

Institut für Tierphysiologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Prof. Dr. W. Clauß

**Elektrophysiologische Untersuchungen  
zur Elektrolyt-Resorption  
am Lungenepithel von *Xenopus laevis***

Dissertationsarbeit im Fachbereich 08  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von  
Martin Fronius

Oktober 2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1. Allgemeine Einleitung .....	1
2. Das Lungenepithel und alveolarer Ionentransport .....	3
3. Bearbeitete Fragestellungen .....	7
<b>II. Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
1. Versuchstier ( <i>Xenopus laevis</i> ) .....	12
1.1 Haltung und Fütterung .....	13
1.2 Vorbehandlung der Tiere mit ACTH .....	13
1.3 Präparation .....	14
1.3.1 Präparation der Lungen .....	14
1.3.2 Präparation der Oocyten .....	14
2. Verwendete Lösungen .....	17
2.1 Ussingkammer und transepitheliale Potentialmessungen .....	17
2.2 Oocyten und patch-clamp .....	18
3. Versuchsaufbauten und elektrische Messverfahren .....	19
3.1 Ussingkammer .....	19
3.1.1 Elektroden .....	20
3.1.2 Auswertung und Vorzeichenkonvention .....	21
3.2 Modifizierte Ussingkammer .....	21
3.3 Transepitheliale Potentialableitungen .....	23
3.3.1 Elektroden .....	24
3.3.2 Auswertung und Vorzeichenkonvention .....	24
3.4 Patch-clamp .....	25
3.4.1 Patch-Pipetten .....	26
3.4.2 Auswertung und Vorzeichenkonvention .....	27
4. Statistik .....	28

<b>III. Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
1. ACTH-induzierte Veränderungen elektrophysiologischer Eigenschaften der <i>Xenopus</i> -Lunge.....	29
1.1 Einfluss von ACTH auf die Wirksamkeit von second messenger am Beispiel cAMP .....	31
1.2 Einfluss von ACTH auf die Wirkung von Liganden am Beispiel des $\beta$ -adrenergen Agonisten Terbutalin.....	32
2. Effekt von Histamin auf die transepitheliale $\text{Na}^+$ -Resorption.....	34
2.1 Effekt des Histamin-Antagonisten Diphenhydramin .....	35
3. Purinerge Rezeptoren .....	37
3.1 P2-Rezeptoren.....	37
3.1.1 ATP.....	37
3.1.2 UTP .....	39
3.1.3 Additive Effekte von ATP und UTP.....	41
3.1.4 Basolaterale Wirkung von ATP und UTP.....	43
3.2 P1-Rezeptoren.....	44
4. Stimulation des transepithelialen $\text{Na}^+$ -Stroms durch extrazelluläres Gadolinium .....	46
4.1 Effekt von Gadolinium auf $I_{sc}$ und $I_{ami}$ .....	46
4.2 Interaktion von $\text{Gd}^{3+}$ mit dem „ $\text{Na}^+$ -feedback/ self-inhibition system“ .....	48
4.2.1 BIG (Benz-Imidazolyl-Guanidin) .....	50
4.2.2 PHMB (p-Hydroxy-Mercuribenzoic Acid) .....	51
4.3 Beteiligung von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an der $\text{Gd}^{3+}$ vermittelten Wirkung ...	52
4.4 Patch-clamp Untersuchungen zur Wirkung von $\text{Gd}^{3+}$ an ENaCs ..	54
5. Alternative elektrophysiologische Messmethoden an der <i>Xenopus</i> -Lunge... ..	56
5.1 Potentialableitungen von intakten, perfundierten <i>Xenopus</i> -Lungen .....	56
5.2 Druckabhängigkeit transepithelialer Ionenströme im Alveolarepithel von <i>Xenopus</i> .....	58

<b>IV. Diskussion</b> .....	<b>60</b>
1. ACTH-induzierte Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften der <i>Xenopus</i> -Lunge .....	63
2. Effekt von Histamin auf die transepitheliale Na <sup>+</sup> -Resorption .....	67
3. Purinerge Rezeptoren .....	70
3.1 P2-Rezeptoren .....	71
3.2 P1-Rezeptoren .....	74
4. Stimulation des transepithelialen Na <sup>+</sup> -Stroms durch extrazelluläres Gadolinium .....	77
5. Alternative elektrophysiologische Messmethoden an der <i>Xenopus</i> -Lunge. . .	84
5.1 Potentialableitungen von intakten, perfundierten <i>Xenopus</i> -Lungen .....	84
5.2 Druckabhängigkeit transepithelialer Ionenströme im Alveolarepithel von <i>Xenopus</i> .....	86
<b>V. Zusammenfassung</b> .....	<b>90</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>92</b>
<b>VII. Anhang</b> .....	<b>102</b>
1. Abkürzungen .....	102
1.1 Präfixe der verwendeten Einheiten .....	102
1.2 Verwendete Einheiten .....	102
1.3 Sonstige Abkürzungen. ....	103
1.4 Benutzte Chemikalien/Pharmaka und deren Bezugsquellen. ....	105
2. Versicherung .....	107
3. Danksagung .....	108

# I. Einleitung

## 1 Allgemeine Einleitung

Die Fähigkeit zur Regulation des Elektrolyt- und des Wasserhaushalts ist eine der wichtigsten Eigenschaften, die Lebewesen im Laufe der Evolution entwickelt haben. Dies geschieht primär durch den gezielten Transport gelöster Bestandteile (Ionen), denen sekundär das Wasser folgt. Durch die Regulation des Ionentransports sind Lebewesen in der Lage, ein konstantes Milieu in ihrem Körperinneren aufrechtzuerhalten. Ermöglicht wird dies durch Epithelien – spezialisierte Zellverbände, die einen Organismus gegen die Umwelt, aber auch Körperkompartimente innerhalb eines Organismus gegeneinander abgrenzen. Wichtigste Ionen zur Aufrechterhaltung der Homöostase sind  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen. Die Regulation des Transports dieser Ionen über die Zellmembranen bedarf einer strengen Kontrolle. Dabei unterscheidet man zwei verschiedene Arten des Ionentransports. Zum einen den parazellulären und zum anderen den transzellulären. Parazellulärer Ionentransport ist gekennzeichnet von einer ungerichteten Diffusion der Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten zwischen den Epithelzellen, wobei diese Art des Transports einzig durch die Dichte der tight junctions limitiert wird. Transzellulärer Ionentransport hingegen, erfolgt gerichtet durch die Zelle hindurch und unterliegt einer strengen Kontrolle – zudem können Ionen dabei auch gegen bestehende elektrochemische Gradienten transportiert werden. Am Beispiel von  $\text{Na}^+$ -reabsorbierenden Epithelien, wie man sie z. B. in der Niere, der Lunge und im distalen Colon findet (Garty & Palmer 1997), kann dies leicht nachvollzogen werden. Basis der  $\text{Na}^+$ -Reabsorption ist stets der gleiche Mechanismus –  $\text{Na}^+$ -Ionen diffundieren von der körperäußeren (apikalen) Seite des Epithels entlang ihres elektrochemischen Gradienten in die Epithelzelle und werden auf der körperinneren (basolateralen) Seite durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase unter Aufwendung von Energie aus der Zelle entfernt. Da die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase je 3  $\text{Na}^+$ -Ionen im Austausch mit 2  $\text{K}^+$ -Ionen transportiert, kommt es zu Ladungsverschiebungen über die Epithelien – man spricht dabei von elektrogenem Transport. Dieser elektrogene Ionentransport kann mittels elektrophysiologischer Methoden nachgewiesen und untersucht werden.

So ist es nicht weiter verwunderlich, dass die Etablierung elektrophysiologischer Methoden die Basis für viele der gewonnenen Erkenntnisse zum Verständnis vom Elektrolyttransport war und ist. Bereits in den 40er Jahren begannen die beiden Wissenschaftler Krogh und Ussing mit der Untersuchung des Elektrolyttransports in Epithelien. Ihre fundamentalen Erkenntnisse ebneten den Weg für das Verständnis vieler physiologischer Fragestellungen. Die Formulierung der „zwei Membranen-Hypothese“ durch Koefoed & Ussing (1958) z. B. stellt ein grundlegendes Prinzip für die Funktion  $\text{Na}^+$ -resorbierender Epithelien dar, das heute nach wie vor Gültigkeit hat. Diese richtungsweisenden Arbeiten an der Froschhaut zeigen zudem eine gewisse Allgemeingültigkeit der Iontentransportmechanismen – unabhängig von evolutiven Entwicklungsstufen der untersuchten Organismen.

Die Weiterentwicklung elektrophysiologischer Methoden und Techniken in den vergangenen Jahrzehnten spielte bei der Erforschung von Iontentransport-Vorgängen eine wichtige Rolle. Hervorzuheben ist an dieser Stelle die bahnbrechende Versuchstechnik der beiden Wissenschaftler Neher und Sakman (1976), denen es gelang, die Ionenströme durch einen einzelnen Kanal zu messen. Die vorgestellte Methode wurde als „patch-clamp“ bezeichnet. Durch ihre Anwendung konnten aufgestellte Theorien über Ionenkanäle endlich experimentell nachgewiesen werden. Das letzte Jahrzehnt war zudem geprägt von einer rasanten Entwicklung molekularbiologischer Techniken und Methoden. Diese Neuerungen ermöglichten schließlich die Klonierung der cDNA von Iontentransportproteinen aus verschiedenen Geweben und damit deren detaillierte funktionelle Untersuchung mittels elektrophysiologischer Methoden.

Anschaulich lassen sich diese Fortschritte am Beispiel epithelialer Natriumkanäle (ENaCs) nachvollziehen. Diese in der apikalen Membran von Epithelien lokalisierten Kanäle kontrollieren die Aufnahme von  $\text{Na}^+$  in Organen wie z. B. der Lunge, der Niere und dem Colon. Zudem konnten ENaCs bis heute in einer Vielzahl von Geweben quer durch das Tierreich nachgewiesen werden (Garty & Palmer, 1997). Die hohe Affinität des Diuretikums Amilorid zu den Kanälen spielt bei ihrer Identifikation eine große Rolle. Diese charakteristische Eigenschaft ermöglichte es, im Laufe der letzten Jahre die Beteiligung der ENaCs an verschiedenen physiologischen Prozessen mittels elektrophysiologischer Methoden näher zu untersuchen. So z. B. findet in der Niere die Rückresorption von  $\text{Na}^+$  durch diese Kanäle statt, welches die treibende Kraft für die Resorption von Wasser ist, das den Ionen passiv nachfolgt (Garty & Palmer, 1997).

Durch den Einsatz von Amilorid kann man in Geweben, die dem distalen Tubulus entstammen, annähernd den gesamten transepithelialen Strom hemmen (amilorid-sensitiver Strom) – ein Hinweis auf die Spezialisierung dieser Gewebsabschnitte auf die Resorption von  $\text{Na}^+$ . Ein weiterer wichtiger Schritt die Bedeutung und Funktion von ENaCs zu verstehen, gelang im Jahr 1994. Der epitheliale  $\text{Na}^+$ -Kanal aus dem Colon der Ratte konnte kloniert und funktionell in Oocyten exprimiert werden. Dabei gelang es, die grundlegende Struktur der Kanäle zu identifizieren – es konnte gezeigt werden, dass die Kanäle aus drei homologen Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) aufgebaut sind (Canessa et al., 1994).

## 2 Das Lungenepithel und alveolarer Ionentransport

ENaCs konnten nachfolgend auch in den Atemwegsepithelien verschiedenster Vertebraten nachgewiesen werden (Matalon & O’Brodivich, 1999). Hier besteht ihre Hauptaufgabe – zusammen mit Chloridkanälen – darin, die Viskosität des Flüssigkeitsfilms, der das Epithel bedeckt, aufrechtzuerhalten (Saumon & Basset 1993). Hauptmechanismen hierfür sind eine streng kontrollierte Sekretion von  $\text{Cl}^-$ , bzw. Resorption von  $\text{Na}^+$ . Dabei gilt die alveolare Resorption von  $\text{Na}^+$  als wichtigste Triebkraft für die Flüssigkeitsresorption aus dem Lungenlumen (O’Grady & Lee, 2003). Wird das Gleichgewicht zwischen Ionensekretion und Resorption gestört, hat dies schwerwiegende Folgen. Eines der populärsten Beispiele hierfür ist sicher die Mukoviszidose (cystic fibrosis; CF), eine rezessiv vererbte Krankheit, bei der eine Mutation in einem Gen, welches einen Chloridkanal kodiert, vorliegt. Die Störungen der Kanalfunktionen führen zu einem Ungleichgewicht im Elektrolythaushalt, infolge dessen es zu einer Verdickung der alveolaren Flüssigkeit kommt. Daraus resultierend wird die Reinigung des Epithels erschwert – inhalierte Schadstoffe und Krankheitserreger können nicht effektiv abtransportiert werden, es kommt zu chronischen Infektionen und schließlich zur Bildung von Fibrosen. Infolge dieser Sekundärschäden kann es zu einer irreparablen Schädigung der Lunge kommen. Bei fortgeschrittener Fibrosierung des Lungenparenchyms und damit chronischer Hypoxie sind pulmonaler Hochdruck und letzten Endes Rechtsherzinsuffizienz weitere mögliche Folgen. Welche Bedeutung den ENaCs bei der Aufrechterhaltung des Flüssigkeitsfilms in der Lunge

zukommt, konnte am eindrucksvollsten bei transgenen Mäusen gezeigt werden. ENaC knock-out Mäuse sterben kurz nach der Geburt (ertrinken), weil sie nicht in der Lage sind die Flüssigkeit aus dem Alveolarraum zu resorbieren (Hummler et al., 1996).

Die Lungeneithelien luftatmender Organismen sind während der Ventilation einer ständigen „Schadstoffbelastung“ ausgesetzt. Das Lungeneithel, zusammen mit seiner wässrigen Auflage, fungiert dabei als physiologische Diffusionsbarriere, die das Eindringen von Antigenen, Krankheitserregern und Schmutz verhindert. Zudem schützt es darunter liegende Zellen (z. B. Nervenzellen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen) vor einem Kontakt mit der Umgebungsluft. Neben diesem mechanischen Schutz sezernieren bestimmte Epithelzellen (alveolare Typ II Zellen) jene Komponenten, die das gesamte Atemepithel bedecken und die Funktion der Lunge gewährleisten/erleichtern. Diese Komponenten bilden eine mehrschichtige Auflage, die das gesamte Epithel bedeckt – man unterscheidet den Mukus, den surfactant und die so genannte periciliäre Flüssigkeit (Rubin, 2002). Die oberste (äußerste) Schicht des alveolaren Flüssigkeitsfilms ist Gel-artig und besteht hauptsächlich aus Mucin (Glykoproteine; Rubin, 2002). Darunter befindet sich eine oberflächenaktive Schicht, die als surfactant bezeichnet wird. Hauptaufgabe dieser, aus Phospholipiden bestehenden, Schicht ist es, die Oberflächenspannung in den Alveolen zu reduzieren, um die Atmung zu erleichtern (Rooney, 2001). Unmittelbar dem Epithel aufliegend folgt eine zum größten Teil wässrige Schicht, die den Cilienschlag der bewimperten Epithelzellen ermöglicht (Rubin, 2002). Der gerichtete und koordinierte Schlag der Cilien, sowie die Beschaffenheit des Flüssigkeitlayers sind die Hauptakteure, die den Abtransport von inhalierten Schadstoffen gewährleisten.

Zusätzlich zur Sekretion dieser Komponenten, sowie der Aufrechterhaltung ihrer Viskosität durch kontrollierten Ionentransport, ist das Lungeneithel in der Lage, verschiedene Moleküle lokal zu sezernieren. Man bezeichnet diese lokale Ausschüttung von zellaktiven Substanzen als auto- bzw. parakrin; d. h. die Moleküle wirken auf die freisetzenden Zellen bzw. auf Zellen in deren unmittelbarer Nachbarschaft. Die Funktion der freigesetzten Faktoren ist allerdings von der Beschaffenheit des alveolaren Flüssigkeitsfilms abhängig. Die Viskosität des Flüssigkeitlayers ist wiederum von der Funktion diverser Ionenkanäle und -pumpen abhängig. Ist der Flüssigkeitlayer zu dünn- oder dickflüssig, kann die Funktion der Lunge (Sauerstoffaufnahme und immunologischer Schutz) beeinträchtigt werden. Neben den bereits genannten Folgeschäden im

Verlauf der Mukoviszidose sei die Bildung von pulmonalen Ödemen genannt, die zwar auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sind, allerdings immer durch eine gestörte Flüssigkeitsresorption gekennzeichnet sind.

Vom Lungenepithel freigesetzte auto-/parakrine Substanzen können eine Vielzahl von unterschiedlichen Wirkungen haben, die die Funktion der Lunge unterstützen bzw. aufrechterhalten. Als Beispiel seien kurz Histamin, Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Stickstoffmonoxid (NO) genannt. PGE<sub>2</sub> und NO beispielsweise gelten als Bronchodilatoren, die kontinuierlich ausgeschüttet werden und permanent aktiv sind. Kommt es zu einer Störung der Ausschüttung von PGE<sub>2</sub> bzw. NO, z. B. durch eine Verletzung des Epithels, führt dies zur Bronchokonstriktion (Verengung der Atemwege; Folkerts & Nijkamp, 1998). Es gibt ernst zu nehmende Hinweise darauf, dass eine rein mechanische Schädigung des Lungenepithels eine entscheidende Rolle bei Asthma einnimmt, weil so genannte EpiDRFs (epithelium derived relaxing factors), zu denen PGE<sub>2</sub> und NO zählen, nicht mehr in ausreichender Menge gebildet und ausgeschüttet werden können (Folkerts & Nijkamp, 1998). Dies führt letztlich zu einer Verengung der Atemwege und damit zu Atemnot – was charakteristisch für Asthma ist.

Angesichts der beschriebenen Beispiele und deren Konsequenzen ist es nicht verwunderlich, dass der Erforschung alveolaren Ionentransports eine wichtige Rolle zukommt. Die Regulationsmechanismen zu verstehen, die für die Aufrechterhaltung eines konstanten Gleichgewichtes der Alveolarflüssigkeit verantwortlich sind, sind von großem Interesse für die medizinische und klinische Forschung. Man erhofft sich dadurch neue Therapie- und Behandlungsmöglichkeiten bei Krankheiten wie Asthma, CF, pulmonaler Hypertonie und ARDS (acute respiratory distress syndrome). Die Fehlfunktion des ENaCs in der Lunge von CF-Patienten (Hyperaktivität und damit gesteigerte Na<sup>+</sup>-Resorption) führte, zum Beispiel, zu der Entwicklung einer Amilorid-Inhalationstherapie, mit dem Ziel, die hyperaktiven Na<sup>+</sup>-Kanäle zu hemmen, um die Flüssigkeitsresorption aus dem Lungenlumen zu reduzieren (Hirsh, 2002).

Die Fragestellungen bezüglich des alveolaren Ionentransports werden gegenwärtig fast ausschließlich an isolierten und kultivierten Zellen untersucht. Allerdings zeigt sich, dass die Eigenschaften der kultivierten Zellen sehr stark von den Kultivierungsbedingungen abhängen. Jain et al. (2001) zeigten, dass die Art der exprimierten Kanäle in Primärkulturen von ATII-Zel-

len von den Bedingungen abhängt, unter denen die Zellen kultiviert werden. Waren die Zellen auf der apikalen Seite mit Medium bedeckt (liquid interface), exprimierten die Zellen hauptsächlich einen nicht-selektiven Kationenkanal mit einer Leitfähigkeit von 21 pS; im Gegensatz dazu wurde bei Zellen, die unter so genannten „air-liquid“ Bedingungen kultiviert wurden, hauptsächlich ein hoch Na<sup>+</sup>-selektiver Kanal mit einer Leitfähigkeit von 4 pS beobachtet. Diese Tatsache erschwert es, physiologisch relevante Eigenschaften von sekundären (Kultur-induzierten) Eigenschaften zu unterscheiden. Aus diesem Grund wäre es wünschenswert, Untersuchungen an einem physiologisch intakten Zellverband, also einem nativen Lungenepithel durchzuführen. Um die Probleme zu umgehen, die bei der Kultivierung von alveolaren Epithelzellen auftreten, werden Untersuchungen an intakten, perfundierten Lungen durchgeführt. Diese Versuche bieten zwar den Vorteil, dass sie unter nativen physiologischen Bedingungen durchgeführt werden, allerdings ist die Aussagekraft relativ eingeschränkt – man kann nur indirekt Rückschlüsse auf Ionenverschiebungen ziehen. Als Maß für transepithelialen Ionentransport gilt zum Teil eine Veränderung des Gewichts der Lungen infolge von Wassereinlagerungen ins Interstitium. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt scheint es kein perfektes Untersuchungsmodell zu geben, um alveolaren Ionentransport zu erforschen. Native Gewebe können aufgrund der anatomischen und morphologischen Eigenschaften der Säugerlungen nicht isoliert werden, um funktionelle Messungen, zum Beispiel in der Ussingkammer, durchzuführen.

Die erforderlichen anatomischen und morphologischen Eigenschaften für solche Messungen erfüllen die Lungen von Amphibien. Deren Lungen sind sackförmig aufgebaut und besitzen eine geringe Kammerung – verglichen mit Säugerlungen. Diese Tatsache ermöglicht es, die entnommenen Organe flächig aufzupräparieren und sie in eine Ussingkammer einzuspannen. Zudem kann ein solches Gewebe unter nahezu physiologischen Bedingungen untersucht werden, da sich die Epithelzellen in einem intakten Zellverband befinden und die auto-/parakrine Kommunikation mit benachbarten Zellen bzw. Geweben gewährleistet ist.

Die *Xenopus*-Lunge weist, wie Amphibienlungen allgemein, eine relativ unkomplizierte Anatomie auf. Sie besitzt eine geringe Verästelung und Kompartimentierung des Alveolarraums. Diese Eigenschaft ermöglicht es, die entnommenen Lungen nach einer unkomplizierten Präparation in eine Ussingkammer einzuspannen. In dieser können, unter kontrollierten Bedingungen, transepitheliale Ionenverschiebungen quantitativ gemessen werden. Trotz der anato-

mischen Unterschiede zwischen Säuger- und *Xenopus*-Lungen gibt es auch ein Reihe von Gemeinsamkeiten. Die Epitheloberflächen (Luft/Blut-Schranke), zum Beispiel, weisen eine große Ähnlichkeit zueinander auf (Meban, 1973; Dierichs, 1975). Zudem ist bekannt, dass die Strukturen zur Bildung/Ausscheidung des surfactant innerhalb der Vertebraten hoch konserviert sind und es funktionell keine Unterschiede gibt (Daniels & Orgeig, 2001). Weitere Parallelen betreffen den alveolaren Ionentransport. Im Jahr 1989 konnte unsere Arbeitsgruppe im Lungenepithel von *Xenopus* Na<sup>+</sup>-Kanäle nachweisen, die die gleichen Eigenschaften aufwiesen, wie die bis dato bekannten ENaCs (Fischer et al., 1989). Die grundlegenden Mechanismen zur Regulation des Flüssigkeitsfilms in der *Xenopus*-Lunge entsprechen denen ausdifferenzierter Säuger-Lungenepithelien: Na<sup>+</sup>-Resorption und Cl<sup>-</sup>-Sekretion (Fischer et al., 1989; Kim, 1990). In weiteren Arbeiten konnten Regulationsmechanismen, wie man sie bereits von anderen Na<sup>+</sup>-resorbierenden Epithelien kannte, in der *Xenopus*-Lunge nachgewiesen werden (Baxendale-Cox, 1999; Fischer & Clauss 1990). Das pulmonale Epithel von *Xenopus* erfüllt somit einige Bedingungen, die es zulassen, Vergleiche zu den pulmonalen Epithelien von Säugetieren zu ziehen. Basierend auf diesen Gemeinsamkeiten hat die *Xenopus*-Lunge das Potential als „Lungenmodell“ für elektrophysiologische Untersuchungen zu dienen, um grundlegende – den alveolaren Ionentransport betreffende – Fragestellungen zu untersuchen. Hingewiesen sei an dieser Stelle auf die Bedeutung der Froschhaut, die eine wichtige Stellung bei der Erforschung grundlegender Ionentransport-Mechanismen eingenommen hat und auch nach wie vor ein beliebtes Studienobjekt ist. Allerdings kann man die gewonnenen Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf andere Spezies bzw. andere Vertebratenklassen übertragen. Dieses bedarf weiterer/zusätzlicher Untersuchungen.

### **3 Bearbeitete Fragestellungen**

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente an dem Alveolarepithel von *Xenopus laevis*, des südafrikanischen Krallenfroschs, durchgeführt. Im Fokus des Interesses stand dabei der durch ENaCs vermittelte Na<sup>+</sup>-Transport, wobei das Ziel dieser Arbeit darin bestand, neben den bereits bekannten, weitere Regulations-Mechanismen der Na<sup>+</sup>-Resorption in der *Xenopus*-

Lunge zu identifizieren. Neben Messungen in einer „Standard-Ussingkammer“ und dem Einsatz unterschiedlicher Substanzen und Pharmaka konnten durch einen Umbau der Kammer auch physikalische Einflüsse auf die Ionentransportrate untersucht werden. Mit dieser modifizierten Kammer bestand die Möglichkeit, während der Messungen einen mechanischen Druck auf das Epithel auszuüben. Gezielte Fragestellungen zur Wirkung bestimmter Substanzen auf xENaCs (aus *Xenopus* isolierter und klonierter ENaC) wurden zudem durch Einzelkanalableitungen an in Oocyten exprimierten Kanälen untersucht. In weiteren Messungen, mit einem eigenständigen Versuchsaufbau, konnten elektrische Ableitungen an ganzen, intakten Lungen gemacht werden.

Beginnend mit der grundlegenden Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Epithelien wurde untersucht, inwieweit das Lungenepithel von *Xenopus* Zielorgan einer ACTH (adrenokortikotropes Hormon) induzierten Aldosteronfreisetzung ist. ACTH ist ein Peptidhormon welches vom Hypophysenvorderlappen gebildet wird. Es wirkt primär auf die Nebennierenrinde und fördert die Freisetzung von Kortikosteroiden. Unter physiologischen Bedingungen ist das Peptidhormon ACTH eines der Hormone, das die Bildung und Sekretion von Aldosteron kontrolliert. Aldosteron nimmt wiederum eine wichtige Rolle bei der Regulation des Na<sup>+</sup>-Transports und damit des Wasserhaushalts ein (Garty & Palmer, 1997; Rossier et al., 2002). Basierend auf den Kenntnissen die Hanke & Kloas (1996) beschrieben – sie beobachteten eine messbare Erhöhung der Steroidkonzentration im Blutplasma von *Xenopus laevis* nach ACTH-Injektion – und der Tatsache, dass die *Xenopus*-Lunge als Zielorgan von Aldosteron beschrieben wurde (Fischer & Clauss, 1990), wurde versucht durch Injektionen der Donoren mit ACTH eine *in vivo*-Stimulation Na<sup>+</sup>-transportierender Proteine im Alveolarepithel von *Xenopus* zu induzieren.

Weitere Versuche wurden durchgeführt, um zu untersuchen, inwieweit auto-/parakrin freigesetzte Stoffe in der Lage sind, den transepithelialen Ionentransport zu beeinflussen. Solche Stoffe gewährleisten immunologischen Schutz gegenüber inhalierten Fremdstoffen. Eine wichtige Substanz ist hierbei das bereits erwähnte Histamin. Freigesetzt, bindet es an spezielle Membranrezeptoren und löst dadurch lokale Abwehrreaktionen sowie Entzündungen aus, die Teil der Immunabwehr sind. In den Zielzellen wird die Wirkung von Histamin durch die Bindung an

spezifische Rezeptoren ausgeübt ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  Rezeptoren; Bakker et al., 2002). Die Beteiligung von Histamin bei Allergien ist zudem sehr gut bekannt. Es handelt sich dabei um eine schädliche Überreaktion von Zellen auf Antigene (Hypersensitivität), worauf eine Freisetzung von Entzündungsmediatoren erfolgt. In der menschlichen Lunge spielt diese Überreaktion eine wichtige Rolle bei Asthma. Hierbei kommt es durch die übermäßige Ausschüttung von Histamin zu Kontraktionen der glatten Muskulatur in den Bronchiolen, die Atemwege verengen sich (Obstruktion) und es kommt zu Atemnot. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Histamin auf das Epithel, speziell auf den transepithelialen Ionentransport in der Lunge von *Xenopus* untersucht. Die Beteiligung von Histamin an der Regulation von Ionentransport-Prozessen ist bekannt, allerdings wurden die meisten Untersuchungen an Geweben der Verdauungsorgane gemacht (Barocelli & Ballabeni, 2003). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es nur wenige Erkenntnisse über die Bedeutung von Histamin als Regulator des alveolaren Ionentransports.

Eine zunehmend wichtigere Rolle als auto-/parakrine first messenger kommt energiereichen Molekülen wie ATP (Adenosintriphosphat) und UTP (Uridintriphosphat) zu (Ralevic & Burnstock 1998). Ein wichtiger Schritt für die Akzeptanz der Trinucleotide als first messenger war die Identifikation spezieller Membranrezeptoren, die man als purinerge Rezeptoren bezeichnet. Man unterscheidet heute P1-Rezeptoren, die speziell Adenosin binden und P2-Rezeptoren, die primär Tri- und Dinucleotide erkennen. Mitglieder der P2-Rezeptor-Familie werden zudem in P2X- und P2Y-Rezeptoren unterteilt. P2X-Rezeptoren sind ionotrope Rezeptoren (liganden-abhängige Ionenkanäle), während P2Y-Rezeptoren ausnahmslos G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind.

Die Trinucleotide können, auf einen Stimulus hin, lokal ausgeschüttet werden und lösen durch die Bindung an die Rezeptoren die jeweiligen Reaktionen aus. Die Beteiligung dieser Rezeptoren an den verschiedensten Stoffwechselprozessen sind vielfältig (Ralevic & Burnstock, 1998). Fehlfunktionen und Störungen dieser Prozesse werden mit unterschiedlichsten Krankheiten in Verbindung gebracht. Neue Erkenntnisse über die Wirkmechanismen dieser Rezeptoren könnten dazu dienen, neue Strategien bei deren Behandlung zu entwickeln (z. B. von Epilepsie, Parkinson und Entzündungsprozessen; Williams & Jarvis, 2000). Sowohl die Freisetzung von ATP oder UTP, als auch deren Beteiligung an der Regulation von Ionentransport-Vorgängen in

Epithelien ist bekannt (Leipziger, 2003). Durch extrazelluläres ATP oder UTP vermittelte Signaltransduktionen scheinen auch den transepithelialen Ionentransport – und damit die Viskosität der alveolaren Flüssigkeit – zu regulieren (Williams & Jarvis, 2000). Eine Beteiligung von ATP, UTP und Adenosin an der Regulation von Elektrolyttransporten im *Xenopus* Alveolarepithel wäre ein Hinweis auf die Präsenz purinerge Rezeptoren in diesem Epithel und damit eine weitere Parallele zu alveolaren Säugerepithelien.

Neben einer hormonellen Regulation konnte in verschiedenen Epithelien eine direkte und konzentrationsabhängige Beteiligung von  $\text{Na}^+$ -Ionen an der Regulation epithelialer  $\text{Na}^+$  Kanäle nachgewiesen werden (Turnheim, 1991). Man unterscheidet zwei Mechanismen: „self-inhibition“ und „feed-back-inhibition“. Erstere ist charakterisiert durch eine Hemmung der apikalen  $\text{Na}^+$ -Kanäle durch hohe extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen, während bei Letzterer die Hemmung auf hohe intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen zurückzuführen ist (Turnheim, 1991). Die Mechanismen dieser Autoregulation, die an diversen  $\text{Na}^+$ -resorbierenden Epithelien nachgewiesen wurden, sind weitgehend unbekannt und wurden bislang nicht an pulmonalen Epithelien beschrieben. Gadolinium ist in der Elektrophysiologie primär als ein potenter Inhibitor mechanisch aktivierbarer Kanäle bekannt (Caldwell et al., 1998). Der Einsatz von  $\text{Gd}^{3+}$  in dieser Arbeit verfolgte ursprünglich das Ziel, solche stretch activated channels (SACs) in der Lunge nachzuweisen. Erstaunlicherweise konnte durch  $\text{Gd}^{3+}$  eine Stimulation des  $\text{Na}^+$ -Stroms beobachtet werden. Dies führte zu der Vermutung, dass  $\text{Gd}^{3+}$  mit strukturellen Komponenten der ENaCs wechselwirkt, die die Autoregulation der Kanäle kontrollieren. Ähnliche Beobachtungen wurden von Friis und Nielsen an der Froschhaut gemacht und 2001 publiziert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von mechanischen Einflüssen auf den Ionentransport zu untersuchen. Lungen und deren Gewebe sind während der Ventilationsbewegungen ständig mechanischen Kräften ausgesetzt. Unter physiologischen Bedingungen kann man davon ausgehen, dass sich die Zellen auf diese Reize hin adaptieren. Was geschieht allerdings, wenn es darüber hinaus zu mechanischen Belastungen kommt? Ursache für diese Frage sind Komplikationen, die während der künstlichen Beatmung von Patienten auftreten können. Konkretes Beispiel dafür ist das ARDS (acute respiratory distress syndrome), welches durch akutes Versagen der Atmung während Entzündungsprozessen (Sepsis) charakterisiert ist (Walmrath et al., 2001). Wichtiges Behandlungsmittel der betroffenen Patienten ist die künst-

liche Beatmung – es gilt Zeit für die Therapie der Sepsis zu gewinnen. Dabei zeigen verschiedene Studien, dass allein durch eine als „protektiv“ bezeichnete Beatmung der Patienten (im Vergleich zu der „traditionellen“ Beatmung) die Letalität signifikant gesenkt werden kann. Eine „protektive“ Beatmung zeichnet sich durch veränderte Beatmungsparameter gegenüber einer „traditionellen“ Beatmung aus (niedrigere Volumina und niedrigere Drücke bei einer höheren Frequenz, Frank & Matthay, 2003, Brower & Rubenfeld, 2003). Das impliziert, dass hohe Volumina in Verbindung mit hohen Drücken sich negativ auswirken.

Um zu untersuchen, welche Rolle der Ionentransport bei diesem Phänomen spielt, wurden mit einer umgebauten Ussingkammer Versuche durchgeführt, wodurch eine mechanische Kraft auf das Epithel ausgeübt werden konnte. Durch den zu einem Kamin umgebauten Abfluss, konnte die Abflusshöhe auf einer Seite der Kammer variiert werden, wodurch ein hydrostatischer Druck auf das eingespannte Gewebe erzeugt werden konnte.

## II. Material und Methoden

### 1 Versuchstier (*Xenopus laevis*)

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Gewebe bzw. Zellen des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) verwendet. *Xenopus laevis* gehört zu der Ordnung der Anura (Froschlurche) und ist seit geraumer Zeit ein beliebtes Studienobjekt für unterschiedlichste Fragestellungen (Hilken et al., 1997). Hier eine genaue Einteilung in die Systematik nach Hilken et al. (1997):

Stamm:	Chordata
Unterstamm:	Vertebrata
Klasse:	Amphibia
Ordnung:	Anura
Familie:	Pipidae
Unterfamilie:	Xenopodinae
Gattung:	<i>Xenopus</i>
Art:	<i>Xenopus laevis</i>

Rezent kommen die Frösche der Gattung *Xenopus* im südwestlichen Teil Afrikas vor. Die niedrigen Ansprüche an die Umgebungsbedingungen führen zu einer großen Verbreitung der Art und ermöglichen zudem eine problemlose Haltung der Tiere in Gefangenschaft zur Verwendung in der Forschung.

Für die durchgeführten Studien wurden getöteten Tieren die beiden Lungen entnommen. Zudem wurden in einigen Fällen weiblichen Tieren unter Anästhesie Oocyten entnommen. Eine genauere Beschreibung der Lungen-/Oocyten-Entnahme folgt im weiteren Verlauf. Versuchstiere wurden entweder direkt aus Südafrika von African Xenopus Facility (Knysna) oder von H. Kähler (Bedarf für Lehre und Forschung, Hamburg) bezogen.

## 1.1 Haltung und Fütterung

Die Tiere wurden in 250 l Kunststoffbecken untergebracht, die oben mit einem Gitter abgedeckt waren. Pro Becken wurden Gruppen von max. 20–25 Tiere gehalten. Als Unterschlupf standen den Tieren Tonröhren zur Verfügung. Auf eine künstliche Beleuchtung wurde verzichtet. Die Becken wurden permanent mit Frischwasser versorgt, so dass weitgehend konstante Bedingungen erzielt werden konnten. Die Wassertemperatur betrug unter diesen Bedingungen 14–16 °C. Für eine kurze Übergangsphase von ca. 10 Wochen wurde die Frischwasserversorgung auf Tageszeiten beschränkt, nachts wurde der Wasserzulauf unterbrochen. Die Temperatur stieg unter diesen Bedingungen auf max. 21 °C an, ein Bereich, den die Tiere noch tolerieren (Hilken et al., 1997). Ein Einfluss auf die Eigenschaften der Versuchspräparate während dieser Zeit konnte nicht festgestellt werden. Unabhängig davon wurde das Wasser in den Haltebecken permanent über Schläuche und Sprudelsteine mit Sauerstoff (Druckluft) angereichert.

Die Frösche, ausschließlich Weibchen, wurden einmal pro Woche mit kommerziellem Fischfutter (Pellets, Kölln-Flocken) gefüttert. Am darauf folgenden Tag wurde das Wasser der Becken gewechselt und die Becken somit von Futterresten und Exkrementen gereinigt.

## 1.2 Vorbehandlung der Tiere mit ACTH

Dem überwiegenden Teil der Tiere wurde 48 und 24 Stunden vor dem Tod das Hormon ACTH (Adrenokortikotropes Hormon, Sigma) subcutan injiziert. Das Hormon wurde in destilliertem Wasser gelöst, anschließend in sterilen 1 ml Einwegspritzen (Dispomed) aufgezogen und bei –20 °C aufbewahrt. Zur Injektion wurden je eine Spritze aufgetaut, eine Kanüle aufgesetzt (0,5 × 23 mm, Enosa) und jedem Tier pro Körperseite 0,25 ml der Hormonlösung subcutan in die dorsalen Lymphsäcke injiziert (insgesamt 0,5 ml Hormonlösung pro Injektion). Diese Prozedur erfolgte ca. 48 und 24 Stunden vor dem Töten der Versuchstiere. Jedem injizierten Frosch wurden so zweimal je 1 nmol ACTH verabreicht (pro Injektion und Tag 1 nmol). Injizierte Frösche wurden bis zum Töten einzeln in kleineren Becken ohne Frischwasserzufluss gehalten. Während dieser 48 Stunden wurden sie zudem nicht mehr gefüttert.

## **1.3 Präparation**

### **1.3.1 Präparation der Lungen**

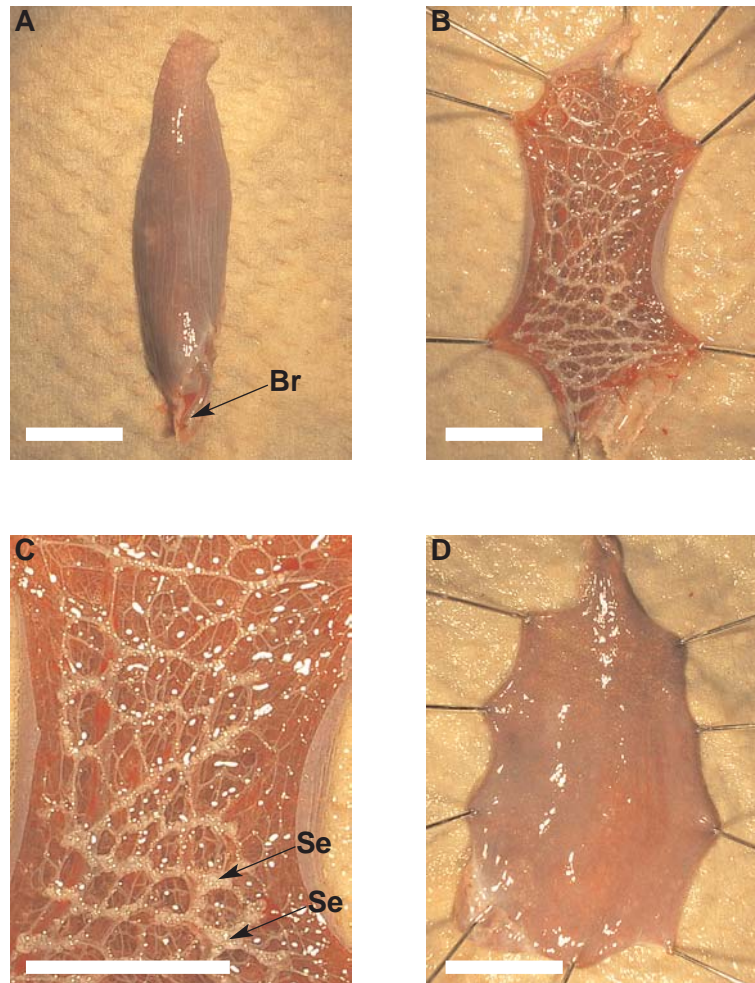
Vor der Entnahme der Organe wurden die Tiere für 45 Minuten in Eiswasser hypothermal anästhesiert. Eine Anästhesie mittels Pharmaka wurde nicht in Betracht gezogen, da ein Verschlucken des Anästhetikums während des Aufenthalts im Narkosebad und somit pharmakologische Effekte auf die Messungen nicht ausgeschlossen werden konnten. Nach 45 Minuten im Eiswasser zeigten die Tiere keinen Schluckreflex mehr und wurden mit einer Guillotine dekapitiert. Zusätzlich wurde das Rückenmark mittels einer Sonde weitestgehend zerstört. Nachdem die Haut und die muskulöse Bauchdecke aufpräpariert wurden, konnten die caudal liegenden Lungen mit feinen Pinzetten am distalen Ende gefasst und vorsichtig aus dem Körper gezogen werden. Die Lungen waren z.T. mit Faszien an der Körperwand befestigt und mussten somit vorsichtig herauspräpariert werden.

Im Bereich des Larynx wurden der Hauptbronchus und die versorgenden Blutgefäße gekappt. Die entnommenen Organe wurden in eine Präparierschale gelegt, mit Ringer-Lösung (NRS, siehe Tabelle II-1) befeuchtet. Für die Messungen in der Ussingkammer wurden die Organe weiter präpariert. Dazu wurden sie mit Stecknadeln fixiert, am proximalen Ende wurde über den Hauptbronchus ein Scherenschenkel in die Lunge eingeführt und das Gewebe vorsichtig bis zum distalen Ende aufgeschnitten. Das Präparat wurde anschließend flächig aufgespannt, wobei teilweise noch einige Septen durchtrennt wurden (Abbildung II-1). Von basolateral wurde ein Plexiglasring (Innendurchmesser 12 mm) mit Hilfe von Histoacryl Gewebekleber (B. Braun, Melsungen) aufgeklebt, der das Präparat stützte und so eine Montage in die Ussingkammer ermöglichte.

### **1.3.2 Präparation der Oocyten**

Die für die patch-clamp-Messungen verwendeten Oocyten wurden meist den für die Lungenentnahme getöteten Tieren entnommen. Teilweise wurden auch Oocyten lebendiger Weibchen

durch eine Laparotomie entnommen. Hierzu wurden die Tiere entweder hypothermal, oder in einem Narkosebad (0,13 %ige Tricaine-Lsg./MS 222, Sigma) anästhesiert. Während des Auf-



**Abbildung II-1:** Präparierte *Xenopus*-Lunge. **A** Frisch entnommene Lunge, der distale Teil zeigt nach oben, Br: Bronchus. **B** Gleiche Lunge, wie in A aufpräpariert und mit Nadeln fixiert. **C** Ausschnittsvergrößerung von B; einige Septen (Se) sind mit einem Pfeil markiert. Solche Septen wurden z. T. mit einer feinen Schere durchtrennt, um das Präparat flächiger aufzuspannen. **D** Basolaterale Aufsicht auf die flächig aufgespannte Lunge kurz vor dem Aufkleben der Plexiglasringe. Die weißen Balken entsprechen ca. 1 cm.

enthaltens im Narkosebad (10–12 Minuten) war zu beachten, dass die Tiere in der Lage waren frei zu atmen. Die anästhesierten Weibchen wurden auf ein befeuchtetes Zellstofftuch in einer Präparierschale gelegt, wobei der Körper teilweise mit Eis bedeckt war. Seitlich, oberhalb der Leistengegend, wurde die Bauchdecke mit einem ca. 1 cm langen Schnitt geöffnet und ein Teil

des Ovars mit einer feinen Pinzette entnommen. Die Wunde wurde abschließend mit einem medizinischen Seidenfaden zweifach genäht. Hypothermal anästhesierte Tiere erwachten recht schnell, sobald man ihre Körpertemperatur erwärmte. Mit Tricaine betäubte Tiere wurden in speziellen Becken gelagert, in denen sie nicht ertrinken konnten, weil diese Tiere erst nach 1–2 Stunden wieder bei Bewusstsein waren. Nach der OP wurden die Tiere für 5–10 Tage isoliert gehalten, danach wurden sie zu den Artgenossen in die großen Becken umgesetzt.

Zur Separation der Oocyten wurden die entnommenen Ovarlappen mit feinen Pinzetten zerteilt und in Oocyten-Ringerlösung (ORI) mit Collagenase (1,5 mg/ml, Serva) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach dem Abdauen des anhaftenden Bindegewebes wurden die Oocyten in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem ORI für 10 Minuten inkubiert, um noch anhaftende Follikelzellen abzulösen, und in ORI gewaschen. Für eine Injektion von RNA wurden intakte, gleichmäßig pigmentierte Oocyten der Stadien V und VI (Dumont 1972) aussortiert und in Kultur-ORI (Kul-ORI) bei 14 °C in einem Brutschrank gelagert.

Für die heterologe Expression von epithelialen Natriumkanälen wurde den Oocyten cRNA über eine feine Glaskapillare mit einem Mikroinjektor (Drummond Scientific) injiziert. Es wurden cRNAs, die  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  Untereinheiten des ENaCs, aus dem *Xenopus* Nephron (xENaC) kodieren, injiziert. Die cRNA wurde unter Mineralöl pipettiert und in die mit Mineralöl gefüllten Glaskapillare aufgezogen. Den Oocyten wurde je ein Volumen von 27,6 nl injiziert. Danach wurden die Zellen in einer  $\text{Na}^+$ -armen Lösung ( $\text{Na}_{\text{arm}}$ -Kul-ORI) im Brutschrank aufbewahrt. Messungen konnten ein bis drei Tage nach der Injektion durchgeführt werden.

Um Einzelkanalableitungen an der Membran durchführen zu können, musste die Vitellinhülle der Oocyten entfernt werden. Dazu wurden die Oocyten zunächst in einer hyperosmotischen Lösung (ORI plus 400 mMol Mannitol) inkubiert, um ihnen Wasser zu entziehen. Durch das Schrumpfen der Zelle löste sich die Vitellinhülle von der Membran ab und konnte anschließend mit feinen Pinzetten unter einem Binokular entfernt werden. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als „Pellen“ der Oocyten.

## 2 Verwendete Lösungen

### 2.1 Ussingkammer und transepitheliale Potentialmessungen

Während der Messungen kamen unterschiedliche Lösungen bei der Perfusion der Kammern zum Einsatz. Zur Messung des transepithelialen Potentials über die gesamte Lunge wurden die gleichen Lösungen benutzt wie für die Ussingkammer-Messungen. In der folgenden Tabelle (Tab. II-1) sind diese Lösungen tabellarisch aufgeführt.

*Tabelle II-1: Zusammensetzung verschiedener Lösungen zur Perfusion der Xenopus-Lunge*

in mM							
Lösung	NaCl	KCl	MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	HEPES	Glucose	NMDG
NRS	100	3	1	1	5	10	--
Na <sup>+</sup> -frei	--	3	1	1	5	10	100
Ca <sup>2+</sup> -frei	100	3	1	--	5	10	--
hoch-Na <sup>+</sup>	200	3	1	1	5	10	--
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	CaSO <sub>4</sub>	HEPES	Glucose	NMDG
Cl <sup>-</sup> -frei	50	1,5	1	1	5	10	--

In Experimenten, in denen unter hyperosmolaren Bedingungen gemessen wurde (hoch-Na<sup>+</sup>, 427 mOsmol), enthielt die basolaterale Lösung nur 100 mM Na<sup>+</sup>. Die Osmolarität wurde, der apikalen Lösung entsprechend, mit NMDG oder Mannitol ausgeglichen. Gleiches galt für apikale Lösungen, sofern die Na<sup>+</sup>-Konzentration nicht 200 mM betrug. NRS: normal Ringer's solution; NMDG: n-Methyl-d-Glucamin.

In manchen Experimenten kamen Cl<sup>-</sup>-freie Lösungen zum Einsatz (Tab. II-1). Die Osmolarität dieser Lösung wurde mit Mannitol ausgeglichen.

Auf Abweichungen der in Tabelle II-1 aufgeführten Rezepturen wird an betreffender Stelle hingewiesen. Der pH-Wert wurde mit Trizma und HCl auf 7,4 eingestellt (mit Ausnahme der Cl<sup>-</sup>-freien Lösung, bei der H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zum Titrieren des pH benutzt wurde) und die Temperatur der Lösungen entsprach immer der umgebenden Raumtemperatur (20–23 °C). Alle genannten Chemikalien, mit Ausnahme von NMDG (n-Methyl-d-Glucamin, Sigma), wurden von Fluka bezogen.

## 2.2 Oocyten und patch-clamp

Die Lösungen für die Präparation und Aufbewahrung der Oocyten sind in Tabelle II-2 zusammengefasst. ORI steht für Oocyten-Ringer, Kul-ORI für Kultur Oocyten-Ringer und diente zur Aufbewahrung entnommener Oocyten, Na<sub>arm</sub> steht für eine Na<sup>+</sup>-arme Lösung, in der die injizierten Oocyten aufbewahrt wurden. Der pH-Wert wurde ebenfalls mit Trizma respektive HCl auf 7,4 eingestellt.

Für die patch-clamp Messungen, sowie für das „Pellen“ der Oocyten wurden die in Tabelle II-3 angegebenen Lösungen benutzt. Der pH-Wert der Badlösung und der Pelllösung wurde auf 7,4 eingestellt.

*Tabelle II-2: Folgende Lösungen kamen bei der Präparation der Oocyten zum Einsatz*

Lösung	in mM							
	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	HEPES	NMDG	Na <sup>+</sup> -Pyruvat	Penicillin	Streptomycin
ORI	90	1	2	5	--	--	--	--
Kul-ORI	90	1	2	5	--	2,5	0,06	0,02
Na <sub>arm</sub>	10	1	2	5	80	2,5	0,06	0,02

*Tabelle II-3: Zusammensetzung der verwendeten Bad- und Pipettenlösungen in cell-attached Messungen*

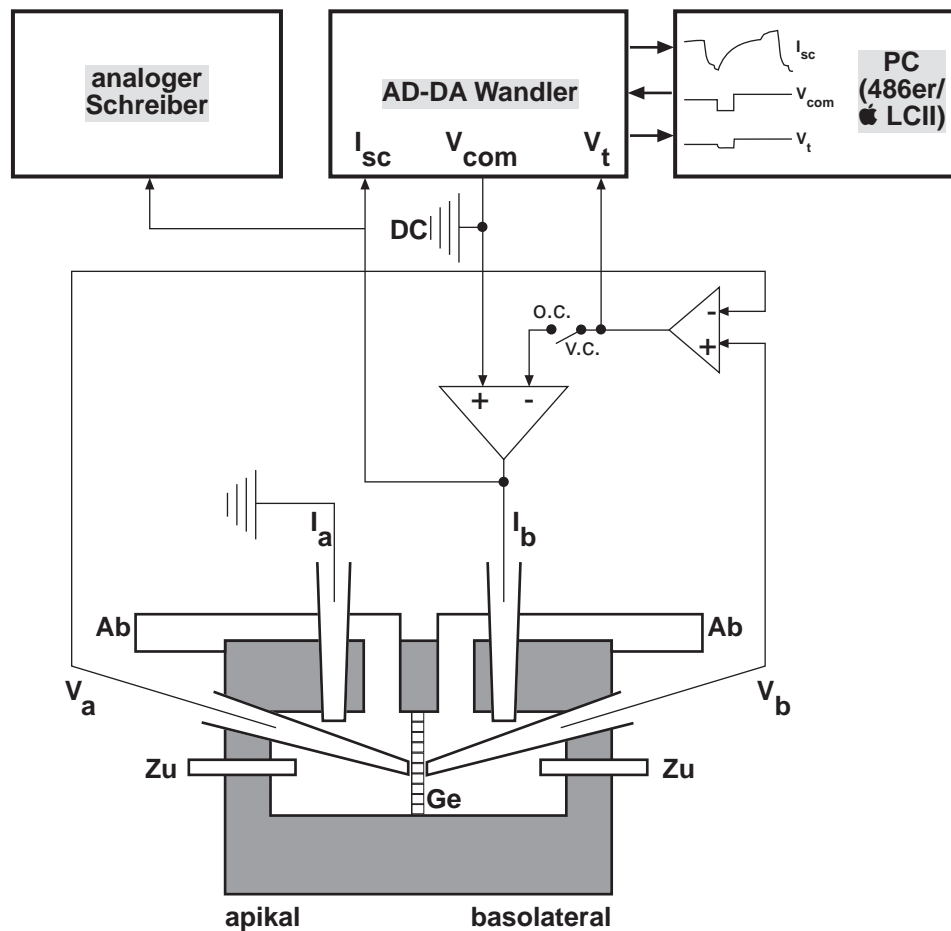
Lösung	in mM				
	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	HEPES	Mannitol
Badlsg.	5	90	1	5	--
Pipettenlsg.	100	--	1	--	--
Pelllsg.	5	90	1	5	400

Eine detaillierte Auflistung der benutzten Substanzen und Pharmaka, sowie deren Bezugsquellen befindet sich im Anhang.

### 3 Versuchsaufbauten und elektrische Messverfahren

#### 3.1 Ussingkammer

Präparierte Gewebe (siehe Abschnitt 1.3.1) wurden zur Messung in eine aus Plexiglas gefertigte Ussingkammer eingespannt. Das Gewebe teilte die Kammer in zwei Kompartimente und durch entsprechend platzierte Elektroden konnten Ladungsverschiebungen über das Epithel (transepitheliale Ionenströme) gemessen werden. Die benutzten Kammern ermöglichten eine permanente Perfusion der beiden Kammerhälften, sowie Lösungswechsel während laufender Messungen (Abb. II-2).



**Abb. II-2:** Schematischer Aufbau der Ussingkammer mit der Lage der Elektroden, sowie des gesamten Messstands. Ab, Abfluss; DC, Gleichspannung (Spannungsquelle); Ge, Gewebe;  $I_a$ , apikale Stromelektrode;  $I_b$ , basolaterale Stromelektrode;  $I_{sc}$ , Kurzschlussstrom; o.c., open-circuit; v.c., voltage-clamp;  $V_a$ , apikale Spannungselektrode;  $V_b$ , basolaterale Spannungselektrode;  $V_{com}$ , Klemmpotential;  $V_t$ , trans-epitheliales Potential; Zu, Zulauf.

Es bestand die Möglichkeit, an zwei Messständen parallel zu messen, wobei sich die Aufbauten der beiden Messstände ähnelten. In der Kammer befanden sich zwei gewebnsnahe Elektroden zur Messung des transepithelialen Potentials ( $V_t$ ), sowie zwei gewebnsferne Elektroden, über die ein Strom appliziert wurde, der das gemessene Potential ( $V_t$ ) auf 0 V kurzschloss (Abb. II-2). Zu Beginn einer jeden Messung wurde im open-circuit mode  $V_t$  gemessen. Nach ca. 2–5 Minuten wurde das Potential auf 0 V geklemmt (short-circuit mode). Dabei wurde über einen Regelkreis ein Strom appliziert, der dem durch das Epithel fließenden Strom entsprach, diesem aber entgegengerichtet war. Dieser Strom wird als short-circuit current ( $I_{sc}$ ) bezeichnet und wurde kontinuierlich aufgezeichnet. Zur Ermittlung des transepithelialen Widerstands ( $R_t$ ) wurde ein Spannungspuls definierter Größe appliziert (2 mV) und die Auslenkung des Stromes darauf aufgezeichnet. Über das Ohm'sche Gesetz konnte so der Widerstand berechnet werden. Der amilorid-sensitive Anteil des  $I_{sc}$  ( $I_{ami}$ ) wurde durch die apikale Superfusion von 10  $\mu$ M Amilorid bestimmt, in einigen Fällen wurde in der apikalen Lösung  $Na^+$  gegen NMDG ausgetauscht, um den  $Na^+$  abhängigen Ionenstrom ( $I_{Na}$ ) zu bestimmen.

Zur Datenerfassung diente zum einen ein Rauschverstärker mit ausgelagerter Spannungsklemme (nach van Drissche und Erlj, 1983). Hier wurden die Messsignale von einem PC (486er) mit einer Digitalisierungskarte und einem analogen Kipp & Zonen Zweikanalschreiber aufgezeichnet. Zum anderen wurde ein voltage-clamp Verstärker, bei dem es sich um einen Eigenbau handelte (Hohenheim), verwendet. Diese Messdaten wurden mittels eines MacLab interfaces digitalisiert und auf einem Macintosh (Apple LCII) gespeichert. Zusätzlich wurden die Daten ebenfalls mit einem analogen Zweikanalschreiber dokumentiert (Philips). Die Ussingkammern und Vorverstärker befanden sich innerhalb eines Faradaykäfigs und waren zudem auf einer mit Pressluft schwingungsgedämpften Platte gelagert. Verstärker, Schreiber und Rechner befanden sich außerhalb des Messstandes.

### 3.1.1 Elektroden

Als Elektroden dienten chlorierte Silberdrähte (Ag/AgCl-Elektroden), die in eine 1 M KCl Lösung getaucht, über 1 M KCl/Agarbrücken Kontakt zur Kammerlösung hatten. Als Halter wurden angepasste 200  $\mu$ l Pipettenspitzen verwendet. Über die gewebnsfernen Stromelektroden

( $I_a$  und  $I_b$ , siehe Abbildung II-2) konnte das transepitheliale Potential, welches durch  $V_a$  und  $V_b$  gemessen wurde, kurzgeschlossen werden. Die Formen der verwendeten Pipettenspitzen für Strom- bzw. Spannungselektroden unterschieden sich voneinander. Es wurden nur Paarelektroden benutzt, deren Eigenpotential unter 1,0 mV betrug.

### 3.1.2 Auswertung und Vorzeichenkonvention

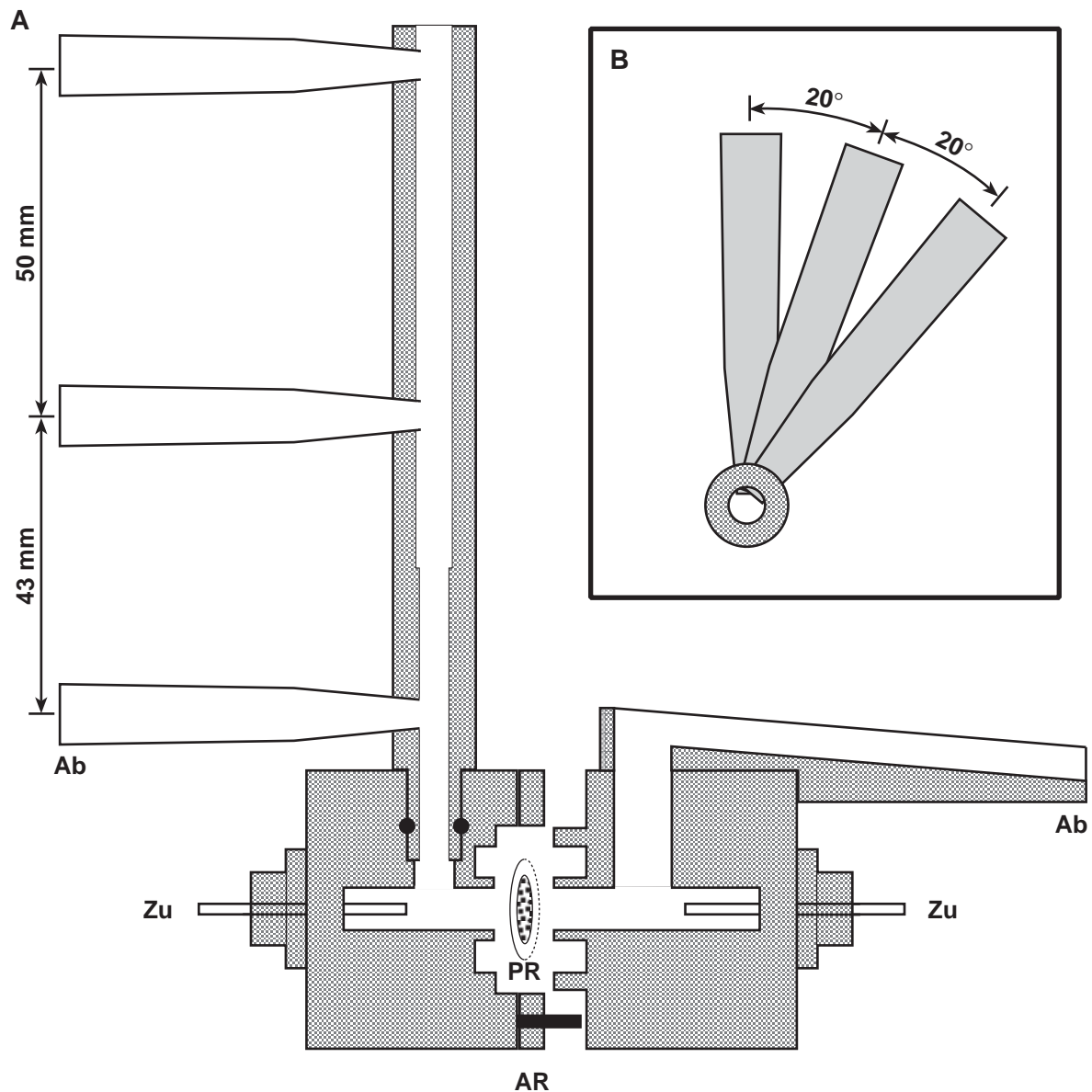
Alle gemessenen Daten wurden von einem PC aufgezeichnet. Strommessungen an Lungengewebe konnten als ASCII files in Origin bzw. Excel importiert werden, mit deren Hilfe das Layout für Abbildungen erstellt wurde. Wirkungskinetiken wurden in Origin mit den darin enthaltenen fitting-Routinen durchgeführt. Entsprechende Daten wurden nach einer Hill-Gleichung gefittet, wobei die Summe der niedrigsten Fehlerquadrate ( $\chi^2$ ) als Kriterium galt.

Der durch die Epithelien geflossene Nettostrom wurde als Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) angegeben. Dabei entspricht ein positiver  $I_{sc}$  einem Kationen-Nettostrom von apikal nach basolateral, bzw. einem Anionen-Nettostrom von basolateral nach apikal, und wird als „Einwärtsstrom“ bezeichnet. Die positiven Ströme sind in den Abbildungen als Ausschläge nach oben dargestellt.

## 3.2 Modifizierte Ussingkammer

Der grundlegende Aufbau, die Handhabung der Gewebe, sowie der Messaufbau und die Datenerfassung entspricht den Angaben unter 3.1. Mit der hier vorgestellten Kammer wurden Einflüsse mechanischer Belastung auf das Lungenepithel untersucht. Gefertigt wurde die Kammer auf Basis des in Abb. II-2 vorgestellten Kammertyps. Hauptunterschied ist der als Abfluss dienende Kamin auf der apikalen Seite, wobei durch eine Änderung der Abflusshöhe während der Messung ein hydrostatischer Druck auf das Gewebe erzeugt werden konnte (Abb. II-3). Der niedrigste Abfluss entsprach unveränderten Bedingungen, wie sie bereits vor dem Umbau der Kammer herrschten (apikaler Abfluss war leicht erhöht gegenüber dem basolateralen, ca. 2 mm). Wurde dieser Abfluss durch einen Gummistopfen verschlossen, stieg der Flüssigkeitspegel in

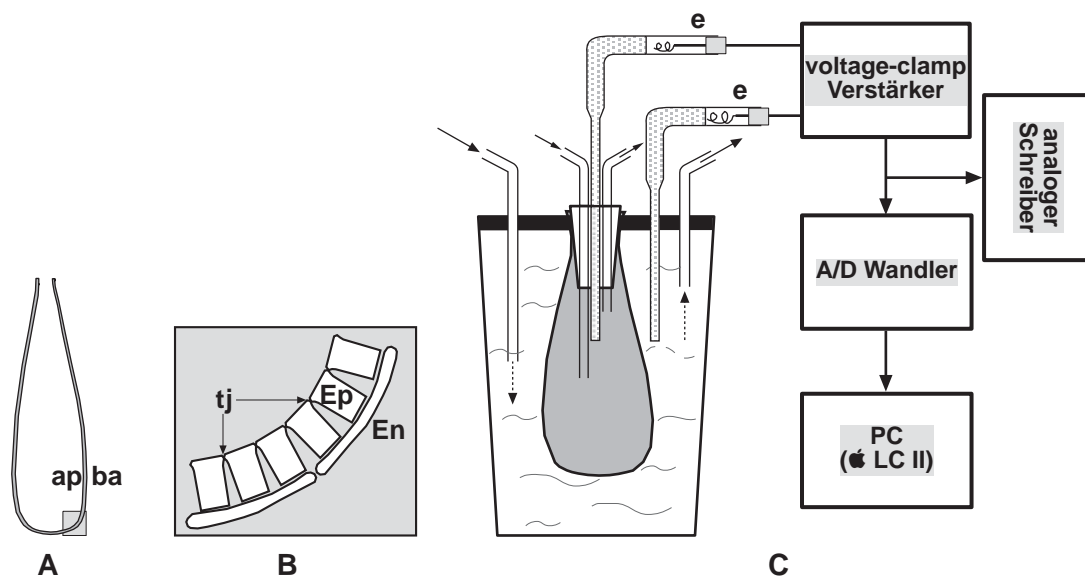
dem Kamin um 43 mm an, was einem Druckanstieg von 43 mbar auf der apikalen Seite entsprach (wurde als 5 cm bezeichnet). Der Pegel konnte in einem weiteren Schritt um abermals 50 mm erhöht werden – das entspricht einer Druckerhöhung von insgesamt 93 mbar. Die benutzten Elektroden entsprachen denen, wie sie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben worden sind. Die Vorzeichenkonvention entspricht ebenfalls der, wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben.



**Abb. II-3:** Maßstabgetreuer Längsschnitt **(A)** durch eine Ussingkammer mit einem erhöhten Kamin auf der apikalen Seite (Maßstab annähernd 1:1). Durch das Variieren der Abflusshöhe konnte innerhalb der Kammer ein Druck auf das Gewebe erzeugt werden (hier auf der apikalen Seite). Ab: Abfluss; AR: Abstandsring; PR: Plexiglasring; Zu: Zulauf. **B** Aufsicht auf den aus Plexiglas gefertigten Kamin.

### 3.3 Transepitheliale Potentialableitungen

Zusätzlich zu Versuchen in der Ussingkammer wurden Potentialableitungen an intakten nicht präparierten Lungen durchgeführt. Der genaue Versuchsaufbau ist in Abbildung II-4 dargestellt. Die Lungen wurden mittels eines konisch geschliffenen Plexiglasstopfens, der in den Bronchus eingeführt wurde, in einer Plexiglasplatte, die eine passende konische Bohrung besaß, befestigt. Über kleine Bohrungen in dem Stopfen konnten feine Kanülen für die Perfusion und eine Elektrode im inneren Hohlraum der Lunge platziert werden. Die gemessenen Potentiale wurden mit Hilfe des voltage-clamp Verstärkers (Hohenheim) im open-circuit gemessen und konnten anschließend ebenfalls von einem PC (Apple LCII) aufgezeichnet werden. Die Aufzeichnung der Daten war identisch zu der in Abschnitt 3.1 beschriebenen Prozedur. Zur optischen Kontrolle wurde das Potential zusätzlich auf einem Schreiber protokolliert. Der Versuchsaufbau befand sich ebenfalls innerhalb eines Faradayschen Käfigs, die Komponenten zur Verstärkung bzw. Aufzeichnung außerhalb.



**Abb. II-4:** Schematische Abbildung zu Potentialmessungen an intakten Lungen. **A** Definition der Symmetrie, ap: apikal; ba: basolateral. **B** Schematische Ausschnittsvergrößerung aus A. En: Endothel; Ep: Epithel; tj: tight junctions. **C** Versuchsaufbau mit eingespannter Lunge. Es bestand die Möglichkeit, sowohl die Kammer als auch die Lunge zu perfundieren und somit die Lösungen während der Messung auszutauschen (feine Pfeile). e: Elektrode.

### 3.3.1 Elektroden

Auch hier wurden Ag/AgCl-Elektroden benutzt, die über Agarbrücken Verbindung zur Umgebungslösung hatten. Die Referenzelektrode bestand aus einer 1 M KCl-Agarbrücke (Polyethylen-schlauch, 1,22 mm Außendurchmesser, Roth), die in den inneren Hohlraum der Lunge eingeführt wurde, und einer 10  $\mu$ l Pipettenspitze, die als Halterung für den chlorierten Silberdraht diente. Der Silberdraht selbst war in 1 M KCl Lösung eingetaucht. Die Messelektrode befand sich in der umgebenden Lösung und war identisch mit den Elektroden aus den Ussingkammer-Experimenten. Benutzt wurden ebenfalls nur Elektroden mit einem Eigenpotential unter 1 mV. Zur Erfassung der Messdaten diente der gleiche Versuchsaufbau wie in Abschnitt 3.1.

### 3.3.2 Auswertung und Vorzeichenkonvention

Die Auswertung der Daten erfolgte weitestgehend wie bereits in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Das gemessene transepitheliale Potential ( $V_{\text{lung}}$ ) ist negativ und wird auch als negatives Potential angegeben. Ein negatives Potential entspricht somit einer Nettobewegung von Kationen aus dem inneren Hohlraum der Lunge (apikal) nach außen (basolateral, siehe Abb. II-4).

### 3.4 Patch-clamp

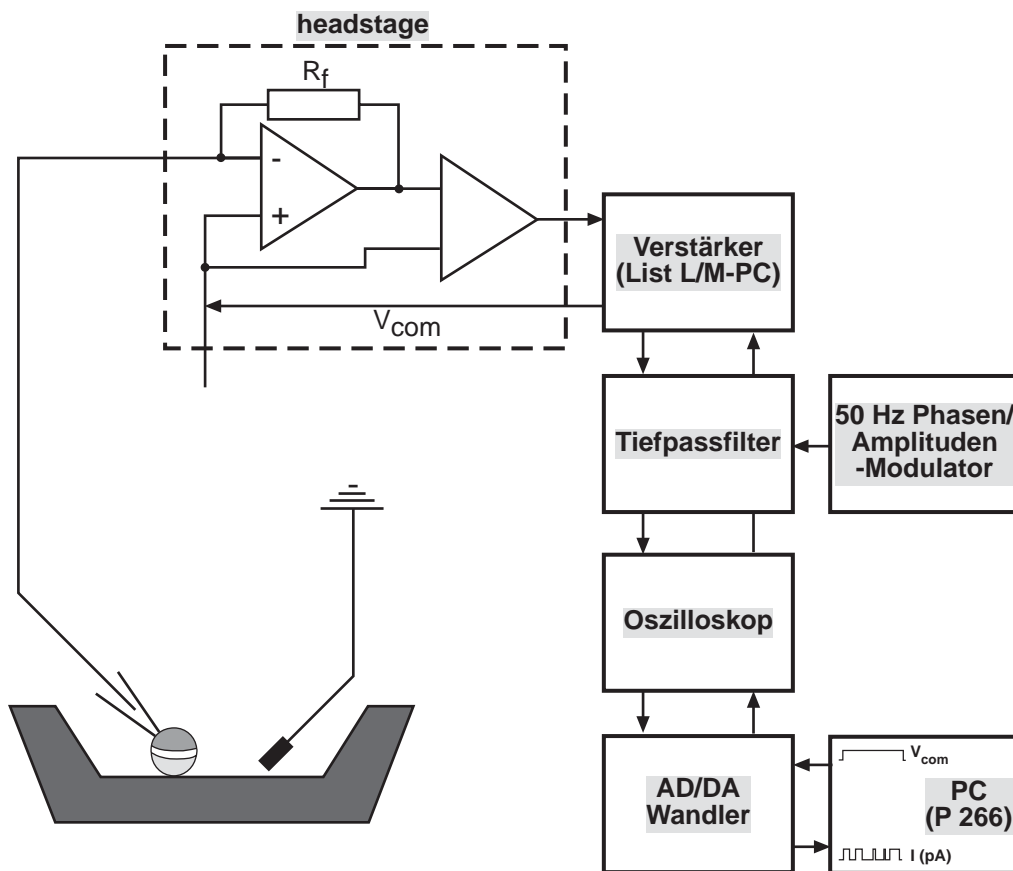
Die Einzelkanalableitungen exprimierter Kanäle in Oocyten erfolgte unter optischer Kontrolle mittels eines Inversmikroskops (Axiovert 35, Zeiss) bei 400facher Endvergrößerung. Die Leuchte des Mikroskops wurde während der Messungen ausgeschaltet, da sie sonst sehr starke Störungen von 50 Hz induzierte.

Zur Aufnahme der Oocyten diente eine aus Plexiglas gefertigte Messkammer mit einer Bohrung von 1 cm Durchmesser. Verschlossen wurde die Kammer mit einem runden Deckgläschen, welches mit Silikon befestigt wurde. Durch seitliche Bohrungen in der Messkammer konnte bei Bedarf die Badlösung ausgetauscht werden. Während laufender Messungen/Aufzeichnungen wurde darauf allerdings verzichtet, da die angeschlossene Pumpe zum Absaugen der Lösung starke Störungen induzierte. Die Kammer wurde in einer Aluminiumplatte fixiert, die auf einem Kreuztisch (Märzhäuser, Wetzlar) gelagert war.

Die headstage war an einem Mikromanipulator (Narishige, Tokyo) befestigt, mit dessen Hilfe die Pipette auf die Zelle aufgesetzt wurde. Dieser wiederum war auf einem weiteren Mikromanipulator befestigt, über den mittels Mikrometerschrauben die grobe Annäherung an die Oocyte erfolgte. Alle Komponenten befanden sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch innerhalb eines Faradayschen Käfigs.

Die Messsignale wurden mit einem patch-clamp Verstärker der Firma List-Medical (L/M-PC) verstärkt (meist bei 200facher Verstärkung des Eingangssignals). Ein 8-poliger Tiefpassfilter (Frequency Devices, Haverhil) diente zur Filterung der Messsignale. Für die Messungen an exprimierten ENaCs, die relativ niedrige Leitfähigkeiten haben (4–6 pS), wurde bei einer Frequenz von 100 Hz gefiltert. Ein Oszilloskop (Tektronix 2230) diente der Kontrolle während der Messungen. Da alle Messungen von mehr oder weniger starken 50 Hz Störungen überlagert waren, kam in den meisten Fällen ein Gerät zum Einsatz, mit dessen Hilfe 50 Hz-Schwingungen erzeugt werden konnten. Diese wurden in den Differenzverstärkereingang B des Filters eingespeist. Geling es, die Amplitude und Phase der eingespeisten Schwingungen der Störungen anzupassen, so konnten diese reduziert, wenn nicht eliminiert werden.

Digitalisiert wurden die Daten mit einem AD/DA Interface der Firma Axon Instruments (Digi-Data 1200). Die Aufzeichnung (2 kHz) und Auswertung der Daten erfolgte auf einem Pentium 266 mit Hilfe des pClamp Software Pakets (pStat, fetchan, clampex und clampfit).



**Abb. II-5:** Schematische Skizze des patch-clamp Messaufbaus. Die headstage mit ihrem Regelkreis gilt als Herzstück der Messapparatur.  $R_f$ , Rückkopplungswiderstand;  $V_{com}$ , Kommandospannung, die vorgegeben wird.

### 3.4.1 Patch-Pipetten

Die Pipetten wurden aus Borsilikatglaskapillaren (Hilgenberg) mit einer Länge von 1 m gefertigt. Die Kapillaren hatten einen Außendurchmesser von 1,6 mm, einen Innendurchmesser von 1,2 mm und wurden in 6–7 cm lange Stücke gebrochen. Sie wurden mit einem Vertikalpuller (Narishige, Tokyo) in zwei Stufen ausgezogen. Geeignete Pipetten hatten in einer 100 mM Salzlösung einen Widerstand zwischen 4 und 7 M $\Omega$ . Auf eine Feuerpolierung und Beschichtung

der Kapillaren wurde verzichtet. Die Kapillaren wurden vor der Messung frisch ausgezogen und mit der Pipettenlösung so weit befüllt, dass der Silberdraht etwa 0,5–1 mm in die Lösung eintauchte. Der Draht wurde in 0,1 M HCl bei niedriger Spannung (ca. 2 mV) chloriert und war in einem Pipettenhalter befestigt. Durch den Pipettenhalter bestand die Möglichkeit, über ein U-Rohr einen Über- bzw. Unterdruck an der Pipette anzulegen.

Die Badelektrode bestand aus einem chlorierten Silberdraht (Ag/AgCl) und stand über eine 100 mM Agar/KCl Brücke mit der Badlösung in Verbindung. Als Halter dienten 10 µl Pipettenspitzen (Abimed) die ca. 1 cm hoch mit KCl-Agar (100 mM KCl) gefüllt waren.

### 3.4.2 Auswertung und Vorzeichenkonvention

Die Patch-clamp Daten wurden auf Grundlage des von Axon mitgelieferten Softwarepakets bearbeitet und ausgewertet. Das Layout der Abbildungen wurde in Origin erstellt. Für die Berechnung der Leitfähigkeiten wurden die Amplituden der Ströme zwischen –40 und 0 mV Spannung aufgetragen, linear gefittet und die Steigung der Geraden bestimmt. Die Permeabilität für Na<sup>+</sup> wurde mittels der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung für Strom bestimmt (Gleichung 1). Die gleiche Formel wurde benutzt um die I/V Kurven zu fitten. Die Offenwahrscheinlichkeiten wurden nach Gleichung 2 berechnet, wobei eine halbmaximale Auslenkung der Amplitude als Kriterium für ein zu wertendes Ereignis galt.

#### Gleichung 1: Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung für Ionenströme

$$I_x = P_x z_x^2 \frac{V_m F^2}{R T} \frac{[X]_i - [X]_o \exp(-z_i F V_m / R T)}{1 - \exp(-z_i F V_m / R T)}$$

$I_x$  : durch Ion „x“ getragener Strom

$P_x$  : Permeabilität

$z_x$  : Ladung des Ions

$V_m$  : Membranpotential

R : Gaskonstante

F : Faradaykonstante

T : absolute Temperatur

z : Wertigkeit des Ions

i/o : intra/extrazelluläres Kompartiment

[X] : Ionenkonzentration des Ions „X“

**Gleichung 2:** Formel nach der die relative Offenwahrscheinlichkeit ( $NP_o$ ) berechnet wurde.

$$NP_o = \frac{(t_1 * 1) + (t_2 * 2) + (t_n * n)}{T_{(t_1 + t_2 + t_n)}}$$

- t : Verweildauer im jeweiligen Level  
 n : Anzahl der sichtbaren Levels einer Messung  
 T : Gesamtdauer der Messung

Die angegebenen Spannungen entsprechen der allgemeinen Konvention (Bertl et. al., 1992), wobei Ströme von Kationen ins Cytoplasma als Einwärtsströme definiert sind und in den Abbildungen einer Auslenkung nach unten entsprechen. Die angegebene Membranspannung ( $V_{mem}$ ) bezieht sich auf die cytoplasmatische Seite, gegenüber der extrazellulären Seite.  $V_{mem}$  der Oocyten wurde teilweise nach Beendigung einer cell-attached Messung im current-clamp Modus bestimmt, allerdings schwankten die Werte zum Teil ziemlich stark und eine genaue Bestimmung war nicht möglich. Die in einigen Fällen gemessenen Werte von  $V_{mem}$  an den depolarisierten Oocyten lagen im Bereich von  $0 \pm 5$  mV, wurden aber gleich 0 mV gesetzt (Canessa et al. 1994). Somit wurde eine Kommandospannung ( $V_{pip}$ ) von + 60 mV einem Membranpotential von – 60 mV gleichgesetzt.

#### 4 Statistik

Alle Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte  $\pm$  SEM (standard error of the mean). Die Anzahl der durchgeführten Experimente einer Messreihe ist mit „n“ angegeben. „N“ markiert die Anzahl der Oocyten-Donoren. Mit Hilfe des *t*-Tests wurde überprüft, ob sich Mittelwerte signifikant voneinander unterschieden. Dies erfolgte überwiegend anhand des gepaarten *t*-Tests; voneinander signifikant verschiedene Werte sind kenntlich gemacht. Voraussetzung für den *t*-Test ist eine Normalverteilung der Daten. Diese wurde mittels Probitplot, bzw.  $\chi^2$ -Test geprüft. Als Signifikanzgrenze galt mindestens  $p \leq 0,05$ .

### III. Ergebnisse

#### 1 ACTH-induzierte Veränderungen elektrophysiologischer Eigenschaften der *Xenopus*-Lunge

In den ersten Versuchen traten erhebliche Schwankungen in den gemessenen elektrophysiologischen Parametern der Epithelien auf ( $I_{sc}$ : Kurzschlussstrom;  $I_{ami}$ : durch Amilorid hemmbarer Teil des  $I_{sc}$ ;  $I_{Na}$ : Gesamt-Natriumstrom). Vor allem die Höhe des durch Amilorid hemmbaren Stromes ( $I_{ami}$ ) wies starke Schwankungen auf. In einigen Geweben konnten nur ca. 10 % des  $I_{sc}$  durch apikales Amilorid gehemmt werden, in manchen betrug der Anteil von  $I_{ami}$  95 %. Da das Hauptaugenmerk in der Studie der Untersuchung transepithelialer  $Na^+$ -Ströme galt, wurde versucht, die  $Na^+$ -Resorption über die Epithelien zu erhöhen. Dazu wurde den Donoren 48 und 24 Stunden vor der Entnahme der Lungen das Hormon ACTH (Adrenokortikotropes Hormon) subcutan in die dorsalen Lymphsäcke injiziert. Ziel war die *in vivo* Stimulation der Ausschüttung von Mineralkortikoiden aus den Nebennierenrinden. Eine Erhöhung der Steroidkonzentration im Blutplasma ACTH-injizierter Frösche konnte von Hanke und Kloas (1996) nachgewiesen werden. Einer anderen Arbeitsgruppe gelang es zudem, die *Xenopus*-Lunge als ein Zielorgan für Aldosteron, dem wichtigsten Mineralkortikoid, zu identifizieren (Fischer et. al., 1990). Durch die Injektion der Frösche sollte eine konstant hohe Expression  $Na^+$ -transportierender Proteine erreicht werden.

Für die eigentlichen Messungen wurden die präparierten Gewebe in der Ussingkammer von beiden Seiten mit NRS (normal Ringer's solution) superfundiert, woraufhin als erstes das transepitheliale Potential ( $V_p$ ) im open-circuit mode gemessen wurde. Nach einer kurzen Zeitspanne von ca. 3–5 Minuten wurde das Potential auf 0 Volt geklemmt und der dazu notwendige Strom kontinuierlich registriert ( $I_{sc}$ ). Der  $I_{sc}$  und der transepitheliale Widerstand ( $R_p$ ) unmittelbar nach dem Klemmen, sind als Initialwerte ( $_{ini}$ ) angegeben. Mittels eines Spannungspulses einer Amplitude von 2 mV sowie 2 Sekunden Dauer und der daraus resultierenden Stromauslenkung, konnte nach dem Ohm'schen Gesetz der Widerstand berechnet werden. Bis zum Erreichen eines konstanten steady-state verging eine Zeitspanne von 30–120 Minuten. Während dieser Zeit-

spanne war in der Regel ein Anstieg des  $I_{sc}$  zu beobachten, während  $R_t$  annähernd unverändert blieb (Tabelle III-1). Der amilorid-sensitive Teil des  $I_{sc}$  ( $I_{ami}$ ) wurde durch apikale Applikation von 10  $\mu$ M Amilorid ermittelt. Natrium-abhängige Ströme ( $I_{Na}$ ) wurden durch equimolare Substitution von  $Na^+$  durch NMDG (n-Methyl-d-Glucamin) bestimmt.

Die so ermittelten Ergebnisse wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Zusammenfassung repräsentativer Messwerte zu den grundlegenden elektrophysiologischen Parametern von unbehandelten (Kontrolle) und ACTH-behandelten Donoren ist in der folgenden Tabelle dargestellt (Tabelle III-1).

*Tabelle III-1: Einfluss von ACTH auf die elektrischen Parameter der Xenopus Lunge*

Parameter	Kontrolle	ACTH
$V_{t\_ini}$ [mV]	$-3,29 \pm 0,36$	$-6,90 \pm 0,41^{\ddagger}$
$R_{t\_ini}$ [ $\Omega \times cm^2$ ]	$325 \pm 21$	$377 \pm 34$
$R_t$ [ $\Omega \times cm^2$ ]	$343 \pm 23$	$362 \pm 13$
$I_{sc\_ini}$ [ $\mu A/cm^2$ ]	$10,44 \pm 0,68$	$21,57 \pm 1,12^{\ddagger}$
$I_{sc}$ [ $\mu A/cm^2$ ]	$11,68 \pm 0,96$	$29,38 \pm 1,42^{\ddagger}$
$I_{ami}$ [ $\mu A/cm^2$ ]	$8,16 \pm 1,04$	$22,13 \pm 1,06^{\ddagger}$
$I_{Na}$ [ $\mu A/cm^2$ ]	$17,14 \pm 1,30$	$28,35 \pm 1,19^{\ddagger}$
n	17	82

Die Werte wurden z.T. unmittelbar nach Beginn der Messung erfasst ( $_{ini}$ ), sowie nach Equilibrierung des Stromes.  $V_t$ , transepitheliales Potential;  $R_t$ , trans-epithelialer Widerstand;  $I_{sc}$ , short-circuit current;  $I_{ami}$ , amilorid-sensitiver Anteil des  $I_{sc}$ ;  $I_{Na}$ , durch die Substitution von  $Na^+$  ermittelter Strom. Gekennzeichnete Werte ( $^{\ddagger}$ ) sind hochsignifikant verschieden ( $p < 0,001$ ); Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Die Veränderungen, die durch die zweimalige Injektion der Tiere mit jeweils 1 nmol ACTH induziert wurden, waren beträchtlich. Alle Parameter, der Widerstand ausgenommen, waren deutlich erhöht. Hervorzuheben ist dabei die Steigerung des  $I_{ami}$  um ca. 170 % in den ACTH-

injizierten Tieren. Des Weiteren war eine Erhöhung des  $I_{ami}$  Anteils, gegenüber dem  $I_{Na}$  durch die Injektion, festzustellen (ca. 50 % in Kontrollen; ca. 80 % in ACTH-injizierten Tieren). Die Stimulation der Nebennierenrinde führte offenbar zu einer erhöhten Ausschüttung von Mineral-kortikoiden ins Blutplasma der Tiere. Die indirekten Folgen dieser *in vivo* Stimulation konnten anhand der signifikanten Erhöhungen der gemessenen elektrischen Parameter ( $I_{sc}$ ,  $I_{ami}$  und  $I_{Na}$ ) nachgewiesen werden.

### 1.1 Einfluss von ACTH auf die Wirksamkeit von second messenger am Beispiel cAMP

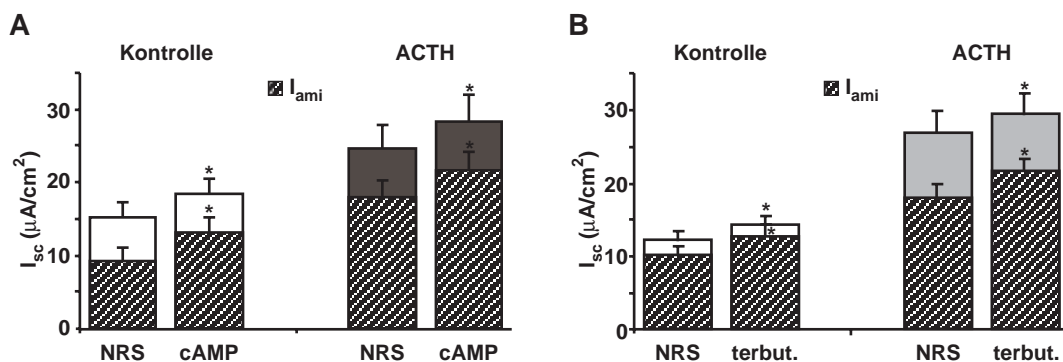
Es galt zu überprüfen, ob die Wirkung bestimmter Substanzen durch die ACTH-Injektionen beeinflusst werden. Die Lungenepithelien nicht-behandelter und ACTH-behandelter Frösche wurden dazu mit einer Lösung, die 100  $\mu\text{M}$  membrangängiges cpt-cAMP (8-(4-Chloro-phenylthio)-cAMP) und 1 mM IBMX, einen Inhibitor endogener Phosphodiesterasen enthielt (Cocktail), auf der basolateralen Seite superfundiert. In beiden Gruppen bewirkte die Applikation des Cocktails die gleiche Reaktion. Kurze Zeit nach Beginn der cpt-cAMP/IBMX Superfusion konnte ein Anstieg des  $I_{sc}$  beobachtet werden. In den Kontrollgeweben war ein Anstieg von  $15,22 \pm 2,01$  auf  $18,50 \pm 1,93 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n = 6$ ) zu verzeichnen, in den Geweben ACTH-behandelter Donoren ein Anstieg von  $24,58 \pm 3,17$  auf  $28,40 \pm 3,53 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n = 5$ ). Eine nachfolgende Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Amilorid auf der apikalen Seite diente zur Ermittlung des amilorid-sensitiven Stroms.  $I_{ami}$  wurde dabei vor und nach der Applikation von cpt-cAMP/IBMX ermittelt. In der Kontrollgruppe erhöhte sich  $I_{ami}$  von  $9,17 \pm 1,88$  auf  $13,11 \pm 2,09 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n = 6$ ,  $p < 0,001$ ). In ACTH-vorbehandelten Geweben wurde ein Anstieg von  $17,96 \pm 2,21$  auf  $21,53 \pm 2,67 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  gemessen ( $n = 5$ ,  $p < 0,01$ ). Eine Zusammenfassung der ermittelten Werte befindet sich in Abbildung III-1A. Die Widerstände der Epithelien blieben in beiden Gruppen gleich und änderten sich auch durch die Applikation des Cocktails nicht wesentlich.

In beiden Gruppen konnte gezeigt werden, dass der Anstieg des  $I_{sc}$  parallel zu einem Anstieg des  $I_{ami}$  erfolgte. In Kontrollversuchen an ACTH-injizierten Donoren, in denen cpt-cAMP/IBMX in Anwesenheit von apikalem Amilorid superfundiert wurde, waren keine signifikanten Veränderungen zu beobachten ( $I_{sc}$  in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ :  $2,61 \pm 2,80$  ohne Cocktail und  $2,75 \pm 3,09$  nach Applikation,  $n = 5$ ).

Die Wirkung des beobachteten Effektes beschränkte sich somit auf den amilorid-sensitiven Strom.

## 1.2 Einfluss von ACTH auf die Wirkung von Liganden am Beispiel des $\beta$ -adrenergen Agonisten Terbutalin

Die Wirkung des  $\beta$ -adrenergen Agonisten Terbutalin wurde ebenfalls an Epithelien unbehandelter und ACTH-behandelter Frösche untersucht. Terbutalin wurde in den Versuchen auf der basolateralen Seite der Gewebe in einer Konzentration von 100  $\mu$ M appliziert. In beiden Gruppen konnte der gleiche Effekt beobachtet werden – eine Stimulation des  $I_{sc}$ . Die Wirkung des  $\beta$ -adrenergen Agonisten war nicht so ausgeprägt, wie die des cAMP/IBMX-Cocktails, allerdings ergab ein Vergleich der Mittelwerte mittels des gepaarten *t*-Tests ein Signifikanzniveau von  $p < 0,01$  in beiden Gruppen (Abb. III-1B). In Epithelien der Kontrollgruppe konnte  $I_{ami}$  um ca. 25 % erhöht werden. Die Steigerung des  $I_{ami}$  innerhalb der ACTH-vorbehandelten Epithelien betrug 22 %. Die Erhöhung konnte somit auf eine Zunahme des amilorid-sensitiven Stroms zurückgeführt werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung III-1B dargestellt.



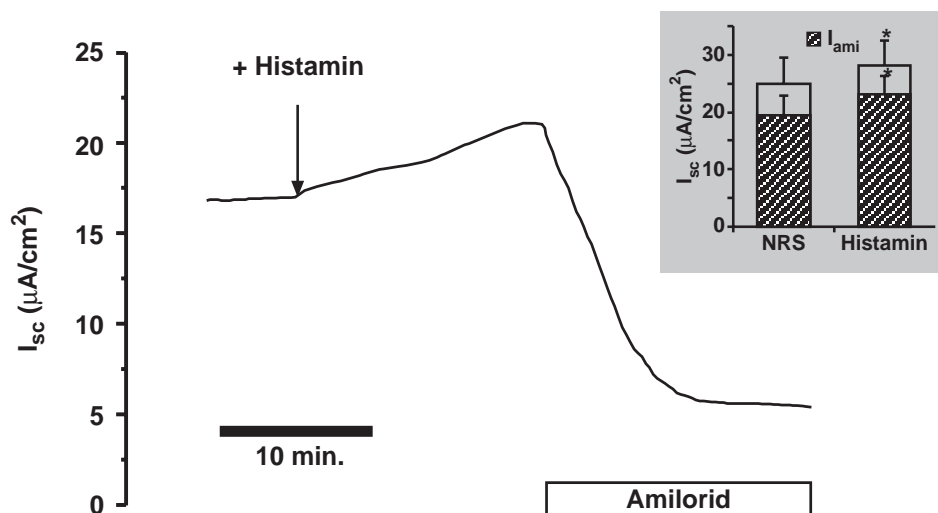
**Abbildung III-1:** Wirkung von ACTH auf die elektrischen Parameter. **A** Effekte von cAMP in Lungenepithelien nicht-injizierter (Kontrolle,  $n = 6$ ) und ACTH-vorbehandelter (ACTH,  $n = 5$ ) Donoren. **B** Vergleich der Wirkung von Terbutalin in Kontrollen ( $n = 8$ ) und ACTH-vorbehandelten Epithelien ( $n = 6$ ).  $I_{sc}$ , short circuit current;  $I_{ami}$ , amilorid-sensitiver Strom. Signifikant verschiedene Werte sind gekennzeichnet \*,  $p < 0,01$ .

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass die Injektion der Tiere zu einem Anstieg der trans-epithelialen Ionenströme führte, die zum größten Teil auf eine Steigerung des amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Stroms zurückzuführen sind. Des Weiteren wurde die Wirksamkeit der appli-zierten Substanzen durch die ACTH-Injektionen nicht beeinträchtigt.

In den Versuchen der im folgenden präsentierten Ergebnisse wurden ausschließlich die Lungen von ACTH-injizierten Fröschen verwendet.

## 2 Effekt von Histamin auf die transepitheliale Na<sup>+</sup>-Resorption

In den folgenden Versuchen wurde der Effekt von Histamin auf die Ionentransportrate des alveolaren *Xenopus*-Epithels untersucht. In Vorversuchen wurden verschiedene Konzentrationen auf der apikalen Seite der Gewebe getestet (10–1000  $\mu\text{M}$ ). Eine stufenweise Erhöhung der Histamin-Konzentration führte zu einem treppenförmigen Anstieg des  $I_{\text{sc}}$ , allerdings war in einigen Messungen mit zunehmender Dauer der Histamin-Exposition eine Abnahme des Histamin-Effektes zu erkennen – die Gewebe desensibilisierten. Zusammenfassend konnte ein halbmaximaler Effekt ( $\text{EC}_{50}$ ) bei einer Konzentration von 84  $\mu\text{M}$  ermittelt werden ( $n = 12$ ). Da in einigen dieser Versuche mit zunehmender Zeit ein Nachlassen der Histamin-Wirkung zu beobachten war, ist der ermittelte Wert nur bedingt aussagekräftig und diente in erster Linie zur Orientierung für nachfolgende Messungen. Weitere Experimente wurden mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  durchgeführt, einer Konzentration, bei der ein ausreichend deutlicher Effekt erzielt wurde. In allen Versuchen wurde Histamin zudem ausschließlich auf der apikalen Seite der Gewebe appliziert.



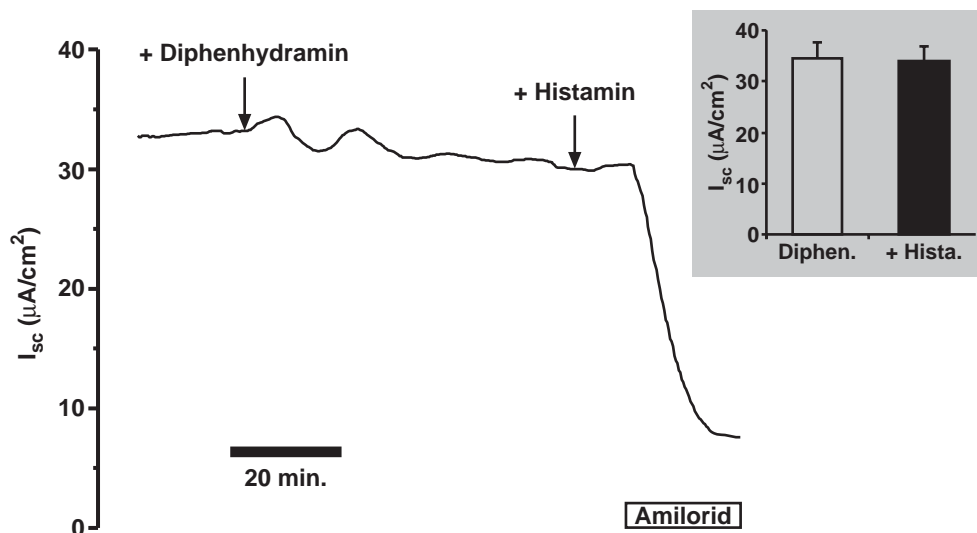
**Abbildung III-2:** Apikale Applikation von Histamin (100  $\mu\text{M}$ ). Histamin führte innerhalb von ca. 20 Minuten zu einer Erhöhung des  $I_{\text{sc}}$ . Der histamin-induzierte Anstieg erwies sich als amilorid-sensitiv. Wie zu sehen, konnte der überwiegende Teil des  $I_{\text{sc}}$  durch die zusätzliche Amilorid-Applikation (10  $\mu\text{M}$ ) gehemmt werden. Grau hinterlegt die statistische Auswertung von  $I_{\text{sc}}$  und  $I_{\text{ami}}$  aus 7 Experimenten (\*;  $p < 0,05$ ).

Kurze Zeit nach Superfusion mit Histamin konnte ein Anstieg des  $I_{\text{sc}}$  beobachtet werden (von

$25,04 \pm 4,40$  auf  $28,10 \pm 4,40 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $n = 7$ ). Nach 10–20 Minuten bildete sich schließlich ein neues Plateau. Die zusätzliche Applikation von  $10 \mu\text{M}$  Amilorid zu der Histaminlösung diente dem Ermitteln des amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Stroms (Abb. III-2). Gleichzeitig zum Anstieg des  $I_{\text{sc}}$  konnte eine Erhöhung des  $I_{\text{ami}}$  nachgewiesen werden (von  $19,53 \pm 3,24$  auf  $23,02 \pm 3,37 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ;  $n = 7$ ). Die Gabe von Histamin in Anwesenheit von Amilorid zeigte keinen signifikanten Effekt ( $10,62 \pm 3,49$  ohne und  $9,88 \pm 3,41 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  mit Histamin,  $n = 4$ ).

## 2.1 Effekt des Histamin-Antagonisten Diphenhydramin

Bekanntermaßen werden die meisten Histamineffekte, den Ionentransport betreffend, über  $\text{H}_1$ -Rezeptoren vermittelt. Um eine eventuelle Beteiligung dieser Rezeptoren an der Stimulation der  $\text{Na}^+$ -Resorption zu untersuchen, wurden Versuche mit dem  $\text{H}_1$ -Antagonisten Diphenhydramin durchgeführt. Dazu wurden die Epithelien für einen Zeitraum von mind. 30 Minuten mit  $100 \mu\text{M}$  Diphenhydramin superfundiert, bevor zusätzlich  $100 \mu\text{M}$  Histamin ins Perfusat zupipettiert wurden.



**Abbildung III-3:** Wirkung von Diphenhydramin ( $100 \mu\text{M}$ ), einem  $\text{H}_1$ -Antagonisten, auf den Effekt von Histamin ( $100 \mu\text{M}$ ). Alle Substanzen wurden apikal appliziert. In der zu sehenden Abbildung wurde der  $I_{\text{sc}}$  durch Diphenhydramin leicht gehemmt, Histamin zeigt unter diesen Bedingungen allerdings keinen Effekt. Die gemittelten Werte aus 4 Versuchen sind im Balkendiagramm dargestellt ( $p > 0,4$ ).

Durch Diphenhydramin wurden Fluktuationen im Kurzschlussstrom ausgelöst, die allerdings keine signifikante Wirkung zeigten ( $I_{sc}$  in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ : vor Diphenhydramin  $33,22 \pm 2,71$ , nach Diphenhydramin  $34,45 \pm 3,32$ ,  $n = 4$ ). Die zusätzliche Applikation von Histamin unter diesen Bedingungen vermochte den  $I_{sc}$  nicht zu erhöhen (nach Histamin:  $33,86 \pm 3,06 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $n = 4$ , Abb. III-3). Die Ergebnisse der Messungen deuten auf die Anwesenheit von  $H_1$ -Rezeptoren in der *Xenopus*-Lunge hin.

### 3 Purinerge Rezeptoren

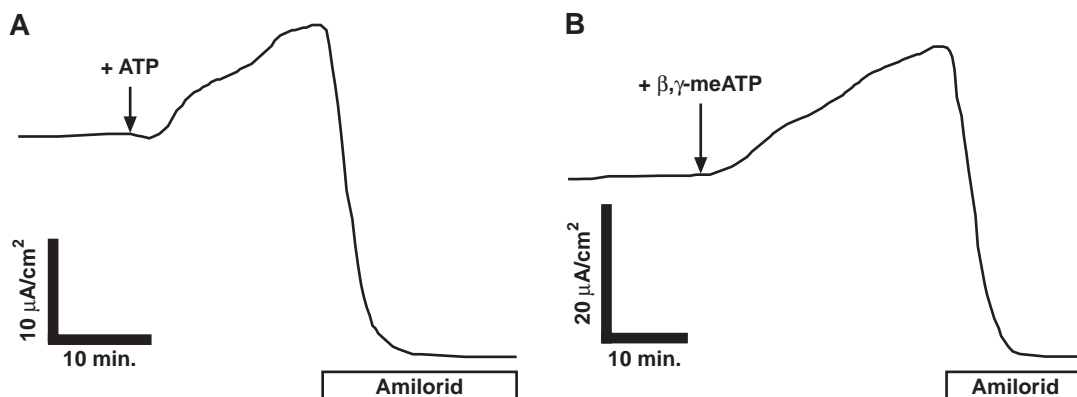
Wurden Trinucleotide (ATP, UTP) bzw. das Nucleosid Adenosin zu den Lungenpräparaten in die Ussingkammer dazugegeben, konnte ein Anstieg des gemessenen Stroms beobachtet werden. Die beobachteten Effekte deuten auf die Anwesenheit von so genannten purinergen Rezeptoren im Alveolarepithel von *Xenopus* hin, über die ATP, UTP und Adenosin den Ionentransport beeinflussen bzw. regulieren. Purine und Pyrimidine wurden in den letzten Jahren zunehmend als auto-/parakrine first messenger entdeckt, die lokal von Zellen ausgeschüttet werden können und ihre Wirkung über die genannten Rezeptoren ausüben. Man unterscheidet dabei verschiedene Typen. Die Hauptunterteilung erfolgt dabei in P1- und P2-Rezeptoren (Ralevic & Burnstock, 1998). Erste binden primär Adenosin, während P2-Rezeptoren Nucleotide, in erster Linie ATP und UTP, binden. Bei den P2-Rezeptoren unterscheidet man zusätzlich P2X- und P2Y-Rezeptoren. Erstgenannte sind unselektive, ligandenabhängige Kationenkanäle, während letztgenannte G-Protein-aktivierende Membranrezeptoren sind (Ralevic & Burnstock, 1998).

#### 3.1 P2-Rezeptoren

##### 3.1.1 ATP

Die Wirkung von ATP war konzentrations-abhängig. Eine schrittweise Erhöhung der ATP-Konzentration (1  $\mu$ M- 4 mM) führte zu einer stufenweisen Erhöhung des  $I_{sc}$ . Die halb-maximale Stimulation konnte bei 96  $\mu$ M ATP ( $EC_{50}$ ) berechnet werden. Dabei diente der ermittelte  $EC_{50}$  in erster Linie dazu, eine Konzentration für nachfolgende Messungen zu ermitteln. Eine pharmakologische Charakterisierung der Rezeptoren anhand dieser Experimente ist nicht sehr aussagekräftig – alle bekannten pharmakologischen Profile purinerge Rezeptoren entstammen Säugergewebe. In den folgenden Messungen wurde eine Konzentration von 200  $\mu$ M ATP appliziert. Die apikale Superfusion von 200  $\mu$ M ATP führte innerhalb von 30–40 Minuten zu einer Erhöhung des  $I_{sc}$  um  $27 \pm 2$  % ( $n = 6$ , Abb. III-4A). Die Erhöhung des  $I_{ami}$  war ähnlich ( $32 \pm 4,5$  %,  $n = 6$ ). Genaue Messwerte sind in der Tabelle III-2 wiedergegeben.

Die Wirkung von ATP konnte weder in Gegenwart von Amilorid, noch in Abwesenheit von apikalem  $\text{Na}^+$  ganz gehemmt werden. In einer  $\text{Na}^+$ -freien apikalen Lösung konnte ein Anstieg des  $I_{\text{sc}}$  von  $2,28 \pm 1,52$  auf  $3,58 \pm 1,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  gemessen werden ( $n = 4$ ,  $p < 0,005$ ). Wurde ATP unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen auf beiden Seiten und in Anwesenheit von Amilorid auf der apikalen Seite appliziert, konnte kein signifikanter Effekt gemessen werden ( $I_{\text{sc}}$  in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ :  $6,56 \pm 2,97$  ohne ATP und  $6,82 \pm 3,03$  mit ATP,  $n = 5$ ). Diese Beobachtung lässt auf eine Beteiligung von  $\text{Cl}^-$ -Ionen an dem beschriebenen Stromanstieg schließen. Dies bestätigte sich in Versuchen mit NPPB, einem  $\text{Cl}^-$ -Kanalblocker. Die Applikation von NPPB und die damit einhergehende Hemmung des  $I_{\text{sc}}$  deuten auf die Aktivität von apikalen  $\text{Cl}^-$ -Kanälen hin ( $I_{\text{sc}}$  ohne NPPB  $27,46 \pm 3,05$  und nach NPPB Applikation  $22,47 \pm 2,64 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $n = 4$ ). Zudem konnte der Effekt von ATP in Anwesenheit von Amilorid zu einem großen Teil mit NPPB weiter gehemmt werden ( $n = 2$ ).



**Abbildung III-4:** Wirkung von ATP und  $\beta,\gamma$ -meATP auf den  $I_{\text{sc}}$ . **A** Applikation von ATP (200  $\mu\text{M}$ , apikal). Die Anwesenheit von ATP führte zu einem deutlichen Anstieg des  $I_{\text{sc}}$ , der innerhalb von ca. 20–40 Minuten gesättigt war. Anschließende Applikation von Amilorid hemmte den größten Teil des  $I_{\text{sc}}$ . **B** Ähnlicher Versuch wie unter A, allerdings mit einem ATP-Analog (100  $\mu\text{M}$ , apikal), welches schwer hydrolysierbar ist und zudem als P2X-selektiver Antagonist gilt. Die  $\beta,\gamma$ -meATP-induzierte Stimulation war etwas ausgeprägter und etwas schneller gesättigt im Vergleich zu ATP.

Weitere Versuche mit ATP-Analogen wurden durchgeführt, um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte wirklich auf ATP zurückzuführen sind, da die Möglichkeit der ATP-Hydrolyse durch Exonucleotidasen an der Zelloberfläche besteht. In Versuchen mit ATP- $\gamma$ -S, einem schwer/nicht hydrolysierbaren ATP-Analog waren gleiche Effekte zu beobachten, wie mit kom-

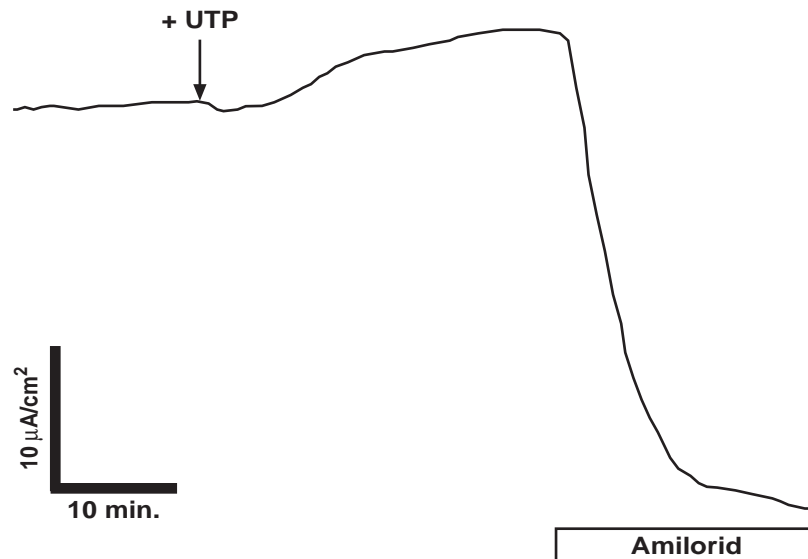
merziell erworbenem ATP. Die Stimulation des  $I_{sc}$  durch apikales ATP- $\gamma$ -S (200  $\mu$ M) betrug  $34 \pm 9$  % ( $n = 4$ ). Des Weiteren kam  $\beta,\gamma$ -meATP zum Einsatz, welches in der Literatur als P2X-selektiver Agonist beschrieben wird (Ralevic & Burnstock, 1998). Die apikale Superfusion einer  $\beta,\gamma$ -meATP-haltigen Lösung (100  $\mu$ M) vermochte den  $I_{sc}$  ebenfalls zu erhöhen. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Wirkung schneller erfolgte als mit ATP bzw. ATP- $\gamma$ -S (Sättigung des Effektes nach max. 30 Minuten) und die Stimulation zudem stärker war ( $43 \pm 4$  %,  $n = 5$ , Abb. III-4B).

Die Ergebnisse deuten auf eine Stimulation von amilorid-sensitiven  $Na^+$ -Kanälen und eine gleichzeitige Stimulation von  $Cl^-$ -Kanälen durch ATP hin, wobei die Hauptwirkung in einer Erhöhung des transepithelialen  $Na^+$ -Stroms liegt. Eine Koexistenz verschiedener Typen von P2-Rezeptoren in der *Xenopus*-Lunge, über die die Effekte vermittelt werden, ist anhand dieser Ergebnisse nicht auszuschließen.

### 3.1.2 UTP

Innerhalb der P2Y-Rezeptorfamilie gibt es Subtypen, die hochselektiv UTP, aber nicht ATP binden (Ralevic & Burnstock, 1998). Im Nachfolgenden sollte die Wirkung von UTP untersucht werden, nachdem die Wirksamkeit von ATP hinlänglich gezeigt werden konnte. Die Wirkung von UTP erwies sich ebenfalls als konzentrations-abhängig. Eingesetzte Konzentrationen von 1  $\mu$ M bis 5 mM auf der apikalen Seite führten zu einer schrittweisen Steigerung des  $I_{sc}$ . Für UTP konnte die halb-maximale Stimulation bei 60  $\mu$ M in der *Xenopus*-Lunge ermittelt werden. Wie in den Versuchen mit ATP wurde UTP ebenfalls in einer Konzentration von 200  $\mu$ M apikal superfundiert. Die beobachtete Wirkung war identisch mit der des ATP (Abb. III-5). Sowohl der  $I_{sc}$  als auch der  $I_{ami}$  wurden signifikant erhöht; die Dauer bis zur Sättigung des Effektes betrug ebenfalls ca. 30–40 Minuten. Die Wirkung des UTP auf  $I_{sc}$  und  $I_{ami}$  fiel allerdings etwas schwächer als bei ATP aus (vergleiche Tabelle III-2). Ein weiterer wichtiger Unterschied zu ATP war, dass UTP in Gegenwart von Amilorid keine Wirkung auf den  $I_{sc}$  hatte. Der Anstieg des  $I_{sc}$  unter diesen Bedingungen von  $2,60 \pm 0,76$  auf  $2,93 \pm 0,85$   $\mu$ A/cm<sup>2</sup> war nicht signifikant ( $n = 5$ ).

Der beobachtete Anstieg des  $I_{sc}$  ohne Amilorid konnte somit auf eine Stimulation amilorid-sensitiver Kanäle zurückgeführt werden.



**Abbildung III-5:** Wirkung von UTP auf den  $I_{sc}$ . Die Perfusion mit 200  $\mu\text{M}$  UTP auf der apikalen Seite führte zu einem deutlichen Anstieg des  $I_{sc}$ , allerdings waren die beobachteten Effekte schwächer, verglichen mit ATP (vgl. Abb III-4A bzw. Tab III-2).

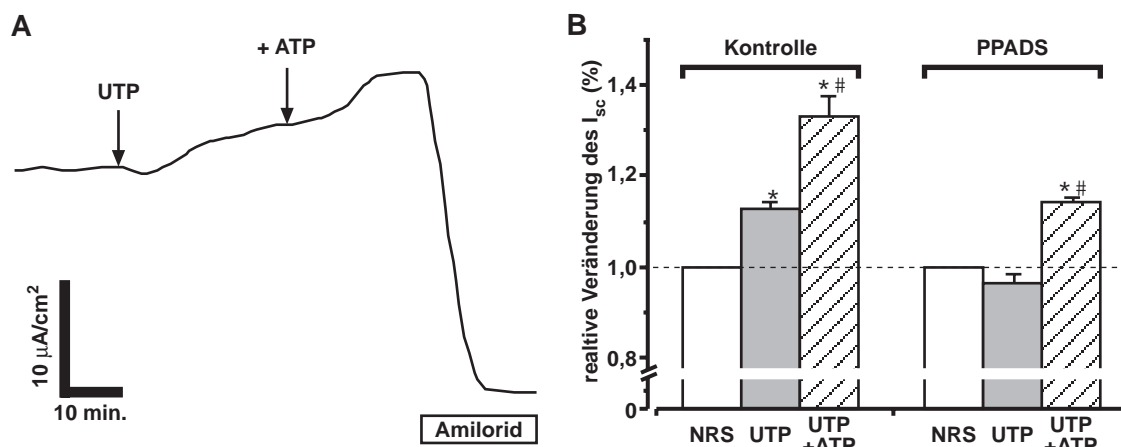
*Tabelle III-2: Wirkung von apikal appliziertem ATP,  $\beta,\gamma$ -meATP bzw. UTP auf  $I_{sc}$  und  $I_{ami}$*

Parameter	NRS	ATP	Stimulation (%)
$I_{sc}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$24,85 \pm 2,54$	$31,48 \pm 3,08^*$	$27,1 \pm 2,2$
$I_{ami}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$21,26 \pm 1,31$	$28,15 \pm 2,25^*$	$31,9 \pm 4,5$
n		6	
	NRS	$\beta,\gamma$ -meATP	Stimulation (%)
$I_{sc}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$20,30 \pm 4,41$	$28,65 \pm 5,96^*$	$42,8 \pm 3,6$
$I_{ami}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$15,48 \pm 2,76$	$23,83 \pm 4,39^*$	$53,3 \pm 1,1$
n		5	
	NRS	UTP	Stimulation (%)
$I_{sc}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$30,26 \pm 4,23$	$34,71 \pm 4,73^*$	$15,1 \pm 1$
$I_{ami}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$22,18 \pm 3,34$	$26,63 \pm 3,89^*$	$21,2 \pm 1,6$
n		6	

ATP und UTP wurden in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$ ,  $\beta,\gamma$ -meATP in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  appliziert. Signifikant verschiedene Werte sind markiert (\*,  $p < 0,05$ ).

### 3.1.3 Additive Effekte von ATP und UTP

Die unterschiedliche Wirkung von ATP und UTP deutete auf unterschiedliche Typen von P2-Rezeptoren im Alveolarepithel von *Xenopus* hin. Daraufhin wurden die Trinucleotide ATP und UTP in einer Serie von Messungen additiv – allerdings zeitlich voneinander getrennt – apikal appliziert. In ersten Messungen wurde zuerst 200  $\mu\text{M}$  UTP superfundiert und, nachdem die Wirkung gesättigt war (Plateaubildung), wurden zusätzlich 200  $\mu\text{M}$  ATP zur Superfusionslösung zupipettiert. Entsprechend der Zugabe der Substanzen, konnte ein zweiteiliger Anstieg im  $I_{sc}$  beobachtet werden (Abb. III-6A). Durch UTP erhöhte sich der  $I_{sc}$  um  $13 \pm 1\%$  und durch die zusätzliche ATP-Perfusion um weitere  $18 \pm 4\%$  ( $n = 6$ , Tabelle III-3). Eine umgekehrte Reihenfolge der Applikation (ATP gefolgt von UTP) brachte sehr ähnliche Ergebnisse. Einen Anstieg von  $20 \pm 2\%$  durch ATP, gefolgt von einer weiteren Erhöhung um  $10 \pm 2\%$  ( $n = 5$ ) durch UTP.



**Abbildung III-6:** Additive Effekte von UTP und ATP. **A** Aufzeichnung eines Experiments in dem nach UTP (200  $\mu\text{M}$ ) zusätzlich ATP (200  $\mu\text{M}$ ) zugegeben wurden. **B** Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von Experimenten einer additiven Trinucleotid-Applikation unter normalen Bedingungen (Kontrolle,  $n = 6$ ) und in Anwesenheit des purinergen Antagonisten PPADS ( $n = 6$ ). Signifikant verschiedene Werte von NRS (\*); respektive von UTP (#),  $p < 0,05$ .

Eine zusätzliche Bestätigung, dass unterschiedliche Typen von P2-Rezeptoren im Lungenepithel von *Xenopus* vorhanden sind, sollte durch den Einsatz eines Antagonisten erbracht werden. Die Wahl fiel dabei auf PPADS (Pyridoxalphosphate-6-Azophenyl-2',4'-Disulfonic Acid), eine Substanz, die einige Subtypen von P2 Rezeptoren hemmt, aber nicht alle. PPADS wurde in

allen Messungen apikal in einer Konzentration von 36  $\mu\text{M}$  superfundiert. Die Inkubation der Epithelien mit dem Antagonisten erfolgte dabei für ca. 30 Minuten. Aus dieser Prozedur resultierte ein schwacher Anstieg des  $I_{sc}$  ( $1 \pm 0,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $n = 6$ ). Eine nachfolgende Applikation von UTP zeigte keine Wirkung, wohingegen die zusätzliche Applikation von ATP zu einem signifikanten Anstieg des  $I_{sc}$  führte (Abb. III-6B). Kontrollversuche mit einer umgekehrten Reihenfolge der Applikation ergaben gleiche Ergebnisse ( $n = 2$ ). In diesen Versuchen konnte, in Anwesenheit von PPADS ( $I_{sc}$ :  $17,37 \pm 2,52 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), ATP den  $I_{sc}$  erhöhen ( $24,9 \pm 5,37 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), nicht aber die nachfolgende Superfusion von UTP ( $23,72 \pm 4,89 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Eine detailliertere Auflistung der Messwerte befindet sich in Tabelle III-3. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse auf die Präsenz von mind. zwei verschiedenen Typen von P2-Rezeptoren im Alveolarepithel von *Xenopus laevis* hin, wovon einer PPADS-sensitiv ist.

Tabelle III-3: Additive Effekte von apikalem ATP und UTP in Kontroll-Epithelien und PPADS-vorbehandelten Epithelien

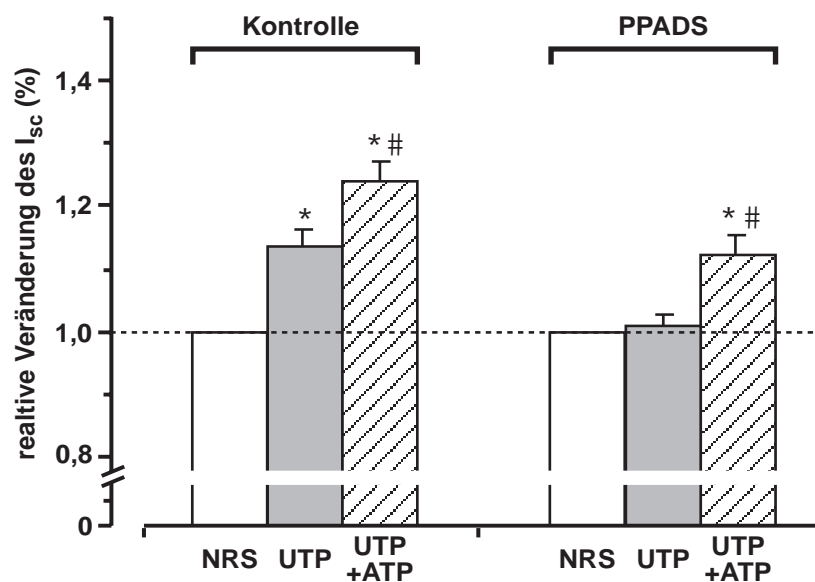
Parameter	NRS	UTP	UTP + ATP	
<b>A) Kontrollen</b>				
$I_{sc}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$30,26 \pm 4,2$	$34,68 \pm 5,18^*$	$39,78 \pm 5,3^*$	
$I_{ami}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$22,18 \pm 3,34$	$26,34 \pm 3,86^*$	$31,26 \pm 3,8^*$	
n		6		
	NRS	ATP	ATP + UTP	
$I_{sc}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$31,88 \pm 4,16$	$38,1 \pm 4,54^*$	$4,82 \pm 3,7^*$	
$I_{ami}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$26,74 \pm 1,4$	$31,88 \pm 1,6^*$	$34,0 \pm 1,2^*$	
n		5		
	NRS	PPADS	UTP	UTP + ATP
<b>B) PPADS</b>				
$I_{sc}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$22,7 \pm 2,92$	$23,74 \pm 3,14$	$23,1 \pm 3,3$	$26,2 \pm 3,62^*$
$I_{ami}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$15,18 \pm 1,4$	$16,2 \pm 1,7$	$15,58 \pm 1,73$	$18,76 \pm 2,1^*$
n		6		

**A)** Wiedergabe der Messergebnisse einer additiven Trinucleotid-Applikation (jeweils 200  $\mu\text{M}$  apikal), in beiden möglichen Abfolgen. **B)** Gleiche Experimente, allerdings wurden die Epithelien apikal mit PPADS vorbehandelt. Die Wirkung von PPADS auf die elektrischen Parameter unter NRS ist nicht signifikant. Hervorzuheben ist eine Hemmung des UTP-, aber nicht des ATP-Effekts (\*,  $p < 0,05$ ).

### 3.1.4 Basolaterale Wirkung von ATP und UTP

Die Wirkungen der beiden Trinucleotide auf die Epithelien wurden zusätzlich nach einer basolateralen Applikation untersucht. Die eingesetzten Konzentrationen von ebenfalls je 200  $\mu\text{M}$  vermochten – ähnlich wie bei der apikalen Applikation – den  $I_{\text{sc}}$  und  $I_{\text{ami}}$  zu erhöhen. Die beobachteten Effekte waren allerdings schwächer. Eine additive Applikation, beginnend mit UTP und einer nachfolgenden ATP Superfusion, erhöhte den  $I_{\text{sc}}$  von  $23,88 \pm 1,36$  auf  $26,86 \pm 1,18$  (UTP) und  $29,06 \pm 1,04 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (+ATP, n = 6).  $I_{\text{ami}}$  konnte von  $20,62 \pm 1,62$  auf  $22,99 \pm 1,73$  (UTP) und  $25,67 \pm 1,32 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (+ATP) erhöht werden. Der Einsatz des P2-Antagonisten PPADS (36  $\mu\text{M}$ ) auf der basolateralen Seite vermochte ebenfalls die Wirkung des UTP zu hemmen, wohingegen die ATP-Wirkung nicht wesentlich beeinflusst wurde (Abb. III-7).

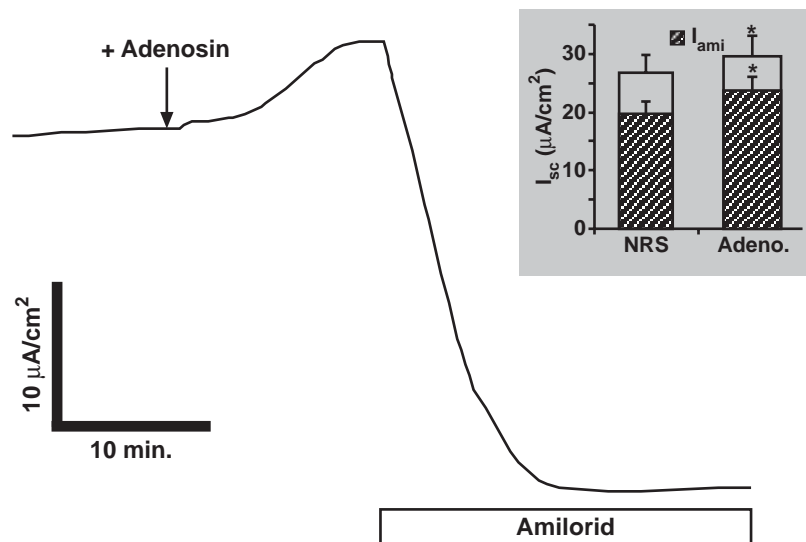
Es scheint, dass ähnliche/gleiche Rezeptoren auf der basolateralen Seite wie auf der apikalen Seite des Lungenepithels vorhanden sind, und dass diese Rezeptoren ebenfalls am trans-epithelialen Elektrolyttransport beteiligt sind.



**Abbildung III-7:** Additive Effekte von basolateralem UTP und ATP. Aufgetragen sind die Mittelwerte zweier Messreihen, in denen UTP und ATP im Verlauf einer Messung additiv appliziert wurden. Verglichen werden die Werte unter NRS-Bedingungen (Kontrolle, n=6) und PPADS vorbehandelter Epithelien (PPADS, n = 8). Signifikant verschiedene Werte von NRS (\*) und von UTP (#),  $p < 0,05$ .

### 3.2 P1-Rezeptoren

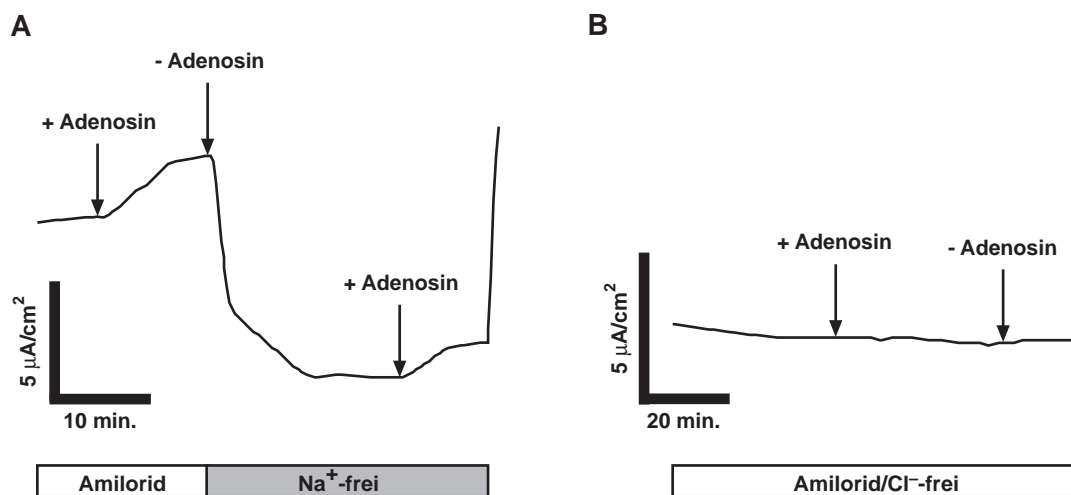
Neben den bereits erwähnten P2-Rezeptoren gibt es noch eine weitere Klasse von purinergen Rezeptoren, die so genannten P1-Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind, wie P2Y-Rezeptoren, G-Protein gekoppelt und werden durch ihre Selektivität zu dem Nucleosid Adenosin charakterisiert (Ralevic & Burnstock, 1998). Ähnlich wie die Trinucleotide vermochte die apikale Superfusion des Nucleosids den  $I_{sc}$  zu erhöhen. Der Effekt war zudem ebenfalls konzentrationsabhängig, die Epithelien zeigten allerdings eine etwas höhere Sensitivität gegenüber Adenosin ( $EC_{50}$ : 26  $\mu$ M). Zur weiteren Charakterisierung der Wirkung wurde eine Konzentration von 100  $\mu$ M eingesetzt (ausschließlich apikal). Sowohl der  $I_{sc}$  als auch der  $I_{ami}$  wurden signifikant durch die Adenosin-Applikation erhöht. Der  $I_{sc}$  erhöhte sich dabei von  $26,03 \pm 3,13$  auf  $28,9 \pm 3,43$   $\mu$ A/cm<sup>2</sup> und der  $I_{ami}$  von  $19,25 \pm 2,1$  auf  $23,7 \pm 2,39$   $\mu$ A/cm<sup>2</sup> ( $n = 8$ ). Die Zeitspanne bis zur Sättigung des Effekts war etwas kürzer als bei ATP bzw. UTP (15–20 Minuten, Abb. III-8).



**Abbildung III-8:** Effekt von apikalem Adenosin (100  $\mu$ M). Nach der Stimulation des  $I_{sc}$  durch Adenosin, wurde zur Bestimmung von  $I_{ami}$  Amilorid (10  $\mu$ M) zusätzlich superfundiert. Die statistische Auswertung acht solcher Experimenten ist in dem Diagramm dargestellt (\*,  $p < 0,05$ )

Ähnlich wie bei ATP konnte die Wirkung von Adenosin durch Amilorid nicht aufgehoben werden. In Anwesenheit von Amilorid in der apikalen Lösung konnte ein Anstieg des  $I_{sc}$  von  $3,10 \pm 1,23$  auf  $4,74 \pm 1,50$   $\mu$ A/cm<sup>2</sup> ( $p < 0,01$ ,  $n = 5$ ) verzeichnet werden. Selbst die Entfernung

von  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der apikalen Lösung vermochte die Wirkung von Adenosin nicht zu unterbinden. Unter diesen Bedingungen stieg der  $I_{\text{sc}}$  signifikant um  $0,97 \pm 0,18 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  an ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ , Abb. III-9A). Wurden Messungen mit  $\text{Cl}^-$ -freien Lösungen auf beiden Seiten und Amilorid auf der apikalen Seite durchgeführt, konnte der Adenosin-Effekt unterdrückt werden ( $I_{\text{sc}}$  in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ :  $1,99 \pm 1,0$  ohne Adenosin und  $1,82 \pm 0,9$  nach Adenosin,  $n = 6$ , Abb. III-9B). Dies lässt, ähnlich wie bei ATP, auf eine Aktivierung apikaler  $\text{Cl}^-$ -Kanäle schließen.



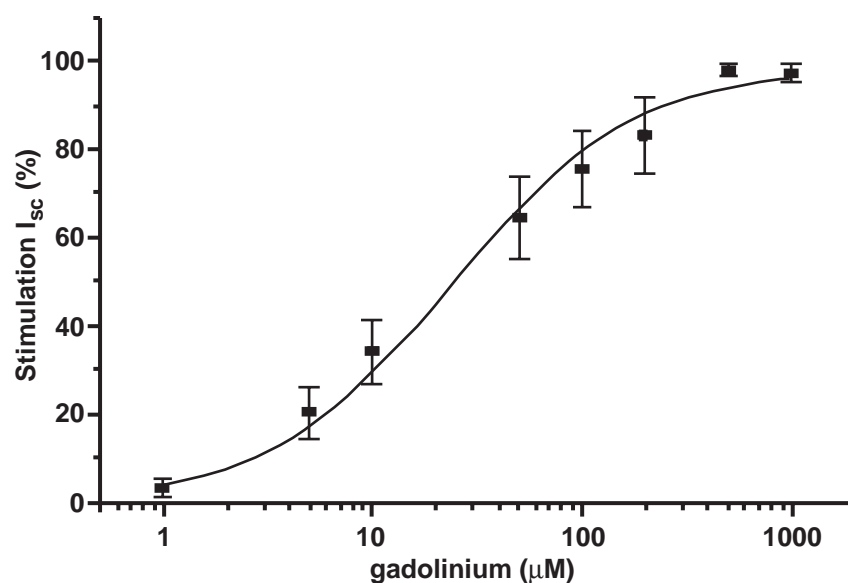
**Abbildung III-9:** Effekt von Adenosin unter unterschiedlichen Bedingungen auf den  $I_{\text{sc}}$ . **A** Apikale Adenosin-Applikation (jeweils  $100 \mu\text{M}$ ) in Anwesenheit von Amilorid, sowie unter  $\text{Na}^+$ -freien Bedingungen – Adenosin erhöhte den  $I_{\text{sc}}$  unter beiden Bedingungen. **B** Ähnliches Experiment, allerdings wurden die Epithelien vor der Adenosin-Applikation mit einer  $\text{Cl}^-$ -freien Lösung superfundiert ( $\text{Cl}^-$  durch  $\text{SO}_4^{2-}$  ersetzt). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Amilorid konnte keine Wirkung beobachtet werden.

## 4 Stimulation des transepithelialen $\text{Na}^+$ -Stroms durch extrazelluläres Gadolinium

Ursprüngliches Ziel dieser Versuche war eine mögliche Identifikation mechanisch aktivierbarer nicht-selektiver Kationenkanäle (stretch-activated cation channels, SACs) im Lungenepithel von *Xenopus laevis*. Gadolinium ( $\text{Gd}^{3+}$ ) ist ein sehr potenter Inhibitor dieser Kanäle und hat deshalb eine lange Tradition in der Elektrophysiologie. Erste Versuche mit dem Erdmetall im Perfusat brachten überraschende Ergebnisse.

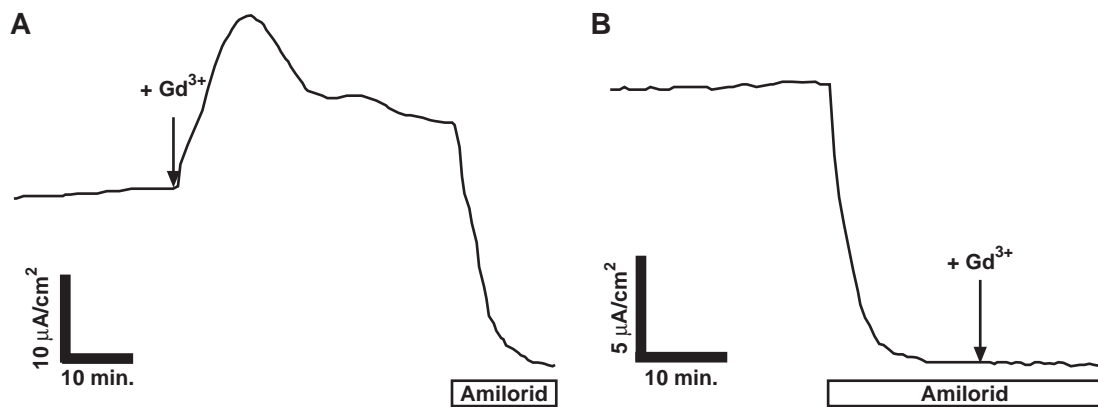
### 4.1 Effekt von Gadolinium auf $I_{sc}$ und $I_{ami}$

Die apikale Applikation von  $\text{Gd}^{3+}$  führte zu einem relativ schnellen, transienten Anstieg des  $I_{sc}$  bis zu einem Maximum und einer darauf folgenden Abnahme, wobei der Strom nach ca. 20–30 Minuten schließlich auf einem Niveau equilibrierte, welches höher war verglichen mit den Ausgangsbedingungen. Die beobachtete Stimulation war Dosis-abhängig. Erste Effekte konnten ab einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  detektiert werden, eine gesättigte Wirkung trat bei  $1000 \mu\text{M}$  ein (Abb. III-10). Die Konzentration, bei der eine halb-maximale Sättigung ( $\text{EC}_{50}$ ) des Effektes eintrat, konnte bei  $23,5 \pm 2,2 \mu\text{M}$  Gadolinium ermittelt werden. Basolaterale Applikation von  $\text{Gd}^{3+}$  zeigte keinen Effekt. In folgenden Versuchen wurde jeweils  $100 \mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$  apikal appliziert.



**Abbildung III-10:** Dosis-abhängiger Effekt von Gadolinium. Die Werte wurden mittels einer Hill-Gleichung gefittet (Hill-Coeffizient = 1; halbmaximale Stimulation bei  $23,5 \mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$ ;  $n = 10$ ).

Durch 100  $\mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$  kam es zu einem schnellen Anstieg des  $I_{\text{sc}}$  von  $20,46 \pm 2,86$  auf  $35,66 \pm 4,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , gefolgt von einem Abfall auf  $28,35 \pm 3,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n = 7$ , Abbildung III-11A). Der Widerstand veränderte sich dabei nicht signifikant (Tabelle III-4). Die Zugabe von Amilorid resultierte in einer Hemmung des  $I_{\text{sc}}$ , unabhängig davon, ob es zum Zeitpunkt der maximalen Stimulation oder nach Plateaubildung appliziert worden ist. Dies bestätigte sich in Versuchen, in denen  $\text{Gd}^{3+}$  in Anwesenheit von Amilorid appliziert wurde ( $I_{\text{sc}}$  ohne  $\text{Gd}^{3+}$   $6,71 \pm 0,89 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , mit  $\text{Gd}^{3+}$   $6,67 \pm 0,93 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $n = 5$ , siehe Abbildung III-11B). Der Stromanstieg unter  $\text{Gd}^{3+}$  war somit amilorid-sensitiv, was auf eine Beteiligung epithelialer  $\text{Na}^+$ -Kanäle schließen lässt.



**Abbildung III-11:** Repräsentative Abbildungen des Effekts von Gadolinium. **A** Applikation von 100  $\mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$  unter normalen Bedingungen ( $\text{Na}^+$ -Ringer). **B** Ebenfalls die Applikation von 100  $\mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$ , allerdings in Anwesenheit von Amilorid.

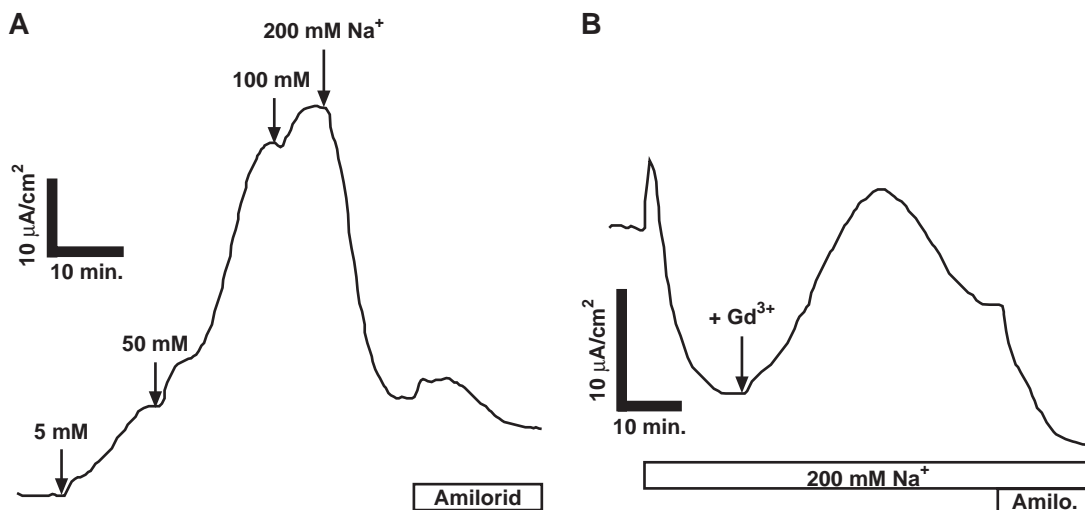
*Tabelle III-4: Wirkung von  $\text{Gd}^{3+}$  auf die elektrischen Parameter*

Parameter	Kontrolle	$\text{Gd}^{3+}$		Stimulation % (Plateau)
		Maximum	Plateau	
$I_{\text{sc}}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$20,46 \pm 2,86$	$35,66 \pm 4,89^*$	$26,56 \pm 3,64^*$	$30,2 \pm 3,5$
$I_{\text{ami}}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$17,15 \pm 1,89$	--	$23,56 \pm 3,64^*$	$36,1 \pm 4,9$
$R_t$ ( $\Omega \times \text{cm}^2$ )	$307 \pm 26$	$322 \pm 25$	$332 \pm 27$	--
n		7		

Die apikale Applikation von Gadolinium führte in allen Versuchen zu einem recht schnellen Anstieg des  $I_{\text{sc}}$  und equilibrierte auf einem erhöhten Niveau. Dieser Strom konnte durch Amilorid (10  $\mu\text{M}$ ) gehemmt werden. Der transepitheliale Widerstand ( $R_t$ ) zeigte keine Veränderungen. Signifikant verschiedene Werte, verglichen mit den Kontrollwerten sind gekennzeichnet (\*,  $p < 0,001$ ).

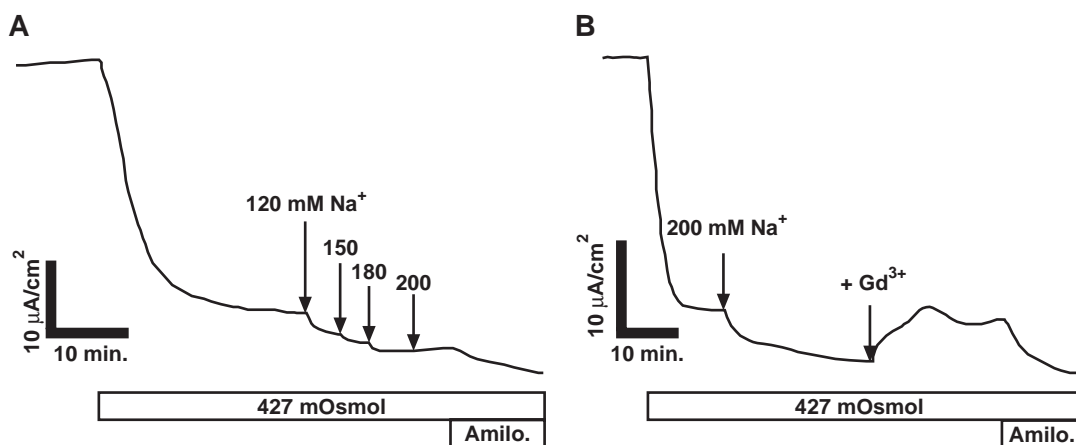
#### 4.2 Interaktion von $Gd^{3+}$ mit dem „ $Na^+$ -feedback/self-inhibition system“

Als „feedback/self-inhibition“ bezeichnet man eine negative Rückkopplung (Inhibition) epithelialer  $Na^+$ -Kanäle durch hohe Konzentrationen von extrazellulärem (self-inhibition), oder intrazellulärem (feedback-inhibition)  $Na^+$ . Diese Eigenschaften konnten an einer Vielzahl von  $Na^+$ -resorbierenden Epithelien nachgewiesen werden (Turnheim 1991). Als Erstes galt es festzustellen, ob dieses Phänomen in dem untersuchten Gewebe zu beobachten war. Dazu wurden einige Gewebe mit ansteigenden  $Na^+$ -Konzentrationen auf der apikalen Seite superfundiert. Beginnend mit 1 mM  $Na^+$  konnte bis zu einer Konzentration von 100 mM ein schrittweiser Anstieg des  $I_{sc}$  beobachtet werden. Die anschließende Erhöhung auf 200 mM  $Na^+$  führte zu einer deutlichen Hemmung des Stromes (Abb. III-12A). Unter diesen Hoch- $Na^+$ -Bedingungen betrug  $I_{ami}$  nur noch  $8,80 \pm 2,90 \mu A/cm^2$  ( $17,15 \pm 1,89 \mu A/cm^2$  unter Kontrollbedingungen, siehe Tabelle III-4). Wurde unter diesen Bedingungen  $Gd^{3+}$  superfundiert, konnte ein Anstieg des  $I_{sc}$  verzeichnet werden. Dieser hatte die gleiche Charakteristik wie unter NRS-Bedingungen (transientes Maximum, erhöhtes Plateau; Abb. III-12B).



**Abbildung III-12:** Effekt von  $Gd^{3+}$  auf den  $Na^+$ -abhängigen Strom. **A** Perfusion ansteigender  $Na^+$ -Konzentrationen, wobei die Erhöhung auf 200 mM apikalem  $Na^+$  den  $I_{sc}$  stark hemmt.  $Na^+$  wurde durch NMDG ersetzt – die beobachtete Hemmung unter 200 mM  $Na^+$  ist zum größten Teil auf osmotische Effekte zurückzuführen (Anstieg der Osmolarität um 200 mOsmol von 100 auf 200 mM  $Na^+$ ). Der transiente Stromanstieg durch Amilorid war eine einzelne Beobachtung von fünf Experimenten. **B** Applikation von  $100 \mu M Gd^{3+}$  unter Hoch- $Na^+$ -Bedingungen und 427 mOsmol Osmolarität.

Da die Erhöhung der  $\text{Na}^+$ -Konzentration von 100 auf 200 mM mit einer Erhöhung der Osmolarität auf beiden Seiten des Gewebes verbunden war (siehe Abb. III-12A+B), wurden nachfolgend Versuche unter konstanten osmotischen Bedingungen durchgeführt um zu prüfen, inwieweit die Erhöhung der Osmolarität den  $I_{\text{sc}}$  beeinflusste. In Versuchen, in denen die Osmolarität erhöht wurde, ohne die  $\text{Na}^+$ -Konzentration zu ändern, zeigten sich ähnliche Effekte – die Erhöhung der Osmolarität führte zu einer erheblichen Hemmung des  $I_{\text{sc}}$ . Allerdings waren die Epithelien in diesen Versuchen – nach wie vor –  $\text{Na}^+$ -sensitiv (Abb. III-13A). Der verbliebene Strom konnte mit einer stufenweisen Erhöhung der apikalen  $\text{Na}^+$ -Konzentration gehemmt werden. Wurde unter diesen Hoch-  $\text{Na}^+$ -Bedingungen (200 mM) und bei konstanter Osmolarität  $\text{Gd}^{3+}$  (100  $\mu\text{M}$ ) zugegeben, konnte eine Stimulation beobachtet werden (Abb. III-13B). Der Verlauf des  $I_{\text{sc}}$ -Anstiegs war dem unter NRS sehr ähnlich (siehe Abb. III-11A), wenn auch nicht so ausgeprägt.



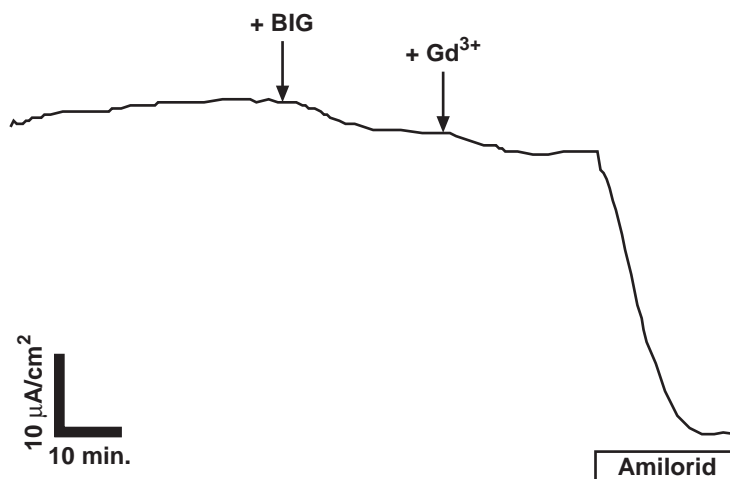
**Abbildung III-13:** Effekt von  $\text{Gd}^{3+}$  auf den  $\text{Na}^+$ -abhängigen Strom unter konstanten osmotischen Bedingungen. **A** Repräsentative Abbildung aus vier Versuchen; nach der Hemmung des  $I_{\text{sc}}$  durch die hohe Osmolarität, wurden apikal ansteigende  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen perfundiert. Dies fand unter konstanten osmotischen Bedingungen statt;  $\text{Na}^+$  wurde in diesen Versuchen durch Mannitol ersetzt (basolateral 100 mM  $\text{Na}^+$ , gleiche Osmolarität wie apikal). **B** Applikation von  $\text{Gd}^{3+}$  (100  $\mu\text{M}$ ) nach der Hemmung des  $I_{\text{sc}}$  durch 200 mM apikales  $\text{Na}^+$ .  $\text{Gd}^{3+}$  vermochte auch unter diesen Hoch-Natrium Bedingungen den  $I_{\text{sc}}$  zu stimulieren.

Diese Daten verdeutlichen, dass das Lungenepithel von *Xenopus* ähnliche Mechanismen des  $\text{Na}^+$ -Transports aufweist, wie man sie aus anderen klassischen  $\text{Na}^+$ -transportierenden Epithelien, wie z. B. der Froschhaut, kennt.

#### 4.2.1 BIG (Benz-Imidazolyl-Guanidin)

Als Nächstes wurde versucht, die beobachteten  $\text{Na}^+$ -abhängigen Effekte pharmakologisch zu charakterisieren. Es gibt eine Reihe von Substanzen, die im Verdacht stehen, diese auto-regulatorischen Mechanismen zu beeinflussen (Turnheim, 1991).

Benz-Imidazolyl-Guanidine ist ein Amilorid-Analog. In Studien verschiedenster Forschungsgruppen konnte eine stimulierende Wirkung von BIG auf epitheliale  $\text{Na}^+$ -Kanäle nachgewiesen werden. Die Wirkung wird dabei dem Aufheben der negativen Rückkopplung amilorid-sensitiver Kanäle zugeordnet. Nach Vorversuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen von BIG (100  $\mu\text{M}$ –1 mM) wurden für die folgenden Messungen 300  $\mu\text{M}$  benutzt. Die apikale Applikation führte entgegen den Erwartungen nicht zu einer Stimulation, sondern zu einer leichten, aber signifikanten, Hemmung des  $I_{\text{sc}}$  ( $28,93 \pm 4,23$  auf  $27,15 \pm 4,05 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). Wurde zusätzlich zu BIG noch 100  $\mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$  appliziert, blieb zudem die Stimulation durch  $\text{Gd}^{3+}$  aus. Es konnte sogar eine weitere leichte Inhibition beobachtet werden ( $I_{\text{sc}}$  mit BIG und  $\text{Gd}^{3+}$   $25,59 \pm 3,74 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ , Abb. III-14).



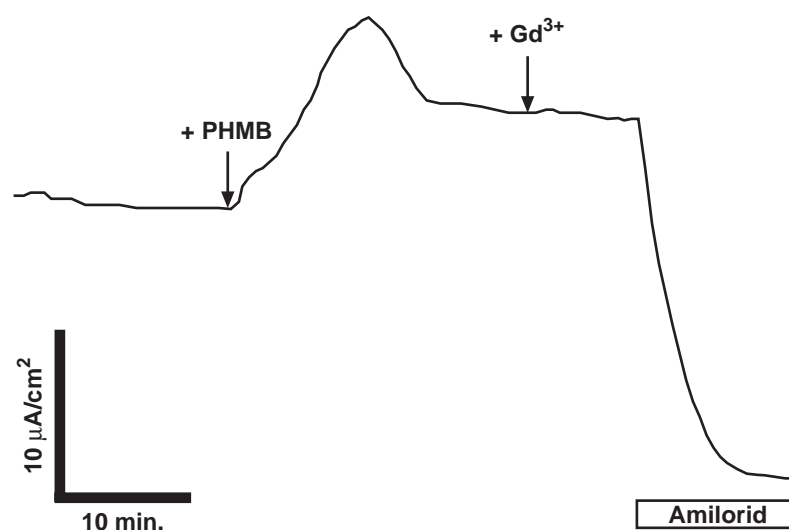
**Abbildung III-14:** Effekte von BIG und  $\text{Gd}^{3+}$ . Nach apikaler Perfusion von BIG (Benz-Imidazolyl-Guanidin, 300  $\mu\text{M}$ ) konnte eine leichte Reduzierung des  $I_{\text{sc}}$  beobachtet werden. Die zusätzliche Applikation von  $\text{Gd}^{3+}$  in Anwesenheit von BIG führte zu einer weiteren Hemmung des  $I_{\text{sc}}$ . Zu beachten ist die Tatsache, dass BIG die  $\text{Gd}^{3+}$ -induzierte Stimulation des  $I_{\text{sc}}$  aufhob.

Nach anschließendem Auswaschen von BIG und  $\text{Gd}^{3+}$  (Gewebe für mind. 45 Minuten mit NRS superfundiert), konnte durch eine anschließende Applikation mit  $\text{Gd}^{3+}$  ein Anstieg des  $I_{\text{sc}}$  be-

obachtet werden. Die Gewebe reagierten somit wieder mit einer Stimulation des  $I_{sc}$  auf die  $Gd^{3+}$ -Superfusion, allerdings war die Wirkung um einiges schwächer. Der maximale Anstieg betrug im Mittel nur noch  $3,42 \pm 0,47 \mu A/cm^2$ , ( $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ).

#### 4.2.2 PHMB (p-Hydroxy-Mercuribenzoic Acid)

PHMB gehört zu einer Gruppe von organischen Quecksilber-haltigen Substanzen, die ähnlich wie BIG mit Teilen der intrinsischen Autoregulation von  $Na^+$ -Kanälen wechselwirken (Turnheim, 1991). Wurde PHMB (1 mM) in das apikale Kompartiment der Ussingkammer gegeben, konnte der gleiche Effekt beobachtet werden, wie durch die Applikation mit  $Gd^{3+}$ : ein schneller Anstieg des  $I_{sc}$  zu einem Maximum, gefolgt von einem Abfall und einem neuen steady-state auf einem erhöhten Niveau. Wurden die PHMB-vorstimulierten Epithelien zusätzlich mit  $Gd^{3+}$  superfundiert, konnte kein  $Gd^{3+}$ -Effekt mehr detektiert werden (Abb. III-15). In Versuchen mit umgekehrter Reihenfolge der Applikation (erst  $Gd^{3+}$ , danach PHMB) zeigte sich das gleiche Phänomen. Die  $Gd^{3+}$ -vorstimulierten Gewebe reagierten nach der Plateaubildung nicht auf die zusätzliche PHMB-Applikation (Tabelle III-5).



**Abbildung III-15:** Effekte von PHMB und  $Gd^{3+}$ . Nach erfolgter Stimulation durch 1 mM PHMB (p-Hydroxy-Mercuribenzoic Acid) wurde zusätzlich  $Gd^{3+}$  ( $100 \mu M$ ) appliziert. Unter diesen Bedingungen zeigte  $Gd^{3+}$  keine weitere Wirkung auf den  $I_{sc}$ .

Tabelle III-5: Einfluss von BIG, bzw. PHMB und  $Gd^{3+}$  auf den  $I_{sc}$ 

Parameter	NRS	BIG		+ $Gd^{3+}$
$I_{sc}$ ( $\mu A/cm^2$ )	28,93 $\pm$ 4,23	27,15 $\pm$ 4,05 <sup>#</sup>		25,59 $\pm$ 3,79 <sup>#</sup>
$I_{ami}$ ( $\mu A/cm^2$ )	26,22 $\pm$ 2,92	24,44 $\pm$ 2,69 <sup>#</sup>		22,88 $\pm$ 2,45 <sup>#</sup>
n		6		
Parameter	NRS	PHMB		+ $Gd^{3+}$
		Maximum	Plateau	
$I_{sc}$ ( $\mu A/cm^2$ )	23,70 $\pm$ 1,94	32,09 $\pm$ 2,52 <sup>*</sup>	29,01 $\pm$ 2,75 <sup>*</sup>	29,22 $\pm$ 2,49
$I_{ami}$ ( $\mu A/cm^2$ )	18,86 $\pm$ 2,22	--	25,85 $\pm$ 2,28 <sup>*</sup>	25,10 $\pm$ 2,10
n		10		
Parameter	NRS	$Gd^{3+}$		+ PHMB
		Maximum	Plateau	
$I_{sc}$ ( $\mu A/cm^2$ )	28,26 $\pm$ 3,03	37,02 $\pm$ 2,76 <sup>*</sup>	33,70 $\pm$ 3,76 <sup>*</sup>	33,31 $\pm$ 3,91
$I_{ami}$ ( $\mu A/cm^2$ )	23,57 $\pm$ 1,26	--	29,01 $\pm$ 1,99 <sup>*</sup>	28,62 $\pm$ 2,06
n		5		

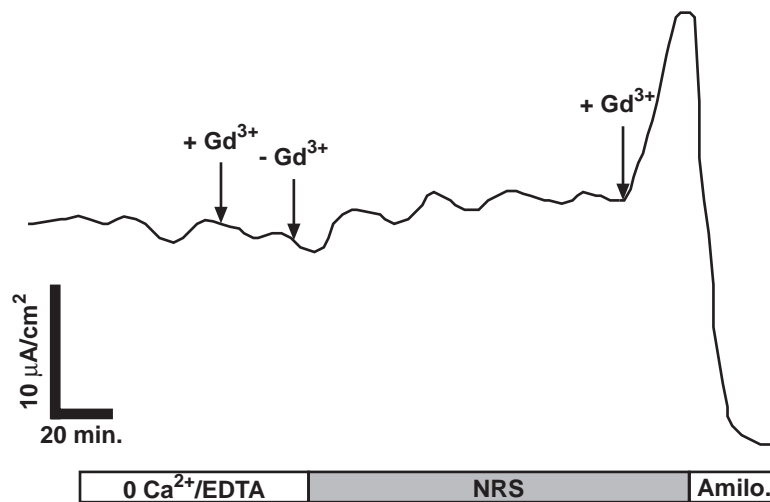
Eine additive Applikation von Substanzen ist durch ein „+“ gekennzeichnet. Signifikant verschiedene Werte sind markiert (<sup>#</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>\*</sup>  $p < 0,005$ ).

Die Stimulation durch PHMB konnte zudem auf amilorid-sensitive  $Na^+$ -Kanäle zurückgeführt werden. Wurde PHMB in Anwesenheit von Amilorid appliziert, war kein signifikanter Effekt zu verzeichnen ( $2,96 \pm 1,14$  vor und  $3,19 \pm 1,31 \mu A/cm^2$  nach PHMB,  $n = 5$ ).

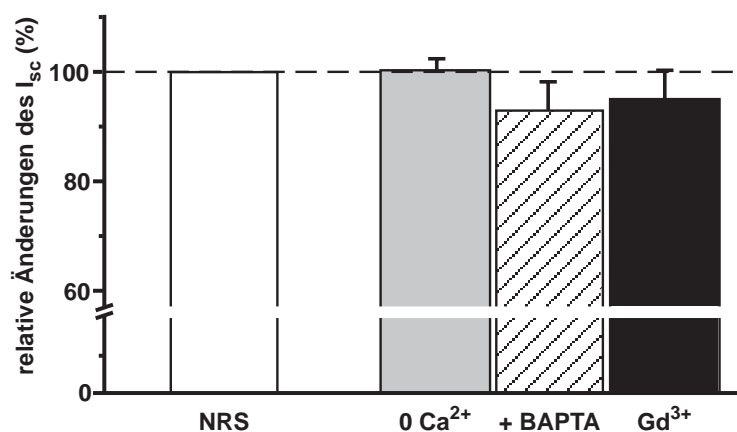
### 4.3 Beteiligung von $Ca^{2+}$ -Ionen an der $Gd^{3+}$ vermittelten Wirkung

Calcium-Ionen gelten als mögliche Mediatoren bei der feedback-inhibition (Turnheim, 1991). Um eine Beteiligung von  $Ca^{2+}$ -Ionen an der Wirkung von Gadolinium zu untersuchen, wurde unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Apikale Lösungen, die nominell kein  $Ca^{2+}$  enthielten (Ringer aus zweifach destilliertem Wasser, ohne  $CaCl_2$ ;  $0 Ca^{2+}$ ) beeinflussten die Wirkung des Erdmetalls nicht. Wurde der apikalen  $0 Ca^{2+}$ -Lösung zusätzlich EDTA (1 mM) zuge-

setzt, so konnte der  $Gd^{3+}$ -Effekt vollständig gehemmt werden, ohne dass die Sensitivität der Epithelien für  $Gd^{3+}$  nachhaltig beeinflusst wurde (Abb. III-16). Dies konnte nach Auswaschen des EDTA-haltigen Ringers und anschließender  $Gd^{3+}$ -Superfusion beobachtet werden. Es galt aber zu bedenken, dass in dem EDTA-haltigen Ringer eventuell kein/wenig freies  $Gd^{3+}$  mehr gelöst war – eine Komplexierung des  $Gd^{3+}$  durch EDTA konnte nicht ausgeschlossen werden (Caldwell et al., 1998).



**Abbildung III-16:** Applikation von  $Gd^{3+}$  unter  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen. Unter diesen Bedingungen auf der apikalen Seite konnte der Effekt von  $Gd^{3+}$  ( $100 \mu M$ ) gehemmt werden. Nach dem Auswaschen der Lösungen mit NRS war die Sensitivität der Epithelien gegenüber  $Gd^{3+}$  wieder vorhanden.



**Abbildung III-17:** Vergleich der Wirkung unterschiedlicher Bedingungen auf den  $I_{sc}$ . Die Perfusion von  $50 \mu M$  BAPTA/AM nach Inkubation in  $Ca^{2+}$ -freier Lösung reduzierte den  $I_{sc}$  leicht; die zusätzliche Gabe von  $Gd^{3+}$  konnte den  $I_{sc}$  nicht stimulieren. Die Werte stammen aus fünf Versuchen ( $\pm$  SEM), deren Ablauf dem, in Abbildung III-10 dargestellten, entspricht.

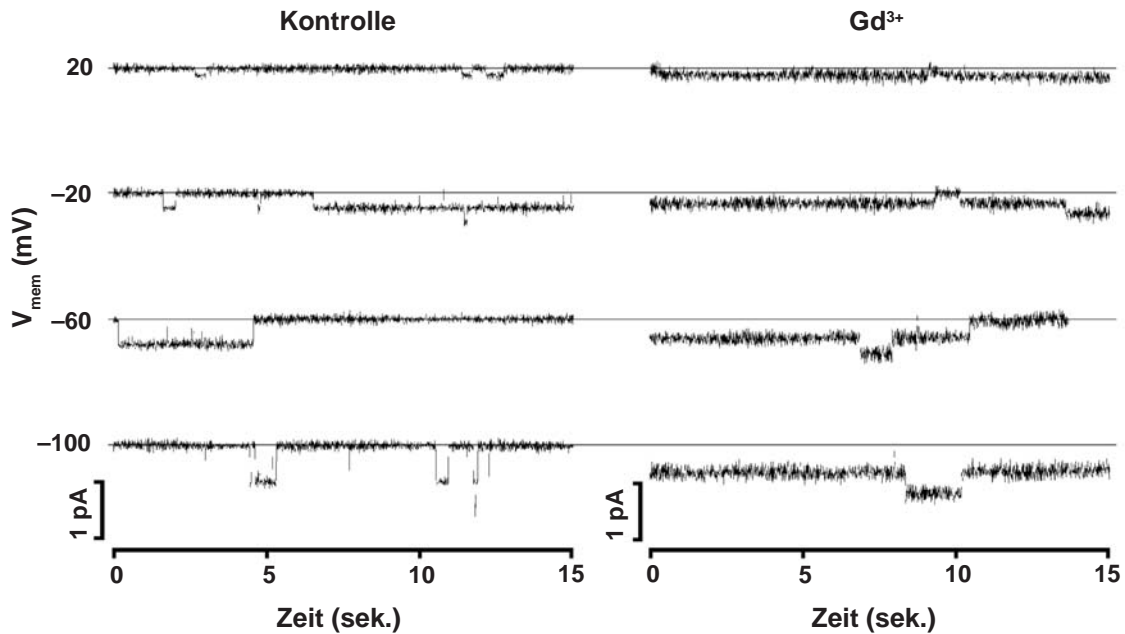
Zusätzliche Versuche mit dem membrangängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA/AM, sollten eine Beteiligung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  zeigen. Während der Messungen wurde apikal erst eine  $0 \text{ Ca}^{2+}$ -Lösung perfundiert, wodurch der  $I_{\text{sc}}$  nicht wesentlich beeinflusst wurde (Abb. III-17). Die darauf folgende Zugabe von BAPTA/AM ( $50 \mu\text{M}$ ) resultierte in einem leichten, nicht signifikanten Abfall des  $I_{\text{sc}}$ . Die Gewebe wurden für einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten mit BAPTA/AM superfundiert, bevor  $100 \mu\text{M Gd}^{3+}$  zugegeben wurden. Die Durchführung der beschriebenen Vorgehensweise hatte zur Folge, dass der Effekt von  $\text{Gd}^{3+}$  auf den  $I_{\text{sc}}$  unterbunden werden konnte (Abb. III-17). Allerdings konnten diese Ergebnisse in einem Kontrollexperiment (Inkubation der Epithelien mit BAPT/AM und nachfolgende Applikation von  $\text{Gd}^{3+}$  ohne BAPTA/AM in der Superfusionslösung) nicht bestätigt werden. Da die Wirkung von  $\text{Gd}^{3+}$  durch die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatoren in der Badlösung gehemmt werden konnte, ist eine Beteiligung von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an dem Effekt nicht auszuschließen. Intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  scheint die Wirkung nicht zu beeinflussen.

#### 4.4 Patch-clamp Untersuchungen zur Wirkung von $\text{Gd}^{3+}$ an ENaCs

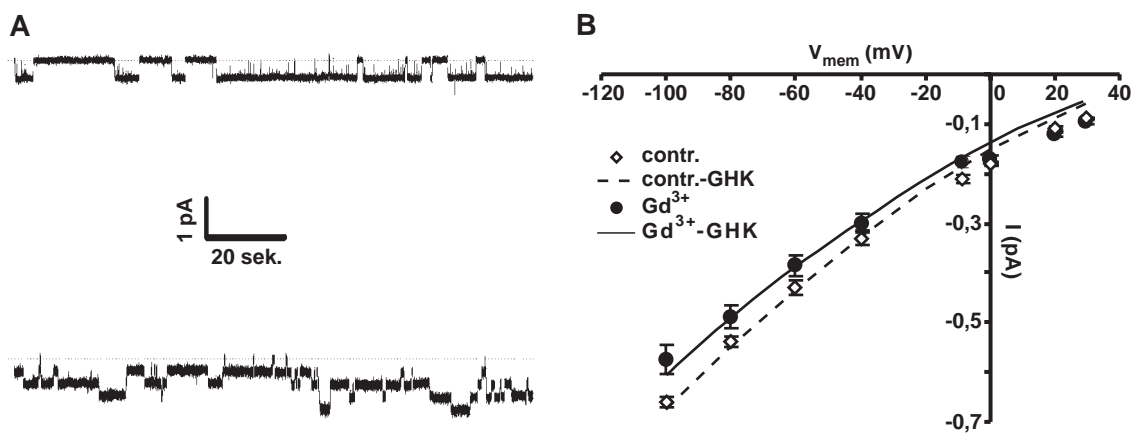
Um eine mögliche Interaktion des  $\text{Gd}^{3+}$  mit extrazellulären Komponenten der Kanäle nachweisen zu können, wurde eine Serie von patch-clamp Messungen an epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanälen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Kanäle durch Mikroinjektion von cRNA in *Xenopus* Oocyten exprimiert. Als Template für die Synthese der cRNA diente DNA, die ursprünglich aus A6-Zellen (distaler Tubulus von *Xenopus laevis*) kloniert wurde. In cell-attached Messungen wurden Kontrollen ohne  $\text{Gd}^{3+}$  und Messungen mit  $\text{Gd}^{3+}$  ( $100 \mu\text{M}$ ) in der Pipette durchgeführt (Abb. III-18).

In Messungen einer Dauer von mindestens zwei Minuten gelang es zu zeigen, dass die Offenwahrscheinlichkeit (relative Offenwahrscheinlichkeit,  $NP_o$ ) in Anwesenheit von extrazellulärem  $\text{Gd}^{3+}$  erhöht war:  $0,72 \pm 0,19$  ohne  $\text{Gd}^{3+}$  ( $n = 9$ ,  $N = 4$ ) und  $1,79 \pm 0,39$  mit  $\text{Gd}^{3+}$  ( $n = 9$ ,  $N = 3$ ; Abb. III-19A). Gleichzeitig war eine Abnahme der Kanalampplituden zwischen  $-100$  und  $-20 \text{ mV}$  durch Gadolinium zu beobachten (Abb. III-19B). Analog dazu war die Leitfähigkeit zwischen  $-100$  und  $-40 \text{ mV}$  reduziert ( $5,5 \text{ pS}$  Kontrolle und  $4,6 \text{ pS}$  mit  $\text{Gd}^{3+}$ ). Zusammengefasst

konnte eine Zunahme der Kanalaktivität durch die Anwesenheit von extrazellulärem  $Gd^{3+}$  festgestellt werden.



**Abbildung III-18:** Einzelkanalaufzeichnungen von xENaCs exprimiert in *Xenopus* Oocyten. Die Stromspuren wurden während einer Messung bei unterschiedlichen Haltepotentialen aufgezeichnet. Die Aufzeichnungen auf der linken Seite wurden in Abwesenheit von  $Gd^{3+}$  durchgeführt (Kontrolle) und die Aufzeichnungen auf der rechten Seite mit  $100 \mu M$   $Gd^{3+}$  in der Pipette. Die Linie entspricht der baseline (keine Kanalaktivität); Kanalereignisse sind als Auslenkung nach unten dargestellt.



**Abbildung III-19:** **A** Aufzeichnungen zweier Messungen (ca. 2 Minuten Dauer;  $-60$  mV) ohne (oben) und mit  $Gd^{3+}$  (unten) in der Pipette zur Bestimmung der Kanalaktivität ( $NP_0$ ). **B** Strom/Spannungskurve der Kanalampplituden gegen die Membranspannung aufgetragen. Die Werte wurden nach der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung für Ionenströme gefittet. Daraus ergibt sich die Permeabilität für  $Na^+$ :  $1,74 \times 10^{-12}$  ohne und  $1,56 \times 10^{-12}$  mit  $Gd^{3+}$ , bei einer intrazellulären  $[Na^+]$  von  $5$  und extrazellulären  $[Na^+]$  von  $100$  mM.

## 5 Alternative elektrophysiologische Messmethoden an der *Xenopus*-Lunge

Neben den bereits vorgestellten Ergebnissen, bei denen es in erster Linie um die Untersuchung des Epithels, bzw. dessen elektrophysiologischen Eigenschaften mittels einer gewöhnlichen Ussingkammer ging, wurden zusätzlich andere Messmethoden getestet.

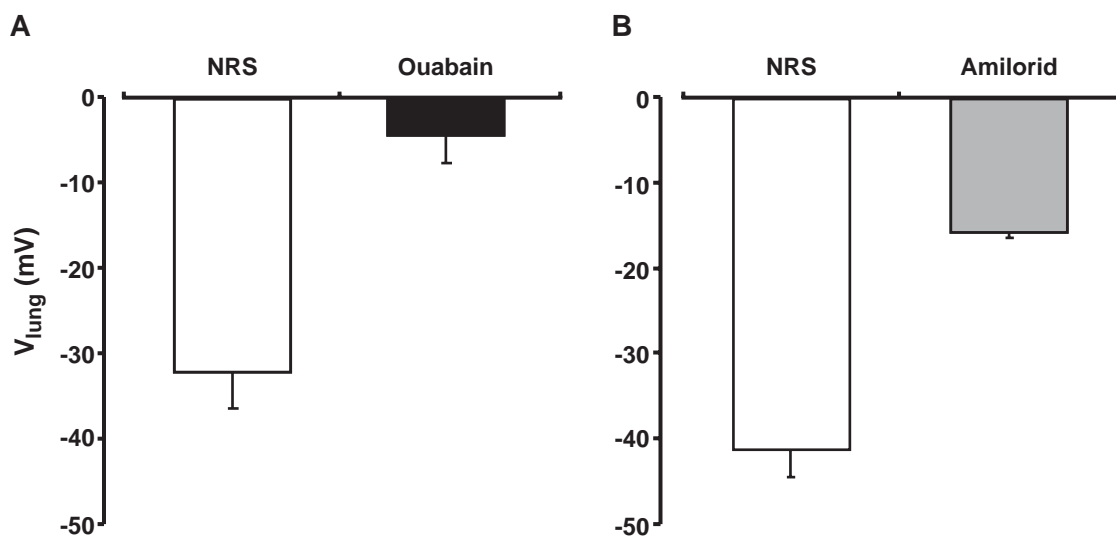
In einem gänzlich von der Ussingkammer verschiedenen Versuchsaufbau, konnten intakte Lungen eingespannt und untersucht werden. Dieser Versuchsaufbau ermöglichte es an ganzen, unpräparierten Lungen Potentiale abzuleiten (siehe Abb. II-4). Ein weiterer Ansatz bestand darin, eine modifizierte Ussingkammer zu bauen, mit der man in der Lage war, die Auswirkung von mechanischen Kräften auf die Ionentransportrate zu untersuchen. Der Versuchsaufbau in diesen Experimenten entsprach dem bereits beschriebenen, einziger Unterschied war der Aufbau der Ussingkammer (vergleiche Abb. II-2 und Abb. II-3).

### 5.1 Potentialableitungen von intakten, perfundierten *Xenopus*-Lungen

In dem auf Seite 23 dargestellten und beschriebenen Versuchsaufbau gelang es – durch die entsprechend platzierten Elektroden – Potentialunterschiede zu messen. Die Möglichkeit der Perfusion im umgebenden Bad sowie in der Lunge, ermöglichte Lösungswechsel bei gleichzeitiger Registrierung eines elektrischen Potentials ( $V_{\text{lung}}$ ). In den durchgeführten Untersuchungen wurden zudem nur Substanzen getestet, deren Wirksamkeit an Lungen-Präparaten von *Xenopus* in der Ussingkammer bereits charakterisiert waren. Zum einen das Diuretikum Amilorid, zum anderen das Gift des Fingerhutes Ouabain. Amilorid wurde in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  in die Lunge perfundiert (apikal). Ouabain kam 1 mM zum Einsatz und wurde über die Badlösung (basolateral) zugeführt. Während der Messungen diente die Elektrode, die im Lungeninneren (apikal) platziert war, als Referenz. Wie bei den Ussingkammerversuchen konnte so ein negatives Potential gemessen werden, was einer Nettotransport-Rate von positiven Ionen aus dem inneren Hohlraum ins äußere Kompartiment (basolateral) entspricht (bzw. umgekehrt negative Ionen aus dem Interstitium ins Lumen). In den durchgeführten Experimenten konnte

so zu Beginn der Messungen ein Potential ( $V_{\text{lung}}$ ) in Höhe von  $-21,41 \pm 3,34$  mV gemessen werden. Dieses Potential stieg, analog zum  $I_{\text{sc}}$ -Anstieg in der Ussingkammer, im weiteren Verlauf der Messung an und equilibrierte bei  $-36,98 \pm 3,05$  mV, ( $n = 11$ ).

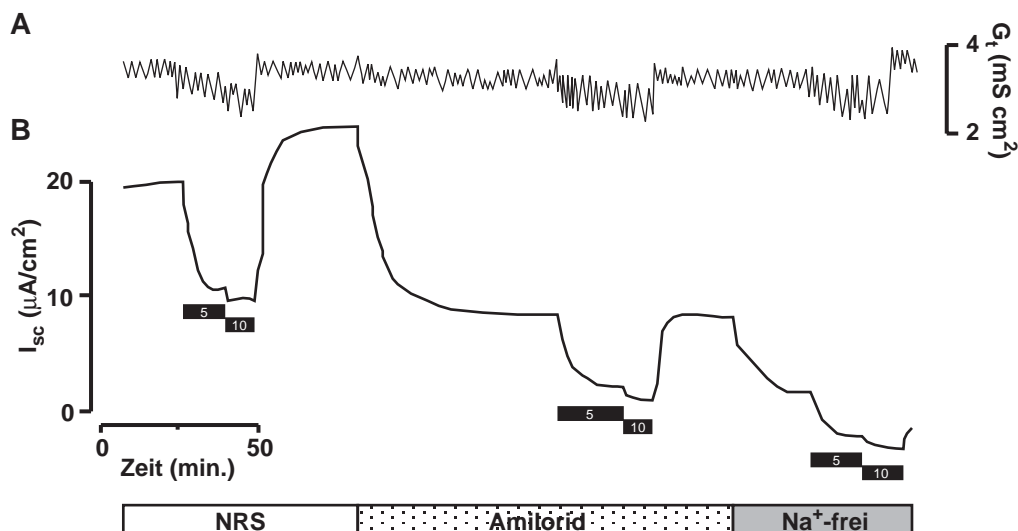
Wurde nach Erreichen eines steady-state Amilorid perfundiert, so konnte ein Abfall im gemessenen Potential beobachtet werden (ca. 63 %). Die Applikation von Ouabain hatte ähnliche Folgen wie die Amilorid-Applikation.  $V_{\text{lung}}$  wurde durch 1 mM Ouabain, basolateral appliziert, gehemmt (87 %). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Abbildung III-20 zusammengefasst.



**Abbildung III-20:** Potentialableitungen intakter *Xenopus*-Lungen. **A** Verglichen werden die Mittelwerte von Messungen, in denen das gemessene Potential durch Ouabain (1 mM), ein potenter Inhibitor der Na/K-ATPase, gehemmt wurde ( $n = 7$ ,  $p < 0,001$ ). **B** Der Ablauf der Messungen war identisch mit A, allerdings wurde statt Ouabain Amilorid (10  $\mu$ M) superfundiert ( $n = 6$ ,  $p < 0,001$ ). In beiden Fällen konnte durch die eingesetzten Inhibitoren eine deutliche Hemmung des Potentials ( $V_{\text{lung}}$ ) gemessen werden.

## 5.2 Druckabhängigkeit transepithelialer Ionenströme im Alveolarepithel von *Xenopus*

Mit Hilfe einer modifizierten Ussingkammer (Abbildung II-3) sollte der Einfluss von mechanischem Druck auf den transepithelialen Ionentransport untersucht werden. Durch eine einseitige Erhöhung der Wassersäule auf der apikalen Seite der Ussingkammer, konnte ein Anstieg des hydrostatischen – und damit eines mechanischen – Drucks auf das Epithel erzielt werden. Die Lungenepithelien von Säugetieren sind bei jedem Atemzug einer Streckung und Dehnung ausgesetzt. Sicher ist die Streckung des Epithels durch eine Erhöhung der Wassersäule kein adäquater Reiz, um die Streckung während der Ventilation zu simulieren. Allerdings kommen die Druckverhältnisse während des Manövers denen einer künstlichen Beatmung von Patienten mit Lungenödemen recht nahe.



**Abbildung III-21:** Beeinflussung elektrischer Parameter durch Druckerhöhung auf das Epithel. Die Erhöhung des Druckes wurde durch ein Vergrößern der Wassersäule auf der apikalen Seite erzielt und erfolgte in zwei Stufen (5 cm, 10 cm  $H_2O$ , durch die schwarzen Balken markiert). Das Ganze wurde unter verschiedenen Bedingungen der apikalen Lösungen wiederholt. **A** Aufzeichnung des Leitwertes ( $G_t$ ). In der abgebildeten Aufzeichnung kann man eine leichte Hemmung des Leitwertes parallel zu der Erhöhung des Druckes erkennen. **B** Aufzeichnung des  $I_{sc}$ , und dessen Veränderungen. Es kommt unter allen Bedingungen zu einem deutlichen Abfall des  $I_{sc}$ .

Wurde auf die beschriebene Weise der Druck in zwei Stufen auf der apikalen Seite der Epithelien erhöht, konnte erstaunlicherweise ein Abfall des  $I_{sc}$  beobachtet werden. Der Abfall erfolgte stufenweise, entsprechend der Erhöhung des Drucks. Unter den Kontrollbedingungen wurde ein Strom in Höhe von  $30,93 \pm 2,64 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  gemessen, der durch die Erhöhung der Wassersäule um 5 cm (5 cm  $\text{H}_2\text{O}$ ) im Mittel auf  $24,87 \pm 2,73$  und durch 10 cm Wassersäule (10 cm  $\text{H}_2\text{O}$ ) schließlich auf  $22,66 \pm 2,22 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  reduziert wurde ( $n = 17$ ,  $p < 0,05$ ). Der transepitheliale Widerstand veränderte sich dabei nicht signifikant (0 cm  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $327 \pm 43$ ; 5 cm  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $332 \pm 21$ ; 10 cm  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $336 \pm 39 \Omega \text{cm}^2$ ,  $n = 17$ ).

In Anwesenheit von Amilorid, sowie in Abwesenheit von apikalem  $\text{Na}^+$  wurden ähnliche Beobachtungen gemacht – es kam zu einem stufenweisen Abfall des  $I_{sc}$  (Abb. III-21). Die Höhe des Abfalls war allerdings niedriger im Vergleich zu den Bedingungen mit NRS. Die Messwerte sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

*Tabelle III-6: Veränderungen von  $I_{sc}$  und  $R_t$  durch den Einfluss von apikalem Druck*

Parameter	0 cm $\text{H}_2\text{O}$	5 cm $\text{H}_2\text{O}$	10 cm $\text{H}_2\text{O}$
<b>NRS</b>			
$I_{sc}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$30,93 \pm 2,64$	$24,87 \pm 2,73^*$	$22,66 \pm 2,22^{**}$
$R_t$ ( $\Omega \text{cm}^2$ )	$327 \pm 43$	$332 \pm 21$	$336 \pm 39$
n		17	
<b>Amilo.</b>			
$I_{sc}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$8,29 \pm 0,85$	$3,65 \pm 1,0^*$	$2,16 \pm 1,03^{**}$
$R_t$ ( $\Omega \text{cm}^2$ )	$313 \pm 40$	$396 \pm 67$	$344 \pm 79$
n		6	
<b><math>\text{Na}^+</math> frei</b>			
$I_{sc}$ ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ )	$2,75 \pm 1,19$	$-0,41 \pm 1,26^*$	$-2,78 \pm 1,51^{**}$
$R_t$ ( $\Omega \text{cm}^2$ )	$333 \pm 31$	$348 \pm 58$	$495 \pm 117$
n		6	

Dokumentiert sind die Veränderungen der Parameter ( $I_{sc}$  und  $R_t$ ) durch die stufenweise Erhöhung des Druckes im apikalen Kammerkompartiment (5 cm Wassersäule, 10 cm Wassersäule). Das Manöver wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt (NRS: identische Lösungen auf beiden Seiten des Epithels; Amilo.: in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Amilorid in der apikalen Lösung;  $\text{Na}^+$ -frei:  $\text{Na}^+$  wurde in der apikalen Lsg. durch NMDG substituiert). Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben (\*: verschieden von 0 cm  $\text{H}_2\text{O}$ ; #: verschieden von 5 cm  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $p < 0,05$ ).

## IV. Diskussion

Aufgrund mehrerer Eigenschaften, aber vor allem wegen ihrer relativ einfachen Anatomie, ist die Lunge des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) ein geeignetes Studienobjekt zur Untersuchung alveolarer Elektrolytregulation. Die entnommenen Organe sind ohne größeren Aufwand so zu präparieren, dass sie problemlos in eine angepasste Ussingkammer montiert werden können. Das Gewebe unterteilt den Kammerhohlraum in zwei Kompartimente und ermöglicht, mit entsprechend platzierten Elektroden, die Ableitung elektrischer Parameter unter kontrollierten Bedingungen. Ähnliche Versuche an alveolaren Epithelien von Säugetieren sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich.

Bereits in den siebziger Jahren wurde auf morphologische Ähnlichkeiten der Luft-/Blut-Barriere in der *Xenopus*-Lunge und im Alveolarepithel von Säugern hingewiesen (Dierichs, 1975; Meban, 1973). Neben diesen beschriebenen morphologischen Gemeinsamkeiten konnte die ähnliche Zusammensetzung des surfactant in *Rana catesbeiana* (Ochsenfrosch) und Säugern nachgewiesen werden (Oguchi et al., 1994). Andere Publikationen weisen zudem auf die bei Fröschen und Menschen ähnlichen Strukturen hin, die zur Produktion und Ausschüttung des surfactant nötig sind (Daniels & Orgeig, 2001). Lässt man die Anatomie ausser Acht, besteht der wichtigste Unterschied darin, dass das Alveolarepithel der Amphibien – wie zum Beispiel das von *Xenopus* – aus nur einem Zelltyp besteht (Fischer et al., 1989); dem stehen alveolare Zellen des Typs I und II in Säugerlungen gegenüber (Crapo et al., 1983), wobei erstere den Gasaustausch bewältigen und letztere die Viskosität des Epithel-bedeckenden Flüssigkeitslayers regulieren.

Neben den bereits beschriebenen morphologischen Gemeinsamkeiten ergaben erste elektrophysiologische Messungen am Alveolarepithel von *Xenopus*, dass dies zudem auch ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften aufweist, verglichen mit den pulmonalen Epithelien, die aus Säugern isoliert wurden (Fischer et al. 1989; Fischer et al., 1990; Kim 1990). Der überwiegende Teil des elektrogenen transepithelialen Ionenstroms in der *Xenopus*-Lunge konnte durch Amilorid gehemmt werden – ein Hinweis auf die Anwesenheit von epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanälen (ENaCs; Fischer et al., 1989), wie man sie bereits aus verschiedenen Alveolar-

epithelien kennt (Matalon et al., 1996; Matalon & O'Brodivich 1999). Neben der Resorption von  $\text{Na}^+$  konnte auch eine Leitfähigkeit für  $\text{Cl}^-$ -Ionen nachgewiesen werden (Kim 1990). Hervorzuheben ist auch, dass die Lungenepithelien von jungen Krallenfröschen keine amilorid-sensitive Leitfähigkeit aufweisen (Baxendale-Cox, 1999), eine Eigenschaft, die man auch von fötalen Säugerepithelien aus der Lunge kennt (Cott & Rao, 1993). Die genannten strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten von *Xenopus*-Lunge und Säugetierlungen rechtfertigen den Einsatz der *Xenopus*-Lunge in der Grundlagenforschung bezüglich der Untersuchung von pulmonalen Ionentransport-Mechanismen. Anhand von Ussingkammer-Experimenten könnte z. B. die Wirkung neuer Pharmaka auf den transepithelialen Ionentransport eines nativen Alveolarepithels untersucht werden. Solche *in vitro* Versuche sind oft die Grundlage für neue Therapien (z. B. die Amilorid-Inhalation bei CF-Patienten, Hirsh 2002).

Nach heutigem Verständnis gelten die Transportwege von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen ( $\text{Na}^+$ -Resorption und  $\text{Cl}^-$ -Sekretion) in Lungenepithelien als wichtigste Faktoren, um die Viskosität des alveolaren Flüssigkeitsfilms, der das Lungenepithel bedeckt, aufrechtzuerhalten (Sartori et al., 2001). Die Konsistenz dieses Flüssigkeitsschicht wird durch den Wassergehalt bestimmt, wobei das Wasser den Elektrolyten passiv nachströmt. Eine Störung des Gleichgewichts zwischen diesen beiden Transportwegen kann gravierende Folgen haben. Beispiele hierfür sind Störungen der Wasserresorption aus dem Lungenlumen bei Neugeborenen (Pitkanen, 2001). Eine direkte Verbindung zu einer gestörten  $\text{Na}^+$ -Resorption in Kombination mit einer gestörten Wasserresorption ist an der hohen Letalität von knock-out-Mäusen ohne funktionelle  $\alpha$ -ENaC-Untereinheit zu erkennen (Hummler et al., 1996). Die Mäuse ertrinken kurz nach der Geburt, da sie nicht in der Lage sind, die Flüssigkeit aus dem Alveolarraum zu resorbieren. Ebenso sind die auftretenden Symptome bei Mukoviszidose-Patienten, die oft mit Schädigungen der Lunge einhergehen, die Folge eines defekten (mutiert/deletiert)  $\text{Cl}^-$ -Kanals (Verkman et al., 2003). Die fehlende  $\text{Cl}^-$ -Sekretion führt zur Bildung eines zähflüssigen Mukus, infolge dessen es zu chronischen Entzündungen kommt und schließlich zur Bildung von Fibrosen.

Eine Dysfunktion der Elektrolyt- und Wasserresorption wird zunehmend auch in Verbindung mit Entzündungsprozessen in der Lunge beobachtet. Beschrieben ist dabei das acute respiratory distress syndrome (ARDS), welches insbesondere bei Patienten in Folge einer Sepsis auftreten kann (Walmrath et al., 2001). Betroffene Patienten drohen trotz künstlicher Beatmung zu ertrinken (Günther et al., 2001).

Diese Erkenntnisse, sowie die bis heute entdeckten Parallelen des *Xenopus*-Lungenepithels mit denen aus Säugern, bildeten die Basis für die vorliegende Arbeit. Neben weiteren funktionellen Gemeinsamkeiten galt es, neue Regulationsprinzipien des alveolaren Ionentransports nachzuweisen; letztlich, um die Akzeptanz dieses Gewebes als pulmonales Ionentransport-Modell zu fördern. Es sei noch einmal erwähnt, dass es sich bei der *Xenopus*-Lunge um ein intaktes Epithel handelt, welches über alle umgebenden Zelltypen verfügt. Damit kommen die Versuchsbedingungen in der Ussingkammer den physiologischen Bedingungen sehr nahe – im Gegensatz zu den alveolaren Zellkulturen, deren Ionentransporteigenschaften erheblich von den Kulturbedingungen abhängig sind (Jain et al., 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass verschiedene, aus alveolaren Säugerepithelien, bekannte Regulationsmechanismen auch im Lungenepithel von *Xenopus* rezent sind. Zusätzlich konnte eine intrinsische/autoregulatorische Kontrolle der apikalen Na<sup>+</sup>-Kanäle in der *Xenopus*-Lunge nachgewiesen werden, wie man sie bisher nur aus klassischen Na<sup>+</sup>-resorbierenden Epithelien kennt (z. B. Froschhaut, Nierenepithel; Turnheim, 1991). Darüber hinaus konnten neue Untersuchungsmethoden angewendet werden, die neue Perspektiven bei der Untersuchung bestehender Fragen eröffnen.

## 1 ACTH-induzierte Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften der *Xenopus*-Lunge

Das Peptidhormon ACTH (Adrenokortikotropes Hormon) wird in der Adenohypophyse gebildet und ist ein wichtiges Glied in der Regulation des Mineralien- und Wasserhaushalts, da es die Freisetzung von Aldosteron aus der *zona glomerulosa* der Nebenniere mitkontrolliert. Das Steroidhormon Aldosteron ist, zusammen mit ADH (Antidiuretische Hormon), das wichtigste Hormon bei der Kontrolle des Salz- und Wasserhaushalts. Aldosteron aktiviert in den Zielgeweben die Transkription und Translation verschiedener Proteine (vor allem von Ionentransport-Proteinen); unter anderem aber die Transkription der verschiedenen ENaC-Untereinheiten (Garty & Palmer, 1997). Die Wirkung von Aldosteron konnte bereits in einer Vielzahl von verschiedenen Epithelien nachgewiesen werden, unter anderem am Lungenepithel. So konnte z. B. Olivera et al. (2000) bei Ratten eine gesteigerte Resorption von Flüssigkeit aus dem Lungenlumen nach Aldosteron-Inhalation nachweisen, aber auch das Alveolarepithel von *Xenopus* wurde bereits als Zielgewebe identifiziert (Fischer et al., 1990). In der von Fischer et al. durchgeführten Studie führte die basolaterale Applikation von Aldosteron nach etwa drei Stunden zu einer ca. dreifachen Steigerung des transepithelialen Stroms, wobei der Anstieg amilorid-sensitiv war.

In ersten Versuchen an den Lungenepithelien von *Xenopus*, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, zeigten sich recht hohe Schwankungen im amilorid-sensitiven Anteil des  $I_{sc}$ , wodurch die statistische Auswertung der Ergebnisse erschwert wurde. Die Kombination der Tatsachen, dass eine subcutane ACTH-Injektion die Konzentration der Steroide im Blutplasma von *Xenopus* messbar erhöht (Thurmond et al., 1986; Hanke & Kloas, 1996) und die Lunge ein potentielles Zielorgan von Mineralkortikoiden ist (Fischer et al., 1990), nährte die Vermutung einer durch die Injektion von ACTH ausgelösten *in vivo*-Stimulation des Ionentransports im Lungenepithel mit dem Ziel, die endogene physiologische  $Na^+$ -Resorption in der Lunge maximal zu stimulieren. In einem repräsentativen Vergleich konnte in dieser Arbeit eine deutliche Erhöhung der elektrophysiologischen Parameter durch die zweifache Injektion von ACTH, 48 und 24 Stunden, vor dem Tod der Tiere beobachtet werden (Seite 30, Tabelle III-1). Alle Parameter ( $I_{sc}$ ,  $I_{ami}$ ,  $I_{Na}$ ), mit Ausnahme des transepithelialen Widerstands

( $R_f$ ), waren deutlich erhöht. Hervorgehoben sei noch einmal die Steigerung von  $I_{ami}$  um ca. 170 %. Dies stützt sowohl die Vermutung, dass ACTH bei Amphibien die Freisetzung von Mineral-kortikoiden fördert, als auch, dass die Lunge *in vivo* ein Zielorgan der Mineralkortikoide (vor allem des Aldosterons) ist. Die Injektion der Tiere mit ACTH ist ein geeignetes Mittel, die Expression  $Na^+$ -transportierender Proteine zu erhöhen und kann bei Untersuchungen des elektrogeneren  $Na^+$ -Transports eingesetzt werden, um die Variabilität auftretender Schwankungen zu reduzieren.

Weitere Versuche, aufgeteilt in zwei verschiedene Gruppen (Kontroll-Donoren und ACTH-Donoren), wurden anschließend durchgeführt um festzustellen, ob die Vorbehandlung der Tiere Auswirkungen auf die Wirksamkeit von Pharmaka hat. Dabei wurden Substanzen verwendet, die bekanntermaßen Mediatoren von Ionentransport-Prozessen sind.

Die Wahl fiel zum einen auf cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), einen second messenger, der viele Funktionen in Zellen hat, aber auch ein potenter Vermittler von Signalen zur Aktivierung von Ionenkanälen ist. Die Beteiligung von cAMP an der Regulation epithelialer  $Na^+$ -Kanäle ist hinlänglich bekannt (Garty & Palmer, 1997). Zusätzlich zu cAMP wurde in den Versuchen IBMX eingesetzt, ein Inhibitor von cAMP-Phosphodiesterasen, der den Abbau des cAMP verhindern/reduzieren sollte.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Fischer et al. (1989) konnten in dieser Studie Veränderungen der elektrischen Parameter durch die basolaterale Applikation von cpt-cAMP nachgewiesen werden. Die cAMP-induzierten Effekte waren sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der ACTH-Gruppe evident. Zudem konnte anhand von Kontrollversuchen die amilorid-sensitive Komponente des  $I_{sc}$  als Ziel der cAMP-Wirkung identifiziert werden. Die durch cpt-cAMP induzierten Veränderungen waren in beiden Gruppen identisch (Abb. III-1). Diese gegensätzlichen Beobachtungen im Vergleich zu der Studie von Fischer et al. (1989) sind schwer zu erklären. Einziger ersichtlicher Unterschied in unserer Studie ist der Einsatz von IBMX. Möglicherweise wird cAMP, dessen Membrangängigkeit durch die Substitution chemischer Gruppen gewährleistet wird, ohne den Phosphodiesterase-Hemmer IBMX schnell metabolisiert/abgebaut, bevor es in ausreichenden Mengen in der Zelle angehäuft werden kann.

In dieser Arbeit wurde das membrangängige cAMP Analog 8-(4-Chlorophenylthio)-cAMP (cpt-cAMP) eingesetzt, welches – wie Chraibi und Mitarbeiter (2001) nachweisen konnten –

mit extrazellulären Komponenten einer ENaC-Chimäre wechselwirkt und dadurch den Kanal stimuliert. Der beschriebene Effekt ist dabei ausdrücklich dem cAMP-Analog (cpt-cAMP) zuzuschreiben. Eine Beteiligung intrazellulären cAMPs an der Regulation von ENaCs steht hingegen außer Frage. Dies konnte in einer Vielzahl von Studien zweifelsfrei nachgewiesen werden (Übersicht in Garty & Palmer 1997). Dass cAMP am ENaC in der *Xenopus*-Lunge intrazellulär wirkt, lässt sich auch anhand einer durch Forskolin-induzierten Erhöhung des amilorid-sensitiven Stromes in der *Xenopus*-Lunge ableiten (Berk et al., 2003). Forskolin stimuliert die Adenylatcyclase und erhöht dadurch den intrazellulären cAMP-Spiegel. Aufgrund dieser Ergebnisse kann ein rein pharmakologischer Effekt durch die cpt-Gruppe ausgeschlossen werden. Es kann aber trotzdem sein, dass cpt-cAMP zusätzlich mit extrazellulären Teilen der Kanäle wechselwirkt. Um dieses zweifelsfrei klären zu können, bedarf es zusätzlicher Untersuchungen.

Eine Aktivierung cAMP-abhängiger Signalkaskaden kann durch  $\beta$ -adrenerge Agonisten und damit durch die Aktivierung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren erfolgen (Dumasius et al., 2001; Minakata et al., 1998; Saumon et al., 1989). Die Aktivierung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren ist somit auch ein Mechanismus zur Regulation von Ionentransportprozessen. Man vermutet, dass in der Lunge eine Aktivierung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren ein wichtiger Mechanismus ist, bei pathologischen Prozessen die betroffenen Areale „trocken“ zu halten (Pittet et al., 1994). Die  $\beta$ -adrenerge Aktivierung von ENaCs in isolierten pulmonalen Säugerepithelien konnte in verschiedenen Studien und durch verschiedene Methoden (voltage-clamp, patch-clamp) demonstriert werden (Bland & Nielson, 1992; Chen et al., 2002; Marunaka et al., 1992; Matalon et al., 1996).

Die basolaterale Applikation von Terbutalin, einem  $\beta$ -adrenergen Agonisten, vermag ENaC-abhängige Ionenströme in der *Xenopus*-Lunge zu aktivieren (Baxendale-Cox, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche mit Terbutalin durchgeführt, um zu sehen, inwieweit die Wirksamkeit eines first messengers durch die ACTH-Injektionen beeinflusst wird. Aber auch, um eventuelle Ungereimtheiten, die auf die Substituierung des cAMP zurückzuführen sind, auszuschließen (Chraibi et al., 2001). Die entsprechenden Versuche wurden wieder an zwei voneinander getrennten Gruppen durchgeführt. Sowohl in unbehandelten als auch in den ACTH-behandelten Donoren waren Effekte von Terbutalin detektierbar. Wie bereits in den Versuchen

mit cpt-cAMP war die Wirkung von Terbutalin in beiden Gruppen identisch, unabhängig von der Vorbehandlung der Tiere. Auffällig war lediglich die Höhe der Stimulation, verglichen mit den Daten aus der Studie von Baxendale-Cox (1999). In dieser Studie wurde eine Stimulation des amilorid-sensitiven Stromes um ca. 100 % gemessen, während die max. Stimulation in unseren Messungen nur ca. 25 % betrug. Eine plausible Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse liegt vielleicht darin, dass in unserer Studie Terbutalin ausschließlich basolateral appliziert wurde und nicht auf beiden Seiten des Gewebes. In der Arbeit von Baxendale-Cox (1999) konnte die Stimulation durch Terbutalin zweifelsfrei auf eine gesteigerte Aktivität von ENaCs zurückgeführt werden. Dieses konnte mittels Rauschanalyse-Spektren nachgewiesen werden: man registrierte eine Verdopplung der geöffneten Kanäle nach Terbutalin-Applikation.

Die Ergebnisse zeigten, dass das alveolare Epithel *in vivo* ein Zielgewebe einer ACTH-induzierten Mineralkortikoidfreisetzung ist, deren Wirkung anhand einer Erhöhung der transepithelialen Na<sup>+</sup>-Resorption nachgewiesen werden konnte. Die Vorbehandlung der Lungen-Donoren mit ACTH vermochte die Wirkung von Pharmaka, in diesem Fall cAMP und Terbutalin, nicht zu beeinflussen.

## 2 Effekt von Histamin auf die transepitheliale Na<sup>+</sup>-Resorption

Histamin ist ein biologisch aktives Amin, welches eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Entzündungsprozessen spielt. Es wird in allen Körpergeweben gebildet – vor allem aber in Mastzellen und basophilen Granulocyten – und durch Degranulation freigesetzt (Klein, 1991). Die Wirkung in den Zielgeweben erfolgt durch die Bindung der Moleküle an spezielle Rezeptoren, wobei drei Typen von Histaminrezeptoren (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> und H<sub>3</sub>) unterschieden werden (Bakker et al., 2002). Andere Autoren unterscheiden vier verschiedene Typen von Histaminrezeptoren (Repka-Ramirez, 2003). Unabhängig von der Einteilung handelt es sich bei allen um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über eine Vielzahl von möglichen Effektoren verfügen. Allein für H<sub>1</sub>-Rezeptoren gibt es verschiedene beschriebene Signalwege, wobei die Bildung von IP<sub>3</sub> (Inositol 1,4,5-Triphosphat) und DAG (1,2-Diacylglycerol) durch die Rezeptorstimulation im Vordergrund steht. Mit IP<sub>3</sub> ist die Mobilisierung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> assoziiert, weshalb man auch von sogenannten „Ca<sup>2+</sup>-mobilizing receptors“ spricht (Smit et al., 1999).

In der Lunge wird Histamin bei Entzündungsprozessen primär von Mastzellen ausgeschüttet. Es führt zu einer Kontraktion der glatten Muskelzellen in den Bronchien und der Trachea, sowie zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität (Devalia & Davies, 1999). Zu erwähnen ist die Beteiligung desamins an Allergien und bei Asthma. Asthma ist gekennzeichnet durch Atemnot infolge einer Atemwegskonstriktion, an der Histamin unmittelbar beteiligt ist (Wood-Baker, 1995). Es ist somit auch nicht verwunderlich, dass Histamin-Rezeptor-Antagonisten eine große Bedeutung in der klinischen Therapie, z. B. bei der Behandlung von Asthma, zukommt (Devalia & Davies, 1999; van der Goot & Timmerman, 2000).

In den letzten Jahren rückte das Alveolarepithel zunehmend in den Fokus der Asthmaforschung (Jacoby, 1997). Durch Beschädigung des Epithels (wodurch darunter liegende Gewebsschichten schutzlos inhalierten Schadstoffen ausgesetzt sind) kann es zu Überreaktionen kommen, deren Folgen die bereits beschriebenen Symptome sind (Folkerts & Nijkamp, 1998). Die gleichen Autoren unterstreichen außerdem die Wichtigkeit des Epithels bei der Aufrechterhaltung der Viskosität der alveolaren Flüssigkeit und die Sekretion so genannter „epithelium derived relaxing factors“ wie z. B. Prostaglandin E<sub>2</sub> (Folkerts & Nijkamp, 1998). Zudem ergaben Unter-

suchungen der Alveolarflüssigkeit von Asthmapatienten, dass diese, verglichen mit der von gesunden Probanden, erhöhte Mengen von Histamin enthielt (Casale et al., 1987; Liu et al., 1990). Dies gab Anlass zu untersuchen, inwieweit Histamin die Elektrolytregulation selbst mitbeeinflusst.

Neben einer Beteiligung von Histamin an Entzündungsprozessen konnte bereits eine Rolle bei der Regulation des epithelialen Ionentransports nachgewiesen werden. Die meisten Erkenntnisse wurden dabei an Colongewebe gewonnen (Rangachari & McWade, 1986; Hardcastle & Hardcastle, 1987; Keely et al., 1995; Barocelli & Ballabeni, 2003), wobei die Hauptwirkung von Histamin in erster Linie in einer Stimulation der intestinalen  $\text{Cl}^-$ -Sekretion über  $\text{H}_1$ -Rezeptoren besteht. Außer an Verdauungsorganen konnte die Wirksamkeit noch in Arterien (van de Voorde et al., 1994; Gokina & Bevan, 2000), Nervenzellen (Undem & Carr, 2001) und in Epithelien der Atemwegsgewebe gezeigt werden (Tessier et al., 1991; Clarke et al., 1992; Yamaya et al., 1993; Rugolo et al., 1996).

Die meisten Erkenntnisse über die Wirkung von Histamin entstammen Studien an Säugetieren bzw. deren Geweben. Dabei spielt es bereits bei Invertebraten eine wichtige Rolle, allerdings sind die bis heute identifizierten Rezeptoren aus Invertebraten ausnahmslos ligandenabhängige Ionenkanäle (Gisselmann et al., 2002) – im Gegensatz zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Vertebraten (Roeder, 2003). Die Beteiligung von Histamin und dessen Rezeptoren konnte zudem bei verschiedenen Prozessen in Amphibien nachgewiesen werden. Baccari et al. (1998) gelang es, Histamin in Mastzellen, die aus verschiedenen Geweben von *Rana esculenta* isoliert wurden, nachzuweisen. Im gleichen Jahr konnte die Arbeitsgruppe um Ali (1998) die Funktion von  $\text{H}_1$ - und  $\text{H}_2$ -Rezeptoren bei der Aggregation von Melanophoren in der Haut von *Rana tigerina* nachweisen.

In den von uns durchgeführten Experimenten konnte ein Anstieg des transepithelialen Kurzschlussstroms gemessen werden, hervorgerufen durch die apikale Perfusion von Histamin. Der Effekt von Histamin erwies sich dabei als konzentrations-abhängig. Die halbmaximale Wirkung konnte bei einer Konzentration von  $86 \mu\text{M}$  bestimmt werden. Die Epithelien waren durch die Vorbehandlung mit Amilorid unempfindlich gegen die Stimulation durch Histamin. Dies deutet auf eine Stimulation der  $\text{Na}^+$ -Resorption durch epitheliale  $\text{Na}^+$ -Kanäle hin. Eine Erhöhung der  $\text{Na}^+$ -Resorption durch die Applikation von Histamin war in Epithelien der Atemwege bislang

nicht bekannt. Durch Histamin wurde eine Erhöhung einer PLC (Phospholipase C)-abhängigen Stimulation der  $\text{Cl}^-$ -Sekretion in humanen nasalen Epithelzellen beschrieben (Clarke et al., 1992). Ebenfalls eine Stimulation einer  $\text{Cl}^-$ -Sekretion, allerdings zusammen mit einer Hemmung der  $\text{Na}^+$ -Resorption, wurde in Tracheen von Pferden nachgewiesen (Tessier et al., 1991). Des Weiteren beschreiben Yamaya und Mitarbeiter (1993) eine histamin-induzierte Stimulation der  $\text{Cl}^-$ -Sekretion in trachealem Gewebe und Devor & Pilewski (1999) eine Hemmung des transepithelialen  $\text{Na}^+$ -Stroms im humanen Bronchialepithel.

Die beobachteten Effekte sind dabei auf eine Aktivierung von  $\text{H}_1$ -Rezeptoren zurückzuführen. Dies konnte durch den Einsatz von entsprechenden Antagonisten gezeigt werden. In den Epithelien der *Xenopus*-Lunge konnte die Wirkung von Histamin durch eine Inkubation der Epithelien mit Diphenhydramin, einem  $\text{H}_1$ -spezifischen Antagonisten (van der Goot & Timmerman, 1999) ebenfalls aufgehoben werden. In Versuchen mit Cimetidin, einem  $\text{H}_2$ -selektiven Antagonisten, konnte der Histamin-Effekt nicht ganz unterbunden werden, allerdings war die Histamin-Wirkung in Anwesenheit von Cimetidin etwas schwächer. Der niedrigere Histamin-Effekt unter Cimetidin ist wahrscheinlich auf eine Sensibilisierung der Rezeptoren gegenüber Histamin zurückzuführen (die Epithelien wurden vor der Inkubation mit Cimetidin bereits mit Histamin superfundiert).

Zusammengefasst kann man aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit auf die Anwesenheit von  $\text{H}_1$ -Rezeptoren im Alveolarepithel von *Xenopus* schließen, sowie auf deren Beteiligung an der Regulation der transepithelialen  $\text{Na}^+$ -Resorption. Allerdings ist es schwierig, die speziesabhängigen Unterschiede im Vergleich zu Säugern zu erklären. In der *Xenopus*-Lunge konnte zweifelsfrei eine Stimulation des transepithelialen  $\text{Na}^+$ -Stroms nachgewiesen werden, während in den Atemwegsepithelien der Säuger ausschließlich eine Hemmung des  $\text{Na}^+$ -Transports durch Histamin beschrieben ist. Es ist daher von großem Interesse zu erforschen, welche Funktion Histamin in der Lunge von Amphibien hat. Diese Erkenntnisse könnten auch das Verständnis dafür erhöhen, welche Bedeutung dem Amin bei der Beteiligung an der Erhöhung der transepithelialen  $\text{Na}^+$ -Resorption zukommt. Möglich, dass Histamin, ähnlich wie es für  $\beta$ -adrenerge Stimulation vermutet wird (Pittet et al., 1994), bei Entzündungsprozessen dazu dient, die betroffenen Areale „trocken“ zu halten, indem es die transepitheliale  $\text{Na}^+$ -Resorption erhöht.

### 3 Purinerge Rezeptoren

Lange Zeit wurde die Möglichkeit, dass energiereiche Moleküle wie ATP als Signalmoleküle fungieren, kontrovers diskutiert, obwohl schon in den dreissiger Jahren Hinweise auf die Wirkung von ATP bekannt waren (Gillespie, 1934). Burnstock (1978) unterschied schließlich erstmals verschiedene Purin-Rezeptor-Typen ( $P_1$ -purinoceptors, bzw.  $P_2$ -purinoceptors) und bezeichnete sie auch als Rezeptoren, die durch die Bindung entsprechender Liganden aktiviert werden. Betreffende Membranproteine werden als purinerge Rezeptoren bezeichnet und zusammengefasst. Es handelt sich um eine Gruppe von Membranrezeptoren, die in der Lage sind, Purine und Pyrimidine als Liganden zu erkennen und zu binden. Als Kriterium für die primäre Einteilung bzw. Unterscheidung der Rezeptoren dient ihre Spezifität gegenüber bestimmten Liganden.

$P_1$ -Rezeptoren sind aus sieben transmembranen Domänen, mit einem extrazellulären N-Terminus und einem cytoplasmatischen C-Terminus, aufgebaut und binden spezifisch Adenosin. Man unterscheidet vier Typen ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ) und bei allen handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Ralevic & Burnstock, 1998).

$P_2$ -Rezeptoren hingegen binden in erster Linie Tri- und Dinucleotide (Ralevic & Burnstock, 1998). Zudem werden sie noch zusätzlich in  $P_2X$ - und  $P_2Y$ -Rezeptoren unterteilt.  $P_2X$ -Rezeptoren sind ligandenabhängige Kationenkanäle, die aus mindestens zwei Untereinheiten bestehen und eine Selektivität für ATP und -Analoge aufweisen. Jede Untereinheit besitzt zwei transmembrane Domänen, N- und C-Terminus liegen im Zellinneren (North, 2002). Die Stöchiometrie der Rezeptoruntereinheiten, die letztlich einen Kanal bilden, ist bisher nicht bekannt. Allerdings geht man von mindestens zwei Untereinheiten aus (North, 2002). Bei den  $P_2Y$ -Rezeptoren hingegen handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren, die, wie  $P_1$ -Rezeptoren, sieben transmembrane Domänen besitzen. Innerhalb der  $P_2$ -Rezeptoren gibt es Subtypen, die im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren ( $P_1$ ,  $P_2X$ ) auch UTP binden (Ralevic & Burnstock, 1998; von Kügelgen & Wetter, 2001).

Die Anwesenheit dieser unterschiedlichen Rezeptoren konnte bislang in sehr vielen Geweben und Organen belegt werden – entsprechend vielfältig sind die Zellfunktionen die über diese Rezeptoren gesteuert werden (Übersicht in Ralevic & Burnstock, 1998).

### 3.1 P2-Rezeptoren

Wie bereits beschrieben, binden P2-Rezeptoren bevorzugt ATP und UTP bzw. deren Dinucleotide (ADP und UDP). Die Relevanz dieser Rezeptoren für die Forschung hat in den letzten Jahren zugenommen – kein Wunder, Fehlfunktionen der durch sie gesteuerten Prozesse werden mit einigen Krankheiten in Verbindung gebracht. Die Rezeptoren gelten damit auch als mögliche Ziele bei der Therapie von verschiedenen Krankheiten (Burnstock, 2002). Zu den Krankheiten zählen zum Beispiel Epilepsie, die Parkinson'sche Krankheit, verschiedene Entzündungsprozesse und Diabetes (Williams & Jarvis, 2000).

Neben einer möglichen Relevanz bei den genannten Krankheitsbildern gibt es eine Vielzahl von publizierten Ergebnissen, die eine Beteiligung der Rezeptoren an der Regulation von trans-epitheliale Ionentransport dokumentieren. Ihre Funktion konnte beispielsweise in den Pankreasgängen von Ratten (Hede et al., 1999; Sørensen & Novak 2001), im distalen Kolon der Ratte (Leipziger et al., 1997), und im corticalen Sammelrohr der Maus (Deetjen et al., 2000; Lehrmann et al., 2002; McCoy et al., 1999) nachgewiesen werden. Die beschriebene Wirkung der Nucleotide besteht dabei fast ausschließlich in einer Stimulation der Cl<sup>-</sup>-Sekretion und einer Hemmung der Na<sup>+</sup>-Resorption (Cuffe et al., 2000; Leipziger, 2003).

Es ist nicht weiter verwunderlich, dass P2-Rezeptoren auch bei der Ionentransportregulation in respiratorischen Epithelien eine Rolle spielen (Inglis et al., 1999; Laubinger et al., 2001; Ramming et al., 1999), wobei ebenfalls eine gesteigerte Cl<sup>-</sup>-Sekretion und eine reduzierte Na<sup>+</sup>-Sekretion zu verzeichnen sind (Inglis et al., 1999). In Verbindung mit dem Nachweis, dass P2Y-Rezeptoren die Sekretion von Mucin (Lethem et al., 1993) und die Frequenz des Cilienschlags (Korngreen & Priel, 1996) in Alveolarepithelien regulieren können, werden die Rezeptoren auch als potentielle Ziele in der Therapie von Mukoviszidose (CF) gehandelt. Eine positive Wirkung auf die „mucociliary clearance“ konnte in einer klinischen Studie an CF-Patienten, denen UTP inhalativ verabreicht wurde, bewiesen werden (Bennett et al., 1996).

Die Nucleotide werden lokal von den Zellen ausgeschüttet und wirken als auto-/parakrine Signalmoleküle. Taylor et al. (1998) dokumentierten eine permanente (basale) Ausschüttung von ATP, sowohl auf der apikalen als auch auf der basolateralen Seite von alveolaren Epithelzellen.

Hauptstimulus für die Ausschüttung scheint dabei mechanischer Stress zu sein (Berühren der Zellen mit einer Pipette, oder einfaches Schütteln der Zellkulturflaschen; Leipziger, 2003). Lazarowski & Boucher (2001; Lazarowski et al., 1997) postulieren dies für UTP und Knight et al. (2002) für ATP. Die Mechanismen, wie die Nucleotide ausgeschüttet werden, sind allerdings noch nicht ausreichend untersucht. Neben  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Exocytose (Watt et al., 1998), wird die Beteiligung des zu den ABC-Transportern zugehörigen CFTR-Proteins vermutet (Schwiebert et al., 1995; Cantiello, 2001) und eine mögliche Existenz von ATP-Kanälen diskutiert (Boudreault & Grygorczyk 2002; Braunstein et al., 2001; Sugita et al., 1998).

Ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung der verschiedenen P2-Rezeptorsubtypen ist deren Affinität für verschiedene Agonisten und Antagonisten (Ralevic & Burnstock, 1998). Allerdings ist es trotz der Vielzahl bekannter Antagonisten und Agonisten nicht möglich, alle Typen anhand ihres pharmakologischen Profils zu unterscheiden bzw. zweifelsfrei zu identifizieren. Suramin ist zum Beispiel ein potenter Antagonist, wird allerdings von fast allen P2-Rezeptoren (unabhängig ob P2X oder P2Y) gebunden (Ralevic & Burnstock, 1998).

Der transepitheliale Ionenstrom in der Froschlunge konnte durch die extrazelluläre Applikation von ATP und UTP stimuliert werden. In beiden Fällen erwies sich der größte Teil der Stimulation als amilorid-sensitiv und steht im Gegensatz zu den bislang beschriebenen Wirkungen, nämlich einer Hemmung des elektrogenen  $\text{Na}^+$ -Transports (Devor & Pilewski, 1999; Kunzelmann, 2002; McCoy et al., 1999;). Einzig Leipziger et al. (1997) publizierten Daten einer gesteigerten  $\text{NaCl}$ -Sekretion in der distalen Colon-Mucosa der Maus durch basolaterales ATP, sowie Brodin & Nielsen (2000b) über eine Erhöhung der  $\text{Na}^+$ -Resorption durch basolaterales ATP bzw. UTP in der Froschhaut. Zudem konnten in der Froschhaut sowohl P2X- als auch P2Y-Rezeptoren nachgewiesen werden (Brodin & Nielsen, 2000a).

Erste Hinweise auf verschiedene purinerge Rezeptoren im *Xenopus*-Lungenepithel lassen sich aus der Tatsache ableiten, dass die UTP-Stimulation vollständig durch Amilorid gehemmt werden konnte, aber nicht die ATP-induzierte Stimulation. Die Wirkung von ATP konnte nur in  $\text{Cl}^-$ -freien Lösungen auf beiden Seiten der Epithelien und der zusätzlichen Anwesenheit von Amilorid auf der apikalen Seite unterbunden werden. Dies, sowie eine teilweise Hemmung des ATP-induzierten Stroms durch den  $\text{Cl}^-$ -Kanalblocker NPPB, deutet auf eine parallele Stimulation von apikalen  $\text{Cl}^-$ -Kanälen durch ATP hin, was sich mit anderen Studien deckt (Cressmann

et al., 1999; Kanoh et al., 2001; McCoy et al., 1999). Um sicher zu gehen, dass die beobachteten Effekte nicht auf Adenosin zurückzuführen sind, welches durch Ectonucleotidasen aus ATP hydrolysiert werden kann (Zimmermann, 2000), wurden zusätzliche Versuche mit ATP- $\gamma$ -S durchgeführt, einem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analog. Es konnte, wie mit dem kommerziell erworbenen ATP, ein größtenteils amilorid-sensitiver Anstieg des  $I_{sc}$  beobachtet werden.

Abgesehen von den Unterschieden in der Wirkung von ATP und UTP vermochte eine additive Applikation der Trinucleotide innerhalb eines Experiments eine zweistufige Erhöhung des  $I_{sc}$  hervorzurufen. Diese additive Wirkung konnte, unabhängig von der Reihenfolge der Applikation, beobachtet werden. Weitere Hinweise auf verschiedene Typen von Rezeptoren ergaben sich aus Versuchen mit dem P2-Rezeptor Antagonisten PPADS. Die Inkubation der Epithelien mit PPADS konnte den Effekt von UTP hemmen, während ATP nach wie vor den  $I_{sc}$  stimulierte. Diese Beobachtung war ebenfalls unabhängig von der Reihenfolge der Trinucleotid-Applikation. Mehrere Möglichkeiten bieten sich an, die Beobachtungen zu erklären: **a.)** bei Säugern ist ein Rezeptor beschrieben ( $P2Y_4$ ), der selektiv UTP bindet und zudem durch PPADS gehemmt wird (Communi et al., 1996; Ralevic & Burnstock, 1998) und man kennt Rezeptoren, wie den humanen  $P2Y_{11}$ -Rezeptor, der ATP bevorzugt bindet und nicht durch PPADS gehemmt wird (Communi et al., 1999a); **b.)** PPADS hemmt einen P2Y-Rezeptor der UTP binden kann, wobei gleichzeitig ein ATP-selektiver P2X-Rezeptor koexistiert, der PPADS-resistent ist (Ralevic & Burnstock, 1998). Die Anwesenheit eines P2X-Rezeptors lässt sich anhand der Wirksamkeit von  $\beta,\gamma$ -meATP ableiten (siehe Tabelle III-4), einem P2X-selektiven Agonisten (North, 2002; Ralevic & Burnstock, 1998).

Eine genaue Charakterisierung der Rezeptoren in der *Xenopus*-Lunge ist schwierig – es gibt keine Studien bezüglich der pharmakologischen Charakterisierung orthologer Proteine bei Amphibien. In den Publikationen von Brodin & Nielsen (2000a; 2000b), die die Effekte von ATP in der Froschhaut untersuchten, wurden lediglich P2X- und P2Y-Rezeptoren unterschieden. Eine weitere Unterscheidung potentieller Subtypen erfolgte nicht. Auf der Basis der erzielten Ergebnisse kann auf die Anwesenheit von mindestens zwei verschiedenen P2-Rezeptoren in der *Xenopus*-Lunge geschlossen werden. Ein P2X-Rezeptor konnte durch  $\beta,\gamma$ -meATP identifiziert werden, und mindestens ein P2Y-Rezeptor durch die Selektivität für UTP. Weitere Subtypen sind nicht auszuschließen; eine weitere Klassifizierung wäre allerdings rein spekulativ.

Die Koexistenz verschiedener purinerger Rezeptoren ist nicht sehr überraschend, da sie den Zielzellen unterschiedliche Reaktionen auf einen einzigen Liganden ermöglichen (Communi et al., 1999b; Hwang et al., 1996).

Der Nachweis, dass die ATP- und UTP-Applikation auf beiden Seiten der Gewebe eine Reaktion auf den  $I_{sc}$  zur Folge hatte, wobei die Effekte durch die apikale Applikation ausgeprägter waren, steht mit der Beobachtung in Einklang, dass die basale ATP-Freisetzung auf der apikalen Seite von Alveolarepithelien höher ist, verglichen mit der basolateralen (Taylor et al., 1998). Damit lässt sich auf eine basolateral niedrigere Dichte der Rezeptoren schließen. Die Ergebnisse der Versuche, in denen der Einfluss von PPADS bei basolateraler Applikation der Trinucleotide getestet wurde, decken sich mit denen, die durch die apikale Applikation erzielt wurden. Dadurch scheinen die Epithelien ähnliche purinerge Rezeptoren auf der basolateralen Seite zu exprimieren wie auf der apikalen (ebenfalls mindestens zwei verschiedene Typen).

### 3.2 P1-Rezeptoren

Diese Rezeptoren binden spezifisch Adenosin, welches ubiquitär in Zellen vorkommt und diesen als Rohstoff für die Synthese von ATP dient. Die Aktivierung der P1-Rezeptoren ist mit einer erhöhten Aktivität der Adenylatcyclase (cAMP) und einer  $Ca^{2+}$ -abhängigen Aktivierung der Phospholipase C verbunden (Ralevic & Burnstock, 1998; Williams & Jarvis, 2000). Im Gegensatz zu ATP und UTP gibt es keine Hinweise darauf, dass Adenosin von Epithelzellen ausgeschieden wird. Es wird nachweislich durch die Hydrolyse von ATP durch Enzyme auf der Zelloberfläche (Ectonucleotidasen) gebildet (Zimmermann, 2000).

Wie die P2-Rezeptoren, werden auch P1-Rezeptoren in Verbindung mit einigen Krankheiten gebracht (Williams & Jarvis, 2000). Eine wichtige Bedeutung wird Adenosin bei Asthma und Allergien zugeschrieben. Feoktistov & Biaggioni (1996) beschreiben die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen nach einer Inhalation von Adenosin. Ähnliche Beobachtungen machten Forsythe und Mitarbeiter (1999). Zudem wird Adenosin in der Lunge mit allergischen Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht (Spruntulis & Broadley, 2001). Weitere Untersuchungen belegen erhöhte Konzentrationen von Adenosin in der Lunge unter hypoxischen Bedingungen und bei Beschädigungen des Alveolarepithels (Driver et al., 1996).

Ähnlich wie bei den Nucleotiden konnte die Wirkung von Adenosin bei der Regulation des Elektrolythaushalts in verschiedenen Epithelien belegt werden. Zum Beispiel hemmt Adenosin in A6-Zellen einen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher (Casavola et al., 1997), es fördert die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion (Reshkin et al., 2000) und reguliert ENaCs (Ma & Ling, 1996) – jeweils durch die vorherige Aktivierung der Rezeptoren. In einer *in vivo* Studie an Ratten konnte ein diuretischer Effekt von Adenosin belegt werden (Yagil, 1994). Ebenfalls bei Ratten wird die Applikation von Adenosin mit der Ödembildung im Pankreas in Verbindung gebracht (Satoh et al., 2000). Im humanen Trachealepithel wird Adenosin als Aktivator eines  $\text{Cl}^-$ -Kanals beschrieben (volume-sensitive organic anion channel; Musante et al., 1999). Einer anderen Arbeitsgruppe gelang es, in humanen Alveolarzellen eine Aktivierung des CFTR durch Adenosin nachzuweisen (Huang et al., 2001).

Am Alveolarepithel von *Xenopus* war in der vorliegenden Arbeit durch die Perfusion von apikalem Adenosin ein Anstieg des  $I_{\text{sc}}$  zu beobachten. Die Stimulation war, wie es bereits bei ATP der Fall war, durch Amilorid größtenteils hemmbar, allerdings gab es eine weitere Komponente, die weder durch Amilorid, noch durch die Entfernung apikalen Natriums aus der Badlösung, gehemmt werden konnte. Dies deutet auf eine zusätzliche Stimulation von  $\text{Cl}^-$ -Kanälen hin, zumal der Effekt unter  $\text{Cl}^-$ -freien Bedingungen gehemmt werden konnte. Die Stimulation apikaler  $\text{Cl}^-$ -Kanäle ist in humanen Atemwegsepithelien beschrieben (Huang et al., 2001; Musante et al., 1999). Eine Regulation epithelialer  $\text{Na}^+$ -Kanäle in Atemwegsepithelien ist bislang nicht dokumentiert, allerdings wurde an A6-Zellen eine Beteiligung von Adenosin an der Regulation von ENaCs belegt (Ma & Ling, 1996). In der betreffenden Studie konnte sowohl eine Stimulation als auch eine Hemmung der Kanäle nachgewiesen werden. Ursache dieser unterschiedlichen Effekte war die Anwesenheit verschiedener P1-Rezeptoren. Die Stimulation wurde durch  $\text{A}_1$ -Rezeptoren, die Hemmung durch  $\text{A}_2$ -Rezeptoren vermittelt, die in der apikalen Membran koexistent waren. Etwas widersprüchlich dazu sind die Ergebnisse, die von Casavola et al. (1996) publiziert wurden. Ebenfalls an A6-Zellen beschrieben sie eine durch apikale  $\text{A}_1$ -Rezeptoren induzierte Stimulation apikaler  $\text{Cl}^-$ -Kanäle und eine Stimulation des transepithelialen  $\text{Na}^+$ -Stroms durch basolaterale  $\text{A}_{2\text{A}}$ -Rezeptoren. Beide Studien bieten eine Grundlage, die an der *Xenopus*-Lunge gemachten Beobachtungen zu erklären – eine Stimulation epithelialer  $\text{Na}^+$ -Kanäle bei gleichzeitiger Stimulation apikaler  $\text{Cl}^-$ -Kanäle. Eine genauere Charakteri-

sierung der Rezeptoren, sowie eine mögliche polare Verteilung verschiedener P1-Rezeptoren (Casavola et al., 1996; Casavola et al., 1997) bleiben Ziele zukünftiger Studien.

Zusammenfassend konnte eine Beteiligung von ATP, UTP und Adenosin an der Regulation des Ionentransports nachgewiesen werden, was auf die Präsenz von verschiedenen Typen purinergere Rezeptoren im Alveolarepithel von *Xenopus* hindeutet. Die drei Substanzen gelten als auto-/parakrine Liganden, deren Hauptwirkung die Stimulation des transepithelialen Na<sup>+</sup>-Stroms war. ATP und Adenosin, aber nicht UTP, zeigten zusätzliche Effekte, die auf eine parallele Stimulation apikaler Cl<sup>-</sup>-Kanäle hindeuten. Aufgrund der Ergebnisse konnten zumindest zwei verschiedene P2-Rezeptoren und ein P1-Rezeptor funktionell nachgewiesen werden. Eine genauere Charakterisierung der Rezeptoren bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.

#### 4 Stimulation des transepithelialen Na<sup>+</sup>-Stroms durch extrazelluläres Gadolinium

Die Verwendung von Lanthaniden, zu denen auch Gadolinium (Gd<sup>3+</sup>) gehört, haben eine lange Tradition in der Elektrophysiologie (Hamill & McBride, 1996; Sunano, 1982). Das Erdmetall Gd<sup>3+</sup> gilt als ein sehr potenter Inhibitor einer Klasse von mechanisch sensitiven Ionenkanälen und ist damit ein wichtiges Werkzeug für deren Identifikation. Bei den Kanälen handelt es sich um mechanisch aktivierbare, nichtselektive Kationenkanäle, so genannte SACs (stretch activated cation channels) (Caldwell et al., 1998; Reifarh et al., 1999). Neben diesen nichtselektiven Kanälen hemmt Gd<sup>3+</sup> pH-sensitive Ionenkanäle (ASICs, acid sensing ion channels) (Allen & Atwell, 2002; Babinski, 2000); diese gehören mit den ENaCs zu einer Überfamilie von Membranproteinen (epithelial sodium channel/degenerin family; Kellenberger & Schild, 2002). Zusätzliche Studien ergaben, dass unabhängig von seiner Rolle als Inhibitor mechanosensitiver Ionenkanäle, Gd<sup>3+</sup> weitere Bedeutung in der Physiologie erlangt. Es gilt als Agonist eines im Jahre 1993 klonierten Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Rezeptors (Brown et al., 1993; Ray & Northup, 2002) und rückte zudem durch seine Toxizität in den Fokus der Forschung (Fuma et al., 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ursprünglich versucht Gd<sup>3+</sup> als Inhibitor der bereits genannten SACs einzusetzen, um gegebenenfalls deren Existenz nachzuweisen. Erste Versuche, in denen nach apikaler Gd<sup>3+</sup>-Applikation eine ausgeprägte Stimulation des I<sub>sc</sub> zu beobachten war – die in Anwesenheit von Amilorid gehemmt werden konnte – deuteten auf eine Stimulation der ENaCs im Lungenepithel von *Xenopus* hin. Berichte über eine Stimulation von Ionenkanälen durch Gd<sup>3+</sup> waren zu dem Zeitpunkt nicht bekannt. Schließlich publizierten Friis & Nielsen (2001) eine Studie, in der apikales Gd<sup>3+</sup> zu einer Stimulation epithelialer Na<sup>+</sup>-Kanäle in der Froschhaut führte. Der beobachtete Effekt wurde als Interaktion des Erdmetalls mit Komponenten der intrinsischen Na<sup>+</sup>-Regulation interpretiert.

Bereits im Jahr 1977 publizierten Fuchs et al. (1977) eine Studie, deren Ergebnisse auf eine nicht-hormonelle/autoregulatorische Regulation der Na<sup>+</sup>-Resorption in der Froschhaut hindeuteten. Sie beobachteten eine Hemmung des Na<sup>+</sup>-Stromes infolge einer erhöhten apikalen Na<sup>+</sup>-Konzentration. Ähnliche Beobachtungen, eine Hemmung des Na<sup>+</sup>-Stroms, allerdings hervorgerufen durch erhöhte intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Konzentrationen, machten zuvor bereits Erlij & Smith

(1973). Die beiden Phänomene wurden schließlich als self-inhibition und feedback-inhibition bezeichnet (Lindemann, 1984). Self-inhibition bezeichnet die Hemmung der epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanäle durch erhöhte apikale (extrazelluläre) Na<sup>+</sup>-Konzentrationen, während feedback-inhibition die Hemmung durch erhöhte intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Konzentrationen beschreibt. Die Bedeutung dieser autoregulatorischen Kontrolle der Kanäle wird als Schutzmechanismus interpretiert, um große Veränderungen der intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration und damit des Zellvolumens zu verhindern (Turnheim, 1991), bzw. um die Aufnahme von Natrium bei sehr hoher Zufuhr über die Nahrung zu limitieren (Palmer, 1998). Beide Mechanismen konnten in einer Vielzahl von unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden (Turnheim, 1991). Abgesehen von nativen Epithelien konnten die Effekte auch an klonierten Kanälen, die in Oocyten (Abriel & Horisberger, 1999; Puoti et al., 1997) bzw. in transfizierten MDCK-Zellen exprimiert wurden, beobachtet werden (Ishikawa et al., 1998).

Trotz der Vielzahl an Studien, die sich mit dieser Fragestellung befassen, sind die Mechanismen dieser Regulationen weitgehend unbekannt. Vor allem für die feedback-inhibition werden unterschiedlichste intrazelluläre Signalwege diskutiert. Die Ubiquitin-Ligase Nedd4 gilt als ein Mediator, über den Kanäle aus der Membran internalisiert und degradiert werden (Staub et al., 2000; Harvey et al., 2001). Die Nedd4-vermittelte Ubiquitinierung der Kanäle gilt dabei als Signal/Markierung für die endocytotische Entfernung der Kanäle aus der Membran und damit deren nachfolgenden Abbau (Konstas et al., 2000). Mutationen von ENaC-Untereinheiten im C-terminalen Bereich, in dem sich ein Prolin-reiches Bindungsmotiv (PY-Motiv) für Proteine befindet, sind assoziiert mit einer reduzierten Internalisierung und damit einer erhöhten Anzahl von Kanälen in der Zellmembran (Snyder et al., 1995) und einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle (Firsov et al., 1996). Das daraus resultierende Krankheitsbild bezeichnet man als Liddle's syndrome (vererbbarer, chronischer Bluthochdruck). Andere Arbeitsgruppen gehen von einer Beteiligung G-Protein-gekoppelter Prozesse aus (Abriel & Horisberger, 1999; Dinudom et al., 1998; Farr et al., 2000; Komwatana et al., 1996). Weiterhin werden die Proteinkinase C (Frindt et al., 1996) und das Cytoskelett als Mediatoren diskutiert (Els & Chou, 1993). Etwas einfacher gestaltet sich die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen bezüglich der self-inhibition. Hier geht man von einer Wechselwirkung der Na<sup>+</sup>-Ionen mit extrazellulären Komponenten der Kanäle aus. Das Abdauen der extrazellulären Schleifen mit

Trypsin hebt die self-inhibition auf (Chraibi & Horisberger, 2002). Ebenso können bestimmte Substanzen, die mit Sulfhydrylgruppen von Aminosäuren wechselwirken, extrazellulär appliziert diese „Selbstkontrolle“ der Kanäle aufheben (Gilbertson & Zhang, 1998; Kellenberger et al., 2002; Snyder et al., 2000). Es gibt aber auch Hinweise auf die Beteiligung von intrazellulärem Calcium an der self-inhibition (Ling & Eaton, 1989).

In den präsentierten Ergebnissen wird deutlich, dass das Lungenepithel von *Xenopus* über  $\text{Na}^+$ -abhängige Regulationsmechanismen verfügt. Es konnte sowohl ein Anstieg des  $I_{sc}$  in Abhängigkeit der apikalen Natriumkonzentration als auch eine Hemmung des  $I_{sc}$  bei  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen über 100 mM beobachtet werden. Dies konnte unter verschiedenen osmotischen Bedingungen gezeigt werden. Ein Nachweis, um welche Art der Inhibition es sich hier handelt, ist anhand der Messungen in der Ussingkammer nicht möglich, da man davon ausgehen muss, dass Veränderungen der extrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration über kurz oder lang auch die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration beeinflussen. Um zwischen self-/ und feedback-inhibition unterscheiden zu können, müsste man mit Hilfe von Mikroelektroden intrazelluläre Ableitungen der Epithelzellen machen, was mit unserem Versuchsaufbau nicht möglich war. Der Nachweis dieser  $\text{Na}^+$ -abhängigen Effekte im Alveolarepithel von *Xenopus* ließe den Schluss zu, dass die beobachtete Stimulation der apikalen  $\text{Na}^+$ -Kanäle durch  $\text{Gd}^{3+}$ , wie bereits von Friis & Nielsen (2001) postuliert, auf ein Aufheben der „Selbstkontrolle“ der Kanäle zurückzuführen ist.

Um weitere Erkenntnisse zu sammeln, kamen Pharmaka zum Einsatz, die bekanntermaßen die autoregulatorische Hemmung der  $\text{Na}^+$ -Kanäle aufheben können. Zum einen BIG (Benz-Imidazolyl-Guanidin) und zum anderen PHMB (p-Hydroxy-Mercuriebenzoic Acid). Die Applikation dieser Substanzen geht in den meisten Fällen mit einer messbaren Stimulation/Aktivierung der Kanäle einher (Turnheim, 1991).

BIG ist ein Amilorid-Analog, welches in einer Vielzahl von Studien nachweislich die self-inhibition aufhob (Friis & Nielsen, 2001; Li & Lindemann, 1983; Lindemann, 1984; Palmer et al., 1998), wobei es die Anzahl der offenen Kanäle erhöhte. In unseren Experimenten konnte keine Stimulation beobachtet werden. Im Gegenteil: eine leichte Hemmung des  $I_{sc}$  war zu beobachten. Bei dem hemmenden BIG-Effekt scheint es sich um einen gewebsspezifischen Effekt zu handeln, wie er auch von anderen Gruppen beschrieben worden ist (Komwatana et al., 1998;

Chraibi & Horisberger, 2002). Allzu erstaunlich ist die Beobachtung einer Hemmung durch ein Amilorid-Analog nicht. Es ist zudem nicht weiter verwunderlich, dass BIG unterschiedliche Wirkungen zeigt, wenn man bedenkt, dass es auch Hinweise auf eine Stimulation epithelialer  $\text{Na}^+$ -Kanäle durch Amilorid gibt (van Driessche & Zeiske, 1985). Allerdings überraschte die Tatsache, dass eine nachfolgende Applikation von  $\text{Gd}^{3+}$  (in Anwesenheit von BIG) ebenfalls keine Stimulation hervorrief. Es kam sogar zu einer weiteren Hemmung des  $I_{sc}$ . Diese Wirkung steht im Kontrast zu den mit der Froschhaut ermittelten Ergebnissen, wo BIG den transepithelialen  $\text{Na}^+$ -Strom in solchem Maße stimulierte, dass kein weiterer Effekt durch die zusätzliche  $\text{Gd}^{3+}$ -Applikation detektierbar war (Friis & Nielsen, 2001). Die Schlussfolgerung von Friis & Nielsen, dass BIG und  $\text{Gd}^{3+}$  auf den gleichen Mechanismus – allerdings an unterschiedlichen extrazellulären Bindestellen – wirken, ist in Einklang mit unseren Beobachtungen. Die Wirkung der beiden Substanzen in der *Xenopus*-Lunge ist gleich (Hemmung), allerdings scheint es mindestens zwei verschiedene Bindestellen zu geben, da sonst die zweistufige Hemmung nicht erklärbar wäre. Eine andere Möglichkeit, die Wirkung von BIG zu erklären wäre: BIG blockiert die Kanäle und hemmt dadurch den  $I_{sc}$ , gleichzeitig bindet es an einer anderen Bindestelle und stimuliert den  $I_{sc}$  durch Hemmung der Autoregulation. Die Folge eines solchen Effekts wäre eine kaum zu messende Veränderung des  $I_{sc}$ , da sich Stimulation und Hemmung in der Waage halten (wie beobachtet waren die Effekt sehr schwach). Die genauen Mechanismen der BIG-Wirkung bleiben allerdings weiterhin unklar.

Etwas mehr weiss man über die Wirkung so genannter Sulfhydryl-reaktiver organischer Quecksilberverbindungen zu denen auch das in den Versuchen eingesetzte PHMB gehört. Diese Verbindungen erhöhen die Aktivität von ENaCs durch Konformationsänderungen der Kanäle (Turnheim 1991), ausgelöst durch die Bildung von Disulfidbrücken mit Cysteinen, die sich in extrazellulären Teilen der Kanäle befinden (Gilbertson & Zhang, 1998). Im Gegensatz zu den Beobachtungen unter BIG war durch die Applikation von PHMB eine Steigerung des amilorid-sensitiven Stroms zu verzeichnen, wobei auffiel, dass der Anstieg die gleiche Charakteristik hatte wie nach  $\text{Gd}^{3+}$ -Applikation: der Strom stieg relativ schnell transient an und stabilisierte sich nach ca. 20–30 Minuten verglichen mit den Ausgangsbedingungen auf einem höheren Niveau (siehe Abb. III-11A und Abb. III-15). Wurde nach Equilibrierung des  $I_{sc}$  und in Anwe-

senheit von PHMB zusätzlich  $Gd^{3+}$  appliziert, konnte kein weiterer Effekt beobachtet werden. Dies konnte in Experimenten mit umgekehrter Applikationsreihenfolge ( $Gd^{3+}$  und anschließend PHMB) zusätzlich bestätigt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass PHMB und  $Gd^{3+}$  an die gleiche Bindestelle binden, bzw. mit der gleichen Bindestelle der Kanäle wechselwirken.

Da Calcium-Ionen im Verdacht stehen, Mediatoren der  $Na^+$ -vermittelten Hemmung epithelialer Kanäle zu sein (Turnheim, 1991), wurden eine Reihe von Experimenten durchgeführt, um einen potentiellen Einfluss von  $Ca^{2+}$  auf die beschriebenen Effekte zu untersuchen. Die genaue Rolle von  $Ca^{2+}$ -Ionen an diesen Mechanismen ist nach wie vor unklar, allerdings konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass durch eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration die Permeabilität der apikalen Membran für Natrium reduziert wird (Chase & Al-Awqati, 1983; Garty & Lindemann, 1984). Schlussfolgerung dieser Ergebnisse war, dass die Hemmung der  $Na^+$ -Kanäle nicht durch  $[Na^+]_i$  selbst stattfindet, sondern durch die Aktivierung einer Signalkaskade in der  $Ca^{2+}$  eine wichtige Rolle spielt. Dies könnte in der Tat der Fall sein, zumal es eine Vielzahl von  $Ca^{2+}$ -abhängigen Proteinen gibt – unter anderem das bereits erwähnte und an der Regulation der  $Na^+$ -Kanäle beteiligte Nedd4 (Plant et al., 1997; Staub et al., 2000). Ling & Eaton (1989) postulieren zudem eine  $Ca^{2+}$ -abhängige Aktivierung der PKC als Mechanismus über den self-inhibition vermittelt werden kann, ohne allerdings zu erklären, wie Veränderungen der extrazellulären  $[Na^+]$  detektiert werden sollen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Effekt von  $Gd^{3+}$  durch den Einsatz von  $Ca^{2+}$ -Chelatoren (EDTA und BAPTA/AM) unterbunden werden, allerdings lässt sich keine endgültige Schlussfolgerung ziehen, inwieweit extrazelluläres  $Ca^{2+}$  an der Wirkung beteiligt ist. Grund dafür ist eine mögliche Komplexbildung des  $Gd^{3+}$  durch die Chelatoren und damit eine Reduzierung der freien  $Gd^{3+}$ -Konzentration. Caldwell et al. (1998) verweisen auf eine Wechselwirkung von  $Gd^{3+}$ -Ionen mit EGTA und damit eine Reduzierung des frei gelösten Gadoliniums. In Epithelien, die mit dem membrangängigen Chelator BAPTA/AM inkubiert wurden und anschließend in Abwesenheit von extrazellulärem BAPTA/AM  $Gd^{3+}$  ausgesetzt waren, konnte ein Anstieg des  $I_{sc}$  beobachtet werden. Somit kann eine Beteiligung von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  bei der Wirkung von  $Gd^{3+}$  ausgeschlossen werden. Zudem kann man anhand dieser Versuche schlussfolgern, dass die Wirkung von  $Gd^{3+}$  – höchstwahrscheinlich – nur extrazellulär erfolgt und man die

Beteiligung intrazellulärer Mediatoren (PKC, G-Proteine,  $\text{Ca}^{2+}$ ), wie sie von Friis & Nielsen (2001) vermutet wird, ausschließen kann.

Die Wirkung von Substanzen wie PHMB konnte bereits in verschiedenen Studien anhand von Einzelkanalableitungen untersucht bzw. nachgewiesen werden (Gilbertson & Zhang, 1998; Kellenberger et al., 2002; Snyder et al., 2000). Dafür scheint die Anwesenheit von Cysteinen in den extrazellulären Loops der Kanäle notwendig zu sein. Aus der Ratte bzw. dem Menschen klonierte native ENaCs waren gegenüber den Modifikationen, wie sie durch PHMB oder ähnlichen Substanzen induziert werden, insensitiv. Hier erfolgte eine Modifikation erst nachdem durch Mutagenese Cysteine in die Untereinheiten der Kanäle eingefügt wurden (Kellenberger et al., 2002; Snyder et al., 2000). Einhergehend mit der chemischen Modifikation dieser mutierten Kanäle, änderte sich durch die Applikation der Sulfhydryl-reaktiven Substanzen ihre Schaltcharakteristik – die Offenwahrscheinlichkeit erhöhte sich bei einer gleichzeitigen Reduzierung der Kanalampplitude. Gilbertson & Zhang (1998) konnten ähnliche Beobachtungen an nativen, nicht modifizierten/mutierten Kanälen machen. Ein Beleg dafür, dass auch Wildtyp-ENaCs Ziel chemischer Modifikationen sein können.

In Anwesenheit von extrazellulärem  $\text{Gd}^{3+}$  während cell-attached Messungen zeigen xENaCs (kloniert aus A6-Zellen) ähnliche Eigenschaften wie die chemisch modifizierten ENaCs: die Offenwahrscheinlichkeit ( $NP_o$ ) war deutlich erhöht und gleichzeitig war die Kanalampplitude über einen Spannungsbereich von  $-100$  bis  $-20$  mV kleiner (gegenüber Kontrollen ohne  $\text{Gd}^{3+}$ ). Diese Veränderungen deuten auf eine Wechselwirkung von  $\text{Gd}^{3+}$  mit extrazellulären Komponenten der ENaCs hin – ähnlich der, wie sie von Sulfhydryl-reaktiven Substanzen beschrieben sind (Gilbertson & Zhang, 1998; Kellenberger et al., 2002; Snyder et al., 2000). Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass PHMB die Wirkung von  $\text{Gd}^{3+}$  an Epithelien der *Xenopus*-Lunge imitiert. Angriffsort von PHMB bzw.  $\text{Gd}^{3+}$  ist wahrscheinlich die DEG-Bindedomäne (degenerin site), die sich im äußeren Bereich der Kanalpore befindet und nachweislich am channel-gating beteiligt ist (Kellenberger et al., 2002). Dieser Region, die oberhalb der Amilorid-Bindestelle und des Selektivitätsfilters liegt, wird von Kellenberger et al. (2002) sowie Snyder et al. (2000) eine wichtige Rolle bei dem Phänomen der self-inhibition zugesprochen. Allerdings werden auch andere Strukturelemente der äußeren ENaC-Pore als mögliche Kandidaten für die Kontrolle der self-inhibition gehandelt. Die Existenz eines so genannten

„Natrium-Rezeptors“, der bislang noch nicht identifiziert wurde, vermuten Chraibi & Horisberger (2002) und Puoti et al. (1997).

Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass im Rahmen dieser Arbeit erstmals an einem Alveolarepithel eine autoregulatorische Kontrolle apikaler Na<sup>+</sup>-Kanäle nachgewiesen werden konnte. Sowohl die Ergebnisse der Ussingkammer, als auch die der patch-clamp-Versuche deuten darauf hin, dass Gd<sup>3+</sup> mit extrazellulären Komponenten der Kanäle interagiert und dadurch die inhibitorische „Selbstkontrolle“ aufhebt. Die meisten Anzeichen deuten auf eine Wechselwirkung mit dem self-inhibition-System hin. Um die Mechanismen dieser Autoregulation zu verstehen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

## 5 Alternative elektrophysiologische Messmethoden an der *Xenopus*-Lunge

Ziel dieser Versuche war es, die methodischen Möglichkeiten der *Xenopus*-Lunge auszuloten, um zukünftige Fragestellungen zu bearbeiten. Dabei wurden zum einen Versuche an intakten, perfundierten Lungen durchgeführt und zum anderen Versuche in einer Ussingkammer, die allerdings Modifikationen aufwies und es ermöglichte, Pharmaka-unabhängige Regulationsmechanismen zu untersuchen. Das ursprüngliche Ziel der vorgestellten Versuchsaufbauten war es, den Einfluss eines hydrostatischen Drucks, der auf dem Epithel lastete, auf den transepithelialen Ionentransport zu untersuchen. Die Applikation eines Drucks erfolgte durch die einseitige Veränderung der Wassersäule, die auf dem Epithel lastete.

### 5.1 Potentialableitungen von intakten, perfundierten *Xenopus*-Lungen

Der erste Ansatz zur Untersuchung, inwieweit hydrostatischer Druck alveolaren Ionentransport beeinflusst, erfolgte an intakten und mit Ringerlösung perfundierten Lungen. Die Lungen konnten ohne weitere Präparation nach der Entnahme in den Versuchsaufbau eingespannt werden. Eine Erhöhung des Drucks im Inneren der Lunge wurde durch einen „Kamin“ erzielt, über den die Perfusionslösung abließ. Die Höhe des Abflusses konnte reguliert werden, so dass durch die Variation der Abflusshöhe im Kamin ein hydrostatischer Druck erzeugt werden konnte. In dieser Versuchsanordnung konnte allerdings keine Veränderung des transepithelialen Potentials als Folge des veränderten hydrostatischen Drucks nachgewiesen werden.

Ein prinzipiell ähnlicher Aufbau, wie der hier vorgestellte, ist nach wie vor eine gängige Methode, um Ionentransport an alveolaren Epithelien zu untersuchen (O’Brodivich et al., 1997; Ghofrani et al., 2001), und war die Grundlage für die durchgeführten Experimente. Es sollte gezeigt werden, dass mit einem einfachen Versuchsaufbau und einem überschaubaren technischen Aufwand Ionenverschiebungen über ein Alveolarepithel gemessen und charakterisiert werden können. Dabei wurde bewusst auf gängige Blocker von Transportproteinen zurückgegriffen, deren Wirkung an der Froschlunge bereits nachgewiesen wurde. Zum einen auf Amilo-

rid, welches im Rahmen dieser Studie oft zum Einsatz kam, um epitheliale  $\text{Na}^+$ -Kanäle zu hemmen, und zum anderen auf Ouabain (Fischer et al., 1989), ein potenter Inhibitor der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Watts, 2002).

Die Perfusion von Säugerlungen wird durchgeführt, um Ionen- und Wasserverschiebungen über alveolare Epithelien zu untersuchen (Effros et al., 1987; O’Brodivich et al., 1997). Dabei werden die flüssigkeitsgefüllten Lungen über Katheter, die in die Pulmonalarterie und das linke Atrium eingebracht wurden, perfundiert. Als Maß für die Verschiebungen von Ladungen wurde in den Versuchen eine Veränderung des Gewichtes – infolge einer verstärkten Wassereinlagerung in das Gewebe – gemessen, sowie der Gehalt der Perfusionslösung auf bestimmte Inhaltsstoffe – vor und nach der Passage durch die Lunge – untersucht (O’Brodivich et al., 1997). Hierbei handelt es sich um eine indirekte Methode, nicht ausreichend sensibel um schwache Effekte zu detektieren. Um die Empfindlichkeit solcher Messungen zu erhöhen, werden auch radioaktiv markierte Isotope eingesetzt (Isotopen-Fluxmessungen; Ghofrani et al., 2001). Dies ist allerdings mit einem sehr hohen apparativen Aufwand und einem erhöhten gesundheitlichen Risiko beim Umgang mit den Isotopen behaftet (Ghofrani et al., 2001).

Barry et al. (1971) beschrieben eine Messmethode, die der hier vorgestellten sehr nahe kommt. Sie wurde von Barry et al. (1971) benutzt, um transepitheliale Ionenverschiebungen in der Gallenblase von Kaninchen zu untersuchen. Die Präparation der Organe wurde als „everted sac preparation“ bezeichnet (Barry, 1989) – was daran lag, dass die Gallenblasen gewendet wurde. Dabei entsprach das Innere dieses Sackes (Lumen) der basolateralen Seite. Gemessen wurde ein Potential, welches sich infolge Ladungsverschiebungen über das einschichtige Epithel aufbaute. Das Prinzip der Versuche, wie sie an Lungen von *Xenopus* durchgeführt wurden, entspricht genau diesem, allerdings wurden die Organe für die Messungen in dieser Studie nicht gewendet, so dass das Lungenlumen der apikalen Seite entspricht und nur durch die Perfusion mit dem Äusseren in Verbindung stand. Die Perfusion des Sackinneren der *Xenopus*-Lunge ist ein weiterer Unterschied zu den Versuchen an der Kanninchen-Gallenblase, bei der ein Lösungs- bzw. Medienwechsel nur im äusseren Kompartiment erfolgte (Barry, 1989).

Durch die beiden Elektroden (1 mM KCl/Agarbrücken) konnte ein Potentialunterschied ( $V_{\text{lunge}}$ ) zwischen den Lungenlumen (apikal) und dem äusseren Kompartiment (basolateral) gemessen werden. Der Verlauf des abgeleiteten Potentials entsprach durchaus dem des Kurzschluss-

stroms, wie er aus den Versuchen in der Ussingkammer bekannt war. Nach dem Einspannen in die Apparatur und dem Beginn der Messung, erhöht sich das Potential und equilibrierte auf einem höheren Wert – verglichen mit den Ausgangsbedingungen. Wurde zu diesem Zeitpunkt Amilorid oder Ouabain perfundiert, so konnte ein Abfall von  $V_{\text{lung}}$  gemessen werden. Die Höhe der beobachteten Hemmung deckt sich durchaus mit den Ergebnissen, die aus der Ussingkammer bekannt sind.

Obwohl der Versuchsaufbau nicht das Potential hat, die Versuche in der Ussingkammer zu ersetzen, wäre er zum Beispiel für Praktika geeignet, um elektrogene Ionentransport-Prozesse an Lungenepithelien nachzuweisen und zu charakterisieren. Der Vorteil gegenüber den Versuchen in einer Ussingkammer ist, dass die entnommenen Organe ohne weitere, zeitaufwendige Präparation untersucht werden könnten und für die Ableitung des Potentials ein handelsübliches Voltmeter ausreicht. Zudem können aufgrund der Möglichkeit eines Mediumwechsels im Lungeninneren bzw. des umgebenden Mediums und der Applikation von Substanzen in die Perfusionslösung Veränderungen des Potentials unmittelbar mit der Applikation von Pharmaka in Verbindung gebracht werden. Dadurch würde eine quantitative und qualitative Charakterisierung betreffender Ladungsverschiebungen ermöglicht.

## 5.2 Druckabhängigkeit transepithelialer Ionenströme im Alveolarepithel von *Xenopus*

Durch den Einsatz einer Ussingkammer, wie sie in Abbildung II-3 wiedergegeben ist, konnte ein hydrostatischer Druck auf das eingespannte Epithel appliziert werden. Ziel dieser Messungen war es festzustellen, inwieweit die transepithelialen Ionenströme durch mechanische Kräfte beeinflusst werden. Eine Relevanz für diesen Versuchsansatz ergibt sich anhand der klinischen Krankheitsbilder in Zusammenhang mit der Bildung und Therapie von Lungenödem. Die Bildung von Lungenödem wird in Zusammenhang mit einer Reihe von Krankheitsbildern beobachtet. Zum Beispiel bei pulmonalem Bluthochdruck, nach Lungentransplantationen und bei ARDS (acute respiratory distress syndrome; Groeneveld, 2003). Infolge der Lungenödeme kommt es zu Wasseransammlungen im alveolaren Raum, was den Gasaustausch erschwert. Die Ansammlung von Flüssigkeit im Alveolarraum und eine damit einhergehende

Hypoxie ist ein Hinweis auf einen gestörten Elektrolythaushalt in den Atemwegsepithelien. Hypoxische Bedingungen in der Lunge werden mit einer reduzierten Flüssigkeits-Resorption assoziiert, gleichzeitig führt eine Störung der Resorptionsleistung des Epithels zu hypoxischen Bedingungen – ein Teufelskreislauf. In einer Vielzahl von Studien konnte ein Zusammenhang von Hypoxie mit einer funktionellen Hemmung von Ionttransportproteinen gezeigt werden. Carpenter et al., (2003) weisen auf eine Hemmung epithelialer Na<sup>+</sup>-Kanäle in Ratten hin, die unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden. Ähnliche Beobachtungen machten zudem Mairböurl et al. (1997; 2002) und Planes et al. (1997). Länger anhaltende hypoxische Bedingungen hemmen nachweislich sogar die Expression Na<sup>+</sup>-transportierender Proteine (Clerici & Matthay, 2000), so dass Hypoxie bereits vorhandene Entzündungsprozesse fördert und deren Therapie zusätzlich erschwert.

Vor allem beim ARDS verschlechtert diese Tatsache den ohnehin lebensbedrohenden Zustand der betroffenen Patienten zusätzlich. Nach Frank & Matthay (2003) liegt die Letalität unter den betroffenen Patienten bei ca. 70 %. ARDS ist charakterisiert durch akutes respiratorisches Versagen infolge einer Sepsis, wobei es unterschiedliche pathologische Mechanismen gibt, die dazu führen können (Walmrath et al., 2001). Die künstliche Beatmung betroffener Patienten steht dabei im Mittelpunkt der Behandlung und ist gleichzeitig ein kritisches Unterfangen, da es durch die künstliche Beatmung zu Schädigungen der Lunge kommen kann (Brower & Rubenfeld, 2003). Als besonders kritisch gilt neben mechanischen Schädigungen der Lunge (Barotrauma; Derdak, 2003) die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen infolge der künstlichen Beatmung (Walmrath et al., 2001) – dies verstärkt die Entzündungsprozesse in der Lunge zusätzlich. Die in den letzten Jahren erzielten Erfolge in der Therapie des ARDS werden vor allem auf Veränderungen bei der Beatmung der Patienten zurückgeführt (Walmrath et al., 2001). Untersuchungen zeigten, dass die Beatmung mit niedrigeren Drücken und kleineren Atemzugvolumina die Letalität signifikant senkten (Frank & Matthay, 2003; Walmrath et al., 2001).

Unabhängig von den Schwierigkeiten, die durch Dehnungsstress bei der künstlichen Beatmung auftreten, konnten mechanische Reize nachweislich auch mit der Differenzierung fötaler alveolarer Epithelzellen (Typ I – Typ II) in Verbindung gebracht werden (Edwards, 2001; Sanchez-Esteban, 2001). Sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* Studien belegen, dass während der Differen-

zierungsphase eine Erhöhung des Drucks zu einer bevorzugten Differenzierung der Typ I-Zellen führt; eine vermehrte Differenzierung von Typ II-Zellen wurde bei Unterdruck beobachtet (Wirtz & Dobbs, 2000). Bereits während des letzten Drittels der Schwangerschaft beginnen Föten ventilationsartige Bewegungen des Brustkorbs durchzuführen – obwohl die Lungen zu diesem Zeitpunkt flüssigkeitsgefüllt sind (Wirtz & Dobbs, 2000).

Der mechanischen Reizung von Lungenepithelien kommt, unter physiologischen und pathologischen Bedingungen, eine wichtige Bedeutung zu. Ziel dieser Studie war es festzustellen, ob mechanische Reize – appliziert in Form eines hydrostatischen Druckes – messbare Veränderungen in der Ionentransportrate des *Xenopus* Lungenepithels zur Folge haben. In den Versuchen konnte, analog zu einer zweistufigen Erhöhung des hydrostatischen Drucks in der apikalen Kammerhälfte, ein zweistufiger Abfall des  $I_{sc}$  beobachtet werden. In einigen Experimenten erfolgte parallel dazu ein Abfall des Leitwertes ( $G_t$ ), in anderen ein Anstieg. Gemittelt waren die Veränderungen von  $G_t$  nicht signifikant. Im Gegensatz zu der Druck-induzierten Hemmung des  $I_{sc}$  sowohl unter  $Na^+$ -Ringer, in Anwesenheit von Amilorid und unter  $Na^+$ -freien Bedingungen. Die Ergebnisse überraschen, da sie nicht leicht zu erklären sind. Ausgehend von der These, dass eine Erhöhung des Druckes auf der apikalen Seite die  $Na^+$ -Diffusion in die Epithelzelle erleichtert ( $Na^+$ -Resorption ist die Haupteigenschaft des Epithels) und damit die  $Na^+$ -Resorption erhöht, wäre ein Anstieg des  $I_{sc}$  zu erwarten gewesen. Aufgrund der Ergebnisse kommt den  $Na^+$ -Ionen bei der beobachteten Hemmung eine große Bedeutung zu, allerdings scheinen auch andere Ionen (damit Ionenkanäle/-transportproteine) daran beteiligt zu sein. Möglich, dass parallel zu einer Hemmung der  $Na^+$ -Resorption die Sekretion von  $Cl^-$ -Ionen durch den einseitigen Druck beeinflusst/gehemmt wird; dies müsste in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Der zugrunde liegende Mechanismus einer Hemmung epithelialer  $Na^+$ -Kanäle ist höchst spekulativ, zumal in einer patch-clamp-Studie an exprimierten ENaCs keine mechanische Beeinflussung der Kanalaktivität festgestellt werden konnte (Awayda & Subramanyam, 1998). Frühere Studien kamen zu einem anderen Schluss, nachdem sie eine mechanische Aktivierbarkeit von ENaC in Lipid-Bilayern beobachtet hatten (Ismailov et al., 1996; Awayda et al., 1995). Nachträglich wurden diese Ergebnisse relativiert; die Grundeigenschaften der gemessenen Kanäle wichen zu stark von denen nativer Zellen ab (Awayda & Subramanyam, 1998). Achard et al. (1996) publiziert Ergebnisse einer Aktivierung amilorid-sensitiver  $Na^+$ -Kanäle infolge

mechanischer Reizung in humanen B-Lymphocyten. Allerdings ist es nicht klar, ob es sich bei den untersuchten Kanälen um „klassische“ ENaCs handelte. Eine mechanische Sensitivität nativer ENaCs konnte folglich bis heute nicht nachgewiesen werden. Eine andere Möglichkeit die Druck-induzierte Hemmung zu interpretieren, ist, dass es durch die Erhöhung des hydrostatischen Drucks zu einer stärkeren Wechselwirkung von Na<sup>+</sup>-Ionen mit extrazellulären Teilen der Na<sup>+</sup>-Kanäle kommt. Ein ähnlicher Effekt konnte durch eine Erhöhung der apikalen Na<sup>+</sup>-Konzentration beobachtet werden und deutet auf eine „Na<sup>+</sup>-induzierte Selbstkontrolle“ der Kanäle hin. Allerdings erklärt dies die Effekte unter Na<sup>+</sup>-freien Bedingungen auf der apikalen Seite nicht – eine Beteiligung anderer Kanäle bzw. Transportproteine an der Hemmung des trans-epithelialen Ionenstroms kann nicht ausgeschlossen werden.

Diese anfangs durchgeführten Versuche zur Druckabhängigkeit des Ionentransports, stellen einen neuen Ansatz dar, um die Wirkung mechanischer Kräfte auf ein Alveolarepithel zu untersuchen. Kräfte, wie sie zum Beispiel während künstlicher Beatmung auf das Epithel wirken. Anhand der Versuche wird deutlich, dass mechanische Drücke die Nettotransportrate des Epithels hemmen. Dass es sich dabei nicht um einen rein physikalischen Effekt handelt, ergibt sich aus der Tatsache, dass der Ionenstrom nicht dem Druckgradienten folgt – im Gegenteil es kommt zu einer Hemmung des Nettoionenstroms. Diese ersten Ergebnisse werfen eine Reihe von Fragen auf, zu deren Klärung es zukünftiger Untersuchungen bedarf.

## V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen am Alveolarepithel von *Xenopus laevis* durchgeführt. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand der transepitheliale Ionentransport über das pulmonale Epithel, wobei ausschließlich elektrophysiologische Messmethoden zum Einsatz kamen. Die einfache Anatomie der *Xenopus*-Lunge ermöglichte es, Messungen in einer Ussingkammer durchzuführen; mit der Möglichkeit, verschiedene Regulationsmechanismen des transepithelialen Ionentransports zu untersuchen und zu charakterisieren.

Haupteigenschaft des Studienobjekts ist die elektrogene Aufnahme von  $\text{Na}^+$ -Ionen durch hochselektive, durch Amilorid hemmbare, epitheliale Kanäle (ENaCs). Die Injektion von Tieren mit ACTH vor der Entnahme der Lungen resultierte in einer deutlichen Steigerung der  $\text{Na}^+$ -Resorption durch ENaCs. Diese Beobachtung unterstreicht zum einen die Relevanz von ACTH bei der Regulation des Salz-/Wasserhaushalts in *Xenopus*, sowie dass die *Xenopus*-Lunge ein potentielles Zielorgan einer ACTH-induzierten Freisetzung von Steroiden der Nebennieren ist – wichtige Parallelen zu bekannten, hormonellen Regulationsmechanismen in Säugetieren. Eine Beeinflussung der Regulation der transepithelialen  $\text{Na}^+$ -Resorption durch die Vorbehandlung mit ACTH konnte dabei nicht festgestellt werden.

Untersuchungen mit bekannten auto- bzw. parakrin wirksamen Substanzen ermöglichten die Identifikation unterschiedlicher Membranrezeptoren, sowie den Nachweis einer Beteiligung an der Elektrolytregulation. Die Applikation von Histamin z. B. führte zu einer Erhöhung des amilorid-sensitiven Stroms. Diese Stimulation konnte durch einen bekannten Antagonisten von  $\text{H}_1$ -Rezeptoren unterbunden werden, was auf die Anwesenheit von  $\text{H}_1$ -Rezeptoren im Alveolarepithel von *Xenopus* deutet. Ebenso konnten durch den Einsatz von ATP, UTP und Adenosin verschiedene purinerge Rezeptoren nachgewiesen werden. Alle drei Moleküle vermochten den transepithelialen Ionenstrom zu erhöhen, wobei sich die Wirkung von ATP und Adenosin nicht nur auf den amilorid-sensitiven Ionenstrom beschränkte. Zusätzlich durchgeführte Experimente deuten auf eine parallele Stimulation einer  $\text{Cl}^-$ -Sekretion durch ATP und Adenosin hin. Eine abschließende Charakterisierung bzw. Identifikation der purinergen Rezeptoren anhand der durchgeführten funktionellen Messungen in der Ussingkammer ist nicht möglich. Dies bedarf

zusätzlicher Experimente sowie des Einsatzes anderer Methoden. Trotzdem kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse auf die Anwesenheit von mindestens je einem Typ eines P2Y-, eines P2X- und eines P1-Rezeptors geschlossen werden.

Der Nachweis einer nicht-hormonellen Kontrolle der epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanäle im Lungenepithel des Krallenfrosches ist eine wichtige Gemeinsamkeit mit anderen, gut charakterisierten und akzeptierten Na<sup>+</sup>-resorbierenden Epithelien. Überraschend war die Entdeckung, dass das Erdmetall Gadolinium als Aktivator dieser Kanäle in Erscheinung treten kann. Versuche mit Substanzen, die bekanntermaßen die self-/feedback inhibition der Na<sup>+</sup>-Kanäle aufheben, sowie zusätzlich durchgeführte Einzelkanalmessungen, ergaben Hinweise, dass Gadolinium mit extrazellulären Komponenten der Kanäle wechselwirkt und damit das gating der Kanäle beeinflusst – Folge dieser Wechselwirkung ist eine gesteigerte Aktivität der Kanäle und damit eine erhöhte transepitheliale Na<sup>+</sup>-Resorption, wie sie in Versuchen an der Froschlunge beobachtet werden konnte.

Die morphologisch/anatomischen Vorteile der Froschlunge waren die Grundlage für die nachfolgend durchgeführten Messungen. Zum einen konnten mit einfachsten Mitteln Potentiale an ganzen, intakten Organen abgeleitet werden. Vorbild waren Messungen, wie sie an isolierten, perfundierten Säugerlungen gemacht werden. Zum anderen konnten mit einer modifizierten Ussingkammer Messungen durchgeführt werden, in denen Effekte mechanischer Kräfte, die in Form von hydrostatischen Drücken appliziert wurden, untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass mechanische Kräfte den Ionentransport signifikant beeinflussen. Die zweistufige Erhöhung des Druckes auf der apikalen Seite führte dabei zu einem entsprechenden zweistufigen Abfall des transepithelialen Ionenstroms. Die Charakterisierung der beobachteten Wirkung mechanischer Kräfte bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einige Parallelen zu bekannten Mechanismen von alveolarem Elektrolyttransport in Säugetieren und unterstreichen eine gewisse Allgemeingültigkeit, die Regulation pulmonalen Ionentransports betreffend – artenunabhängig. Da entsprechende elektrophysiologische Untersuchungen in der Ussingkammer an nativen Alveolarepithelien von Säugetieren zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich sind, bietet die Lunge von *Xenopus laevis* die Möglichkeit, grundlegende Fragestellungen der alveolaren Elektrolytregulation unter weitgehend physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

## VI. Literaturverzeichnis

- ABRIEL, H. AND J. D. HORISBERGER.** Feedback inhibition of rat amiloride sensitive epithelial sodium channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol (Lond)* 516: 31–43, 1999.
- ACHARD, J. M., J. K. BUBIEN, D. J. BENOS AND D. G. WARNOCK.** Stretch modulates amiloride sensitivity and cation selectivity of sodium channels in human B lymphocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 270: C224–C234, 1996.
- ALI, S. A., J. PETER AND A. S. ALI.** Histamine receptors in the skin melanophores of Indian bullfrog *Rana tigerina*. *Comp Biochem Physiol A. Mol Integr Physiol* 121: 229–234, 1998.
- ALLEN, N. J. AND D. ATTWELL.** Modulation of ASIC channels in rat cerebellar purkinje neurons by ischaemia-related signals. *J Physiol (Lond)* 543: 521–529, 2002.
- AWAYDA, M. S., I. I. ISMAILOV, B. K. BERDIEV AND D. J. BENOS.** A cloned renal epithelial Na<sup>+</sup> channel protein displays stretch activation in planar lipid bilayers. *Am J Physiol Cell Physiol* 268: C1450–C1459, 1995.
- AWAYDA, M. S. AND M. SUBRAMANYAM.** Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by membrane tension. *J Gen Physiol* 112: 97–111, 1998.
- BABINSKI, K., S. CATARSI, G. BIAGINI AND P. SEGUELA.** Mammalian ASIC2a and ASIC3 subunits co-assemble into heteromeric proton-gated channels sensitive to Gd<sup>3+</sup>. *J Biol Chem* 275: 28519–28525, 2000.
- BACCARI, G. C., A. DE PAULIS, L. DI MATTEO, M. GENTILE, G. MARONE AND S. MINUCCI.** In situ characterization of mast cells in the frog *Rana esculenta*. *Cell Tissue Res* 292: 151–162, 1998.
- BAKKER, R. A., H. TIMMERMAN AND R. LEURS.** Histamine receptors: specific ligands, receptor biochemistry, and signal transduction. *Clin Allergy Immunol* 17: 27–64, 2002.
- BAROCELLI, E. AND V. BALLABENI.** Histamine in the control of gastric acid secretion: a topic review. *Pharmacol Res* 47: 299–304, 2003.
- BARRY, P. H., J. M. DIAMOND AND E. M. WRIGHT.** The mechanism of cation permeation in rabbit gallbladder: dilution potentials and biionic potentials. *J Membr Biol* 4: 358–394, 1971.
- BARRY, P. H.** Ionic permeation mechanisms in epithelia: biionic potentials, dilution potentials, conductances, and streaming potentials. *Methods Enzymol* 171: 678–715, 1989.
- BAXENDALE-COX, L. M.** Terbutaline increases open channel density of epithelial sodium channel (ENaC) in distal lung. *Respir Physiology* 116: 1–8, 1999.
- BENNETT, W. D., K. N. OLIVIER, K. L. ZEMAN, K. W. HOHNEKER, R. C. BOUCHER AND M. R. KNOWLES.** Effect of uridine 5'-triphosphate plus amiloride on mucociliary clearance in adult cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1796–1801, 1996.
- BERK, A., M. FRONIUS, W. CLAUSS AND M. SCHNIZLER.** Prostaglandin E<sub>2</sub> induces upregulation of Na<sup>+</sup> transport across *Xenopus* lung epithelium. *J Comp Physiol B* (accepted).
- BERTL, A., E. BLUMWALD, R. CORONADO, R. EISENBERG, G. FINDLAY, D. GRADMANN, B. HILLE, K. KOHLER, H. A. KOLB AND E. MACROBBIE.** Electrical measurements on endomembranes. *Science* 258: 873–874, 1992.
- BLAND, R. D. AND D. W. NIELSON.** Developmental changes in lung epithelial ion transport and liquid movement. *Annu Rev Physiol* 54: 373–394, 1992.
- BOUDREAU, F. AND R. GRYGORCZYK.** Cell swelling-induced ATP release and gadolinium-sensitive channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C219–C226, 2002.

- BRAUNSTEIN, G. M., R. M. ROMAN, J. P. CLANCY, B. A. KUDLOW, A. L. TAYLOR, V. G. SHYLONSKY, B. JOVOV, K. PETER, T. JILLING, I. I. ISMAILOV, D. J. BENOS, L. M. SCHWIEBERT, J. G. FITZ AND E. M. SCHWIEBERT.** 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.
- BRODIN, B. AND R. NIELSEN.** Electrophysiological evidence for an ATP-gated ion channel in the principal cells of the frog skin epithelium. *Pflügers Arch* 439: 227–233, 2000a.
- BRODIN, B. AND R. NIELSEN.** Evidence for P2Y-type ATP receptors on the serosal membrane of frog skin epithelium. *Pflügers Arch* 439: 234–239, 2000b.
- BROWER, R.G. AND G.D. RUBENFELD.** Lung-protective ventilation strategies in acute lung injury. *Crit Care Med* 31: S312–S316, 2003.
- BROWN, E. M., G. GAMBA, D. RICCARDI, M. LOMBARDI, R. BUTTERS, O. KIFOR, A. SUN, M. A. HEDIGER, J. LYTTON AND S. C. HEBERT.** Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366: 575–580, 1993.
- BURNSTOCK, G.** A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: Cell membrane receptors for drugs and hormones, edited by L. Bolis and R.W. Straub, *New York: Raven Press*, 1978, p. 107–118.
- BURNSTOCK, G.** Potential therapeutic targets in the rapidly expanding field of purinergic signalling. *Clin Med* 2: 45–53, 2002.
- CALDWELL, R. A., H. F. CLEMO AND C. M. BAUMGARTEN.** Using gadolinium to identify stretch-activated channels: technical considerations. *Am J Physiol Cell Physiol* 275: C619–C621, 1998.
- CANESSA, C. M., L. SCHILD, G. BUELL, B. THORENS, I. GAUTSCHI, J. D. HORISBERGER AND B. C. ROSSIER.** Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367: 463–467, 1994.
- CANTIELLO, H. F., G. R. JACKSON JR., C. F. GROSMAN, A. G. PRAT, S. C. BORKAN, Y. WANG, I. L. REISIN, C. R. O’RIORDAN AND D. A. AUSIELLO.** Electrodifusional ATP movement through the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: C799–C809, 1998.
- CARPENTER, T. C., S. SCHOMBERG, C. NICHOLS, K. R. STENMARK AND J. V. WEIL.** Hypoxia reversibly inhibits epithelial sodium transport but does not inhibit lung ENaC or Na-K-ATPase expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L77–L83, 2003.
- CASALE, T. B., D. WOOD, H. B. RICHERSON, S. TRAPP, W. J. METZGER, D. ZAVALA AND G. W. HUNNINGHAKE.** Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with methacholine bronchial hyperresponsiveness. *J Clin Invest.* 79: 1197–1203, 1987.
- CASAVOLA, V., L. GUERRA, S. J. RESHKIN, K. A. JACOBSON, F. VERREY AND H. MURER.** Effect of adenosine on Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> currents in A6 monolayers. Receptor localization and messenger involvement. *J Membr Biol* 151: 237–245, 1996.
- CASAVOLA, V., L. GUERRA, S. J. RESHKIN, K. A. JACOBSON AND H. MURER.** Polarization of adenosine effects on intracellular pH in A6 renal epithelial cells. *Mol Pharmacol* 51: 516–523, 1997.
- CHASE, H. S. JR. AND Q. AL-AWQATI.** Calcium reduces the sodium permeability of luminal membrane vesicles from toad bladder. Studies using a fast-reaction apparatus. *J Gen Physiol* 81: 643–665, 1983.
- CHEN, X. J., D. C. EATON AND L. JAIN.** Alveolar epithelial ion and fluid transport:  $\beta$ -adrenergic regulation of amiloride-sensitive lung sodium channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L609–L620, 2002.
- CHRAIBI, A., M. SCHNIZLER, W. CLAUSS AND J. D. HORISBERGER.** Effects of 8-cpt-cAMP on the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol* 183: 15–23, 2001.
- CHRAIBI, A. AND J. D. HORISBERGER.** Na<sup>+</sup> self inhibition of human epithelial Na<sup>+</sup> channel: temperature dependence and effect of extracellular proteases. *J Gen Physiol* 120: 133–145, 2002.

- CLARKE, L. L., A. M. PARADISO AND R. C. BOUCHER. Histamine-induced Cl<sup>-</sup> secretion in human nasal epithelium: responses of apical and basolateral membranes. *Am J Physiol Cell Physiol* 263: C1190–C1199, 1992.
- CLERICI, C. AND M. A. MATTHAY. Hypoxia regulates gene expression of alveolar epithelial transport proteins. *J Appl Physiol* 88: 1890–1896, 2000.
- COMMUNI, D., S. MOTTE, J. M. BOEYNAEMS AND S. PIROTTON. Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>4</sub> receptor. *Eur J Pharmacol* 317: 383–389, 1996.
- COMMUNI, D., B. ROBAYE AND J. M. BOEYNAEMS. Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>11</sub> receptor. *Br J Pharmacol* 128: 1199–1206, 1999a.
- COMMUNI, D., P. PAINDAVOINE, G. A. PLACE, M. PARMENTIER AND J. M. BOEYNAEMS. Expression of P2Y receptors in cell lines derived from the human lung. *Br J Pharmacol* 127: 562–568, 1999b.
- COTT, G. R. AND A. K. RAO. Hydrocortisone promotes the maturation of Na<sup>+</sup>-dependent ion transport across the fetal pulmonary epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 166–171, 1993.
- CRAPO, J. D., S. L. YOUNG, E. K. FRAM, K. E. PINKERTON, B. E. BARRY AND R. O. CRAPO. Morphometric characteristics of cells in the alveolar region of mammalian lungs. *Am Rev Respir Dis* 128: S42–S46, 1983.
- CRESSMAN, V. L., E. LAZAROWSKI, L. HOMOLYA, R. C. BOUCHER, B. H. KOLLER AND B. R. GRUBB. Effect of loss of P2Y<sub>2</sub> receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl<sup>-</sup> transport. *J Biol Chem* 274: 26461–26468, 1999.
- CUFFE, J. E., A. BIELFELD-ACKERMANN, J. THOMAS, J. LEIPZIGER AND C. KORBMACHER. ATP stimulates Cl<sup>-</sup> secretion and reduces amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> absorption in M-1 mouse cortical collecting duct cells. *J Physiol* 524: 77–90, 2000.
- DANIELS, C. B. AND S. ORGEIG. The comparative biology of pulmonary surfactant: past, present and future. *Comp Biochem Physiol A. Mol Integr Physiol* 129: 9–36, 2001.
- DEETJEN, P., J. THOMAS, H. LEHRMANN, S. J. KIM AND J. LEIPZIGER. The luminal P2Y receptor in the isolated perfused mouse cortical collecting duct. *J Am Soc Nephrol* 11: 1798–1806, 2000.
- DERDAK, S. High-frequency oscillatory ventilation for acute respiratory distress syndrome in adult patients. *Crit Care Med* 31: S317–S323, 2003.
- DEVALIA, J. L. AND R. J. DAVIES. Effect of antihistamines on epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 29: 64–68, 1999.
- DEVOR, D. C. AND J. M. PILEWSKI. UTP inhibits Na<sup>+</sup> absorption in wild-type and Delta F508 CFTR-expressing human bronchial epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C827–C837, 1999.
- DIERICHS, 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.
- DINUDOM, A., K. F. HARVEY, P. KOMWATANA, J. A. YOUNG, S. KUMAR AND D. I. COOK. Nedd4 mediates control of an epithelial Na<sup>+</sup> channel in salivary duct cells by cytosolic Na<sup>+</sup>. *PNAS* 95: 7169–7173, 1998.
- DRIVER, A. G., C. A. KUKOLY, S. ALI AND S. J. MUSTAFA. Adenosine in bronchoalveolar lavage fluid in asthma. *Am Rev Respir Dis* 148: 91–97, 1993.
- DUMASIU, V., J. I. SZNAJDER, Z. S. AZZAM, J. BOJA, G. M. MUTLU, M. B. MARON AND P. FACTOR. β<sub>2</sub>-Adrenergic receptor overexpression increases alveolar fluid clearance and responsiveness to endogenous catecholamines in rats. *Circ Res* 89: 907–914, 2001.
- DUMONT, J. N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). 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.
- EFFROS, R. M., G. R. MASON, J. HUKKANEN AND P. SILVERMAN.** Reabsorption of solutes and water from fluid-filled rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* 136: 669–676, 1987.
- ELS, W. J. AND K. Y. CHOU.** Sodium-dependent regulation of epithelial sodium channel densities in frog skin; a role for the cytoskeleton. *J Physiol* 462: 447–464, 1993.
- ERLIJ, D. AND M. W. SMITH.** Sodium uptake by frog skin and its modification by inhibitors of transepithelial sodium transport. *J Physiol* 228: 221–239, 1973.
- FARR, T. J., S. J. CODDINGTON-LAWSON, P. M. SNYDER AND F. J. McDONALD.** Human Nedd4 interacts with the human epithelial Na<sup>+</sup> channel: WW3 but not WW1 binds to Na<sup>+</sup>-channel subunits. *Biochem J* 345: 503–509, 2000.
- FEOKTISTOV, I. AND I. BIAGGIONI.** Role of adenosine in asthma. *Drug Dev Res* 39: 333–336, 1996.
- FIRSOV, D., L. SCHILD, I. GAUTSCHI, A. M. MERRILLAT, E. SCHNEEBERGER AND B. C. ROSSIER.** Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: A quantitative approach. *PNAS* 93: 15370–15375, 1996.
- FISCHER, H., W. VAN DRIESSCHE AND W. CLAUSS.** Evidence for apical sodium channels in frog lung epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 256: C764–C771, 1989.
- FISCHER, H. AND W. CLAUSS.** Regulation of Na<sup>+</sup> channels in frog lung epithelium: a target tissue for aldosterone action. *Pflügers Arch* 416: 62–67, 1990.
- FOLKERTS, G. AND F. P. NIJKAMP.** Airway epithelium: more than just a barrier! *Trends Pharmacol Sci* 19: 334–341, 1998.
- FORSYTHE, P., L. P. MCGARVEY, L. G. HEANEY, J. MACMAHON AND M. ENNIS.** Adenosine induces histamine release from human bronchoalveolar lavage mast cells. *Clinical Science* 96: 349–355, 1999.
- FRANK, J. A. AND M. A. MATTHAY.** Science review: mechanisms of ventilator-induced injury. *Crit Care* 7: 233–241, 2003.
- FRIIS, S. AND R. NIELSEN.** Effect of the putative Ca<sup>2+</sup>-receptor agonist Gd<sup>3+</sup> on the active transepithelial Na<sup>+</sup> transport in frog skin. *J Membr Biol* 184: 291–297, 2001.
- FRINDT, G., L. G. PALMER AND E. E. WINDHAGER.** Feedback regulation of Na channels in rat CCT. IV. Mediation by activation of protein kinase C. *Am J Physiol Renal Physiol* 270: F371–F376, 1996.
- FUCHS, W., E. H. LARSEN AND B. LINDEMANN.** Current-voltage curve of sodium channels and concentration dependence of sodium permeability in frog skin. *J Physiol* 267: 137–166, 1977.
- FUMA, S., H. TAKEDA, K. MIYAMOTO, K. YANAGISAWA, Y. INOUE, N. ISHII, K. SUGAI, C. ISHII AND Z. KAWABATA.** Ecological evaluation of gadolinium toxicity compared with other heavy metals using an aquatic microcosm. *Bull Environ Contam Toxicol* 66: 231–238, 2001.
- GARTY, H. AND B. LINDEMANN.** Feedback inhibition of sodium uptake in K<sup>+</sup>-depolarized toad urinary bladders. *Biochim Biophys Acta* 771: 89–98, 1984.
- GARTY, H. AND L. G. PALMER.** Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 77: 359–396, 1997.
- GHOFRANI, H. A., M. G. KOHSTALL, N. WEISSMANN, T. SCHMEHL, R. T. SCHERMULY, W. SEEGER AND F. GRIMMINGER.** Alveolar epithelial barrier functions in ventilated perfused rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L896–L904, 2001.
- GILBERTSON, T. A. AND H. ZHANG.** Self-Inhibition in amiloride-sensitive sodium channels in taste receptor cells. *J Gen Physiol* 111: 667–677, 1998.

- GILLESPIE, J. H.** The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol (Lond)* 80: 345–349, 1934.
- GISSELMANN, G., H. PUSCH, B. T. HOVEMANN AND H. HATT.** Two cDNAs coding for histamine-gated ion channels in *D. melanogaster*. *Nat Neurosci* 5: 11–12, 2002.
- GOKINA, N. I. AND J. A. BEVAN.** Histamine-induced depolarization: ionic mechanisms and role in sustained contraction of rabbit cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H2094–H2104, 2000.
- GROENEVELD, A. B.** Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Vascul Pharmacol* 39: 247–256, 2003.
- GÜNTHER, A., C. RUPPERT, R. SCHMIDT, P. MARKART, F. GRIMMINGER, D. WALMRATH AND W. SEEGER.** Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res* 2: 353–364, 2001.
- HAMILL, O. P. AND D. W. MCBRIDE JR.** The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol Rev* 48: 231–252, 1996.
- HANKE, W. AND W. KLOAS.** Kinetic, storage and release of corticosteroids in *Xenopus laevis*. *Int. Symposium on Amphibian Endocrinology Boulder, Colorado* 1996 (Abstract).
- HARDCASTLE, J. AND P. T. HARDCASTLE.** The secretory actions of histamine in rat small intestine. *J Physiol* 388: 521–532, 1987.
- HARVEY, K. F., A. DINUDOM, D. I. COOK AND S. KUMAR.** The Nedd4-like protein KIAA0439 is a potential regulator of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 276: 8597–8601, 2001.
- HEDE, S. E., J. AMSTRUP, B. C. CHRISTOFFERSEN AND I. NOVAK.** Purinoceptors evoke different electrophysiological responses in pancreatic ducts. P2Y inhibits K<sup>+</sup> conductance, and P2X stimulates cation conductance. *J Biol Chem* 274: 31784–31791, 1999.
- HILKEN, J., F. IGLAUER, UND H. P. RICHTER.** Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Labortier: Biologie, Haltung, Zucht und experimentelle Nutzung. GV-Solas, Stuttgart: *Ferdinand Enke Verlag*, 1997
- HIRSH, A. J.** Altering airway surface liquid volume: Inhalation therapy with amiloride and hyperosmotic agents. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 1445–1462, 2002.
- HUMMLER, E., P. BARKER, J. GATZY, F. BEERMANN, C. VERDUMO, A. SCHMIDT, R. BOUCHER AND B. C. ROSSIER.** Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in  $\alpha$ -ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 12: 325–328, 1996.
- HWANG, T. H., E. M. SCHWIEBERT AND W. B. GUGGINO.** Apical and basolateral ATP stimulates tracheal epithelial chloride secretion via multiple purinergic receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 270: C1611–C1623, 1996.
- INGLIS, S. K., A. COLLETT, H. L. MCALROY, S. M. WILSON AND R. E. OLVER.** Effect of luminal nucleotides on Cl<sup>-</sup> secretion and Na<sup>+</sup> absorption in distal bronchi. *Pflügers Arch* 438: 621–627, 1999.
- ISHIKAWA, T., Y. MARUNAKA AND D. ROTIN.** Electrophysiological characterization of the rat epithelial Na<sup>+</sup> channel (rENaC) expressed in MDCK cells. Effects of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. *J Gen Physiol* 111: 825–846, 1998.
- ISMAILOV, I. I., M. S. AWAYDA, B. K. BERDIEV, J. K. BUBIEN, J. E. LUCAS, C. M. FULLER AND D. J. BENOS.** Triple-barrel organization of ENaC, a cloned epithelial Na<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 271: 807–816, 1996.
- JACOBY, D. B.** Role of the respiratory epithelium in asthma. *Res Immunol* 148: 48–58, 1997.
- JAIN, L., X. J. CHEN, S. RAMOSEVAC, L. A. BROWN AND D. C. EATON.** 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.

- KANO, S., M. KONDO, J. TAMAOKI, H. KOBAYASHI, K. MOTOYOSHI AND A. NAGAI.** Differential regulations between adenosine triphosphate (ATP)- and uridine triphosphate-induced  $\text{Cl}^-$  secretion in bovine tracheal epithelium. Direct stimulation of P1-like receptor by ATP. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25: 370–376, 2001.
- KEELY, S. J., W. A. STACK, D. P. O'DONOGHUE AND A. W. BAIRD.** Regulation of ion transport by histamine in human colon. *Eur J Pharmacol* 279: 203–209, 1995.
- KELLENBERGER, S. AND L. SCHILD.** Epithelial sodium Channel/Degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 82: 735–767, 2002.
- KELLENBERGER, S., I. GAUTSCHI AND L. SCHILD.** An external site controls closing of the epithelial  $\text{Na}^+$  channel ENaC. *J Physiol (Lond)* 543: 413–424, 2002.
- KIM, K. J.** Active  $\text{Na}^+$  transport across *Xenopus* lung alveolar epithelium. *Respir Physiol* 81: 29–39, 1990.
- KLEIN, J.** Immunologie. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1991.
- KNIGHT, G. E., P. BODIN, W. C. DE GROAT AND G. BURNSTOCK.** ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F281–F288, 2002.
- KOEFOD-JOHNSON, V. AND H. H. USSING.** The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand* 42: 298–308, 1958.
- KOMWATANA, P., A. DINUDOM, J. A. YOUNG AND D. I. COOK.** Cytosolic  $\text{Na}^+$  controls an epithelial  $\text{Na}^+$  channel via the Go guanine nucleotide-binding regulatory protein. *PNAS* 93: 8107–8111, 1996.
- KOMWATANA, P., A. DINUDOM, J. A. YOUNG AND D. I. COOK.** Activators of epithelial  $\text{Na}^+$  channels inhibit cytosolic feedback control. Evidence for the existence of a G protein-coupled receptor for cytosolic  $\text{Na}^+$ . *J Membr Biol* 162: 225–232, 1998.
- KONSTAS, A. A., D. MAVRELOS AND C. KORBMACHER.** Conservation of pH sensitivity in the epithelial sodium channel (ENaC) with Liddle's syndrome mutation. *Pflügers Arch* 441: 341–350, 2000.
- KORNGREEN, A. AND Z. PRIEL.** Purinergic stimulation of rabbit ciliated airway epithelia: control by multiple calcium sources. *J Physiol* 497: 53–66, 1996.
- KUNZELMANN, K., R. SCHREIBER AND D. COOK.** Mechanisms for the inhibition of amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  absorption by extracellular nucleotides in mouse trachea. *Pflügers Arch* 444: 220–226, 2002.
- LAUBINGER, W., G. STREUBEL AND G. REISER.** Physiological evidence for a P2Y receptor responsive to diadenosine polyphosphates in human lung via  $\text{Ca}^{2+}$  release studies in bronchial epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 61: 623–629, 2001.
- LAZAROWSKI, E. R., L. HOMOLYA, R. C. BOUCHER AND T. K. HARDEN.** Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation. *J Biol Chem* 272: 24348–24354, 1997.
- LAZAROWSKI, E. R. AND R. C. BOUCHER.** UTP as an extracellular signaling molecule. *News Physiol Sci* 16: 1–5, 2001.
- LEHRMANN, H., J. THOMAS, S. J. KIM, C. JACOBI AND J. LEIPZIGER.** Luminal P2Y<sub>2</sub> receptor-mediated inhibition of  $\text{Na}^+$  absorption in isolated perfused mouse CCD. *J Am Soc Nephrol* 13: 10–18, 2002.
- LEIPZIGER, J., D. KERSTAN, R. NITSCHKE AND R. GREGER.** ATP increases  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and ion secretion via a basolateral P2Y-receptor in rat distal colonic mucosa. *Pflügers Arch* 434: 77–83, 1997.
- LEIPZIGER, J.** Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F419–F432, 2003.
- LETHEM, M. I., M. L. DOWELL, M. VAN SCOTT, J. R. YANKASKAS, T. EGAN, R. C. BOUCHER AND C. W. DAVIS.** Nucleotide regulation of goblet cells in human airway epithelial explants: normal exocytosis in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 315–322, 1993.

- LI, J. H. AND B. LINDEMANN. Chemical stimulation of Na transport through amiloride-blockable channels of frog skin epithelium. *J Membr Biol* 75: 179–192, 1983.
- LINDEMANN, B. Fluctuation analysis of sodium channels in epithelia. *Annu Rev Physiol* 46: 497–515, 1984.
- LING, B. N. AND D. C. EATON. Effects of luminal Na<sup>+</sup> on single Na<sup>+</sup> channels in A6 cells, a regulatory role for protein kinase C. *Am J Physiol Renal Physiol* 256: F1094–F1103, 1989.
- LIU, M. C., E. R. BLEECKER, L. M. LICHTENSTEIN, A. KAGEY-SOBOTKA, Y. NIV, T. L. MCLEMORE, S. PERMUTT, D. PROUD AND W. C. HUBBARD. Evidence for elevated levels of histamine, prostaglandin D<sub>2</sub>, and other bronchoconstricting prostaglandins in the airways of subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis* 142: 126–132, 1990.
- MA, H. AND B. N. LING. Luminal adenosine receptors regulate amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channels in A6 distal nephron cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 270: F798–F805, 1996.
- MAIRBÄURL, H., R. WODOPIA, S. ECKES, S. SCHULZ AND P. BARTSCH. Impairment of cation transport in A549 cells and rat alveolar epithelial cells by hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 273: L797–L806, 1997.
- MAIRBÄURL, H., K. MAYER, K. J. KIM, Z. BOROK, P. BARTSCH AND E. D. CRANDALL. Alveolar epithelial ion and fluid transport: Hypoxia decreases active Na transport across primary rat alveolar epithelial cell monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L659–L665, 2002.
- MARUNAKA, Y., H. TOHDA, N. HAGIWARA AND H. O'BRODOVICH. Cytosolic Ca<sup>2+</sup>-induced modulation of ion selectivity and amiloride sensitivity of a cation channel and b agonist action in fetal lung epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 648–656, 1992.
- MATALON, S., D. J. BENOS AND R. M. JACKSON. Biophysical and molecular properties of amiloride-inhibitable Na<sup>+</sup> channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 271: L1–L22, 1996.
- MATALON, S. AND H. O'BRODOVICH. Sodium channels in alveolar epithelial cells: Molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance. *Annu Rev Physiol* 61: 627–661, 1999.
- MCCOY, D. E., A. L. TAYLOR, B. A. KUDLOW, K. KARLSON, M. J. SLATTERY, L. M. SCHWIEBERT, E. M. SCHWIEBERT AND B. A. STANTON. Nucleotides regulate NaCl transport in mIMCD-K2 cells via P2X and P2Y purinergic receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 277: F552–F559, 1999.
- MEBAN, C. The pneumonocytes in the lung of *Xenopus laevis*. *J Anat* 114: 235–244, 1973.
- MINAKATA, Y., S. SUZUKI, C. GRYGORCZYK, A. DAGENAIS AND Y. BERTHIAUME. Impact of β-adrenergic agonist on Na<sup>+</sup> channel and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase expression in alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 275: L414–L422, 1998.
- MUSANTE, L., O. ZEGARRA-MORAN, P. G. MONTALDO, M. PONZONI AND L. J. GALIETTA. Autocrine regulation of volume-sensitive anion channels in airway epithelial cells by adenosine. *J Biol Chem* 274: 11701–11707, 1999.
- NEHER, E. AND B. SAKMANN. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799–802, 1976.
- NORTH, R. A. Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol Rev* 82: 1013–1067, 2002.
- O'BRODOVICH, H. M., B. MULLEN, V. L. HANNAM AND B. E. GOODMAN. Active <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> transport by the intact lung during early postnatal life. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 431–435, 1997.
- O'GRADY, S. M. AND S. Y. LEE. Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L689–L700, 2003.
- OGUCHI, A., M. MITA, M. OHKAWA, K. KAWAMURA AND S. KIKUYAMA. Analysis of lung surfactant in the metamorphosing bullfrog (*Rana catesbeiana*). *J Exp Zool* 269: 515–521, 1994.

- OLIVERA, W. G., D. E. CICCOLELLA, N. BARQUIN, K. M. RIDGE, D. H. RUTSCHMAN, D. B. YATES AND J. I. SZNAJDER.** Aldosterone regulates Na/K-ATPase and increases lung edema clearance in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 567–573, 2000.
- PALMER, L. G., H. SACKIN AND G. FRINDT.** Regulation of Na<sup>+</sup> channels by luminal Na<sup>+</sup> in rat cortical collecting tubule. *J Physiol* 509: 151–162, 1998.
- PITKANEN, O.** Lung epithelial ion transport in neonatal lung disease. *Biology of the Neonate* 80: 14–17, 2001.
- PITTET, J. F., J. P. WIENER-KRONISH, M. C. MCELROY, H. G. FOLKESSON AND M. A. MATTHAY.** Stimulation of lung epithelial liquid clearance by endogenous release of catecholamines in septic shock in anesthetized rats. *J Clin Invest* 94: 663–671, 1994.
- PLANES, C., B. ESCOUBET, M. BLOT-CHABAUD, G. FRIEDLANDER, N. FARMAN AND C. CLERICI.** Hypoxia down-regulates expression and activity of epithelial sodium channels in rat alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: C508–C518, 1997.
- PLANT, P. J., H. YEGER, O. STAUB, P. HOWARD AND D. ROTIN.** The C2 domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca<sup>2+</sup>-dependent plasma membrane localization. *J Biol Chem* 272: 32329–32336, 1997.
- PUOTI, A., A. MAY, B. C. ROSSIER AND J. D. HORISBERGER.** Novel isoforms of the b and g subunits of the *Xenopus* epithelial Na channel provide information about the amiloride binding site and extracellular sodium-sensing. *PNAS* 94: 5949–5954, 1997.
- RALEVIC, V. AND G. BURNSTOCK.** Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50: 413–492, 1998.
- RAMMINGER, S. J., A. COLLETT, D. L. BAINES, H. MURPHIE, H. L. MCALROY, R. E. OLVER, S. K. INGLIS AND S. M. WILSON.** P2Y<sub>2</sub> receptor mediated inhibition of ion transport in distal lung epithelial cells. *Br J Pharmacol* 128: 293–300, 1999.
- RANGACHARI, P. K. AND D. MCWADE.** Epithelial and mucosal preparations of canine proximal colon in ussing chambers: comparison of responses. *Life Sci* 38: 1641–1652, 1986.
- RAY, K. AND J. NORTHUP.** Evidence for distinct cation and calcimimetic compound (NPS 568) recognition domains in the transmembrane regions of the human Ca<sup>2+</sup> receptor. *J Biol Chem* 277: 18908–18913, 2002.
- REIFARTH, F. W., W. CLAUSS AND W. M. WEBER.** Stretch-independent activation of the mechanosensitive cation channel in oocytes of *Xenopus laevis*. *Biochim Biophys Acta* 1417: 63–76, 1999.
- REPKA-RAMIREZ, M. S.** New concepts of histamine receptors and actions. *Curr Allergy Asthma Rep* 3: 227–231, 2003.
- RESHKIN, S. J., L. GUERRA, A. BAGORDA, L. DEBELLIS, R. CARDONE, A. H. LI, K. A. JACOBSON AND V. CASAVOLA.** Activation of A<sub>3</sub> adenosine receptor induces calcium entry and chloride secretion in A(6) cells. *J Membr Biol* 178: 103–113, 2000.
- ROEDER, T.** Metabotropic histamine receptors-nothing for invertebrates? *Eur J Pharmacol* 466: 85–90, 2003.
- ROONEY, S. A.** Regulation of surfactant secretion. *Comp Biochem Physiol A. Mol Integr Physiol* 129: 233–243, 2001.
- ROSSIER, B. C., S. PRADERVAND, L. SCHILD AND E. HUMMLER.** Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: Interaction between genetic and environmental factors. *Annu Rev Physiol* 64: 877–897, 2002.
- RUBIN, B. K.** Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care* 47: 761–768, 2002.
- RUGOLO, M., F. BARZANTI, D. C. GRUENERT AND S. HRELIA.** Histamine activates phospholipase C in human airway epithelial cells via a phorbol ester-sensitive pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 271: L665–L671, 1996.

- SANCHEZ-ESTEBAN, J., L. A. CICCHIELLO, Y. WANG, S. W. TSAI, L. K. WILLIAMS, J. S. TORDAY AND L. P. RUBIN. Mechanical stretch promotes alveolar epithelial type II cell differentiation. *J Appl Physiol* 91: 589–595, 2001.
- SARTORI, C., M. A. MATTHAY AND U. SCHERRER. Transepithelial sodium and water transport in the lung: Major player and novel therapeutic target in pulmonary edema. *Adv Exp Med Biol* 502: 315–338, 2001.
- SATOH, A., T. SHIMOSEGAWA, K. SATOH, H. ITO, Y. KOHNO, A. MASAMUNE, M. FUJITA AND T. TOYOTA. Activation of adenosine A<sub>1</sub>-receptor pathway induces edema formation in the pancreas of rats. *Gastroenterology* 119: 829–836, 2000.
- SAUMON, G., G. BASSET, F. BOUCHONNET AND C. CRONE. Cellular effects of  $\beta$ -adrenergic and of cAMP stimulation on potassium transport in rat alveolar epithelium. *Pflügers Arch* 414: 340–345, 1989.
- SAUMON, G. AND G. BASSET. Electrolyte and fluid transport across the mature alveolar epithelium. *J Appl Physiol* 74: 1–15, 1993.
- SCHWIEBERT, E. M., M. E. EGAN, T. H. HWANG, S. B. FULMER, S. S. ALLEN, G. R. CUTTING AND W. B. GUGGNO. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81: 1063–1073, 1995.
- SMIT, M. J., M. HOFFMANN, H. TIMMERMAN AND R. LEURS. Molecular properties and signalling pathways of the histamine H<sub>1</sub> receptor. *Clin Exp Allergy* 29: S19–S28, 1999.
- SNYDER, P. M., M. P. PRICE, F. J. McDONALD, C. M. ADAMS, K. A. VOLK, B. G. ZEIHNER, J. B. STOKES AND M. J. WELSH. Mechanism by which Liddle's syndrome mutations increase activity of a human epithelial Na<sup>+</sup> channel. *Cell* 83: 969–978, 1995.
- SNYDER, P. M., D. B. BUCHER AND D. R. OLSON. Gating induces a conformational change in the outer vestibule of ENaC. *J Gen Physiol* 116: 781–790, 2000.
- SØRENSEN, C. E. AND I. NOVAK. 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.
- SPRUNTULIS, L. M. AND K. J. BROADLEY. A<sub>3</sub> receptors mediate rapid inflammatory cell influx into the lungs of sensitized guinea-pigs. *Clin Exp Allergy* 31: 943–951, 2001.
- STAUB, O., H. ABRIEL, P. PLANT, T. ISHIKAWA, V. KANELIS, R. SALEKI, J. D. HORISBERGER, L. SCHILD AND D. ROTIN. Regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by Nedd4 and ubiquitination. *Kidney Int* 57: 809–815, 2000.
- SUGITA, M., Y. YUE AND J. K. FOSKETT. CFTR Cl<sup>-</sup> channel and CFTR-associated ATP channel: distinct pores regulated by common gates. *EMBO J* 17: 898–908, 1998.
- SUNANO, S. Actions of manganese and lanthanum on smooth muscles. *Nippon. Yakurigaku Zasshi* 80: 93–104, 1982.
- TAYLOR, A. L., B. A. KUDLOW, K. L. MARRS, D. C. GRUENERT, W. B. GUGGINO AND E. M. SCHWIEBERT. Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 275: C1391–C1406, 1998.
- TESSIER, G. J., T. R. TRAYNOR, M. S. KANNAN AND S. M. O'GRADY. Mucosal histamine inhibits Na absorption and stimulates Cl secretion across equine tracheal epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 261: L456–L461, 1991.
- THURMOND, W., W. KLOAS AND W. HANKE. Circadian rhythm of interrenal activity in *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol* 61: 260–271, 1986.
- TURNHEIM, K. Intrinsic regulation of apical sodium entry in epithelia. *Physiol Rev* 71: 429–445, 1991.
- UNDEM, B. J. AND M. J. CARR. Pharmacology of airway afferent nerve activity. *Respir Res* 2: 234–244, 2001.

- VAN DE VOORDE, J., V. BROCHEZ AND B. VANHEEL. Heterogenous effects of histamine on isolated rat coronary arteries. *Eur J Pharmacol* 271: 17–23, 1994.
- VAN DER GOOT, H. AND H. TIMMERMAN. Selective ligands as tools to study histamine receptors. *Eur J Med Chem* 35: 5–20, 2000.
- VAN DRIESSCHE, W. AND D. ERLIJ. Noise analysis of inward and outward Na<sup>+</sup> currents across the apical border of ouabain-treated frog skin. *Pflügers Arch* 398: 179–188, 1983.
- VAN DRIESSCHE, W. AND W. ZEISKE. Ca<sup>2+</sup>-sensitive, spontaneously fluctuating, cation channels in the apical membrane of the adult frog skin epithelium. *Pflügers Arch* 405: 250–259, 1985.
- VERKMAN, A. S., Y. SONG AND J. R. THIAGARAJAH. Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C2–15, 2003.
- VON KÜGELGEN, I. AND A. WETTER. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 310–323, 2000.
- WALMRATH, D., F. GRIMMINGER AND W. SEEGER. Schwere Sepsis – neue Therapieverfahren. *Internist* 42: 1619–1630, 2001.
- WATT, W. C., E. R. LAZAROWSKI AND R. C. BOUCHER. Cystic fibrosis transmembrane regulator-independent release of ATP. Its implications for the regulation of P2Y<sub>2</sub> receptors in airway epithelia. *J Biol Chem* 273: 14053–14058, 1998.
- WATTS, A. Direct studies of ligand-receptor interactions and ion channel blocking. *Mol Membr Biol* 19: 267–275, 2002.
- WILLIAMS, M. AND M. F. JARVIS. Purinergic and Pyrimidinergic receptors as potential drug targets. *Biochem Pharmacol* 59: 1173–1185, 2000.
- WIRTZ, H. R. AND L. G. DOBBS. The effects of mechanical forces on lung functions. *Respir Physiol* 119: 1–17, 2000.
- WOOD-BAKER, R. Histamine and its receptors. In: Asthma and Rhinitis, edited by W.W. Busse and S.T. Holgate. London: Blackwell Scintific Publications, 1995, p. 791–800.
- YAGIL, Y. The effects of adenosine on water and sodium excretion. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 826–835, 1994.
- YAMAYA, M., T. OHRUI, W. E. FINKBEINER AND J. H. WIDDICOMBE. Calcium-dependent chloride secretion across cultures of human tracheal surface epithelium and glands. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 265: L170–L177, 1993.
- ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 299–309, 2000.

## VII. Anhang

### 1 Abkürzungen

#### 1.1 Präfixe der verwendeten Einheiten

Symbol	Präfix	Faktor
G	Giga	$10^9$
M	Mega	$10^6$
k	Kilo	$10^3$
c	Centi	$10^{-2}$
m	Milli	$10^{-3}$
$\mu$	Mikro	$10^{-6}$
n	Nano	$10^{-9}$
p	Pico	$10^{-12}$

#### 1.2 Verwendete Einheiten

Symbol	Einheit
A	Ampere
bar	Bar; (Druck angegeben als mm Wassersäule)
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
l	Liter
M	Molar
m	Meter
min	Minute
Osmol	Osmolarität
s	Sekunde
V	Volt
$\Omega$	Ohm
%	Prozent

### 1.3 Sonstige Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
A6	Epithelzellen aus dem distalen Tubulus von <i>Xenopus</i>
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADH	antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
ARDS	acute respiratory distress syndrome, akute respiratorische Insuffizienz
ASIC	acid sensing ion channels, pH-sensitive Ionenkanäle
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATP- $\gamma$ -S	Adenosin-5'-O-3-Thiotriphosphat
BAPTA/AM	Bis-(-O-Aminophenoxy)-Ethan-N,N,N,N,-Tetraacetylsäure Actoxy-methyl
$\beta,\gamma$ -me ATP	beta, gamma-Methylene-ATP
BIG	Benz-Imidazolyl-Guanidin
c.a.	cell-attached
cAMP	cyclisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CF	Cystische Fibrose
cRNA	komplementäre RNA
ctp-cAMP	8-(4-Chlorophenylthio)-cAMP
DAG	1,2-Diacylglycerol
DEG	Degenerin, Proteine die zu der Degenerin/ENaC-Proteinfamilie gehören
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EC <sub>50</sub>	halbmaximale Substratkonzentration
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ENaC	epithelialer Natriumkanal
EpiDRFs	epithelium derived relaxing factors, von Epithelien freigesetzte Relaxationsfaktoren
GHK	Goldman-Hodgkin-Katz
G <sub>t</sub>	transepitheliale Leitfähigkeit
H <sub>1-3</sub>	Histamin-Rezeptoren
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
I	Strom
I <sub>ami</sub>	amilorid-sensitiver Anteil des I <sub>sc</sub>
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin

Abkürzung	Bedeutung
$I_{Na}$	Gesamt-Natriumstrom
$IP_3$	Inositol-1,4,5-Triphosphat
$I_{sc}$	Kurzschlussstrom
Kul-ORI	Kultur-Oocytenringer
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MDCK	Madin-Darby canine kidney, Nieren-Epithelzellen
MS222	Tricaine (Anästhetikum)
n	Anzahl der Experimente
N	Anzahl der Donoren (Oocytendonoren)
Nedd4	neuronal precursor cells expressed developmentally down-regulated 4, ENaC Regulatorprotein
NMDG	n-Methyl-d-Glucamin
NO	Stickstoffmonoxid
$NP_o$	relative Offenwahrscheinlichkeit
NPPB	5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino) Benzoic Acid
NRS	Standard-Ringerlösung (normal Ringer's solution)
o.c.	open-circuit
OP	Operation
ORI	Oocytenringer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Permeabilität
P1/P2	purinerge Rezeptoren
P2X	ionotrope purinerge Rezeptoren
P2Y	G-Protein gekoppelte purinerge Rezeptoren
$PGE_2$	Prostaglandin $E_2$
PHMB	p-Hydroxy-Mercuribenzoic Acid
PKA	Proteinkinase A (cAMP-abhängig)
PKC	Proteinkinase C ( $Ca^{2+}$ -abhängig)
PLC	Phospholipase C
PPADS	Pyridoxalphosphate-6-Azophenyl-2',4'-Disulfonic Acid
R	elektrischer Widerstand
$R_t$	transepithelialer Widerstand
RNA	Ribonucleinsäure
SAC	stretch activated ion channel, mechanisch aktivierbare Ionenkanäle
s.c.	short-circuit
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
U	elektrische Spannung
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
v.c.	voltage-clamp

Abkürzung	Bedeutung
$V_{com}$	Klemm-/Kommandopotential
$V_{lung}$	transepitheliales Potential gemessen an intakten Lungen
$V_t$	transepitheliales Potential
xENaC	aus <i>Xenopus</i> klonierter epithelialer Natriumkanal

#### 1.4 Benutzte Chemikalien/Pharmaka und deren Bezugsquellen

Chemikalien	Bezugsquellen
ACTH	Sigma
Adenosin	Sigma
Amilorid	Sigma
ATP	Sigma
ATP- $\gamma$ -S	Calbiochem
$\beta, \gamma$ -meATP	Calbiochem
BIG	Sigma
$CaCl_2$	Fluka
$CaSO_4$	Fluka
Cimetidin	Sigma
Collagenase	Serva
cpt-cAMP	Sigma
Diphenhydramin	Sigma
Glucose	Fluka
HCl	Fluka
Hepes	Fluka
KCl	Fluka
$K_2SO_4$	Fluka
Mannitol	Sigma
$MgCl_2$	Fluka
$MgSO_4$	Fluka
NaCl	Fluka
Na <sup>+</sup> -Pyruvat	Fluka
$Na_2SO_4$	Fluka
NMDG	Fluka
NPPB	Sigma

---

Chemikalien	Bezugsquellen
Penicillin G	Sigma
PHMB	Sigma
PPADS	Sigma
Streptomycinsulfat	Sigma
Terbutalin	Sigma
Tricaine (MS222)	Sigma
Trizma	Fluka
UTP	Sigma

---

## **2 Versicherung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Zitate und übernommenen Darstellungen wurden durch Quellenangaben kenntlich gemacht.

Gießen, im Oktober 2003

Martin Fronius

### 3 Danksagung

Abschließend möchte ich meinen Dank all jenen aussprechen, die mich während der letzten Jahre unterstützt haben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

.... Herrn Prof. Dr. Wolfgang Clauß, meinem „Chef“ und Mentor gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der benötigten Arbeitsplätze, sowie seine Hilfestellungen und seine Diskussionsbereitschaft. Bedanken möchte ich mich zudem für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

.... Herrn Priv. Doz. Dr. Andreas Scholz möchte ich dafür danken, dass er mir während der gesamten Zeit in Sachen „patch-clamp“ als Ansprechpartner mit Rat und Tat zur Seite stand und sich bereit erklärte, die Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten.

.... Herrn Dr. Mikael Schnizler danke ich für die kameradschaftliche Betreuung und Unterstützung während der letzten Jahre. Vor allem aber für seine Hilfe und konstruktiven Vorschläge bei der Korrektur von Manuskripten und dieser Arbeit.

.... mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts, die – in welcher Form auch immer – etwas zu dieser Arbeit beigetragen haben (von Kaffee kochen über Lösungen ansetzen, Kabel löten bis hin zum Fertigen neuer Messkomponenten und dem seelisch/moralischen Beistand).

.... Andreas Berk danke ich für das freundschaftliche Arbeitsklima und seine Kameradschaft, die bei weitem über das Berufliche hinausgeht.

.... Anke Bennert danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung während dieser Zeit, für die unerschöpfliche Geduld und ihren Beistand, sowie für ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten. Besonders möchte ich mich für ihren Einsatz bei den zahlreichen Korrekturen der verschiedenen Versionen dieser Arbeit bedanken.

.... meiner Familie, die mich während der gesamten Zeit in vielfältiger Weise unterstützt hat. Für die Geduld bei der Korrektur der Arbeit danke ich Dagmar und Sigrid.