AM.

Zusammengenommen zeigen die Versuche zum Einfluss der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ also, dass der Druckeffekt in geringem Maße Ca^{2+} -abhängig ist. Die Hypothese, dass die Druck-induzierte Strominhibition durch Stimulation Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle nach Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hervorgerufen wird, kann durch die hier diskutierten Daten zunächst nicht gestützt werden. Vielmehr legen die erhaltenen Ergebnisse nahe, dass eine Komponente, welche unter Druckeinwirkung zur Stimulation des I_{SC} führt, Ca^{2+} -abhängig ist. Eine mögliche Erklärung liegt in der Aktivierung einer Ca^{2+} -abhängigen Chlorid-Sekretion. Allerdings konnte klar gezeigt werden, dass sich der Druckeffekt durch Clotrimazol, einem spezifischen Inhibitor des

Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanals IK, abschwächen lies. Zur Erklärung dieser Diskrepanz können verschiedene Aspekte angeführt werden:

(A) Die Abpufferung der [Ca²⁺]_i mittels BAPTA/AM ist zwar ausreichend, um eine Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Chlorid-Kanäle zu verhindern, jedoch nicht genügend um auch IK zu inhibieren. Dies würde bedeuten, dass die Aktivierung von IK durch geringere Ca²⁺-Konzentrationen erfolgt als diejenige von Ca²⁺-abhängigen Chlorid-Kanälen. Die publizierten Werte stützen diese Hypothese: eine halbmaximale Aktivierung des humanen IK wird von Logsdon *et al.* (1997) bei einem Wert von circa 300 nM beschrieben, während die halbmaximale Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Chloridkanäle typischerweise bei circa 650 nM liegt (in Abhängigkeit des Membranpotenzials werden allerdings auch niedrigere Werte ermittelt, Nilius & Droogmans 2003). Bedenkt man zusätzlich, dass Ca²⁺-aktivierte K⁺-Kanäle und spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle colokalisiert sein können (Vergara *et al.* 1998), so verhindert die enge räumliche Nähe möglicherweise einen effizienten Entzug einströmenden Calciums. Die hier gewählten Versuchsbedingungen zur Chelatisierung der [Ca²⁺]_i sind also eventuell nicht ausreichend, um eine Druck-induzierte Aktivierung von IK zu unterbinden.

(B) Neben der Erhöhung der [Ca²⁺]_i wird das *gating* von IK auch direkt durch ATP beeinflusst (Gerlach *et al.* 2001). In *inside out patches* von IK-exprimierenden *Xenopus* Oocyten kam es bei konstanter Ca²⁺-Konzentration zu einer Verdopplung der Offenwahrscheinlichkeit, wenn der Perfusionslösung ATP zugesetzt wurde. Zwar bleibt das *gating* weiterhin Ca²⁺-abhängig, jedoch zeigt diese Arbeit den starken Einfluss von ATP auf das Schaltverhalten des Kanals. Ein weiterer Regulationsmechanismus Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanäle besteht in der Wechselwirkung mit purinergen Rezeptoren. Je nach beteiligtem Rezeptortyp kann durch Applikation extrazellulärer Nukleotide eine Aktivierung oder eine Inhibition der Kanäle erfolgen (Hede *et al.* 2005). Die Aktivierung von IK kann also auch mit der hier nachgewiesenen Freisetzung von ATP in Zusammenhang stehen.

IV.10 Mechanischer Stress aktiviert neben Kalium-Kanälen auch Natrium- und Chlorid-Leitfähigkeiten

Die Sensitivität des Druckeffekts gegenüber Ba²⁺ sowie der extrazellulären K⁺-Konzentration zeigt, dass die Druck-induzierte Strominhibition zum größten Teil auf eine verstärkte K⁺-Sekretion zurückzuführen ist. Eine Untersuchung von Na⁺- und Chlorid-Kanälen erbrachte

jedoch zusätzliche Hinweise, dass auch diese Leitfähigkeiten durch mechanischen Stress modifiziert werden.

Die Experimente zur Untersuchung apikaler Na^+ -Leitfähigkeiten lassen sich in zwei Ansätze aufteilen. Einerseits wurde der Na^+ -Transport über das Gewebe durch Perfusion von 10 μM Amilorid oder Na^+ -freier Lösung komplett inhibiert. Dabei zeigte sich, dass der Kurzschlussstrom durch beide Bedingungen nahezu vollständig gehemmt wurde und der Druckeffekt sich signifikant verringerte. Andererseits wurde nur eine anteilige Reduktion des Na^+ -Transports angestrebt, indem lediglich 1 μM Amilorid perfundiert wurde oder die Na^+ -Konzentration der Ringerlösung auf 50 bzw. 25 mM vermindert wurde. Die Applikation hydrostatischen Drucks resultierte unter diesen Bedingungen in einer Vergrößerung des Druckeffekts im Vergleich zu Kontrollversuchen. Die Höhe der Druck-induzierten Strominhibition ist also Na^+ abhängig: der komplette Block des Na^+ -Transport führt zum Verschwinden des Druckeffekts, während eine anteilige Reduktion der Na^+ -Leitfähigkeit den Druckeffekt vergrößert.

Da bereits dargestellt wurde, dass der hauptsächliche Effekt des Druckeinflusses in der Aktivierung einer K^+ -Sekretion besteht, sind die erhaltenen Ergebnisse zunächst nicht einfach zu interpretieren. Eine mögliche Erklärung, warum die K^+ -Sekretion unter 10 μM Amilorid nicht mehr detektiert werden konnte, kann in der Veränderung des Membranpotenzials gesehen werden. Durch die Blockade eines apikalen Na^+ -Einstroms gelangen weniger positive Ladungsträger in das Zellinnere, wodurch es zu einer Hyperpolarisation der apikalen Membran kommt. Damit vermindert sich die elektrochemische Triebkraft für einen K^+ -Ausstrom. Da die Applikation hydrostatischen Drucks bei gleichzeitiger Ableitung des Membranpotenzials durch Mikroelektroden nicht möglich war, wurde die Annahme einer Membranhyperpolarisation indirekt überprüft. Im Falle einer Negativierung der apikalen Potenzialdifferenz sollte eine erhöhte Triebkraft für einen Chlorid-Ausstrom resultieren (Horisberger 2003). Deshalb wurde der Effekt des Chlorid-Kanalblockers DIDS in An- und Abwesenheit von 10 μM Amilorid untersucht. Es zeigte sich, dass die Chloridsekretion entgegen der Erwartung durch 10 μM Amilorid gehemmt wurde. Dies spricht dafür, dass es nicht zu einer Hyperpolarisation der apikalen Membran kommt. Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass K^+ - und Chlorid-Leitfähigkeiten in der *Xenopus* Lunge stark an eine funktionierende Na^+ -Resorption gekoppelt sind. Wird diese Komponente komplett ausgeschaltet, so wirkt sich dies auch auf weitere Transporteigenschaften des Epithels aus.

Weiterhin muss bedacht werden, dass Amilorid in niedrigen Konzentration zwar als spezifischer ENaC-Blocker angesehen wird, in höheren Dosen jedoch auch Einfluss auf

andere Zellfunktionen ausübt. Von Kleyman & Cragoe (1988) wird berichtet, dass Amilorid eine Reihe von Transportproteinen inhibiert. Darunter befinden sich Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (IC_{50} : 1 mM), Na^+ - K^+ -ATPase (IC_{50} : 3 mM), Na^+ - H^+ -Austauscher (IC_{50} : zwischen 1 mM Kleyman & Cragoe 1988 und 4 μM Zhuang *et al.* 1984, abhängig von der extrazellulären Na^+ -Konzentration) und spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (IC_{50} : 90 μM). Weiterhin werden Proteinkinasen (IC_{50} : 1 mM) und Proteinsynthese (IC_{50} : 100 μM) inhibiert. In Fischerythrocyten wurde eine Hemmung der Adenylatzyklase (IC_{50} : 6 μM) beschrieben (Kleyman & Cragoe 1988). Wie die IC_{50} -Werte zeigen, bedarf der Großteil der geschilderten Effekte einer höheren Amilorid-Konzentration als der in dieser Arbeit verwendeten. Allerdings wird Amilorid in das Cytoplasma von Epithelzellen aufgenommen (Briggman *et al.* 1983). Bei länger andauernder Applikation kommt es dort zu einer Ansammlung des Pharmakons, welche die extrazelluläre Konzentration um das 10 bis 30fache übersteigen kann (Leffert *et al.* 1982; Davis & Czech 1985). Um eine vollständige Blockade der Na^+ -Resorption an der *Xenopus* Lunge zu erzielen, wurde 10 μM Amilorid über Zeiträume von 30 - 50 Minuten appliziert. Es ist also nicht auszuschließen, dass während dieser Zeit eine Akkumulation des Pharmakons in den Zellen stattgefunden hat, welche die Zelleigenschaften unabhängig vom Na^+ -Transport beeinflusst.

Um dies auszuschließen wurden letztlich Versuche durchgeführt, in denen Amilorid lediglich in einer Konzentration von 1 μM appliziert wurde. Hier zeigte sich zunächst eine Hemmung des Kurzschlussstroms um circa 40 %, was im Einklang mit dem von Fischer *et al.* (1989) publizierten IC_{50} Wert von 1,2 μM steht. Eine darauffolgende Erhöhung des hydrostatischen Drucks resultierte in einer stärkeren Strominhibition als dies unter Kontrollbedingungen (ohne Amilorid) der Fall war. Dies zeigt, dass der Druckeffekt neben einer K^+ -Sekretion auch eine ENaC-getragene Stromkomponente beinhaltet. Wird ein Teil des ENaC-getragenen Stroms geblockt, so wird die durch K^+ -Sekretion bedingte Strominhibition prominenter. Dies legt nahe, dass es unter Kontrollbedingungen (ohne Amilorid) zu einer Stimulation des ENaC kommt, welche von der K^+ -Sekretion überlagert wird. Das gleiche Resultat ergab sich, wenn die Na^+ -Konzentration in der Perfusionslösung auf 25 bzw. 50 mM reduziert wurde. Dies stützt die Vermutung, dass es unter Kontrollbedingungen tatsächlich zu einer gesteigerten Na^+ -Resorption kommt. Zum besseren Verständnis sind die Auswirkungen einer gesteigerten Na^+ -Resorption sowie einer Chlorid- und K^+ -Sekretion in **Abb. IV-2** dargestellt.

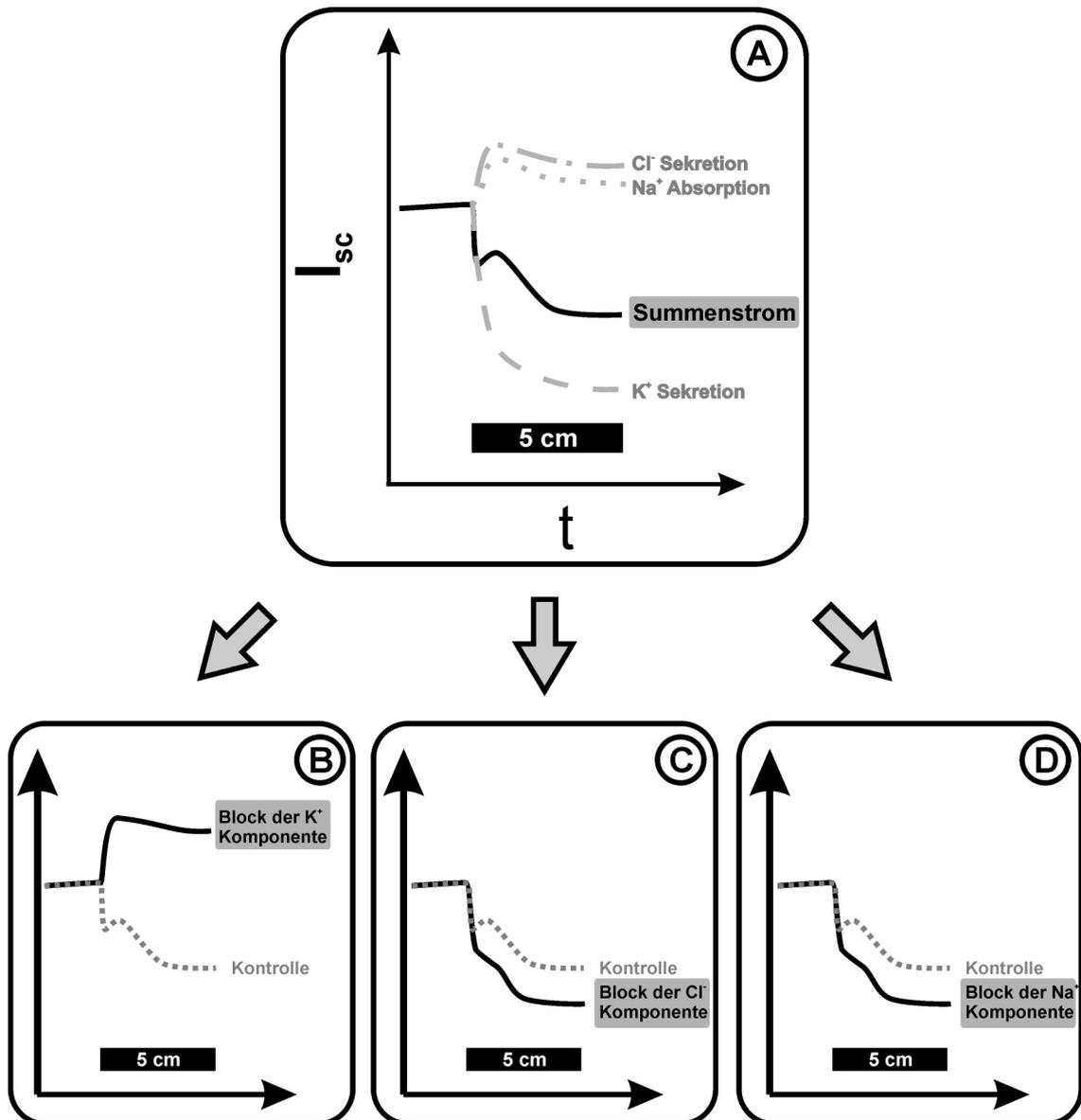


Abb. IV-2: Auswirkung einer kombinierten Na⁺-Resorption sowie einer K⁺- und Chlorid-Sekretion. (A) Zeitlicher Verlauf des Kurzschlussstroms (I_{sc}) unter Druckeinwirkung (5 cm). Die Sekretion von K⁺ bewirkt eine Inhibition des I_{sc} , wohingegen die Chlorid-Sekretion und Na⁺-Resorption den I_{sc} stimulieren. Da die K⁺-Sekretion jedoch die beiden anderen Vorgänge überwiegt, resultiert in Kombination ein inhibitorischer Summenstrom. (B) Wird die K⁺-Komponente geblockt, so setzt sich der Summenstrom nur noch aus der Na⁺- und Chlorid-Komponente zusammen. Es resultiert eine Stimulation des I_{sc} . (C) Die Blockade der Chlorid-Komponente und (D) der Na⁺-Komponente resultieren in einer verstärkten Inhibition.

Weiterhin wurden Versuche zur Beteiligung von Chlorid-Leitfähigkeiten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Applikation der Chlorid-Kanalblocker DIDS und NFA zu einer Vergrößerung der Druck-induzierten Strominhibition führte. Der gegenteilige Effekt wurde beobachtet, wenn die elektrochemische Triebkraft für einen Chlorid-Ausstrom erhöht wurde (Chlorid-freie Perfusionslösung). Die Versuchsreihen sprechen dafür, dass es unter Druckeinwirkung zu einer vermehrten Chlorid-Sekretion kommt.

Zusammengenommen werden also verschiedene Leitfähigkeiten durch die Erhöhung des hydrostatischen Drucks beeinflusst. Es kommt sowohl zu einer Aktivierung einer K^+ - und Chlorid-Sekretion als auch zu einer verstärkten Na^+ -Resorption. Die Chlorid-Sekretion sowie die Na^+ -Resorption führen zwar zu einer Stimulation des I_{SC} , werden jedoch von der prominenteren K^+ -Sekretion überlagert. Hemmt man die Chlorid- oder Na^+ -Komponente, so tritt die K^+ -Sekretion noch deutlicher zu Tage - der Druckeffekt vergrößert sich also.

Zwei unterschiedliche Mechanismen können zur Druck-induzierten Aktivierung der Na^+ - und Chloridleitfähigkeiten geführt haben: (A) eine direkte Mechanosensitivität der Kanäle; (B) eine Hyperpolarisierung aufgrund eines vorangegangenen K^+ -Ausstroms (Cowley & Linsdell 2002)

Sowohl innerhalb der Na^+ - wie auch der Chlorid-Kanäle werden mechanosensitive Vertreter diskutiert. Während aber für die Na^+ -Kanäle molekulare Kandidaten-Gene identifiziert wurden (siehe nachfolgenden Abschnitt), ist die Situation innerhalb der Chlorid-Kanäle weitaus weniger geklärt. In der Literatur ist zwar vielfach das Auftreten eines Volumen-sensitiven Chlorid-Stroms ($I_{Cl,swell}$) oder eines Volumen-regulierten Anionenstroms (VRAC, *volume-regulated anion current*) beschrieben, die dahinterstehenden Proteine sind bislang allerdings weitgehend unbekannt (Nilius *et al.* 1996; Jentsch *et al.* 2002; Nilius & Droogmans 2003). Molekulare Kandidaten wie MDR1 (P-Glycoprotein) oder ClC-3 konnten nicht bestätigt werden (Nilius & Droogmans 2003). Somit beziehen sich die Charakteristika der Kanäle, wie Aktivierbarkeit oder Pharmakologie, immer nur auf einen Volumen-sensitiven Chlorid-Strom, ohne dass dabei geklärt ist, ob dieser Strom eventuell durch verschiedene Proteine hervorgerufen wird. Das Problem der Differenzierung wird offenkundig, indem Liu *et al.* (2007) eine Beteiligung von ORCCs (*outwardly rectifying chloride channels*) an VRAC postulieren, wobei jedoch die molekulare Identität der ORCCs ebenfalls ungeklärt ist (Jentsch *et al.* 2002; Nilius & Droogmans 2003).

Als mögliche Vermittler Schwellungs-induzierter Chlorid-Ströme kommen Kanäle in Betracht, die sowohl Chlorid als auch organische Osmolyte transportieren können. Da die intrazelluläre Chlorid-Konzentration in einigen Zelltypen sehr gering ist, kann über einen Chlorid-Ausstrom allein keine effiziente Volumenregulation stattfinden. Über sogenannte VSOACs (*volume-stimulated osmolyte and anion channels*, ein Synonym für VRAC, Nilius & Droogmans 2003) strömen Chlorid sowie Osmolyte wie beispielsweise Taurin aus, was zusammengenommen in einem Schwellungs-induzierten Strom resultiert (Jentsch *et al.* 2002). Genauere Kenntnisse über die Mechanosensitivität bei Chlorid-Kanälen konnten durch Klonierung und Expression des Kanals ClC-2 gewonnen werden. Für dieses Transportprotein

wurde die Volumensensitivität im *Xenopus* Oocyten Expressionsmodell bestätigt (Grunder *et al.* 1992). Allerdings kann es sich bei CIC-2 nicht um den Schwellungs-sensitiven Kanal handeln, der $I_{Cl,swell}$ bzw. VRAC zu Grunde liegt, da die biophysikalischen Eigenschaften differieren (Jentsch *et al.* 2002). Zwar wurde von Lipecka *et al.* (2002) eine Lokalisation von CIC-2 in pulmonalen Epithelzellen beschrieben, eine Beteiligung von CIC-2 an dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Druckeffekt ist allerdings unwahrscheinlich. Der Druckeffekt konnte durch Applikation des Blockers DIDS moduliert werden, wohingegen CIC-2 auch durch hohe Konzentrationen des Pharmakons (1 mM) nicht effektiv inhibiert wird (Jentsch *et al.* 2002).

Neben direkt mechanosensitiven Chlorid-Kanälen können für die Interpretation des Druckeffekts auch Ca^{2+} -aktivierte Chlorid-Kanäle herangezogen werden. Die Sensitivität gegenüber den verwendeten Blockern DIDS und NFA ist sowohl vereinbar mit einer Wirkung auf Ca^{2+} -aktivierte Chlorid-Kanäle (Jentsch *et al.* 2002), wie auch auf VRAC (Nilius & Droogmans 2003). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Stromkomponente, welche der Druck-induzierten Strominhibition entgegenwirkt, abhängig ist von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Da die Aktivierung von VRAC unabhängig von $[Ca^{2+}]_i$ erfolgt (Nilius & Droogmans 2003), könnte es sich hierbei um Ca^{2+} -aktivierte Chlorid-Kanäle handeln.

IV.10.1 Scherkräfte aktivieren den humanen epithelialen Na^+ -Kanal

Im Gegensatz zu den unklaren Verhältnissen bei Chlorid-Kanälen sind innerhalb der Na^+ -Kanäle mechanosensitive Vertreter bekannt. Dabei handelt es sich um Mitglieder der DEG-ENaC Proteinfamilie. Identifiziert wurden die sogenannten Degenerine (DEG) in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*. Würmer, die Mutationen in den entsprechenden Genen aufwiesen, fielen durch eine beeinträchtigte Mechanorezeption auf. Die Degenerine umfassen die Proteine MEC-4, MEC-10, MEC-2 und MEC-9, die funktionell zu einem Mechanorezeptor zusammentreten (Poirier & Iglesias 2007). MEC-4 und MEC-10, bilden die Porenregion, während MEC-2 und MEC-9 an der Verankerung des Kanalkomplex in der Membran beteiligt sind (Poirier & Iglesias 2007). Die phylogenetische Verwandtschaft des ENaC mit den Degenerinen führte dazu, dass auch diesem Kanal eine Mechanosensitivität zugeschrieben wurde. In der Literatur findet man jedoch teils widersprüchliche Angaben über die Art des mechanischen Stimulus, der durch den ENaC perzipiert werden kann (eine Übersicht findet sich bei Fronius & Clauss 2007). Die Auswirkung der Lösungsmolarität auf epitheliale Na^+ -Kanäle wurde unter anderem an der renalen Zelllinie A6 untersucht. Wills

et al. (1991) beobachteten einen I_{SC} -Anstieg in hypotoner Lösung und eine Verminderung des I_{SC} unter hypertoner Perfusion. Die Autoren führen die Effekte auf eine Veränderung der Na^+ -Kanaldichte in der apikalen Membran zurück. Hypotonizität führte demzufolge zu einem Einbau von Na^+ -Kanälen in die Membran, während Hyperosmolarität den gegenteiligen Effekt bewirkt. Zum gleichen Schluss kommen Niisato *et al.* (2000), die die Erhöhung der Kanaldichte auf eine Vesikelfusion zurückführen. Eine mögliche physiologische Bedeutung ergibt sich für Nierenzellen (Wills *et al.* 1991). Im Falle einer erhöhten Plasmaosmolarität wird die weitere Na^+ -Resorption aus dem Harn durch Verminderung der Kanaldichte gesenkt. Sollte die Plasmaosmolarität im umgekehrten Fall zu stark sinken, so kann durch Einbau zusätzlicher Na^+ -Kanäle die Elektrolytresorption forciert werden. Untersuchungen im Oocyten-Expressionssystem ergaben kontroverse Ergebnisse. Awayda & Subramanyam (1998) konnte keine Beeinflussung des Ratten-ENaC nach Inkubation in hypotonem Medium feststellen. Hypertonizität reduzierte jedoch den ENaC-Strom. Das gleiche Resultat brachte eine Diplomarbeit am Institut für Tierphysiologie (Decker 2005), die ENaCs von *Xenopus* untersuchte. Demgegenüber postulierten Ji *et al.* (1998), dass es in hypertone Medium zu einer Stimulation des ENaCs kommt. Auch der Mechanismus, über den der osmotische Reiz perzipiert wird, scheint nicht einheitlich zu sein. Während Wills *et al.* (1991) eine ENaC-Inhibition an A6 Zellen nur dann feststellen konnten, wenn die Hyperosmolarität von der basolateralen Seite einwirkte, war dies bei der Studie von Willumsen *et al.* (1994) an Nasenepithelzellen nur bei apikaler Applikation zu beobachten. Letztere Autoren vermuten, dass der Rückgang des ENaC-Stroms seine Ursache in einer Hemmung basolateraler K^+ -Kanäle sowie einer Inhibition der Na^+ - K^+ -ATPase haben könnte.

Der Gruppe um Kleyman gelang der Nachweis, dass laminarer Scher-Stress, wie er etwa beim Durchströmen des Sammelrohrs auftritt, einen adequate Reiz zur Aktivierung des ENaCs der Maus darstellte (Satlin *et al.* 2001; Carattino *et al.* 2004). Die Autoren konnten eine Zunahme der Membranströme in ENaC-exprimierenden Oocyten nachweisen, wenn diese in der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme laminarer Strömung ausgesetzt wurden. Weiterhin wurden Hinweise darauf geliefert, dass die Zunahme der Leitfähigkeit durch Scher-Stress auf eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit zurückzuführen ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Effekt von Scher-Stress ausblieb, wenn Ratten-ENaC exprimierende Zellen zuvor mit Zn^{2+} perfundiert wurden. Wie die Arbeit von Sheng *et al.* (2004) zeigt, führte die Applikation von Zn^{2+} an Maus-ENaCs zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit. Der Befund, dass Scherkräfte unter diesen Bedingungen keinen zusätzlichen Effekt hervorrufen, lässt den Schluss zu, dass beide Stimuli

die gleiche Kanaleigenschaft – nämlich die Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit – beeinflussen.

Ein direkter Nachweis dieser Hypothese gelang unserer Arbeitsgruppe durch Einzelkanalableitungen mittels der *Patch Clamp* Technik. Dort konnte bewiesen werden, dass Scherkräfte die Leitfähigkeit von *Xenopus*- und Ratten-ENaC durch Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit steigern (Althaus *et al.* 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich der humane ENaC (hENaC) mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme und *Patch Clamp* untersucht. Dazu wurde der Kanal aus adultem Lungengewebe kloniert und heterolog in *Xenopus* Oocyten exprimiert. Wie bereits für den ENaC von Maus, *Xenopus* und Ratte beschrieben, führten laminare Scherkräfte in Ganzzell-Ableitungen von hENaC-exprimierenden Oocyten zu einer Steigerung der Leitfähigkeit. Der Effekt trat weder unter Amilorid-Perfusion noch in nativen Oocyten auf, so dass es sich um einen Einfluss auf den hENaC handeln muss. Auch in *Patch Clamp* Untersuchungen war in 3 von 5 Messungen eine Erhöhung der Kanalaktivität festzustellen. Eine Begründung, warum nicht alle *patches* durch mechanischen Stress stimuliert werden konnten, findet sich in der Arbeit von Ma *et al.* (2002). Die Autoren untersuchten die Aktivierbarkeit von ENaCs der renalen Zelllinie A6 durch Membrandehnung. Sie fanden, dass sich lediglich ein Drittel der ENaC-enthaltenden *patches* aktivieren ließ. Eine konsistente Stimulation wurde beobachtet, wenn P-Rezeptoren geblockt wurden oder extrazelluläres ATP hydrolysiert wurde. Die Autoren folgerten, dass Membrandehnung zwar den ENaC aktiviert, gleichzeitig jedoch auch ATP freigesetzt werden kann. Das Nukleotid vermag wiederum die Aktivität des Kanals zu inhibieren. Die Inkonsistenz der Ergebnisse der *Patch Clamp* Messungen lässt sich also erklären, wenn man eine unterschiedlich starke Freisetzung von ATP postuliert.

Der Mechanismus, über den Scher-Stress das *gating* des ENaC beeinflusst, ist bislang nicht bekannt. Wie von Althaus *et al.* (2007) gezeigt, verändert sich jedoch der Scher-Stresseffekt speziesabhängig, wenn der Kanal durch Trypsin-Behandlung proteolytisch prozessiert wird. Dies legt nahe, dass die große extrazelluläre *loop*-Region an der Perzeption mechanischer Stimuli beteiligt ist. Jasti *et al.* (2007) gelang kürzlich die hochauflösende Kristallstrukturanalyse des ASIC1, einem Na⁺-Kanal mit enger Verwandtschaft zum ENaC. In der Studie konnte der komplexe Aufbau der extrazellulären Schleife gezeigt werden, der von den Autoren in verschiedene funktionelle Domänen gegliedert wurde. Die Anordnung der Domänen erinnert an eine Hand, weshalb die verschiedenen Bereiche als „*palm*“, „*finger*“ und „*thumb*“ bezeichnet wurden. Die Domänen scheinen im Falle des ASIC1 den pH-Sensor

zu beeinhaltend. Eine Aktivierung des Sensors in den extrazellulären Domänen kann also einen unmittelbaren Einfluss auf das *gating* ausüben. Überträgt man diese Annahme auf den ENaC, könnte der Einfluss von laminarer Strömung zu einer Scherung der extrazellulären *loops* führen. Dadurch wäre eine veränderte sterische Anordnung der funktionellen Domänen möglich, die sich letztlich auf das *gating* des Kanals auswirkt.

IV.11 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass hydrostatischer Druck die Transporteigenschaften nativer Lungenepithelzellen stark beeinflusst. Eine mögliche pathophysiologische Bedeutung ergibt sich bei der Betrachtung von mechanisch beatmeten Patienten mit Lungenödemen. Die Resorption überschüssigen Wassers im Lumen ist eng an einen funktionierenden Ionentransport gekoppelt (Mutlu & Sznajder 2005). Eine Netto-Resorption von Ionen führt zu osmotischen Triebkräften, die Wasser aus dem Alveolarraum eliminieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es durch Druckeinwirkung unter anderem zu einer Stimulation apikal lokalisierter K^+ -Kanäle kommt. Über diese Leitfähigkeiten werden Ionen in das Lumen sekretiert, was letztlich die Wasserresorption vermindert und damit die Auflösung des Ödems erschweren kann.

Neben der Aktivierung von K^+ -Kanälen konnte auch eine Auswirkung auf Na^+ - und Chlorid-Leitfähigkeiten festgestellt werden. Eine Aktivierung aller drei Leitfähigkeiten findet sich auch bei Wang *et al.* (2003a), die den Einfluss hydrostatischen Drucks auf das Blasenepithel des Kaninchens untersuchten. Das Auftreten ähnlicher Mechanismen in unterschiedlichen Spezies und Organsystemen spricht dafür, dass es sich bei dem beobachteten Phänomen um ein grundlegendes zelluläres Antwortverhalten handelt. Da der Druckeffekt in der vorliegenden Arbeit durch die Osmolarität der Perfusionslösung beeinflusst werden konnte, handelt es sich dabei eventuell um ubiquitäre volumenregulatorische Prozesse. Die Sensitivität des Druckeffekts gegenüber Blockern mechanosensitiver Kanäle (Gd^{3+} und La^{3+}) deuten auf eine Beteiligung dieser Leitfähigkeiten hin.

Als zusätzliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist sicherlich die weitere Charakterisierung des *Xenopus* Lungenmodells zu sehen. Die funktionelle bzw. strukturelle Darstellung von Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen, 2-Poren-Domänen K^+ -Kanälen, ATP-abhängigen K^+ -Kanälen, TRP-Kanälen sowie des Chlorid-Kanals CFTR in der *Xenopus* Lunge bekräftigen die Ähnlichkeit hinsichtlich der Transporterausstattung der Lungenepithelien von *Xenopus* und Säugern.

V Zusammenfassung

Das Lungenepithel landlebender Vertebraten ist von einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt, dessen Höhe und Viskosität streng reguliert wird. Die Zusammensetzung wird im wesentlichen durch Ionentransportprozesse der Epithelzellen bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss mechanischer Kräfte auf den pulmonalen Ionentransport untersucht. Dazu wurden zum einen elektrophysiologische Messungen (Ussing-Kammer) an nativen Lungenpräparaten des Südafrikanischen Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) durchgeführt, zum anderen wurde der humane epitheliale Na^+ -Kanal aus Lungengewebe kloniert, in *Xenopus* Oocyten exprimiert und mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme sowie der *Patch Clamp* Technik untersucht.

Als mechanischer Stimulus diente in den Ussing-Kammer-Messungen die Erhöhung des hydrostatischen Drucks um 5 cm Wassersäule. Dies bedingte eine Veränderung folgender Parameter:

- Reduktion des Kurzschlussstroms (I_{SC}) in *voltage clamp* Messungen
- Reduktion der transepithelialen Potenzialdifferenz in *current clamp* Messungen
- Zunahme der Kapazität
- Erhöhung der extrazellulären ATP-Konzentration.

Eine Inhibition durch Druck konnte verhindert werden, wenn die Wassersäule gleichzeitig sowohl in der apikalen wie auch der basolateralen Kammerhälfte erhöht wurde oder das Gewebe mittels eines Nylonnetzes abgestützt wurde.

Die Höhe der Druck-induzierten Inhibition des I_{SC} konnte durch unterschiedliche Pharmaka und Versuchsbedingungen beeinflusst werden. Die apikale Applikation von Ba^{2+} sowie die Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration führte zu einer Abschwächung des Druckeffekts. Dies macht es wahrscheinlich, dass die Druck-induzierte Strominhibition maßgeblich durch eine Sekretion von K^+ über die apikale Membran verursacht wurde. Die Sensitivität gegenüber Clotrimazol, Chlorzoxazon sowie Glibenclamid legt eine Beteiligung Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle sowie ATP-abhängiger K^+ -Kanäle nahe. Die mRNA Expression für die Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle BK (*KCNMA1*) und IK (*KCNN4*) in der *Xenopus* Lunge wurde durch RT-PCR nachgewiesen. Weiterhin scheinen 2-Poren-Domänen K^+ -Kanäle durch Druckeinwirkung betroffen zu sein, deren mRNA-Expression für TWIK2 (*KCNK6*) und TASK2 (*KCNK5*) gezeigt werden konnte.

Neben einer Druck-induzierten Aktivierung von K^+ -Kanälen wurde eine Stimulation der Chlorid-Sekretion sowie eine Zunahme der Na^+ -Resorption durch epitheliale Na^+ -Kanäle

(ENaC) beobachtet. Sowohl der ENaC als auch der Chlorid-Kanal CFTR konnten durch RT-PCR nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte die Expression des CFTR mittels Immunfluoreszenz dargestellt werden.

Die Abhängigkeit des Druckeffekt von der Osmolarität der Perfusionslösung weist darauf hin, dass der mechanische Stimulus intrinsische Volumenregulationsmechanismen beeinflusst.

Nach Applikation von Inhibitoren mechanosensitiver Ionenkanäle (Gd^{3+} und La^{3+}) wurde der Druckeffekt stark abgeschwächt. Die mechanosensitiven Ca^{2+} -permeablen Ionenkanäle TRPC1 und TRPV4 wurden durch RT-PCR in der *Xenopus* Lunge sowie in humanen Epithelzellkulturen nachgewiesen. Durch Modulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration konnte der Druck-induzierte Effekt allerdings nur gering verändert werden.

Die Mechanosensitivität des epithelialen Na^+ -Kanals wurde im Oocytenexpressionsmodell untersucht. Dazu wurde der humane ENaC aus Lungengewebe kloniert, *in vitro* transkribiert und in *Xenopus* Oocyten exprimiert. In Ganzzelleableitungen zeigte sich eine Zunahme des ENaC-getragenen Stroms durch laminaren Scherstress. In *outside-out Patch Clamp* Untersuchungen konnte in einigen jedoch nicht allen Messungen eine Zunahme der Kanalaktivität durch den mechanischen Reiz festgestellt werden.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass mechanische Kräfte innerhalb kurzer Zeiträume von wenigen Minuten Ionentransportprozesse in nativen Lungenpräparaten beeinflussen können.

Summary

The present work investigated the impact of mechanical forces on pulmonary ion transport. Therefore we conducted Ussing chamber measurements on native lung preparations of the clawed frog *Xenopus laevis*. Further on the human epithelial Na⁺ channel was cloned from lung tissue, expressed in *Xenopus* oocytes and investigated by two electrode voltage clamp and patch clamp measurements.

Mechanical stimulation in Ussing chamber measurements was achieved by increasing the hydrostatic pressure to 5 cm water column. This led to the change of the following parameters:

- reduction of the short-circuit current (I_{SC}) in *voltage clamp* measurements
- reduction of the transepithelial potential in *current clamp* measurements
- increase in capacitance
- increase in extracellular ATP concentration.

The pressure-induced current inhibition could be prevented when the application of hydrostatic pressure occurred at the same time in both chamber compartments or when the tissue was fixed on a nylon mesh.

The pressure response was sensitive to various ion channel blockers. It could be prevented by the application of Ba²⁺ or by increasing the apical K⁺ concentrations. This shows that the main part of the pressure-induced current inhibition is due to a secretion of K⁺ via apical channels. The sensitivity towards clotrimazole, chlorzoxazon and glibenclamide points towards an involvement of Ca²⁺-activated K⁺ channels as well ATP-dependent K⁺ channels. The mRNA expression of the Ca²⁺-activated K⁺ channels KCNN4 and KCNMA1 was shown by reverse transcriptase PCR. Further the pressure-induced effect was sensitive to blockers of 2 pore K⁺ channels, whose mRNA expression was shown for KCNK6 and KCNK5.

Besides K⁺ secretion, pressure also induced the activation of Na⁺ as well as Cl⁻ conductances. Epithelial Na⁺ channels (ENaCs) as well as the Cl⁻ channel CFTR were detected on the molecular level.

The pressure effect was dependent on the solution osmolarity. This may be due to an interference of the mechanical stimulus with intrinsic volume regulation mechanisms.

The pressure-induced current inhibition could be attenuated by application of blockers of mechanosensitive channels (Gd³⁺ and La³⁺) but showed little dependence on intracellular Ca²⁺ concentrations.

The mechanosensitivity of ENaC was investigated in the *Xenopus* Oocyte expression system. Laminar shear stress, which was used as a mechanical stimulus, led to an increase in whole cell currents. In outside-out patch clamp studies the channel activity increased in some but not all experiments.

Taken together these results show that ion transport processes can be influenced in a short term manner due to application of mechanical forces on native lung preparations.

VI Literaturverzeichnis

- ALEU, J., MARTIN-SATUE, M., NAVARRO, P., PEREZ, D.L., I, BAHIMA, L., MARSAL, J., UND SOLSONA, C. Release of ATP induced by hypertonic solutions in *Xenopus oocytes*. *J Physiol*. 547, 209 - 219 (2003)
- ALTHAUS, M., BOGDAN, R., CLAUSS, W.G., UND FRONIUS, M. Mechano-sensitivity of epithelial sodium channels (ENaCs): laminar shear stress increases ion channel open probability. *FASEB J*. (2007)
- ALVAREZ, J., MONTERO, M., UND GARCIA-SANCHO, J. High affinity inhibition of Ca^{2+} -dependent K^+ channels by cytochrome P-450 inhibitors. *J Biol Chem*. 267, 11789 - 11793 (1992)
- APODACA, G. Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli. *Am J Physiol Renal Physiol*. 282, F179 - F190 (2002)
- ARNIGES, M., VAZQUEZ, E., FERNANDEZ-FERNANDEZ, J.M., UND VALVERDE, M.A. Swelling-activated Ca^{2+} entry via TRPV4 channel is defective in cystic fibrosis airway epithelia. *J Biol Chem*. 279, 54062 - 54068 (2004)
- AWAYDA, M.S. UND SUBRAMANYAM, M. Regulation of the epithelial Na^+ channel by membrane tension. *J Gen Physiol*. 112, 97 - 111 (1998)
- BANG, H., KIM, Y., UND KIM, D. TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K^+ channel family. *J Biol Chem*. 275, 17412 - 17419 (2000)
- BARFOD, E.T., MOORE, A.L., ROE, M.W., UND LIDOFKY, S.D. Ca^{2+} -activated IK1 channels associate with lipid rafts upon cell swelling and mediate volume recovery. *J Biol Chem*. 282, 8984 - 8993 (2007)
- BARRITT, G. UND RYCHKOV, G. TRPs as mechanosensitive channels. *Nat Cell Biol*. 7, 105 - 107 (2005)
- BASSET, G., BOUCHONNET, F., CRONE, C., UND SAUMON, G. Potassium transport across rat alveolar epithelium: evidence for an apical $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump. *J Physiol*. 400, 529 - 543 (1988)
- BAUKROWITZ, T. UND FAKLER, B. K_{ATP} channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur J Biochem*. 267, 5842 - 5848 (2000)
- BAXENDALE-COX, L.M. Terbutaline increases open channel density of epithelial sodium channel (ENaC) in distal lung. *Respir Physiol*. 116, 1 - 8 (1999)
- BECKER, D., BLASE, C., BEREITER-HAHN, J., UND JENDRACH, M. TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *J Cell Sci*. 118, 2435 - 2440 (2005)
- BENSON, D.A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J., OSTELL, J., UND WHEELER, D.L. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 35, D21 - D25 (2007)

- BERK, A., FRONIUS, M., CLAUSS, W., UND SCHNIZLER, M.** Prostaglandin E2 induces upregulation of Na⁺ transport across *Xenopus* lung epithelium. *J Comp Physiol [B]*. 174, 83 - 89 (2004)
- BLANK, T., NIJHOLT, I., KYE, M.J., UND SPIESS, J.** Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels as targets of CNS drug development. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 3, 161 - 167 (2004)
- BOITANO, S., SANDERSON, M.J., UND DIRKSEN, E.R.** A role for Ca²⁺-conducting ion channels in mechanically-induced signal transduction of airway epithelial cells. *J Cell Sci*. 107 (Pt 11), 3037 - 3044 (1994)
- BOUCHER, R.C.** Human airway ion transport. Part one. *Am J Respir Crit Care Med*. 150, 271 - 281 (1994)
- BOUCHER, R.C.** An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 54, 1359 - 1371 (2002)
- BOUDREAULT, F. UND GRYGORCZYK, R.** Cell swelling-induced ATP release and gadolinium-sensitive channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 282, C219 - C226 (2002)
- BRAUNSTEIN, G.M., ROMAN, R.M., CLANCY, J.P., KUDLOW, B.A., TAYLOR, A.L., SHYLONSKY, V.G., JOVOV, B., PETER, K., JILLING, T., ISMAILOV, I.I., BENOS, D.J., SCHWIEBERT, L.M., FITZ, J.G., UND SCHWIEBERT, E.M.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *J Biol Chem*. 276, 6621 - 6630 (2001)
- BRIEL, M., GREGER, R., UND KUNZELMANN, K.** Cl⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na⁺ channels (ENaCs) in *Xenopus* oocytes co-expressing CFTR and ENaC. *J Physiol*. 508 (Pt 3), 825 - 836 (1998)
- BRIGGMAN, J.V., GRAVES, J.S., SPICER, S.S., UND CRAGOE, E.J., JR.** The intracellular localization of amiloride in frog skin. *Histochem J*. 15, 239 - 255 (1983)
- BROWN, R.H. UND MITZNER, W.** Airway response to deep inspiration: role of inflation pressure. *J Appl Physiol*. 91, 2574 - 2578 (2001)
- BROWN, R.H., SCICHLONE, N., MUDGE, B., DIEMER, F.B., PERMUTT, S., UND TOGIAS, A.** High-resolution computed tomographic evaluation of airway distensibility and the effects of lung inflation on airway caliber in healthy subjects and individuals with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 163, 994 - 1001 (2001)
- BROWN, R.H. UND MITZNER, W.** Airway response to deep inspiration: role of nitric oxide. *Eur Respir J*. 22, 57 - 61 (2003)
- BRUGNARA, C., DE FRANCESCHI, L., UND ALPER, S.L.** Inhibition of Ca²⁺-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest*. 92, 520 - 526 (1993)

- CALDWELL, R.A., CLEMO, H.F., UND BAUMGARTEN, C.M. Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations. *Am J Physiol.* 275, C619 - C621 (1998)
- CARATTINO, M.D., SHENG, S., UND KLEYMAN, T.R. Epithelial Na⁺ channels are activated by laminar shear stress. *J Biol Chem.* 279, 4120 - 4126 (2004)
- CASTILLO, K., BACIGALUPO, J., UND WOLFF, D. Ca²⁺-dependent K⁺ channels from rat olfactory cilia characterized in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 579, 1675 - 1682 (2005)
- CAVANAUGH, K.J., JR., OSWARI, J., UND MARGULIES, S.S. Role of stretch on tight junction structure in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 25, 584 - 591 (2001)
- CHATTERJEE, S., LEVITAN, I., WEI, Z., UND FISHER, A.B. K_{ATP} channels are an important component of the shear-sensing mechanism in the pulmonary microvasculature. *Microcirculation.* 13, 633 - 644 (2006)
- CHEN, J. UND BARRITT, G.J. Evidence that TRPC1 (transient receptor potential canonical 1) forms a Ca²⁺-permeable channel linked to the regulation of cell volume in liver cells obtained using small interfering RNA targeted against TRPC1. *Biochem J.* 373, 327 - 336 (2003)
- CHEN, B., NICOL, G., UND CHO, W.K. Electrophysiological characterization of volume-activated chloride currents in mouse cholangiocyte cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 287, G1158 - G1167 (2004)
- CHESS, P.R., TOIA, L., UND FINKELSTEIN, J.N. Mechanical strain-induced proliferation and signaling in pulmonary epithelial H441 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279, L43 - L51 (2000)
- CHRISTENSEN, A.P. UND COREY, D.P. TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat Rev Neurosci.* 8, 510 - 521 (2007)
- CHRISTENSEN, O. Mediation of cell volume regulation by Ca²⁺ influx through stretch-activated channels. *Nature.* 330, 66 - 68 (1987)
- CLARKE, L.L., CHINET, T., UND BOUCHER, R.C. Extracellular ATP stimulates K⁺ secretion across cultured human airway epithelium. *Am J Physiol.* 272, L1084 - L1091 (1997)
- COELHO, R.R., SOUZA, E.P., SOARES, P.M., MEIRELES, A.V., SANTOS, G.C., SCARPARO, H.C., ASSREUY, A.M., UND CRIDDLE, D.N. Effects of chloride channel blockers on hypotonicity-induced contractions of the rat trachea. *Br J Pharmacol.* 141, 367 - 373 (2004)
- COETZEE, W.A., AMARILLO, Y., CHIU, J., CHOW, A., LAU, D., MCCORMACK, T., MORENO, H., NADAL, M.S., OZAITA, A., POUNTNEY, D., SAGANICH, M., VEGA-SAENZ, D.M., UND RUDY, B. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci.* 868, 233 - 285 (1999)
- COWLEY, E.A. UND LINSDELL, P. Characterization of basolateral K⁺ channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. *J Physiol.* 538, 747 - 757 (2002)

- CZOPEK, J.** Quantitative studies on the morphology of respiratory surfaces in amphibians. *Acta Anat (Basel)*. 62, 296 - 323 (1965)
- DANIELS, C.B. UND ORGEIG, S.** The comparative biology of pulmonary surfactant: past, present and future. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 129, 9 - 36 (2001)
- DAVID, P., MAYAN, H., CRAGOE, E.J., JR., UND KARLISH, S.J.** Structure-activity relations of amiloride derivatives, acting as antagonists of cation binding on Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. 1146, 59 - 64 (1993)
- DAVIS, K.A. UND COWLEY, E.A.** Two-pore-domain potassium channels support anion secretion from human airway Calu-3 epithelial cells. *Pflugers Arch*. 451, 631 - 641 (2006)
- DAVIS, R.J. UND CZECH, M.P.** Amiloride directly inhibits growth factor receptor tyrosine kinase activity. *J Biol Chem*. 260, 2543 - 2551 (1985)
- DECHER, N., MAIER, M., DITTRICH, W., GASSENHUBER, J., BRUGGEMANN, A., BUSCH, A.E., UND STEINMEYER, K.** Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family. *FEBS Lett*. 492, 84 - 89 (2001)
- DECKER, S.** Mechanische Regulation epithelialer Na⁺-Kanäle. Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, (2005)
- DENKER, B.M. UND NIGAM, S.K.** Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol*. 274, F1 - F9 (1998)
- DIERICH, R.** Electron microscopic studies of the lung of the frog. II. Topography of the inner surface by scanning and transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res*. 160, 399 - 410 (1975)
- DOBBS, L.G., GONZALEZ, R., MATTHAY, M.A., CARTER, E.P., ALLEN, L., UND VERKMAN, A.S.** Highly water-permeable type I alveolar epithelial cells confer high water permeability between the airspace and vasculature in rat lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 2991 - 2996 (1998)
- DOBBS, L.G. UND GUTIERREZ, J.A.** Mechanical forces modulate alveolar epithelial phenotypic expression. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 129, 261 - 266 (2001)
- DOS SANTOS, C.C. UND SLUTSKY, A.S.** Mechanotransduction, ventilator-induced lung injury and multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med*. 26, 638 - 642 (2000)
- DREYFUSS, D., SOLER, P., BASSET, G., UND SAUMON, G.** High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. 137, 1159 - 1164 (1988)
- DU, S., ARAKI, I., MIKAMI, Y., ZAKOJI, H., BEPPU, M., YOSHIYAMA, M., UND TAKEDA, M.** Amiloride-sensitive ion channels in urinary bladder epithelium involved in mechanosensory transduction by modulating stretch-evoked adenosine triphosphate release. *Urology*. 69, 590 - 595 (2007)

- DUMONT, J.N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol.* 136, 153 - 179 (1972)
- EDWARDS, Y.S. Stretch stimulation: its effects on alveolar type II cell function in the lung. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 129, 245 - 260 (2001)
- EYRE, T.A., DUCLUZEAU, F., SNEDDON, T.P., POVEY, S., BRUFORD, E.A., UND LUSH, M.J. The HUGO Gene Nomenclature Database, 2006 updates. *Nucleic Acids Res.* 34, D319 - D321 (2006)
- FANG, X., FUKUDA, N., BARBRY, P., SARTORI, C., VERKMAN, A.S., UND MATTHAY, M.A. Novel role for CFTR in fluid absorption from the distal airspaces of the lung. *J Gen Physiol.* 119, 199 - 207 (2002)
- FELIX, J.A., CHABAN, V.V., WOODRUFF, M.L., UND DIRKSEN, E.R. Mechanical stimulation initiates intercellular Ca^{2+} signaling in intact tracheal epithelium maintained under normal gravity and simulated microgravity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 18, 602 - 610 (1998)
- FERNANDEZ-FERNANDEZ, J.M., NOBLES, M., CURRID, A., VAZQUEZ, E., UND VALVERDE, M.A. Maxi K^+ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283, C1705 - C1714 (2002)
- FISCHER, H., VAN DRIESSCHE, W., UND CLAUSS, W. Evidence for apical sodium channels in frog lung epithelial cells. *Am J Physiol.* 256, C764 - C771 (1989)
- FISCHER, H. UND CLAUSS, W. Regulation of Na^+ channels in frog lung epithelium: a target tissue for aldosterone action. *Pflugers Arch.* 416, 62 - 67 (1990)
- FISHER, J.L. UND MARGULIES, S.S. Na^+K^+ -ATPase activity in alveolar epithelial cells increases with cyclic stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283, L737 - L746 (2002)
- FISHER, J.L., LEVITAN, I., UND MARGULIES, S.S. Plasma membrane surface increases with tonic stretch of alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 31, 200 - 208 (2004)
- FITZ, J.G. Regulation of Cellular ATP Release. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 118, 199 - 208 (2007)
- FRIIS, S. UND NIELSEN, R. Effect of the putative Ca^{2+} -receptor agonist Gd^{3+} on the active transepithelial Na^+ transport in frog skin. *J Membr Biol.* 184, 291 - 297 (2001)
- FRONIUS, M. Elektrophysiologische Untersuchungen zur Elektrolyt-Resorption am Lungenepithel von *Xenopus laevis*. Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, (2003)
- FRONIUS, M., CLAUSS, W., UND SCHNIZLER, M. Stimulation of transepithelial Na^+ current by extracellular Gd^{3+} in *Xenopus laevis* alveolar epithelium. *J Membr Biol.* 195, 43 - 51 (2003)

- FRONIUS, M., BERK, A., CLAUSS, W., UND SCHNIZLER, M.** Ion transport across *Xenopus* alveolar epithelium is regulated by extracellular ATP, UTP and adenosine. *Respir Physiol Neurobiol.* 139, 133 - 144 (2004)
- FRONIUS, M. UND CLAUSS, W.G.** Mechano-sensitivity of ENaC: may the (shear) force be with you. *Pflugers Arch.* (2007)
- FUCHS, S., GUMBLETON, U., SCHÄFER, U.F., UND LEHR, C.M.** Models of the alveolar epithelium. 189 - 210 (2002)
- GATZY, J.T.** Ion transport across the excised bullfrog lung. *Am J Physiol.* 228, 1162 - 1171 (1975)
- GATZY, J.T.** Ion transport across amphibian lung. *Ciba Found Symp.* 179 - 197 (1976)
- GERLACH, A.C., SYME, C.A., GILTINAN, L., ADELMAN, J.P., UND DEVORS, D.C.** ATP-dependent activation of the intermediate conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel, hIK1, is conferred by a C-terminal domain. *J Biol Chem.* 276, 10963 - 10970 (2001)
- GOLDMAN, M.J., ANDERSON, G.M., STOLZENBERG, E.D., KARI, U.P., ZASLOFF, M., UND WILSON, J.M.** Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell.* 88, 553 - 560 (1997)
- GOLDSTEIN, S.A., BOCKENHAUER, D., O'KELLY, I., UND ZILBERBERG, N.** Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci.* 2, 175 - 184 (2001)
- GRAAF, A.R.** Investigations into the distribution of blood in the heart and aortic arches of *Xenopus laevis*. *Exp Biol.* 34, 143 - 161 (1957)
- GRUNDER, S., THIEMANN, A., PUSCH, M., UND JENTSCH, T.J.** Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature.* 360, 759 - 762 (1992)
- GRUNNET, M., JENSEN, B.S., OLESEN, S.P., UND KLAERKE, D.A.** Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Pflugers Arch.* 441, 544 - 550 (2001)
- HAMILL, O.P. UND MCBRIDE, D.W., JR.** The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol Rev.* 48, 231 - 252 (1996)
- HAMILL, O.P. UND MARTINAC, B.** Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev.* 81, 685 - 740 (2001)
- HAMILTON, K.L., MEADS, L., UND BUTT, A.G.** 1-EBIO stimulates Cl⁻ secretion by activating a basolateral K⁺ channel in the mouse jejunum. *Pflugers Arch.* 439, 158 - 166 (1999)
- HANSEN, M., BOITANO, S., DIRKSEN, E.R., UND SANDERSON, M.J.** Intercellular calcium signaling induced by extracellular adenosine 5'-triphosphate and mechanical stimulation in airway epithelial cells. *J Cell Sci.* 106 (Pt 4), 995 - 1004 (1993)
- HARDIE, R.C. UND MINKE, B.** The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron.* 8, 643 - 651 (1992)

- HEDE, S.E., AMSTRUP, J., KLAERKE, D.A., UND NOVAK, I.** P2Y2 and P2Y4 receptors regulate pancreatic Ca^{2+} -activated K^+ channels differently. *Pflugers Arch.* 450, 429 - 436 (2005)
- HILKEN, G, IGLAUER, F, UND RICHTER, H-P.** Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Labortier - Biologie, Haltung, Zucht und experimentelle Nutzung Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, (1997)
- HIRCHE, T.O., LOITSCH, S., SMACZNY, C., UND WAGNER, T.O.** Neue Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie der Mukoviszidose. *Pneumologie.* 59, 811 - 818 (2005)
- HODGKIN, A.L., HUXLEY, A.F., UND KATZ, B.** Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol.* 116, 424 - 448 (1952)
- HOGER, J.H., ILYIN, V.I., FORSYTH, S., UND HOGER, A.** Shear stress regulates the endothelial *Kir2.1* ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 7780 - 7785 (2002)
- HOMOLYA, L., STEINBERG, T.H., UND BOUCHER, R.C.** Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia. *J Cell Biol.* 150, 1349 - 1360 (2000)
- HORISBERGER, J.D.** ENaC-CFTR interactions: the role of electrical coupling of ion fluxes explored in an epithelial cell model. *Pflugers Arch.* 445, 522 - 528 (2003)
- HUMMLER, E., BARKER, P., GATZY, J., BEERMANN, F., VERDUMO, C., SCHMIDT, A., BOUCHER, R., UND ROSSIER, B.C.** Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet.* 12, 325 - 328 (1996)
- HYATT, B.A., RESNIK, E.R., JOHNSON, N.S., LOHR, J.L., UND CORNFELD, D.N.** Lung specific developmental expression of the *Xenopus laevis* surfactant protein C and B genes. *Gene Expr Patterns.* 7, 8 - 14 (2007)
- ILLEK, B., FISCHER, H., UND CLAUSS, W.** Aldosterone regulation of basolateral potassium channels in alveolar epithelium. *Am J Physiol.* 259, L230 - L237 (1990)
- INGLIS, S.K., BROWN, S.G., CONSTABLE, M.J., MCTAVISH, N., OLVER, R.E., UND WILSON, S.M.** A Ba^{2+} -resistant, acid-sensitive K^+ conductance in Na^+ absorbing H441 human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2007)
- JAIN, L., CHEN, X.J., RAMOSEVAC, S., BROWN, L.A., UND EATON, D.C.** 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 - L658 (2001)
- JASTI, J., FURUKAWA, H., GONZALES, E.B., UND GOUAUX, E.** Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature.* 449, 316 - 323 (2007)
- JENSEN, B.S., STROBAEK, D., CHRISTOPHERSEN, P., JORGENSEN, T.D., HANSEN, C., SILAHTAROGLU, A., OLESEN, S.P., UND AHRING, P.K.** Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. *Am J Physiol.* 275, C848 - C856 (1998)

- JENSEN, B.S., STROBAEK, D., OLESEN, S.P., UND CHRISTOPHERSEN, P.** The Ca^{2+} -activated K^+ channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? *Curr Drug Targets*. 2, 401 - 422 (2001)
- JENTSCH, T.J., STEIN, V., WEINREICH, F., UND ZDEBIK, A.A.** Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev*. 82, 503 - 568 (2002)
- JESPERSEN, T., GRUNNET, M., ANGELO, K., KLAERKE, D.A., UND OLESEN, S.P.** Dual-function vector for protein expression in both mammalian cells and *Xenopus laevis* oocytes. *Biotechniques*. 32, 536 - 8, 540 (2002)
- JI, H.L., FULLER, C.M., UND BENOS, D.J.** Osmotic pressure regulates alpha beta gamma-rENaC expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol*. 275, C1182 - C1190 (1998)
- JIANG, Q., MAK, D., DEVIDAS, S., SCHWIEBERT, E.M., BRAGIN, A., ZHANG, Y., SKACH, W.R., GUGGINO, W.B., FOSKETT, J.K., UND ENGELHARDT, J.F.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP release is controlled by a chloride sensor. *J Cell Biol*. 143, 645 - 657 (1998)
- JOHNSON, M.D., WIDDICOMBE, J.H., ALLEN, L., BARBRY, P., UND DOBBS, L.G.** 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*. 99, 1966 - 1971 (2002)
- JOHNSON, M.D., BAO, H.F., HELMS, M.N., CHEN, X.J., TIGUE, Z., JAIN, L., DOBBS, L.G., UND EATON, D.C.** Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 4964 - 4969 (2006)
- JOHNSON, M.D.** Ion transport in alveolar type I cells. *Mol Biosyst*. 3, 178 - 186 (2007)
- JOINER, W.J., WANG, L.Y., TANG, M.D., UND KACZMAREK, L.K.** hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 11013 - 11018 (1997)
- JURGENS, K.D. UND GROS, G.** Phylogenese der Gasaustauschsysteme. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 37, 185 - 198 (2002)
- KADO, R.T.** Membrane area and electrical capacitance. *Methods Enzymol*. 221, 273 - 299 (1993)
- KEMP, P.J., KIM, K.J., BOROK, Z., UND CRANDALL, E.D.** Re-evaluating the Na^+ conductance of adult rat alveolar type II pneumocytes: evidence for the involvement of cGMP-activated cation channels. *J Physiol*. 536, 693 - 701 (2001)
- KETAI, L.H. UND GODWIN, J.D.** A new view of pulmonary edema and acute respiratory distress syndrome. *J Thorac Imaging*. 13, 147 - 171 (1998)
- KIM, K.J.** Active Na^+ transport across *Xenopus* lung alveolar epithelium. *Respir Physiol*. 81, 29 - 39 (1990)
- KLEYMAN, T.R. UND CRAGOE, E.J., JR.** Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol*. 105, 1 - 21 (1988)

- KLODA, A. UND MARTINAC, B.** Common evolutionary origins of mechanosensitive ion channels in Archaea, Bacteria and cell-walled Eukarya. *Archaea*. 1, 35 - 44 (2002)
- KNIGHT, G.E., BODIN, P., DE GROAT, W.C., UND BURNSTOCK, G.** ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 282, F281 - F288 (2002)
- KOEFOED-JOHNSEN, V. UND USSING, H.H.** The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand*. 42, 298 - 308 (1958)
- KUNG, C.** A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature*. 436, 647 - 654 (2005)
- KUNZELMANN, K., SCHREIBER, R., NITSCHKE, R., UND MALL, M.** Control of epithelial Na⁺ conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch*. 440, 193 - 201 (2000)
- LACAZ-VIEIRA, F.** Calcium site specificity. Early Ca²⁺-related tight junction events. *J Gen Physiol*. 110, 727 - 740 (1997)
- LECUONA, E., SALDIAS, F., COMELLAS, A., RIDGE, K., GUERRERO, C., UND SZNAJDER, J.I.** Ventilator-associated lung injury decreases lung ability to clear edema in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 159, 603 - 609 (1999)
- LEE, S.Y., MANIAK, P.J., INGBAR, D.H., UND O'GRADY, S.M.** Adult alveolar epithelial cells express multiple subtypes of voltage-gated K⁺ channels that are located in apical membrane. *Am J Physiol Cell Physiol*. 284, C1614 - C1624 (2003)
- LEFFERT, H.L., KOCH, K.S., FEHLMANN, M., HEISER, W., LAD, P.J., UND SKELLY, H.** Amiloride blocks cell-free protein synthesis at levels attained inside cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 108, 738 - 745 (1982)
- LEROY, C., DAGENAIS, A., BERTHIAUME, Y., UND BROCHIERO, E.** Molecular identity and function in transepithelial transport of K_{ATP} channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 286, L1027 - L1037 (2004)
- LEWIS, S.A. UND DE MOURA, J.L.** Incorporation of cytoplasmic vesicles into apical membrane of mammalian urinary bladder epithelium. *Nature*. 297, 685 - 688 (1982)
- LEWIS, S.A. UND DE MOURA, J.L.** Apical membrane area of rabbit urinary bladder increases by fusion of intracellular vesicles: an electrophysiological study. *J Membr Biol*. 82, 123 - 136 (1984)
- LIEDTKE, W.** TRPV4 as osmosensor: a transgenic approach. *Pflugers Arch*. 451, 176 - 180 (2005)
- LIPECKA, J., BALI, M., THOMAS, A., FANEN, P., EDELMAN, A., UND FRITSCH, J.** Distribution of ClC-2 chloride channel in rat and human epithelial tissues. *Am J Physiol Cell Physiol*. 282, C805 - C816 (2002)
- LIU, G.X., VEPA, S., ARTMAN, M., UND COETZEE, W.A.** Modulation of Human Cardiovascular Outward Rectifying Chloride Channel by Intra- and Extracellular ATP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. (2007)

- LOGSDON, N.J., KANG, J., TOGO, J.A., CHRISTIAN, E.P., UND AIYAR, J. A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes. *J Biol Chem.* 272, 32723 - 32726 (1997)
- LYTLE, C. Activation of the avian erythrocyte Na-K-Cl cotransport protein by cell shrinkage, cAMP, fluoride, and calyculin-A involves phosphorylation at common sites. *J Biol Chem.* 272, 15069 - 15077 (1997)
- MA, H.P., LI, L., ZHOU, Z.H., EATON, D.C., UND WARNOCK, D.G. ATP masks stretch activation of epithelial sodium channels in A6 distal nephron cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 282, F501 - F505 (2002)
- MAINGRET, F., FOSSET, M., LESAGE, F., LAZDUNSKI, M., UND HONORE, E. TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel. *J Biol Chem.* 274, 1381 - 1387 (1999)
- MAINGRET, F., PATEL, A.J., LESAGE, F., LAZDUNSKI, M., UND HONORE, E. Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K⁺ channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem.* 275, 10128 - 10133 (2000)
- MAROTO, R. UND HAMILL, O.P. Brefeldin A block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction. *J Biol Chem.* 276, 23867 - 23872 (2001)
- MAROTO, R., RASO, A., WOOD, T.G., KUROSKY, A., MARTINAC, B., UND HAMILL, O.P. TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol.* 7, 179 - 185 (2005)
- MEBAN, C. The pneumonocytes in the lung of *Xenopus laevis*. *J Anat.* 114, 235 - 244 (1973)
- METHFESSEL, C., WITZEMANN, V., TAKAHASHI, T., MISHINA, M., NUMA, S., UND SAKMANN, B. Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflugers Arch.* 407, 577 - 588 (1986)
- MILLER, C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* 1, REVIEWS0004 - (2000)
- MIRONOV, S.L. UND RICHTER, D.W. Intracellular signalling pathways modulate K_{ATP} channels in inspiratory brainstem neurones and their hypoxic activation: involvement of metabotropic receptors, G-proteins and cytoskeleton. *Brain Res.* 853, 60 - 67 (2000)
- MÜLLER, T., BUDWEISER, S., MUDERS, F., SCHULZ, C., JERON, A., NEUHIERL, F., RIEGGER, G., UND PFEIFER, M. Hochfrequenzoszillationsventilation beim akuten Lungenversagen des Erwachsenen. *Deutsches Ärzteblatt.* 101, 928 - 934 (2004)
- MUTLU, G.M. UND SZNAJDER, J.I. Mechanisms of pulmonary edema clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289, L685 - L695 (2005)
- NAINI, A.A., SHIMONY, E., KOZLOWSKI, E., SHAIKH, T., DANG, W., UND MILLER, C. Interaction of Ca²⁺-activated K⁺ channels with refolded charybdotoxins mutated at a central interaction residue. *Neuropharmacology.* 35, 915 - 921 (1996)

- NGUYEN, T.V., MATSUYAMA, H., BAELE, J., HUNNE, B., FOWLER, C.J., SMITH, J.E., NURGALI, K., UND FURNESS, J.B. Effects of compounds that influence IK (KCNN4) channels on afterhyperpolarizing potentials, and determination of IK channel sequence, in guinea pig enteric neurons. *J Neurophysiol.* 97, 2024 - 2031 (2007)
- NIEMEYER, M.I., CID, L.P., BARROS, L.F., UND SEPULVEDA, F.V. Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K⁺ channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume. *J Biol Chem.* 276, 43166 - 43174 (2001)
- NIISATO, N., VAN DRIESSCHE, W., LIU, M., UND MARUNAKA, Y. Involvement of protein tyrosine kinase in osmoregulation of Na⁺ transport and membrane capacitance in renal A6 cells. *J Membr Biol.* 175, 63 - 77 (2000)
- NILIUS, B., EGGERMONT, J., VOETS, T., UND DROOGMANS, G. Volume-activated Cl⁻ channels. *Gen Pharmacol.* 27, 1131 - 1140 (1996)
- NILIUS, B. UND DROOGMANS, G. Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand.* 177, 119 - 147 (2003)
- NUMBERGER, M UND DRAGUHN, A. Patch-Clamp-Technik Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akad. Verl., (1996)
- O'CONNELL, A.D., MORTON, M.J., UND HUNTER, M. Two-pore domain K⁺ channels-molecular sensors. *Biochim Biophys Acta.* 1566, 152 - 161 (2002)
- O'GRADY, S.M. UND LEE, S.Y. Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284, L689 - L700 (2003)
- OHYA, S., KIMURA, S., KITSUKAWA, M., MURAKI, K., WATANABE, M., UND IMAIZUMI, Y. SK4 encodes intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in mouse urinary bladder smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol.* 84, 97 - 100 (2000)
- OKADA, Y., ISHIKO, S., DAIDO, S., KIM, J., UND IKEDA, S. Comparative morphology of the lung with special reference to the alveolar epithelial cells. I. Lung of the amphibia. *Acta Tuberc Jpn.* 11, 63 - 72 (1962)
- PASANTES-MORALES, H. UND MORALES, M.S. Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron.* 86, 414 - 427 (2000)
- PATEL, A.J., LAZDUNSKI, M., UND HONORE, E. Lipid and mechano-gated 2P domain K⁺ channels. *Curr Opin Cell Biol.* 13, 422 - 428 (2001)
- PATEL, A.S., REIGADA, D., MITCHELL, C.H., BATES, S.R., MARGULIES, S.S., UND KOVAL, M. Paracrine stimulation of surfactant secretion by extracellular ATP in response to mechanical deformation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289, L489 - L496 (2005)
- PITKANEN, O.M. UND O'BRODOVICH, H.M. Significance of ion transport during lung development and in respiratory disease of the newborn. *Ann Med.* 30, 134 - 142 (1998)
- POIRIER, C.C. UND IGLESIAS, P.A. An integrative approach to understanding mechanosensation. *Brief Bioinform.* 8, 258 - 265 (2007)

- PUOTI, A., MAY, A., CANESSA, C.M., HORISBERGER, J.D., SCHILD, L., UND ROSSIER, B.C.** The highly selective low-conductance epithelial Na channel of *Xenopus laevis* A6 kidney cells. *Am J Physiol.* 269, C188 - C197 (1995)
- REDDY, M.M., QUINTON, P.M., HAWS, C., WINE, J.J., GRYGORCZYK, R., TABCHARANI, J.A., HANRAHAN, J.W., GUNDERSON, K.L., UND KOPITO, R.R.** Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP. *Science.* 271, 1876 - 1879 (1996)
- REIFARTH, F.W., CLAUSS, W., UND WEBER, W.M.** Stretch-independent activation of the mechanosensitive cation channel in oocytes of *Xenopus laevis*. *Biochim Biophys Acta.* 1417, 63 - 76 (1999)
- REUSS, L.** Ussing's two-membrane hypothesis: the model and half a century of progress. *J Membr Biol.* 184, 211 - 217 (2001)
- REYES, R., DUPRAT, F., LESAGE, F., FINK, M., SALINAS, M., FARMAN, N., UND LAZDUNSKI, M.** Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J Biol Chem.* 273, 30863 - 30869 (1998)
- RIBEIRO R., HEINKE B. UND DIENER M.** Cell volume-induced changes in K⁺ transport across the rat colon. *Acta Physiol Scand.* 171, 445-458 (2001)
- RIDGE, F.P., DUSZYK, M., UND FRENCH, A.S.** A large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel in a human lung epithelial cell line (A549). *Biochim Biophys Acta.* 1327, 249 - 258 (1997)
- RIESEN, F.K., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., UND WUNDERLI-AlLENSPACH, H.** A ZO1-GFP fusion protein to study the dynamics of tight junctions in living cells. *Histochem Cell Biol.* 117, 307 - 315 (2002)
- ROMAN, R.M., FERANCHAK, A.P., DAVISON, A.K., SCHWIEBERT, E.M., UND FITZ, J.G.** Evidence for Gd³⁺ inhibition of membrane ATP permeability and purinergic signaling. *Am J Physiol.* 277, G1222 - G1230 (1999)
- ROSSIER, B.C.** Mechanosensitivity of the epithelial sodium channel (ENaC): controversy or pseudocontroversy? *J Gen Physiol.* 112, 95 - 96 (1998)
- ROTHEN-RUTISHAUSER, B., RIESEN, F.K., BRAUN, A., GUNTHER, M., UND WUNDERLI-AlLENSPACH, H.** Dynamics of tight and adherens junctions under EGTA treatment. *J Membr Biol.* 188, 151 - 162 (2002)
- ROZEN, S. UND SKALETSKY, H.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 132, 365 - 386 (2000)
- RUBIN, B.K.** Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care.* 47, 761 - 768 (2002)
- RYCHKOV, G. UND BARRITT, G.J.** TRPC1 Ca²⁺-permeable channels in animal cells. *Handb Exp Pharmacol.* 23 - 52 (2007)
- SAITOU, T., ISHIKAWA, T., OBARA, K., UND NAKAYAMA, K.** Characterization of whole-cell currents elicited by mechanical stimulation of *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch.* 440, 858 - 865 (2000)

- SAKUMA, T., TAKAHASHI, K., OHYA, N., NAKADA, T., UND MATTHAY, M.A. Effects of ATP-sensitive potassium channel opener on potassium transport and alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Pharmacol Toxicol.* 83, 16 - 22 (1998)
- SAMBROOK, J UND RUSSELL, DW. Molecular cloning: a laboratory manual 3. Ausgabe. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, (2001)
- SARKADI, B. UND PARKER, J.C. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim Biophys Acta.* 1071, 407 - 427 (1991)
- SATLIN, L.M., SHENG, S., WODA, C.B., UND KLEYMAN, T.R. Epithelial Na⁺ channels are regulated by flow. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280, F1010 - F1018 (2001)
- SAUMON, G., BASSET, G., BOUCHONNET, F., UND CRONE, C. Cellular effects of beta-adrenergic and of cAMP stimulation on potassium transport in rat alveolar epithelium. *Pflugers Arch.* 414, 340 - 345 (1989)
- SAVLA, U., SPORN, P.H., UND WATERS, C.M. Cyclic stretch of airway epithelium inhibits prostanoid synthesis. *Am J Physiol.* 273, L1013 - L1019 (1997)
- SCHWIEBERT, E.M., EGAN, M.E., HWANG, T.H., FULMER, S.B., ALLEN, S.S., CUTTING, G.R., UND GUGGINO, W.B. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell.* 81, 1063 - 1073 (1995)
- SCHWIEBERT, E.M., POTTER, E.D., HWANG, T.H., WOO, J.S., DING, C., QIU, W., GUGGINO, W.B., LEVINE, M.A., UND GUGGINO, S.E. cGMP stimulates sodium and chloride currents in rat tracheal airway epithelia. *Am J Physiol.* 272, C911 - C922 (1997)
- SCHWIEBERT, E.M., BENOS, D.J., UND FULLER, C.M. Cystic fibrosis: a multiple exocrinopathy caused by dysfunctions in a multifunctional transport protein. *Am J Med.* 104, 576 - 590 (1998)
- SEGAL, Y. UND REUSS, L. Ba²⁺, TEA⁺, and quinine effects on apical membrane K⁺ conductance and maxi K⁺ channels in gallbladder epithelium. *Am J Physiol.* 259, C56 - C68 (1990)
- SHENG, S., PERRY, C.J., UND KLEYMAN, T.R. Extracellular Zn²⁺ activates epithelial Na⁺ channels by eliminating Na⁺ self-inhibition. *J Biol Chem.* 279, 31687 - 31696 (2004)
- SILBERBERG, S.D. UND MAGLEBY, K.L. Voltage-induced slow activation and deactivation of mechanosensitive channels in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 505 (Pt 3), 551 - 569 (1997)
- SINGH, A.K., DEVOR, D.C., GERLACH, A.C., GONDOR, M., PILEWSKI, J.M., UND BRIDGES, R.J. Stimulation of Cl⁻ secretion by chlorzoxazone. *J Pharmacol Exp Ther.* 292, 778 - 787 (2000)
- SLUTSKY, A.S. Ventilator-induced lung injury: from barotrauma to biotrauma. *Respir Care.* 50, 646 - 659 (2005)
- SOLC, C.K. UND WINE, J.J. Swelling-induced and depolarization-induced Cl⁻ channels in normal and cystic fibrosis epithelial cells. *Am J Physiol.* 261, C658 - C674 (1991)

- SOMMER, D., BOGDAN, R., BERGER, J., PETERS, D.M., MORTY, R.E., CLAUSS, W.G., UND FRONIUS, M.** CFTR-dependent Cl⁻ secretion in *Xenopus laevis* lung epithelium. *Respir Physiol Neurobiol.* 158, 97 - 106 (2007)
- SORENSEN, C.E. UND NOVAK, I.** Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. Use of fluorescent probes and confocal microscopy. *J Biol Chem.* 276, 32925 - 32932 (2001)
- SYME, C.A., GERLACH, A.C., SINGH, A.K., UND DEVOR, D.C.** Pharmacological activation of cloned intermediate- and small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 278, C570 - C581 (2000)
- TAKAHIRA, M., SAKURAI, M., SAKURADA, N., UND SUGIYAMA, K.** Fenamates and diltiazem modulate lipid-sensitive mechano-gated 2P domain K⁺ channels. *Pflugers Arch.* 451, 474 - 478 (2005)
- TARRAN, R.** Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proc Am Thorac Soc.* 1, 42 - 46 (2004)
- TARRAN, R., BUTTON, B., UND BOUCHER, R.C.** Regulation of normal and cystic fibrosis airway surface liquid volume by phasic shear stress. *Annu Rev Physiol.* 68, 543 - 561 (2006)
- TAYLOR, A.L., KUDLOW, B.A., MARRS, K.L., GRUENERT, D.C., GUGGINO, W.B., UND SCHWIEBERT, E.M.** Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia. *Am J Physiol.* 275, C1391 - C1406 (1998)
- TERZIC, A. UND KURACHI, Y.** Actin microfilament disrupters enhance K_{ATP} channel opening in patches from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol.* 492 (Pt 2), 395 - 404 (1996)
- THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME NETWORK.** Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med.* 342, 1301 - 1308 (2000)
- TONG, Q., MENON, A.G., UND STOCKAND, J.D.** Functional polymorphisms in the alpha-subunit of the human epithelial Na⁺ channel increase activity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290, F821 - F827 (2006)
- TREMBLAY, L., VALENZA, F., RIBEIRO, S.P., LI, J., UND SLUTSKY, A.S.** Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest.* 99, 944 - 952 (1997)
- TREMBLAY, L.N. UND SLUTSKY, A.S.** Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside. *Intensive Care Med.* 32, 24 - 33 (2006)
- TRINH, N.T., PRIVE, A., KHEIR, L., BOURRET, J.C., HIJAZI, T., AMRAEI, M.G., NOEL, J., UND BROCHIERO, E.** Involvement of K_{ATP} and K_vLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2007)

- TSUCHIYA, K., WANG, W., GIEBISCH, G., UND WELLING, P.A.** ATP is a coupling modulator of parallel Na,K-ATPase-K-channel activity in the renal proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 6418 - 6422 (1992)
- UYEKUBO, S.N., FISCHER, H., MAMINISHKIS, A., ILLEK, B., MILLER, S.S., UND WIDDICOMBE, J.H.** cAMP-dependent absorption of chloride across airway epithelium. *Am J Physiol.* 275, L1219 - L1227 (1998)
- VAN WAGONER, D.R.** Mechanosensitive gating of atrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res.* 72, 973 - 983 (1993)
- VASUDEVAN, A., LODHA, R., UND KABRA, S.K.** Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Indian J Pediatr.* 71, 743 - 750 (2004)
- VAZQUEZ, E., NOBLES, M., UND VALVERDE, M.A.** Defective regulatory volume decrease in human cystic fibrosis tracheal cells because of altered regulation of intermediate conductance Ca²⁺-dependent potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 5329 - 5334 (2001)
- VEITH, C.** Untersuchungen zur Rolle von Ca²⁺ an mechanosensitiven Ionenströmen am Lungenepithel von *Xenopus laevis*. Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, (2007)
- VERGARA, C., LATORRE, R., MARRION, N.V., UND ADELMAN, J.P.** Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol.* 8, 321 - 329 (1998)
- VLAHAKIS, N.E., SCHROEDER, M.A., LIMPER, A.H., UND HUBMAYR, R.D.** Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol.* 277, L167 - L173 (1999)
- VLAHAKIS, N.E., SCHROEDER, M.A., PAGANO, R.E., UND HUBMAYR, R.D.** Deformation-induced lipid trafficking in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 280, L938 - L946 (2001)
- VOETS, T., SZUCS, G., DROOGMANS, G., UND NILIUS, B.** Blockers of volume-activated Cl⁻ currents inhibit endothelial cell proliferation. *Pflugers Arch.* 431, 132 - 134 (1995)
- WANG, E.C., LEE, J.M., JOHNSON, J.P., KLEYMAN, T.R., BRIDGES, R., UND APODACA, G.** Hydrostatic pressure-regulated ion transport in bladder uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol.* 285, F651 - F663 (2003a)
- WANG, J., MORISHIMA, S., UND OKADA, Y.** IK channels are involved in the regulatory volume decrease in human epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284, C77 - C84 (2003b)
- WANG, Y., ROMAN, R., LIDOFKY, S.D., UND FITZ, J.G.** Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 12020 - 12025 (1996)
- WATERS, C.M., RIDGE, K.M., SUNIO, G., VENETSANOU, K., UND SZNAJDER, J.I.** Mechanical stretching of alveolar epithelial cells increases Na⁺-K⁺-ATPase activity. *J Appl Physiol.* 87, 715 - 721 (1999)

- WELLING, P.A. Cross-talk and the role of K_{ATP} channels in the proximal tubule. *Kidney Int.* 48, 1017 - 1023 (1995)
- WELSH, M.J., SMITH, P.L., UND FRIZZELL, R.A. Chloride secretion by canine tracheal epithelium: II. The cellular electrical potential profile. *J Membr Biol.* 70, 227 - 238 (1982)
- WILLS, N.K., MILLINOFF, L.P., UND CROWE, W.E. Na^+ channel activity in cultured renal (A6) epithelium: regulation by solution osmolarity. *J Membr Biol.* 121, 79 - 90 (1991)
- WILLUMSEN, N.J., DAVIS, C.W., UND BOUCHER, R.C. Selective response of human airway epithelia to luminal but not serosal solution hypertonicity. Possible role for proximal airway epithelia as an osmolality transducer. *J Clin Invest.* 94, 779 - 787 (1994)
- WILSON, S.M., BROWN, S.G., MCTAVISH, N., MCNEILL, R.P., HUSBAND, E., INGLIS, S.K., OLVER, R.E., UND CLUNES, M.T. Expression of the intermediate conductance, Ca^{2+} -activated K^+ channel (KCNN4) in human distal airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2006)
- WIRTZ, H.R. UND DOBBS, L.G. The effects of mechanical forces on lung functions. *Respir Physiol.* 119, 1 - 17 (2000)
- WU, J.V., KROUSE, M.E., RUSTAGI, A., JOO, N.S., UND WINE, J.J. An inwardly rectifying potassium channel in apical membrane of Calu-3 cells. *J Biol Chem.* 279, 46558 - 46565 (2004)
- WULFF, H., MILLER, M.J., HANSEL, W., GRISSMER, S., CAHALAN, M.D., UND CHANDY, K.G. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 8151 - 8156 (2000)
- WULFF, H., GUTMAN, G.A., CAHALAN, M.D., UND CHANDY, K.G. Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1. *J Biol Chem.* 276, 32040 - 32045 (2001)
- XU, W., LEUNG, S., WRIGHT, J., UND GUGGINO, S.E. Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in airway epithelial cells. *J Membr Biol.* 171, 117 - 126 (1999)
- YAMAZAKI, J. UND HUME, J.R. Inhibitory effects of glibenclamide on cystic fibrosis transmembrane regulator, swelling-activated, and Ca^{2+} -activated Cl^- channels in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res.* 81, 101 - 109 (1997)
- YANG, X.C. UND SACHS, F. Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science.* 243, 1068 - 1071 (1989)
- ZHUANG, Y., CRAGOE, E.J., JR., SHAIKEWITZ, T., GLASER, L., UND CASSEL, D. Characterization of potent Na^+/H^+ exchange inhibitors from the amiloride series in A431 cells. *Biochemistry.* 23, 4481 - 4488 (1984)
- ZIGANSHIN, A.U., ZIGANSHINA, L.E., KING, B.E., UND BURNSTOCK, G. Characteristics of ecto-ATPase of *Xenopus* oocytes and the inhibitory actions of suramin on ATP breakdown. *Pflugers Arch.* 429, 412 - 418 (1995)

VII Abbildungsverzeichnis

Abb. II-1: Lunge von <i>Xenopus laevis</i>	10
Abb. II-2: Zeit-Temperaturschema der PCR zur Detektion Ionenkanal-kodierender mRNA in <i>Xenopus</i> Lungen.	13
Abb. II-3: Zeit-Temperaturschema zur Amplifikation der kodierenden Sequenz der drei ENaC-Untereinheiten α , β und γ	16
Abb. II-4: Plasmidkarte des TA-Klonierungsvektors pGEM-T Easy von PROMEGA.	18
Abb. II-5: Plasmidkarte des Oocytenexpressionsvektors pTNT (PROMEGA).	20
Abb. II-6: Schematische Darstellung der modifizierten Ussing-Kammer.	27
Abb. II-7: Aufbau der Zwei-Elektroden-Spannungs-Klemme zur Untersuchung des Einflusses von Scherkräften auf heterolog exprimierte Ionenkanäle.	30
Abb. II-8: <i>Patch Clamp</i> Konfigurationen.....	33
Abb. II-9: Aufbau des <i>Patch Clamp</i> Messstands zur Applikation von Scherstress auf Einzelkanäle.	35
Abb. III-1: Druck-induzierte Strominhibition.....	45
Abb. III-2: Unterschiedliche Ausprägung der Druck-induzierten Strominhibition.....	46
Abb. III-3: Druck-induzierte Strominhibition nach basolateraler Erhöhung des hydrostatischen Drucks.	47
Abb. III-4: Beeinflussung des Kurzschlussstroms (I_{SC}) durch beidseitige Erhöhung der Wassersäule.	48
Abb. III-5: Eine Gewebsabstützung mittels eines Nylonnetzes verhinderte die Inhibition des Kurzschlussstroms (I_{SC}) während der Erhöhung des hydrostatischen Drucks.	49
Abb. III-6: Auftragung des Widerstands zu verschiedenen Messzeitpunkten.....	50
Abb. III-7: Auswirkung einer mechanischen Stimulation auf die transepitheliale Potenzial-differenz (V_t).....	51
Abb. III-8: Veränderung der transepithelialen Kapazität (C_t) als Folge einer Erhöhung des hydrostatischen Drucks auf der apikalen Gewebsseite.	52
Abb. III-9: Wiederholbarkeit des Druckeffekts und Einfluss von Lösungsmitteln.....	54

Abb. III-10: Mechanische Stimulation führte zu einer transienten Freisetzung von ATP.....	55
Abb. III-11: Einfluss von 10 μM Amilorid auf den Druckeffekt.....	57
Abb. III-12: Einfluss einer reduzierten Na^+ -Leitfähigkeit auf den Druckeffekt.....	59
Abb. III-13: Die apikale Perfusion von 500 μM DIDS vergrößert den Druckeffekt.....	60
Abb. III-14: Einfluss einer apikalen Perfusion des Chlorid-Kanalblockers NFA auf den Druckeffekt.....	61
Abb. III-15: Die apikale Substitution von Chlorid durch Gluconat verminderte den Druckeffekt.....	62
Abb. III-16: Druckeffekt während Ba^{2+} Applikation.....	63
Abb. III-17: Druckeffekt unter Hoch- K^+ Bedingungen.....	65
Abb. III-18: Druckeffekt nach Permeabilisierung der apikalen Membran durch Nystatin und Anlegen eines transepithelialen K^+ Gradienten.....	66
Abb. III-19: Verstärkung der Druck-induzierten Strominhibition nach Blockade von 2-Poren-Domänen K^+ -Kanälen (2-P).....	68
Abb. III-20: Verminderung der Druck-induzierten Inhibition des Kurzschlussstroms (I_{sc}) durch Clotrimazol.....	69
Abb. III-21: Inhibition des Druckeffekts durch Clotrimazol unter <i>current clamp</i> Bedingungen.....	70
Abb. III-22: Einfluss von Blockern Ca^{2+} aktivierter K^+ -Kanäle.....	71
Abb. III-23: Einfluss von Chlorzoxazon auf den Druckeffekt.....	72
Abb. III-24: Druckeffekt während Glibenclamid-Applikation.....	73
Abb. III-25: Auswirkung Ca^{2+} -freier Bedingungen auf den Druckeffekt.....	75
Abb. III-26: Auswirkung einer Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} Konzentration.....	76
Abb. III-27: Der Druckeffekt wurde durch Thapsigargin abgeschwächt.....	77
Abb. III-28: Einfluss des Ca^{2+} -permeablen Porenbildners Ionomycin auf den Druckeffekt.....	78
Abb. III-29: Druckeffekt nach Chelatisierung intrazellulären Calciums.....	79
Abb. III-30: Gadolinium, ein Blocker mechanosensitiver Ionenkanäle, hemmt den Druckeffekt.....	80

Abb. III-31: Wirkung von La^{3+} auf die Druck-induzierte Inhibition des Kurzschlussstroms (I_{SC}).....	81
Abb. III-32: Weder eine Inhibition des TRPV4 durch Ruthenium Rot noch eine Aktivierung des Kanals durch 4α -PDD bewirkte eine Veränderung der Druck-induzierten Strominhibition (n = 4 für Ruthenium Rot, n = 7 für 4α -PDD).	81
Abb. III-33: Einfluss der Lösungsosmolarität auf die Druck-induzierte Strominhibition.....	83
Abb. III-34: Nachweis der mRNA des (A) epithelialen Na^+ -Kanals (ENaC) bzw. des (B) <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulators</i> (CFTR) in Homogenaten der <i>Xenopus</i> Lunge.....	85
Abb. III-35: Immunfluoreszenzfärbung der <i>Xenopus</i> Lunge mit α -CFTR Antikörpern.....	85
Abb. III-36: Nachweis der mRNA der Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle IK und BK in Homogenaten der <i>Xenopus</i> Lunge.....	86
Abb. III-37: Nachweis der mRNA der 2-Poren- K^+ -Kanäle TASK2 und TWIK2 in Homogenaten der <i>Xenopus</i> Lunge.....	87
Abb. III-38: Nachweis der mRNA mechanosensitiver Ionenkanäle der <i>transient receptor potential</i> (TRP) Familie in Homogenaten der <i>Xenopus</i> Lunge.....	88
Abb. III-39: Immunfluoreszenzfärbung mit α -TRPC1 Antikörpern an <i>Xenopus laevis</i> Oocyten.....	89
Abb. III-40: Immunfluoreszenzfärbung der <i>Xenopus</i> Lunge mit α -TRPC1 Antikörpern.....	89
Abb. III-41: Nachweis der mRNA-Expression des mechanosensitiven Ionenkanals TRPC1 in Zellen der humanen pulmonalen Zelllinien H441 und A549.....	90
Abb. III-42: Aktivierung des heterolog exprimierten humanen epithelialen Na^+ -Kanals durch Scherkräfte.....	92
Abb. III-43: Zn^{2+} (10 μM) vermindert die Scherstress-induzierte Stromstimulation an rENaC-exprimierenden Oocyten.....	93
Abb. III-44: Einfluss von laminaem Scherstress (LSS) auf den humanen epithelialen Na^+ -Kanal in <i>outside-out Patch Clamp</i> Messungen.....	94
Abb. IV-1: Auswirkung des transepithelialen Ionen transports auf den Kurzschlussstrom (I_{SC}).....	103
Abb. IV-2: Auswirkung einer kombinierten Na^+ -Resorption sowie einer K^+ - und Chlorid-Sekretion.....	130

Abb. IX-1: <i>Alignment</i> der Nukleotidsequenz der α -Untereinheit des epithelialen Na^+ -Kanals (ENaC) ($h\alpha\text{ENaC_RefSeq}$, GenBank-Zugangsnummer NM_001038) mit dem Klonierungsprodukt ($h\alpha\text{ENaC_Klon}$).....	172
Abb. IX-2: <i>Alignment</i> der Nukleotidsequenz der β -Untereinheit des epithelialen Na^+ -Kanals ($h\beta\text{ENaC_RefSeq}$, GenBank Zugangsnummer NM_000336) mit dem Klonierungsprodukt ($h\beta\text{ENaC_Klon}$).....	174
Abb. IX-3: <i>Alignment</i> der Nukleotidsequenz der γ -Untereinheit des epithelialen Na^+ -Kanals ($h\gamma\text{ENaC_RefSeq}$, GenBank Zugangsnummer NM_001039) mit dem Klonierungsprodukt ($h\gamma\text{ENaC_Klon}$).....	176
Abb. IX-4: <i>Alignment</i> der Proteinsequenzen von KCNN4.....	177

VIII Tabellenverzeichnis

Tab. II-1: Primärantikörper zur immunhistologischen Detektion der Ionenkanäle TRPC1 und CFTR in der <i>Xenopus</i> Lunge.	24
Tab. II-2: Sekundärantikörper zur immunhistologischen Detektion verschiedener Ionenkanäle in der <i>Xenopus</i> Lunge.	24
Tab. II-3: Medien und Puffer	38
Tab. II-4: Lösungen zur Isolation von <i>Xenopus</i> Oocyten (Konzentrationen in mM).	39
Tab. II-5: Lösungen für Zwei-Elektroden- <i>Voltage-Clamp</i> und <i>Patch Clamp</i> Untersuchungen an <i>Xenopus</i> Oocyten (Konzentrationen in mM).	39
Tab. II-6: Lösungen für Ussing-Kammer-Experimente an <i>Xenopus</i> Lungen I (Konzentrationen in mM).	40
Tab. II-7: Lösungen für Ussing-Kammer-Experimente an <i>Xenopus</i> Lungen II (Konzentrationen in mM).	40
Tab. II-8: Lösungen für Ussing-Kammer-Experimente an <i>Xenopus</i> Lungen III (Konzentrationen in mM).	41
Tab. II-9: Verwendete Stammlösungen.	42
Tab. III-1: Elektrophysiologische Parameter der untersuchten Lungen von <i>Xenopus laevis</i>	43
Tab. III-2: Druck-induzierte Änderung des Kurzschlussstroms (I_{sc}).	45
Tab. III-3: Änderung der transepithelialen Potenzialdifferenz durch Druckeinwirkung.	51
Tab. III-4: Änderung der transepithelialen Kapazität (C_t) durch Druckeinwirkung.	52
Tab. III-5: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses diverser K^+ -Kanalmotoren auf den Druckeffekt.	74
Tab. III-6: Wirkung $[Ca^{2+}]_i$ -modulierender Substanzen.	79
Tab. III-7: Klonierung des humanen epithelialen Na^+ -Kanals (ENaC).	91
Tab. IX-1: <i>Primer</i> zum Nachweis Ionenkanal-kodierender mRNA in <i>Xenopus</i> Lungen.	162
Tab. IX-2: <i>Primer</i> zur Detektion von mRNA für die humanen Ionenkanäle TRPC1 und TRPV4.	163

Tab. IX-3: <i>Primer</i> zur Klonierung der α , β und γ Untereinheit des humanen epithelialen Na^+ -Kanals (hENaC).	163
Tab. IX-4: <i>Primer</i> zur Sequenzierung der drei Untereinheiten des humanen epithelialen Na^+ -Kanals (hENaC).	164
Tab. IX-5: Verwendete Geräte	165
Tab. IX-6: Verwendete Chemikalien	166
Tab. IX-7: Einheiten und Dimensionen.....	168
Tab. IX-8: Abkürzungen	168
Tab. IX-9: Molekularbiologische Kits	170

IX Anhang

Tab. IX-1: *Primer zum Nachweis Ionenkanal-kodierender mRNA in Xenopus Lungen.*

Zielgen	Symbol nach HGNC	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
αENaC	SCNN1a	xENaC_For	AGCAGGTCTGTGTCCGTTCT
		xENaC_Rev	ATTGTCGGGACAGTGTGTGA
CFTR	CFTR	xCFTR_For	ATCAGTTTCCAGGACAATTG
		xCFTR_Rev	ACCAGAAAGCGCTGGCATTG
SK1	KCNN1	xSK1_For	ATCAAAGCGGGTGAAAAATG
		xSK1_Rev	AGCTGTTTGAAGGGGGAAAT
SK2	KCNN2	xSK2_For	TGCACAAGCTTTTTCTGCTG
		xSK2_Rev	TGCAGCTGAACTTCAACCAA
IK	KCNN4	xIK_For	CCTCCTGGGTTCTCTCTGTG
		xIK_Rev	TCTGAGCAGGTTCTCTGGT
BK	KCNMA1	xBK_For	AACAGAGACCGCTGTGCGAGT
		xBK_Rev	TGCATCAGGCAAAGATGAG
TRPC1	TRPC1	xTRPC1_For	TGATTGTGCTCACCAAGCTC
		xTRPC1_Rev	CACAAGGCAGCACATCACCT
TRPV4	TRPV4	xTRPV4_For	TTGCGGGAGAGATCGTACT
		xTRPV4_Rev	AAGGACACCAAAGCTGATGC
TREK1	KCNK2	xTREK1_For	CCACTCATGTGTCAACGTCA
		xTREK1_Rev	GGGTCTGCAACCATTCTTT
TREK2	KCNK10	xTREK2_For	AAGGCTGGACAGAACTGGAA
		xTREK2_Rev	GCCTCCAATTCAGCAAAAAC
TRAAK	KCNK4	xTRAAK_For	GGAATCGGGAAAGTGGAAT
		xTRAAK_Rev	CCATCTCAGCCCTTGTCTTC
TASK2	KCNK5	xTASK2_For	TTGGTGATCCCACCTTTCAT
		xTASK2_Rev	TGTGCATCGCCATTCAGTAT
TWIK2	KCNK6	xTWIK2_For	CACGCTACTTGTGTGTGCCTAT
		xTWIK2_Rev	GAGCTTCCGGAGCCACTG

HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee Eyre *et al.* 2006.

Tab. IX-2: *Primer* zur Detektion von mRNA für die humanen Ionenkanäle TRPC1 und TRPV4.

Zielgen	GenBank-Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
TRPC1	NM_003304.4	hTRPC1_For	ACCTTCCATTCGTTTCATTGG
		hTRPC1_Rev	AACTGTTTTGCCGTTTGACC
TRPV4	NM_021625.3	hTRPV4_For	ATCCTCACCTTTGTGCTGCT
		hTRPV4_Rev	GCGTCATCAGTCCCTCCACTT

GenBank-Nummer: Zugangsnummer der NCBI GenBank Benson *et al.* 2007. TRP: *transient receptor potential*.

Tab. IX-3: *Primer* zur Klonierung der α , β und γ Untereinheit des humanen epithelialen Na⁺-Kanals (hENaC).

Zielgen	Symbol nach HGNC	GenBank-Nummer	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
α ENAC	SCNN1a	NM_001038.4	h α ENAC_For	CATGGAGGGGAACAAGCT
			h α ENAC_Rev	CCTTGGTGTGAGAAACCTCTCC
β ENAC	SCNN1b	NM_000336.1	h β ENAC_For	CCACTATGCACGTGAAGAAGTACC
			h β ENAC_Rev	CAGGGTTAGATGGCATCACCCCTCAC
γ ENAC	SCNN1g	NM_001039.2	h γ ENAC_For	CCTCAAAGTCCCATCCTCGCC
			h γ ENAC_Rev	CCCTGCCTCAGAGCTCATCC

HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee Eyre *et al.* 2006. GenBank-Nummer: Zugangsnummer der NCBI GenBank Benson *et al.* 2007.

Tab. IX-4: *Primer zur Sequenzierung der drei Untereinheiten des humanen epithelialen Na⁺-Kanals (hENaC).*

hENaC Untereinheit	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
α	fwd1	SP6-Primer
	fwd2	GCACCCTCAATCCCTACAG
	fwd3	GGACACGCTGGGCAACTTC
	fwd4	GGCAGTGATGTTTCCTGTTG
	fwd5	GTCTCCCTCTGTCACGATG
β	fwd1	TCACGCGTGGTACCTCTAG
	fwd2	CTGAAGGACCTGGATGAGCTG
	fwd3	GCTGAGCCCTGCAACTAC
	fwd4	AGGCCTGTCTTCGCTCCTG
	fwd5	CTGCTCTCGAATCTGGGTG
γ	fwd1	SP6-Primer
	fwd2	AGCTGACTTGGAACAGGAG
	fwd3	AGCTATTCTGCTGAGGAG
	fwd4	ATCTACAACGCTGCCTACTC
	fwd5	GGAGAGCCCAGCCAACAG

Tab. IX-5: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
-80°C Kühltruhe	Profi Line Taurus	National Lab
AD/DA Wandler <i>Patch Clamp</i>	DigiData 1200	Axon Instruments
AD/DA Wandler Ussing-Kammer	MacLab/2e	MacLab
AD/DA-Wandler TEVC	CED 1402	Science Park Cambridge
Binokular	GZ6	Leica
Elektronischer Filter	902	Frequency Devices
Kühlzentrifuge	J-21B	Beckman
Luminometer	1250	LKB Wallac
Mikroinjektionspumpe	Nanoject	Drummond Scientific
Mikromanipulator <i>Patch Clamp</i>	WR-88	Narishigi
Mikromanipulator TEVC	-	Bachofer
Mikroschmiede	L/M-CPZ 101	List Medical
Mikroskop <i>Patch Clamp</i>	Axiovert 35	Zeiss
Multimeter	M-3650B	Voltcraft
Perfusion <i>Patch Clamp</i>	BPS-4 + ALA-VM4	Scientific Instruments
Pipetten-Puller Mikroinjektion	PA-81	Bachofer
Pipetten-Puller <i>Patch Clamp</i>	PP-83	Narishige
Pipetten-Puller TEVC	P-2000	Sutter Instruments
Schüttler	IKA-Vibrax-VXR	Janke und Kunkel
Thermocycler	GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer
Tischzentrifuge	Biofuge13	Heraeus
Ussing-Kammer-Messverstärker	Eigenbau des Instituts für Tierphysiologie	
Verstärker PC	L/M-PC	List Medical
Verstärker TEVC	Oocyte Clamp OC-725B	Warner Instruments
Zweikanalschreiber	-	Kipp&Zonen

Tab. IX-6: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
100 bp DNA Leiter	Promega
1 kb DNA Leiter	Fermentas
4 α -Phorbol 12,13-didecanoate	Sigma
Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
Antibiotika/Antimykotika-Mix	Sigma
Apamin	MoBiTec/AnaSpec
ATP (2Na ⁺ -Salz)	Sigma
Ba(NO ₃) ₂	Sigma
BamHI	Promega
BAPTA/AM	Fluka
Bubivacain	Sigma
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	Merck
CaCl ₂ x2H ₂ O	Fluka
Ca-Gluconat x H ₂ O	Fluka
Charybdotoxin	MoBiTec/AnaSpec
Chlorzoxazone	Sigma
Clofilium Tosylate	Alexis
Clotrimazole	Sigma
Dexamethason	Sigma
DIDS	Sigma
DMEM/F-12 + GlutaMax	Gibco
Econazolnitrat	Sigma
EcoRI	Promega
EDTA	Serva
EGTA	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Fetales Kälberserum	Promocell
GdCl ₃ x 6 H ₂ O	Sigma
Glibenclamid	Sigma
Glucose	Sigma
HEPES	Sigma
HindIII	Promega
Ionomycin	Sigma
IPTG	Sigma
Isopentan	Roth
Kaliumchlorid	Fluka

Chemikalie	Bezugsquelle
Kaliumgluconat	Fluka
Kollagenase NB4	Serva
LaCl ₃ x H ₂ O	Sigma
Mannitol	Sigma
Mg(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	Sigma
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck
MgCl ₂	Sigma
NaCl	Fluka
Natriumgluconat	Fluka
Natriumacetat	Sigma
Natriumpyruvat	Sigma
NFA	Sigma
NMDG	Fluka
NotI	Promega
NPPB	RBI (Research Biochemicals International)
Oligo (dT) ₁₅ <i>Primer</i>	Qiagen
Ouabain x 8 H ₂ O	Sigma
Quinin	Sigma
RPMI + L-Glutamin	Promocell
Ruthenium Rot	Fluka
SacI	Promega
Salzsäure	Fluka
Tamoxifen	Sigma
Thapsigargin	Axxora
Tissue Tek	Sakura
TRAM-34	Sigma
Tris	Sigma
Trypsin	Sigma
X-Gal	Sigma
ZnCl ₂	Riedel-de-Haen

Tab. IX-7: Einheiten und Dimensionen

Abkürzung	Einheit/Dimension
l	Liter
°C	Grad Celsius
min	minute
g	Gramm
m	milli
m	Meter
μ	Micro
V	Volt
C	centi
k	Kilo
h	Stunde
s	Sekunde
Hz	Hertz
F	Farad

Tab. IX-8: Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AD/DA	Analog-Digital/Digital-Analog
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
Cl	Chlor
cRNA	RNA, welche durch <i>in vitro</i> Transkription von cDNA erhalten wurde
C _T	Kapazität
DNA	Deoxyribonucleinsäure
F	Farad
g	Erdbeschleunigung
Gl.	Gleichung
h	Stunde
hENaC	Humaner epithelialer Natrium-Kanal
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HUGO	Human Genome Organisation
Hz	Hertz
I _{sc}	Transepithelialer Kurzschlussstrom

Abkürzung	Bedeutung
kb	Kilobasen
l	Liter
m	Meter
M	Mol pro Liter, molar
min	Minute
n	Durchgeführte Einzelversuche
N	Anzahl der Oocytondonoren
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRS	Normal-Ringerlösung
ORi	Oocyten-Ringerlösung
Pa	Pascal
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
R	Widerstand
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
u.a.	unter anderem
u.a.m.	und anderes mehr
U_c	Kommandopotenzial
U_M	Membranpotenzial
usw.	und so weiter
V	Volt
V_t	Transepitheliale Potenzialdifferenz
w/V	Gewichtsprozent
w/V	Gewichtsprozent
Ω	Ohm
τ	Zeitkonstante

Tab. IX-9: Molekularbiologische Kits

Verwendungszweck	Bezeichnung	Hersteller
RNA-Extraktion	RNeasy Midi	Qiagen
Reverse Transkription	Omniscript	Qiagen
PCR	GoTAQ	Promega
Reverse Transkription	M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus Point Mutant Kits	Promega
PCR	Platinum Pfx DNA Polymerase Kit	Invitrogen
Gel-Extraktion	MinElute kit	Qiagen
A-Addition	A-Addition kit	Qiagen
TA-Klonierung	pGEMT-Easy Vector Kit	Promega
Plasmidpräparation	Miniprep Kit	Qiagen
<i>In vitro</i> Transkription	RiboMax	Promega

hαENaC_RefSeq	1	ATGGAGGGGAACAAGCTGGAGGAGCAGGACTCTAGCCCTCCACAGTCCACTCCAGGGCTC
hαENaC_Klon	1	ATGGAGGGGAACAAGCTGGAGGAGCAGGACTCTAGCCCTCCACAGTCCACTCCAGGGCTC
hαENaC_RefSeq	61	ATGAAGGGGAACAAGCGTGGAGGAGCAGGGGCTGGGCCCCGAACCTGCGGCGCCCCAGCAG
hαENaC_Klon	61	ATGAAGGGGAACAAGCGTGGAGGAGCAGGGGCTGGGCCCCGAACCTGCGGCGCCCCAGCAG
hαENaC_RefSeq	121	CCCACGGCGGAGGAGGAGGCCCTGATCGAGTTCCACCGCTCCTACCGAGAGCTCTTCGAG
hαENaC_Klon	121	CCCACGGCGGAGGAGGAGGCCCTGATCGAGTTCCACCGCTCCTACCGAGAGCTCTTCGAG
hαENaC_RefSeq	181	TTCTTCTGCAACAACACCACCATCCACGGCGCCATCCGCTGGTGTGCTCCAGCACAAC
hαENaC_Klon	181	TTCTTCTGCAACAACACCACCATCCACGGCGCCATCCGCTGGTGTGCTCCAGCACAAC
hαENaC_RefSeq	241	CGCATGAAGACGGCCTTCTGGGCAGTGTGTGGCTCTGCACCTTTGGCATGATGTACTGG
hαENaC_Klon	241	CGCATGAAGACGGCCTTCTGGGCAGTGTGTGGCTCTGCACCTTTGGCATGATGTACTGG
hαENaC_RefSeq	301	CAATTCGGCCTGCTTTTCGGAGAGTACTTCAGCTACCCCGTCAGCCTCAACATCAACCTC
hαENaC_Klon	301	CAATTCGGCCTGCTTTTCGGAGAGTACTTCAGCTACCCCGTCAGCCTCAACATCAACCTC
hαENaC_RefSeq	361	AACTCGGACAAGCTCGTCTTCCCGCAGTGACCATCTGCACCCTCAATCCCTACAGGTAC
hαENaC_Klon	361	AACTCGGACAAGCTCGTCTTCCCGCAGTGACCATCTGCACCCTCAATCCCTACAGGTAC
hαENaC_RefSeq	421	CCGGAAATTAAGAGGAGCTGGAGGAGCTGGACCGCATCACAGAGCAGACGCTCTTTGAC
hαENaC_Klon	421	CCGGAAATTAAGAGGAGCTGGAGGAGCTGGACCGCATCACAGAGCAGACGCTCTTTGAC
hαENaC_RefSeq	481	CTGTACAAATACAGCTCCTTCACCACTCTCGTGGCCGGTCCCGCAGCCGTGCGGACCTG
hαENaC_Klon	481	CTGTACAAATACAGCTCCTTCACCACTCTCGTGGCCGGTCCCGCAGCCGTGCGGACCTG
hαENaC_RefSeq	541	CGGGGGACTCTGCCGCACCCCTTGCCAGCGCTGAGGGTCCCGCCCCGCTCACGGGGCC
hαENaC_Klon	541	CGGGGGACTCTGCCGCACCCCTTGCCAGCGCTGAGGGTCCCGCCCCGCTCACGGGGCC
hαENaC_RefSeq	601	CGTCGAGCCCGTAGCGTGGCCTCCAGCTTGCGGGACAACAACCCCCAGGTGGACTGGAAG
hαENaC_Klon	601	CGTCGAGCCCGTAGCGTGGCCTCCAGCTTGCGGGACAACAACCCCCAGGTGGACTGGAAG
hαENaC_RefSeq	661	GACTGGAAGATCGGCTTCCAGCTGTGCAACCAGAACAATCGGACTGCTTCTACCAGACA
hαENaC_Klon	661	GACTGGAAGATCGGCTTCCAGCTGTGCAACCAGAACAATCGGACTGCTTCTACCAGACA
hαENaC_RefSeq	721	TACTCATCAGGGGTGGATGCGGTGAGGGAGTGGTACCGCTTCCACTACATCAACATCCTG
hαENaC_Klon	721	TACTCATCAGGGGTGGATGCGGTGAGGGAGTGGTACCGCTTCCACTACATCAACATCCTG
hαENaC_RefSeq	781	TCGAGGCTGCCAGAGACTCTGCCATCCCTGGAGGAGGACAGCTGGGCAACTTCATCTTC
hαENaC_Klon	781	TCGAGGCTGCCAGAGACTCTGCCATCCCTGGAGGAGGACAGCTGGGCAACTTCATCTTC
hαENaC_RefSeq	841	GCCTGCCGCTTCAACCAGGTCTCCTGCAACCAGGCGAATTACTTCACTTCCACCACCCG
hαENaC_Klon	841	GCCTGCCGCTTCAACCAGGTCTCCTGCAACCAGGCGAATTACTTCACTTCCACCACCCG
hαENaC_RefSeq	901	ATGTATGAAACTGCTATACTTTCAATGACAAGAACAACCTCCAACCTCTGGATGTCTTCC
hαENaC_Klon	901	ATGTATGAAACTGCTATACTTTCAATGACAAGAACAACCTCCAACCTCTGGATGTCTTCC
hαENaC_RefSeq	961	ATGCCTGGAATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCCAGAGCAGAATGACTTCATT
hαENaC_Klon	961	ATGCCTGGAATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCCAGAGCAGAATGACTTCATT
hαENaC_RefSeq	1021	CCCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCCCGGGTAATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCC
hαENaC_Klon	1021	CCCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCCCGGGTAATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCC
hαENaC_RefSeq	1081	TTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGGCCTGGCGTGGAGACCTCCATCAGCATGAGG
hαENaC_Klon	1081	TTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGGCCTGGCGTGGAGACCTCCATCAGCATGAGG
hαENaC_RefSeq	1141	AAGGAAACCCTGGACAGACTTGGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGAT
hαENaC_Klon	1141	AAGGAAACCCTGGACAGACTTGGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGAT
hαENaC_RefSeq	1201	GTTCTGTGAGAACCTTTACCCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGTATTCACTCCTGC
hαENaC_Klon	1201	GTTCTGTGAGAACCTTTACCCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGTATTCACTCCTGC

h α ENaC_RefSeq	1261	TTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGTGCCTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAG
h α ENaC_Klon	1261	TTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGTGCCTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAG
h α ENaC_RefSeq	1321	AACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCTGGGGTACTGCTACTATAAGCTC
h α ENaC_Klon	1321	AACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCTGGGGTACTGCTACTATAAGCTC
h α ENaC_RefSeq	1381	CAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTCACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGC
h α ENaC_Klon	1381	CAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTCACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGC
h α ENaC_RefSeq	1441	GTGACCAGCTACCAGCTCTCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCCAGGAA
h α ENaC_Klon	1441	GTGACCAGCTACCAGCTCTCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCCAGGAA
h α ENaC_RefSeq	1501	TGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAAACAATTACACCGTCAACAACAAGAGAAATGGA
h α ENaC_Klon	1501	TGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAAACAATTACACCGTCAACAACAAGAGAAATGGA
h α ENaC_RefSeq	1561	GTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATCTGAGTCTCCC
h α ENaC_Klon	1561	GTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATCTGAGTCTCCC
h α ENaC_RefSeq	1621	TCTGTACGATGGTCACCCTCCTGTCCAACCTGGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCCGGC
h α ENaC_Klon	1621	TCTGTACGATGGTCACCCTCCTGTCCAACCTGGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCCGGC
h α ENaC_RefSeq	1681	TCCTCGGTGTTGTCTGTGGTGGAGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTCATCATG
h α ENaC_Klon	1681	TCCTCGGTGTTGTCTGTGGTGGAGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTCATCATG
h α ENaC_RefSeq	1741	TTCTCATGCTGCTCCGAAGGTTCCGAAGCCGATACTGGTCTCCAGGCCGAGGGGGCAGG
h α ENaC_Klon	1741	TTCTCATGCTGCTCCGAAGGTTCCGAAGCCGATACTGGTCTCCAGGCCGAGGGGGCAGG
h α ENaC_RefSeq	1801	GGTGCTCAGGAGGTAGCCTCCACCCTGGCATCCTCCCCTCTTCCCCTTCTGCCCCAC
h α ENaC_Klon	1801	GGTGCTCAGGAGGTAGCCTCCACCCTGGCATCCTCCCCTCTTCCCCTTCTGCCCCAC
h α ENaC_RefSeq	1861	CCCATGTCTCTGTCTTGTCCCAGCCAGGCCCTGCTCCCTCTCCAGCCTTGACAGCCCCT
h α ENaC_Klon	1861	CCCATGTCTCTGTCTTGTCCCAGCCAGGCCCTGCTCCCTCTCCAGCCTTGACAGCCCCT
h α ENaC_RefSeq	1921	CCCCCTGCCTATGCCACCCTGGGCCCCCGCCCATCTCCAGGGGGCTCTGCAGGGGCCAGT
h α ENaC_Klon	1921	CCCCCTGCCTATGCCACCCTGGGCCCCCGCCCATCTCCAGGGGGCTCTGCAGGGGCCAGT
h α ENaC_RefSeq	1981	TCCTCCACCTGTCTCTGGGGGGGCCCTGA
h α ENaC_Klon	1981	TCCTCCGCCTGTCTCTGGGGGGGCCCTGA

Abb. IX-1: *Alignment* der Nukleotidsequenz der α -Untereinheit des epithelialen Na⁺-Kanals (ENaC) (h α ENaC_RefSeq, GenBank-Zugangsnummer NM_001038) mit dem Klonierungsprodukt (h α ENaC_Klon).

Identische Nukleotide sind schwarz hinterlegt. Die Nukleotid-Austausche an Position 1000 und 1987 bedingen im translatierten Protein die Aminosäure-Austausche A334T sowie T663A. Bei beiden Mutationen handelt es sich um bereits beschriebene *single nucleotide polymorphisms* (SNPs, GenBank-Zugangsnummern: rs11542844 und rs2228576)

hβENaC_RefSeq	1	ATGCACGTGAAGAAGTACCTGCTGAAGGGCTGCATCGGCTGCAGAAGGGCCCCGGCTAC
hβENaC_Klon	1	ATGCACGTGAAGAAGTACCTGCTGAAGGGCTGCATCGGCTGCAGAAGGGCCCCGGCTAC
hβENaC_RefSeq	61	ACGTACAAGGAGCTGCTGGTGTGGTACTGCGACAACACCAACACCCACGGCCCCAAGCGC
hβENaC_Klon	61	ACGTACAAGGAGCTGCTGGTGTGGTACTGCGACAACACCAACACCCACGGCCCCAAGCGC
hβENaC_RefSeq	121	ATCATCTGTGAGGGGCCAAGAAGAAAGCCATGTGGTTCTGCTCACCTGCTCTTCGCC
hβENaC_Klon	121	ATCATCTGTGAGGGGCCAAGAAGAAAGCCATGTGGTTCTGCTCACCTGCTCTTCGCC
hβENaC_RefSeq	181	GCCCTCGTCTGCTGGCAGTGGGGCATCTTCATCAGGACCTACTTGAGCTGGGAGGTCAGC
hβENaC_Klon	181	GCCCTCGTCTGCTGGCAGTGGGGCATCTTCATCAGGACCTACTTGAGCTGGGAGGTCAGC
hβENaC_RefSeq	241	GTCTCCCTCTCCGTAGGCTTCAAGACCATGGACTTCCCTGCGCTCACCATCTGCAATGCT
hβENaC_Klon	241	GTCTCCCTCTCCGTAGGCTTCAAGACCATGGACTTCCCTGCGCTCACCATCTGCAATGCT
hβENaC_RefSeq	301	AGCCCTTCAAGTATTCCAAAATCAAGCATTGCTGAAGGACCTGGATGAGCTGATGGAA
hβENaC_Klon	301	AGCCCTTCAAGTATTCCAAAATCAAGCATTGCTGAAGGACCTGGATGAGCTGATGGAA
hβENaC_RefSeq	361	GCTGTCTGGAGAGAATCCTGGCTCCTGAGCTAAGCCATGCCAATGCCACCAGGAACCTG
hβENaC_Klon	361	GCTGTCTGGAGAGAATCCTGGCTCCTGAGCTAAGCCATGCCAATGCCACCAGGAACCTG
hβENaC_RefSeq	421	AACTTCTCCATCTGGAACCACACACCCTGGTCCTTATTGATGAACGGAACCCCCACCAC
hβENaC_Klon	421	AACTTCTCCATCTGGAACCACACACCCTGGTCCTTATTGATGAACGGAACCCCCACCAC
hβENaC_RefSeq	481	CCCATGGTCCTTGATCTCTTTGGAGACAACCACAATGGCTTAACAAGCAGCTCAGCATCA
hβENaC_Klon	481	CCCATGGTCCTTGATCTCTTTGGAGACAACCACAATGGCTTAACAAGCAGCTCAGCATCA
hβENaC_RefSeq	541	GAAAAGATCTGTAATGCCACGGGTGCAAAAATGGCCATGAGACTATGTAGCCTCAACAGG
hβENaC_Klon	541	GAAAAGATCTGTAATGCCACGGGTGCAAAAATGGCCATGAGACTATGTAGCCTCAACAGG
hβENaC_RefSeq	601	ACCCAGTGACCTTCCGGAACCTCACCAGTGCTACCCAGGCATTGACAGAGTGGTACATC
hβENaC_Klon	601	ACCCAGTGACCTTCCGGAACCTCACCAGTGCTACCCAGGCATTGACAGAGTGGTACATC
hβENaC_RefSeq	661	CTGCAGGCCACCAACATCTTTGCACAGGTGCCACAGCAGGAGCTAGTAGAGATGAGCTAC
hβENaC_Klon	661	CTGCAGGCCACCAACATCTTTGCACAGGTGCCACAGCAGGAGCTAGTAGAGATGAGCTAC
hβENaC_RefSeq	721	CCCGGCGAGCAGATGATCCTGGCCTGCCTATTCGGAGCTGAGCCCTGCAACTACCGGAAC
hβENaC_Klon	721	CCCGGCGAGCAGATGATCCTGGCCTGCCTATTCGGAGCTGAGCCCTGCAACTACCGGAAC
hβENaC_RefSeq	781	TTCACGTCCATCTTCTACCTCACTATGGCAACTGTTACATCTTCAACTGGGGCATGACA
hβENaC_Klon	781	TTCACGTCCATCTTCTACCTCACTATGGCAACTGTTACATCTTCAACTGGGGCATGACA
hβENaC_RefSeq	841	GAGAAGGCACTTCCTTCGGCCAACCCTGGAAGTGAATTCGGCCTGAAGTTGATCCTGGAC
hβENaC_Klon	841	GAGAAGGCACTTCCTTCGGCCAACCCTGGAAGTGAATTCGGCCTGAAGTTGATCCTGGAC
hβENaC_RefSeq	901	ATAGGCCAGGAAGACTACGTCCCCTTCCTTTCGCTCCACGGCCGGGGTCAGGCTGATGCTT
hβENaC_Klon	901	ATAGGCCAGGAAGACTACGTCCCCTTCCTTTCGCTCCACGGCCGGGGTCAGGCTGATGCTT
hβENaC_RefSeq	961	CACGAGCAGAGGTCATACCCCTTCATCAGAGATGAGGGCATCTACGCCATGTCCGGGGACA
hβENaC_Klon	961	CACGAGCAGAGGTCATACCCCTTCATCAGAGATGAGGGCATCTACGCCATGTCCGGGGACA
hβENaC_RefSeq	1021	GAGACGTCCATCGGGGTACTCGTGGACAAGCTTCAGCGCATGGGGGAGCCCTACAGCCCG
hβENaC_Klon	1021	GAGACGTCCATCGGGGTACTCGTGGACAAGCTTCAGCGCATGGGGGAGCCCTACAGCCCG
hβENaC_RefSeq	1081	TGCACCGTGAATGGTTCTGAGGTCCCCGTCCAAAACCTTACAGTGACTACAACACGACC
hβENaC_Klon	1081	TGCACCGTGAATGGTTCTGAGGTCCCCGTCCAAAACCTTACAGTGACTACAACACGACC
hβENaC_RefSeq	1141	TACTCCATCCAGGCCTGTCTTCGCTCCTGCTTCCAAGACCACATGATCCGTAAGTCAAC
hβENaC_Klon	1141	TACTCCATCCAGGCCTGTCTTCGCTCCTGCTTCCAAGACCACATGATCCGTAAGTCAAC
hβENaC_RefSeq	1201	TGTGGCCACTACCTGTACCCACTGCCCCGTGGGGAGAAATACTGCAACAACCGGGACTTC
hβENaC_Klon	1201	TGTGGCCACTACCTGTACCCACTGCCCCGTGGGGAGAAATACTGCAACAACCGGGACTTC

hβENaC_RefSeq	1261	CCAGACTGGGCCCATTTGCTACTCAGATCTACAGATGAGCGTGGCGCAGAGAGACCTGC
hβENaC_Klon	1261	CCAGACTGGGCCCATTTGCTACTCAGATCTACAGATGAGCGTGGCGCAGAGAGACCTGC
hβENaC_RefSeq	1321	ATTGGCATGTGCAAGGAGTCTGCAATGACACCCAGTACAAGATGACCATCTCCATGGCT
hβENaC_Klon	1321	ATTGGCATGTGCAAGGAGTCTGCAATGACACCCAGTACAAGATGACCATCTCCATGGCT
hβENaC_RefSeq	1381	GACTGGCCTTCTGAGGCCTCCGAGGACTGGATTTTCCACGTCTTGTCTCAGGAGCGGGAC
hβENaC_Klon	1381	GACTGGCCTTCTGAGGCCTCCGAGGACTGGATTTTCCACGTCTTGTCTCAGGAGCGGGAC
hβENaC_RefSeq	1441	CAAAGCACCAATATCACCTGAGCAGGAAGGAATTGTCAAGCTCAACATCTACTTCCAA
hβENaC_Klon	1441	CAAAGCACCAATATCACCTGAGCAGGAAGGAATTGTCAAGCTCAACATCTACTTCCAA
hβENaC_RefSeq	1501	GAATTTAACTATCGCACCATTTGAAGAATCAGCAGCCAATAACATCGTCTGGCTGCTCTCG
hβENaC_Klon	1501	GAATTTAACTATCGCACCATTTGAAGAATCAGCAGCCAATAACATCGTCTGGCTGCTCTCG
hβENaC_RefSeq	1561	AATCTGGGTGGCCAGTTTGGCTTCTGGATGGGGGGCTCTGTGCTGTGCCTCATCGAGTTT
hβENaC_Klon	1561	AATCTGGGTGGCCAGTTTGGCTTCTGGATGGGGGGCTCTGTGCTGTGCCTCATCGAGTTT
hβENaC_RefSeq	1621	GGGGAGATCATCATCGACTTTGTGTGGATCACCATCATCAAGCTGGTGGCCTTGGCCAAG
hβENaC_Klon	1621	GGGGAGATCATCATCGACTTTGTGTGGATCACCATCATCAAGCTGGTGGCCTTGGCCAAG
hβENaC_RefSeq	1681	AGCCTACGGCAGCGGCAGGCCAAGCCAGCTACGCTGGCCACCGCCACCGTGGCCGAG
hβENaC_Klon	1681	AGCCTACGGCAGCGGCAGGCCAAGCCAGCTACGCTGGCCACCGCCACCGTGGCCGAG
hβENaC_RefSeq	1741	CTGGTGGAGGCCACACCAACTTTGGCTTCCAGCCTGACACGGCCCCCGCAGCCCCAAC
hβENaC_Klon	1741	CTGGTGGAGGCCACACCAACTTTGGCTTCCAGCCTGACACGGCCCCCGCAGCCCCAAC
hβENaC_RefSeq	1801	ACTGGGCCCTACCCCAGT GAGCAGGCCCTGCCATCCCAGGCACCCCGCCCCCAACTAT
hβENaC_Klon	1801	ACTGGGCCCTACCCCAGT GAGCAGGCCCTGCCATCCCAGGCACCCCGCCCCCAACTAT
hβENaC_RefSeq	1861	GACTCCCTGCGTCTGCAGCCGCTGGACGTCATCGAGTCTGACAGTGAGGTTGATGCCATC
hβENaC_Klon	1861	GACTCCCTGCGTCTGCAGCCGCTGGACGTCATCGAGTCTGACAGTGAGGTTGATGCCATC
hβENaC_RefSeq	1921	TAA
hβENaC_Klon	1921	TAA

Abb. IX-2: Alignment der Nukleotidsequenz der β -Untereinheit des epithelialen Na^+ -Kanals (hβENaC_RefSeq, GenBank Zugangsnummer NM_000336) mit dem Klonierungsprodukt (hβENaC_Klon). Identische Nukleotide sind schwarz hinterlegt. Der Nukleotid-Austausch an Position 279 hat keinen Aminosäureaustausch im translatierten Protein zur Folge.

hyENaC_RefSeq	1	ATGGCACCCGGAGAGAAGATCAAAGCCAAAATCAAGAAGAATCTGCCCGTGACGGGCCCT
hyENaC_Klon	1	ATGGCACCCGGAGAGAAGATCAAAGCCAAAATCAAGAAGAATCTGCCCGTGACGGGCCCT
hyENaC_RefSeq	61	CAGGCGCCGACCATTAAAGAGCTGATGCGGTGGTACTGCCTCAACACCAACACCCATGGC
hyENaC_Klon	61	CAGGCGCCGACCATTAAAGAGCTGATGCGGTGGTACTGCCTCAACACCAACACCCATGGC
hyENaC_RefSeq	121	TGTCGCCGATCGTGGTGTCCC CGCGCCGTCTGCGCCGCTCCTCTGGATCGGGTTCACA
hyENaC_Klon	121	TGTCGCCGATCGTGGTGTCCC CGCGCCGTCTGCGCCGCTCCTCTGGATCGGGTTCACA
hyENaC_RefSeq	181	CTGACTGCCGTGGCCCTCATCTCTGGCAGTGCGCCCTCCTCGTCTTCTCTTCTATACT
hyENaC_Klon	181	CTGACTGCCGTGGCCCTCATCTCTGGCAGTGCGCCCTCCTCGTCTTCTCTTCTATACT
hyENaC_RefSeq	241	GTCTCAGTTTCCATCAAAGTCCACTTCCGGAAGCTGGATTTTCTGCAGTCACCATCTGC
hyENaC_Klon	241	GTCTCAGTTTCCATCAAAGTCCACTTCCGGAAGCTGGATTTTCTGCAGTCACCATCTGC
hyENaC_RefSeq	301	AACATCAACCCCTACAAGTACAGCACCGTTCGCCACCTTCTAGCTGACTTGAACAGGAG
hyENaC_Klon	301	AACATCAACCCCTACAAGTACAGCACCGTTCGCCACCTTCTAGCTGACTTGAACAGGAG
hyENaC_RefSeq	361	ACCAGAGAGGCCCTGAAGTCCCTGTATGGCTTTCAGAGTCCCGGAAGCGCCGAGAGGCC
hyENaC_Klon	361	ACCAGAGAGGCCCTGAAGTCCCTGTATGGCTTTCAGAGTCCCGGAAGCGCCGAGAGGCC
hyENaC_RefSeq	421	GAGTCCTGGAACTCCGTCTCAGAGGGAAAGCAGCCTAGATTCTCCCACCGGATTCCGCTG
hyENaC_Klon	421	GAGTCCTGGAACTCCGTCTCAGAGGGAAAGCAGCCTAGATTCTCCCACCGGATTCCGCTG
hyENaC_RefSeq	481	CTGATCTTTGATCAGGATGAGAAGGGCAAGGCCAGGGACTTCTTCACAGGGAGGAAGCGG
hyENaC_Klon	481	CTGATCTTTGATCAGGATGAGAAGGGCAAGGCCAGGGACTTCTTCACAGGGAGGAAGCGG
hyENaC_RefSeq	541	AAAGTCGGCGGTAGCATCATTCACAAGGCTTCAAATGTCATGCACATCGAGTCCAAGCAA
hyENaC_Klon	541	AAAGTCGGCGGTAGCATCATTCACAAGGCTTCAAATGTCATGCACATCGAGTCCAAGCAA
hyENaC_RefSeq	601	GTGGTGGGATTCCAACGTGCTCAAATGACACCTCCGACTGTGCCACCTACACCTTCAGC
hyENaC_Klon	601	GTGGTGGGATTCCAACGTGCTCAAATGACACCTCCGACTGTGCCACCTACACCTTCAGC
hyENaC_RefSeq	661	TCGGGAATCAATGCCATTTCAGGAGTGGTATAAGCTACACTACATGAACATCATGGCACAG
hyENaC_Klon	661	TCGGGAATCAATGCCATTTCAGGAGTGGTATAAGCTACACTACATGAACATCATGGCACAG
hyENaC_RefSeq	721	GTGCCTCTGGAGAAGAAAATCAACATGAGCTATTCTGCTGAGGAGCTGCTGGTGACCTGC
hyENaC_Klon	721	GTGCCTCTGGAGAAGAAAATCAACATGAGCTATTCTGCTGAGGAGCTGCTGGTGACCTGC
hyENaC_RefSeq	781	TTCTTTGATGGAGTGTCTGTGATGCCAGGAATTTACGCTTTTCCACCACCCGATGCAT
hyENaC_Klon	781	TTCTTTGATGGAGTGTCTGTGATGCCAGGAATTTACGCTTTTCCACCACCCGATGCAT
hyENaC_RefSeq	841	GGGAATTGCTATACTTTCAACAACAGAGAAAATGAGACCATTCTCAGCACCTCCATGGGG
hyENaC_Klon	841	GGGAATTGCTATACTTTCAACAACAGAGAAAATGAGACCATTCTCAGCACCTCCATGGGG
hyENaC_RefSeq	901	GGCAGCGAATATGGGCTGCAAGTCATTTTGTACATAAACAAGAGGAATACAACCCATTC
hyENaC_Klon	901	GGCAGCGAATATGGGCTGCAAGTCATTTTGTACATAAACAAGAGGAATACAACCCATTC
hyENaC_RefSeq	961	CTCGTGCTCCTCCACTGGAGCTAAGGTGATCATCCATCGGCAGGATGAGTATCCCTTCGTC
hyENaC_Klon	961	CTCGTGCTCCTCCACTGGAGCTAAGGTGATCATCCATCGGCAGGATGAGTATCCCTTCGTC
hyENaC_RefSeq	1021	GAAGATGTGGGAACAGAGATTGAGACAGCAATGGTCACCTCTATAGGAATGCACCTGACA
hyENaC_Klon	1021	GAAGATGTGGGAACAGAGATTGAGACAGCAATGGTCACCTCTATAGGAATGCACCTGACA
hyENaC_RefSeq	1081	GAGTCCTTCAAGCTGAGTGAGCCCTACAGTCAGTGCACGGAGGACGGGAGTGACGTGCCA
hyENaC_Klon	1081	GAGTCCTTCAAGCTGAGTGAGCCCTACAGTCAGTGCACGGAGGACGGGAGTGACGTGCCA
hyENaC_RefSeq	1141	ATCAGGAACATCTACAACGCTGCCTACTCGCTCCAGATCTGCCTTCATTCATGCTTCCAG
hyENaC_Klon	1141	ATCAGGAACATCTACAACGCTGCCTACTCGCTCCAGATCTGCCTTCATTCATGCTTCCAG
hyENaC_RefSeq	1201	ACAAAGATGGTGGAGAAATGTGGGTGTGCCAGTACAGCCAGCCTCTACCTCCTGCAGCC
hyENaC_Klon	1201	ACAAAGATGGTGGAGAAATGTGGGTGTGCCAGTACAGCCAGCCTCTACCTCCTGCAGCC

h γ ENaC_RefSeq	1261	AACTACTGCAACTACCAGCAGCACCCCACTGGATGTATTGTTACTACCAACTGCATCGA
h γ ENaC_Klon	1261	AACTACTGCAACTACCAGCAGCACCCCACTGGATGTATTGTTACTACCAACTGCATCGA
h γ ENaC_RefSeq	1321	GCCTTTGTCCAGGAAGAGCTGGGCTGCCAGTCTGTGTGCAAGGAAGCCTGCAGCTTTAAA
h γ ENaC_Klon	1321	GCCTTTGTCCAGGAAGAGCTGGGCTGCCAGTCTGTGTGCAAGGAAGCCTGCAGCTTTAAA
h γ ENaC_RefSeq	1381	GAGTGGACACTAACCACAAGCCTGGCACAATGGCCATCTGTGGTTTCGGAGAAGTGGTTG
h γ ENaC_Klon	1381	GAGTGGACACTAACCACAAGCCTGGCACAATGGCCATCTGTGGTTTCGGAGAAGTGGTTG
h γ ENaC_RefSeq	1441	CTGCCTGTTCTCACTTGGGACCAAGGCCGGCAAGTAAACAAAAGCTCAACAAGACAGAC
h γ ENaC_Klon	1441	CTGCCTGTTCTCACTTGGGACCAAGGCCGGCAAGTAAACAAAAGCTCAACAAGACAGAC
h γ ENaC_RefSeq	1501	TTGGCCAAACTCTTGATATTCTACAAAGACCTGAACCAGAGATCCATCATGGAGAGCCCA
h γ ENaC_Klon	1501	TTGGCCAAACTCTTGATATTCTACAAAGACCTGAACCAGAGATCCATCATGGAGAGCCCA
h γ ENaC_RefSeq	1561	GCCAACAGTATTGAGATGCTTCTGTCCAACCTTCGGTGGCCAGCTGGGCCTGTGGATGAGC
h γ ENaC_Klon	1561	GCCAACAGTATTGAGATGCTTCTGTCCAACCTTCGGTGGCCAGCTGGGCCTGTGGATGAGC
h γ ENaC_RefSeq	1621	TGCTCTGTTGTCTGCGTCATCGAGATCATCGAGGTCTTCTTCATTGACTTCTTCTCTATC
h γ ENaC_Klon	1621	TGCTCTGTTGTCTGCGTCATCGAGATCATCGAGGTCTTCTTCATTGACTTCTTCTCTATC
h γ ENaC_RefSeq	1681	ATTGCCCGCCGCCAGTGGCAGAAAGCCAAGGAGTGGTGGGCCTGGAAACAGGCTCCCCCA
h γ ENaC_Klon	1681	ATTGCCCGCCGCCAGTGGCAGAAAGCCAAGGAGTGGTGGGCCTGGAAACAGGCTCCCCCA
h γ ENaC_RefSeq	1741	TGTCCAGAAGCTCCCCGTAGCCACAGGGCCAGGACAATCCAGCCCTGGATATAGACGAT
h γ ENaC_Klon	1741	TGTCCAGAAGCTCCCCGTAGCCACAGGGCCAGGACAATCCAGCCCTGGATATAGACGAT
h γ ENaC_RefSeq	1801	GACCTACCCACTTTCAACTCTGCTTTGCACCTGCCTCCAGCCCTAGGAACCCAAGTGCCC
h γ ENaC_Klon	1801	GACCTACCCACTTTCAACTCTGCTTTGCACCTGCCTCCAGCCCTAGGAACCCAAGTGCCC
h γ ENaC_RefSeq	1861	GGCACACGCCCCCAATAACAATACCTTGGCTTGGAGAGGGCCTTTTCCAACCAGCTC
h γ ENaC_Klon	1861	GGCACACGCCCCCAATAACAATACCTTGGCTTGGAGAGGGCCTTTTCCAACCAGCTC
h γ ENaC_RefSeq	1921	ACAGATACCCAGATGCTGGATGAGCTCTGA
h γ ENaC_Klon	1921	ACAGATACCCAGATGCTGGATGAGCTCTGA

Abb. IX-3: *Alignment* der Nukleotidsequenz der γ -Untereinheit des epithelialen Na⁺-Kanals (h γ ENaC_RefSeq, GenBank Zugangsnummer NM_001039) mit dem Klonierungsprodukt (h γ ENaC_Klon). Identische Nukleotide sind schwarz hinterlegt.

Versicherung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen habe, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, November 2007

Danksagung

Abschließend möchte ich einigen Personen und Institutionen meinen Dank aussprechen, die in mittel- oder unmittelbarer Weise in die vorliegende Arbeit eingebunden waren.

Prof. Dr. Clauss möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken, sowie für das Vertrauen in meine Fähigkeiten und die Möglichkeit, auch eigenen wissenschaftlichen Pfaden folgen zu können.

Prof. Dr. Diener danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die prompte Korrektur.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft verdanke ich die Finanzierung dieser Arbeit.

Bei Dr. Martin Fronius möchte ich mich aus vielerlei Gründen bedanken: für die kameradschaftliche Betreuung und die fruchtbare Zusammenarbeit, die weit über die Grenzen des Laboralltags hinausging.

Gleiches gilt für Mike Althaus und Jens Berger. Danke für ein wirklich tolles Arbeitsklima, die belebenden Diskussionen zu fachlichen aber vor allem auch nicht-fachlichen Themen sowie für die Korrektur der Arbeit.

Meinen Kolleginnen und Kollegen Miriam Buß, Thomas deVries, Nadine Dotzauer, Monica Hollenhorst, Gitte Jositsch, Sarah Kessler, Julia Lüdke, Dagmar Sommer, Christoph Straub, Johannes Strauß und Christine Veith danke ich ebenfalls für eine Atmosphäre, die mich immer gerne zur Arbeit kommen ließ.

Allen weiteren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts danke ich für diverse Hilfestellungen in technischen und administrativen Dingen.

Bei Dr. Rory Morty und Dr. Oliver Eikelberg möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in ihren Laboren und die Hilfe bei der Klonierung des ENaCs bedanken.

Martin Bodenbenner und Prof. Dr. Kummer gilt mein Dank für die Hilfe rund um die Immunfluoreszenzfärbungen.

Prof. Dr. Petzinger, Prof. Dr. Bauerfeind sowie Jana Heber möchte ich für ihre Arbeit im Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“ danken.

Dr. Joachim Geyer danke ich für die Beratung in bioinformatischen Fragestellungen.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie im Kleinen wie im Großen: Anna und Ella, ohne die der Alltag schlicht nicht vorstellbar wäre, meinen Eltern, von denen ich viel gelernt habe und die mir meinen jetzigen Lebensweg erst ermöglicht haben sowie meinen Schwiegereltern, auf die ich stets zählen konnte.