

Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Tierphysiologie
AG Molekulare Zellphysiologie
PD Dr. Mike Althaus

Die Wirkung von luminal appliziertem Acetylcholin auf den Ionentransport im Trachealepithel des Schweins

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

vorgelegt von
Nikolaus Paul Dittrich

Gießen, Mai 2016

Diese Dissertation wurde angefertigt
im Institut für Tierphysiologie
an der Justus-Liebig-Universität Gießen
unter der Leitung von
Prof. Dr. R. Lakes-Harlan

Dekan: Prof. Dr. V. Wissemann

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Lakes-Harlan
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Tag der Abgabe: 23.05.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2016

Nach Gutachten korrigierte Fassung: 31.10.2016

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Dittrich, N. P.; Kummer, W.; Clauss, W. G.; Fronius, M. (2015): Luminal acetylcholine does not affect the activity of the CFTR in tracheal epithelia of pigs. In: *International immunopharmacology* **29**, 166–172.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Zusammenfassung	VI
Abstract	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Flüssigkeitsregulation in den Atemwegen	1
1.1.1 Anatomischer Aufbau und Funktion der unteren Atemwege der Säugetierlunge.....	1
1.1.2 Anatomie der Schweinetrachea.....	4
1.1.3 Mukoziliäre Clearance	6
1.1.4 Regulation des ASL-Volumens in der Trachea.....	8
1.1.5 Feinregulation des ASL-Volumens durch Ionen-transport-Prozesse	9
1.1.6 Mukoziliäre Clearance und zystische Fibrose.....	11
1.2 Flüssigkeitsregulation in den Atemwegen durch Acetylcholin.....	13
1.2.1 ACh-Metabolismus des NCS und NNCS	13
1.2.2 ACh und die Regulation des Ionen-transportes.....	18
1.3 Ziel der Arbeit und Vorgehensweise.....	19
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Tierethik	21
2.2 Das Versuchstier: Hausschwein	21
2.2 Experimentelle Ringer-Lösungen.....	21
2.3 Gewebe-Isolation (Trachealepithel)	22
2.4 Ussing-Kammer Experimente	23
2.4.1 Aufbau und Funktion der verwendeten Ussing-Kammer	23
2.4.2 Messablauf und Messtechnik	24
2.5 Verwendete Substanzen	25

2.6	Auswertung der Daten und Statistik.....	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Elektrophysiologische Charakterisierung des Schweine-trachealepithels	28
3.2	Pharmakologische Wirkung von luminal appliziertem ACh	28
3.2.1	Der Einfluss von luminal appliziertem ACh auf den transepithelialen Ionentransport ..	28
3.2.2	Die Beteiligung von mAChR und nAChR am ACh-Effekt	29
3.3	Ca ²⁺ -Abhängigkeit des luminalen ACh-Effekts	33
3.3.1	Die Beteiligung einer Erhöhung der zytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration am ACh-Effekt aus intrazellulären Ca ²⁺ -Speichern	33
3.3.2	Die Beteiligung eines Ca ²⁺ -Einstroms aus dem Extrazellularraum am ACh-Effekt.....	36
3.3.3	Die Beteiligung der Phospholipase C _β am ACh-Effekt.....	37
3.3.4	Die Beteiligung von Ca ²⁺ -freisetzenden Ionenkanälen am ACh-Effekt	38
3.3.5	Die Beteiligung eines cAMP-abhängigen Signalwegs am ACh-Effekt.....	41
3.4	Beteiligung von Ionenkanälen am luminalem ACh-Effekt.....	42
3.4.1	Die Beteiligung von Na ⁺ -resorbierenden Ionenkanälen.....	42
3.4.2	Die Beteiligung von Cl ⁻ sekretierenden Ionenkanälen.....	44
3.4.3	Die Beteiligung von basolateralen K ⁺ -Kanälen am ACh-Effekt.....	49
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	51
4.	Diskussion	53
4.1	Das Schwein als Untersuchungsmodell für den transepithelialen Ionentransport	53
4.2	Pharmakologische Wirkung von luminal appliziertem ACh	54
4.2.1	Luminal appliziertes ACh induziert einen Anstieg des I _{SC} in der Schweinetrachea	54
4.2.2	mAChR und nicht nAChR sind am ACh-Effekt beteiligt.....	55
4.3	Ca ²⁺ -Abhängigkeit des luminalen ACh-Effekts	57
4.3.1	Eine Erhöhung der zytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration am ACh-Effekt konnte nicht nachgewiesen werden.....	57
4.3.2	Ca ²⁺ -freisetzende Ionenkanäle sind nicht am ACh-Effekt beteiligt	59
4.3.3	Ein cAMP-abhängiger Signalweg ist nicht am ACh-Effekt beteiligt	60
4.4	Beteiligung von Ionenkanälen am luminalen ACh-Effekt	63

4.4.1	Na ⁺ -resorbierende Ionenkanäle sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.....	63
4.4.2	Cl ⁻ -sekretierende Ionenkanäle sind nicht am ACh-Effekt beteiligt	63
4.4.3	Basolaterale K ⁺ -Kanäle sind am ACh-Effekt beteiligt.....	66
4.5	Moduliert luminal appliziertes ACh den basalen elektrogenen Ionentransport?	68
4.6	Schlussfolgerung und physiologische Relevanz von luminal appliziertem ACh.....	69
5	Literaturverzeichnis.....	72
6.	Anhang	94
6.1	Verzeichnis der Abkürzungen	94
6.2	Curriculum Vitae	98
6.3	Danksagung	101
6.4	Selbstständigkeitserklärung.....	102

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Anatomie und Funktion der unteren Atemwege.....	3
Abb. 2. Anatomie und Aufbau der Schweinetrachea.	5
Abb. 3. Mukoziliäre Clearance – angeborener Abwehrmechanismus der Atemwege.....	7
Abb. 4. Absorption und Sekretion von Flüssigkeit durch Ionentransport-Prozesse.....	11
Abb. 5. Mukoziliäre Clearance und zystische Fibrose.	12
Abb. 6. Der Metabolismus-Kreislauf von ACh im NCS und NNCS.	14
Abb. 7. Aufbau und Struktur der nikotinergen und muskarinergen ACh-Rezeptoren.	16
Abb. 8. PLC β /IP $_3$ -Signalweg für luminal appliziertes ACh.	17
Abb. 9. Präparation der Schweinetrachea.....	22
Abb. 10. Schematische Darstellung der verwendeten Ussing-Kammer.....	23
Abb. 11. Aufbau der Potential- und Stromelektroden.	24
Abb. 12. Luminales ACh induziert einen Anstieg des I $_{sc}$ in der Schweinetrachea.	29
Abb. 13. Muskarinerge ACh-Rezeptoren sind am ACh-Effekt beteiligt.	30
Abb. 14. Der muskarinerge M $_3$ AChR ist maßgeblich am ACh-Effekt beteiligt.	31
Abb. 15. Nikotinerge ACh-Rezeptoren sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.....	32
Abb. 16. Der SERCA-Inhibitor Thapsigargin reduziert den ACh-Effekt.	34
Abb. 17. In Gegenwart des SERCA-Inhibitors DTBHQ ist der ACh-Effekt unverändert.....	35
Abb. 18. In Gegenwart des SERCA-Inhibitors CPA ist der ACh-Effekt unverändert.....	36
Abb. 19. Der ACh-Effekt ist unabhängig von einem extrazellulären Ca $^{2+}$ -Einstrom.	37
Abb. 20. Die Beteiligung der Phospholipase C β am ACh-Effekt ist nicht eindeutig.	38
Abb. 21. IP $_3$ -Rezeptoren sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.	39
Abb. 22. IP $_3$ -Rezeptoren sind am ATP-induzierten Anstieg des I $_{sc}$ beteiligt.	40
Abb. 23. Ryanodin-Rezeptoren sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.....	41
Abb. 24. Adenylylcyclasen sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.	42
Abb. 25. Der ENaC ist nicht am ACh-Effekt beteiligt.....	43
Abb. 26. Na $^+$ -resorbierende Ionenkanäle sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.....	44
Abb. 27. Der CFTR ist in der Schweinetrachea vorhanden und aktivierbar.	45
Abb. 28. Der CFTR ist nicht am ACh Effekt beteiligt.	46
Abb. 29. CaCC sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.....	48
Abb. 30. Eine basolaterale K $^+$ -Leitfähigkeit ist am ACh-Effekt beteiligt.....	49
Abb. 31. Der K $^+$ -Kanalblocker Ba $^{2+}$ hat keine Auswirkungen auf den ACh-Effekt.....	50
Abb. 32. Basolaterale K $_{Ca}$ -Kanäle sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.	51
Abb. 33. Übersicht der Ca $^{2+}$ -Abhängigkeit des luminalen ACh-Effekts.	62

Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Ringer-Lösungen	22
Tab. 2. Verwendete Substanzen	26
Tab. 3. Elektrophysiologische Charakterisierung des Schweinetrachealepithels.....	28
Tab. 4. Verwendete Abkürzungen und ihre Bedeutung	94
Tab. 5. Verwendete Größenordnungen.....	97

Zusammenfassung

Einleitung: In den Atemwegen von Mäusen konnte gezeigt werden, dass Acetylcholin (ACh) als ein autokrines/parakrines Signalmolekül in die Atemwegsflüssigkeit entlassen wird und dort nikotinerge und muskarinerge ACh-Rezeptoren (n- und mAChR) aktiviert, die eine Cl^- -Sekretion über Ca^{2+} -abhängige Cl^- - und K^+ -Kanäle vermitteln sollen. Schweine werden, im Vergleich zum Mausmodell, verstärkt als ein geeignetes Modell zur Untersuchung menschlicher Atemwegserkrankungen angesehen, die mit einem gestörten epithelialen Ionentransport verbunden sind (z.B. Mukoviszidose, COPD). Aus diesem Grund wurden in Atemwegsepithelien von Schweinen (i) die Pharmakologie von luminal appliziertem ACh, (ii) die intrazelluläre Ca^{2+} -Abhängigkeit des Effekts von luminal appliziertem ACh und (iii) die Regulierung des transepithelialen Ionentransports durch luminal appliziertes ACh untersucht.

Methode: Trachealpräparationen von Schweinen wurden in Ussing-Kammern eingesetzt, um die transepithelialen Ionentransport-Prozesse elektrophysiologisch als Kurzschlussstrom (I_{SC}) zu messen.

Ergebnisse: Luminal appliziertes ACh induzierte eine transiente Erhöhung des I_{SC} . Dieser Effekt konnte durch den unspezifischen ACh-Rezeptor-Agonisten Carbachol und die mAChR-Agonisten Muskarin und Pilocarpin nachgeahmt werden. Weiterhin wurde der ACh-induzierte Anstieg des I_{SC} durch den nicht-selektiven mAChR-Antagonisten Atropin (M1-5AChR) größtenteils geblockt. Weitere Experimente mit dem M1AChR-Antagonisten Pirenzepin und dem M3AChR-Antagonisten 4-DAMP resultierten in einer dosisabhängigen Hemmung des ACh-induzierten I_{SC} (IC_{50} von 69.1 μM bzw. 49.3 nM). Im Vergleich zu den muskarinergen Agonisten waren der nAChR-Agonist Nikotin und der membranundurchlässige nAChR-Agonist DMPP nicht in der Lage, den ACh-induzierten I_{SC} zu verändern. Zusätzlich wurden in Gegenwart von Nikotin und dem nicht-selektiven nAChR-Antagonisten Mecamylamin keine Veränderungen im ACh-induzierten I_{SC} registriert.

Weiterhin wurde eine potentielle Beteiligung von Ca^{2+} am Effekt von luminal appliziertem ACh untersucht. Eine Entfernung von extrazellulärem Ca^{2+} aus der Ringerlösung hatte keinen Einfluss auf den ACh-induzierten I_{SC} . In Experimenten, bei denen intrazelluläre sarko/endoplasmatische Ca^{2+} -ATPasen mit drei Inhibitoren (Thapsigargin, DTBHQ und Cyclopiazonsäure) gehemmt wurden, war nur Thapsigargin in der Lage, den ACh-induzierten I_{SC} zu inhibieren. Weiterhin konnte in Gegenwart des Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor (IP_3R)-Inhibitors 2-APB und des Ryanodin-Rezeptor (RyR)-Inhibitors Rutheniumrot keine Veränderung des ACh-induzierten I_{SC} beobachtet werden. Zudem zeigte ein Inhibitor der Phos-

phatidylinositol-Phospholipase C (U73122) keine Auswirkung auf den ACh-induzierten I_{SC} , während ein Phosphatidylcholin-Phospholipase C-Inhibitor (D609) diesen reduzierte. Des Weiteren wurde ein cAMP-abhängiger Signalweg durch die Verwendung eines Adenylylcyclase-Inhibitors (MDL) ausgeschlossen.

Bei den Untersuchungen zur Regulierung des transepithelialen Ionentransports durch luminal appliziertem ACh, konnte mit den Kanalblockern für die Cl^- sekretierenden Ionenkanäle CFTR (GlyH101) und CaCC (Tanninsäure) kein Einfluss auf den ACh-induzierten I_{SC} festgestellt werden. Im Gegensatz dazu führte eine Depolarisation der basolateralen Membran mit einer hohen K^+ -Konzentration zu einer Inhibition des ACh-induzierten I_{SC} . Allerdings konnte mit dem allgemeinen K^+ -Kanalblocker Ba^{2+} keine Inhibition des ACh-induzierten I_{SC} erzielt werden. Weiterhin waren verschiedene Kanalblocker für *big conductance* (BK-), *intermediate conductance* (IK-) und *small conductance* (SK-) Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle nicht in der Lage, den ACh-induzierten I_{SC} zu inhibieren.

Fazit: Luminal appliziertes ACh stimuliert M1AChR- und M3AChR-Subtypen (bevorzugt den M3AChR-Subtyp) in den Atemwegsepithelzellen des Schweins. Interessanterweise wurde keine Beteiligung von nAChR beobachtet. Des Weiteren wurden keine klaren Hinweise für eine potentielle Beteiligung einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration infolge von luminal appliziertem ACh gefunden. Überdies wird durch luminal appliziertes ACh, mit der Ausnahme einer K^+ -Leitfähigkeit in der basolateralen Membran, keine weitere Ionenkanalaktivität beeinträchtigt; einschließlich einer apikalen Cl^- -Leitfähigkeit. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass in den Atemwegen von Schweinen und Mäusen beträchtliche Unterschiede in den cholinergen Signalwegen vorliegen.

Abstract

Introduction: In murine airways it was shown that acetylcholine (ACh) can be released into the airway lining fluid to act as an auto-/paracrine signaling molecule by activating nicotinic and muscarinic ACh receptors (n- and mAChR) which are assumed to trigger Cl^- secretion via Ca^{2+} -dependent Cl^- and K^+ channels. Compared to mice, pigs represent a suitable model to study human airway diseases which are associated with impaired airway epithelial ion transport processes (e.g. cystic fibrosis, COPD). Therefore, the present study investigated (i) the pharmacology of lumenally applied ACh, (ii) the intracellular Ca^{2+} dependence of lumenally applied ACh and (iii) the regulation of ion transport processes across porcine airway epithelia by lumenally applied ACh.

Method: Porcine tracheal preparations were mounted in Ussing-chambers and ion transport processes were measured electrophysiologically as short-circuit-current (I_{SC}) signals.

Results: Lumenally applied ACh induced a transient increase in I_{SC} . The action of lumenally applied ACh was mimicked by the cholinergic receptor agonist carbachol and by the mAChR agonists muscarine and pilocarpine. The ACh-induced I_{SC} was largely blocked by the non-selective mAChR antagonist atropine (M1-5AChR). The M1AChR-preferring antagonist pirenzepine, as well as the M3AChR-preferring antagonist 4-DAMP dose-dependently inhibited the ACh-induced I_{SC} (IC_{50} of 69.1 μM and 49.3 nM, respectively). In contrast to the action of muscarinic agonists, the nAChR agonist nicotine and the membrane-impermeable nAChR agonist DMPP failed to increase the I_{SC} . Furthermore, the ACh-induced I_{SC} was not altered in the presence of nicotine or the non-selective nAChR-antagonist mecamylamine.

In further experiments a potential contribution of Ca^{2+} was investigated. Removal of extracellular Ca^{2+} from the Ringer solution did not affect the ACh-induced I_{SC} . In experiments where intracellular sarco/endoplasmic Ca^{2+} -ATPases were blocked with three inhibitors (thapsigargin, DTBHQ and cyclopiazonic acid), exclusively thapsigargin was able to inhibit the ACh-induced I_{SC} . Furthermore, there was no change in the ACh-induced I_{SC} in the presence of the inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptor inhibitor 2-APB and the ryanodine receptor (RyR) inhibitor ruthenium red. An inhibitor of phosphatidylinositol-phospholipase C (U73122) was without any effect on the luminal ACh-induced I_{SC} which was, in contrast, attenuated by a phosphatidylcholine-phospholipase C inhibitor (D609). A cAMP-sensitive pathway was also excluded by using an inhibitor of adenylyl cyclase (MDL).

It was also investigated which transport pathways contribute to the ACh-induced I_{SC} . Channel blockers of Cl^- secreting ion channels CFTR (GlyH101) and CaCC (tannic acid) did not affect the ACh-induced I_{SC} . By contrast, depolarization of the basolateral membrane by a high K^+ concentration decreased the ACh-stimulated I_{SC} . However, the broad spectrum K^+ channel blocker Ba^{2+} was ineffective to block the ACh-induced I_{SC} . In addition, different channel blockers for big conductance (BK), intermediate conductance (IK) and small conductance (SK) Ca^{2+} -activated K^+ channels also did not block the ACh-induced I_{SC} .

Conclusion: Luminally applied ACh stimulates M1AChR and M3AChR subtypes (preferentially the M3AChR subtype) in porcine airway epithelium. Interestingly, there is no participation of nAChR and there is no clear evidence for a potential contribution of an increase in intracellular Ca^{2+} due to luminally applied ACh. Furthermore, with the exception of a K^+ channel conductance in the basolateral membrane, no other ion channel activity, including apical Cl^- channel conductance, is affected by luminally applied ACh. These results indicate considerable differences in cholinergic signaling pathways in the airways of pigs compared to mice airways.

1. Einleitung

1.1 Flüssigkeitsregulation in den Atemwegen

1.1.1 Anatomischer Aufbau und Funktion der unteren Atemwege der Säugetierlunge

Die Atemwege bezeichnen die luftleitenden Strukturen zwischen der Außenwelt und den Alveolen. Dabei wird bei den Säugetieren zwischen den oberen Atemwegen und den unteren Atemwegen unterschieden. Die oberen Atemwege erstrecken sich von der Nasenhöhle bis zum Rachen (Pharynx) und die unteren Atemwege vom Kehlkopf (Larynx) bis zu den Alveolen der Lunge.

In den unteren Atemwegen wird der Bronchialbaum einer Säugetierlunge wiederum von der Trachea bis in die Alveolen in Verzweigungen (Generationen) aufgeteilt. Die Verästelung des Bronchialbaums und auch die Anzahl der Verzweigungen sind speziesabhängig. Generell liegt beim menschlichen Bronchialbaum eine bipodiale (gabelartige) Verästelung und bei allen anderen Tieren eine monopodiale (Verzweigung mit durchgehender Achse) Verästelung des Bronchialbaums vor (Judge et al. 2014; Monteiro und Smith 2014; Florens et al. 2011). Die Anzahl der Verzweigungen von der Trachea bis in die Alveolen beträgt beim Menschen insgesamt 23 Verzweigungen und soll auch beim Schwein, trotz des Unterschieds in der Verästelung, insgesamt 23 Verzweigungen betragen (Judge et al. 2014). Jedoch ist bei kleineren Säugetieren, wie bei Ratten und Mäusen, aufgrund der Größe der Lunge (im Vergleich zum Menschen und zum Schwein), keine einheitliche Korrelation zwischen dem Durchmesser des Bronchialbaumabschnitts und der Generation zu finden, die für eine korrekte Beschreibung der Lage und der physiologischen Funktion geeignet wäre (Hofmann et al. 1989). Aus diesem Grund wird für die Klassifizierung der unteren Atemwege bei Ratten der alleinige Durchmesser der Abschnitte des Bronchialbaums empfohlen und nicht eine theoretische zugeordnete Generationsnummer (Hofmann et al. 1989). Im Folgenden wird die Anatomie und Funktion der unteren Atemwege anhand der bipodalen Verästelung des Bronchialbaums (Generationen 0-23) des Menschen genauer beschrieben (siehe auch **Abb. 1**), bei der eine starke Korrelation zwischen dem Durchmesser und der Generation vorliegt (Hofmann et al. 1989).

Von der Trachea (Generation 0) bis zu den Bronchien (Generation 1-10) sind die Wände der Atemwege durch Knorpel gekennzeichnet. In der Trachea ist der Knorpel C-förmig (dorsal offen) und kommt in regelmäßigen Abständen vor. Nach der Bifurkation liegt der Knorpel

immer noch regelmäßig und C-förmig vor, bis gegen Ende der Bronchien nur noch knorpelige Plaques in den Wänden zu finden sind. Die dorsal offenen Knorpelringe dienen dem Schutz vor äußeren Einflüssen und verhindern ein Kollabieren der Lunge beim Einatmen (Snowball et al. 2015). Mit dem vollständigen Verschwinden des Knorpels ab der 11. Generation werden die Atemwege bis zur 20. Generation als Bronchiolen bezeichnet. Von Generation 11-15 sind die Bronchiolen ausschließlich luftleitend und werden deshalb auch luftleitende Bronchiolen genannt. Ab der 16. Generation tauchen die ersten Alveolen in den Wänden der Bronchiolen auf, weswegen die Bronchiolen ab hier respiratorische Bronchiolen heißen. Mit der 21. Generation beginnt der Abschnitt der Alveolargänge. Ab hier nimmt die Anzahl der Alveolen immer weiter zu und die Wände der Atemwege sind mit Surfactant bedeckt, einer emulgierenden, oberflächenaktiven Substanz, die die Oberflächenspannung verringert und die Alveolen bei der Expiration vor einem „Verkleben“ schützt. Ganz am Ende der Alveolargänge liegen die Alveolarsäckchen (23), Gruppen von Alveolaren, in denen hauptsächlich der Gasaustausch stattfindet (Widdicombe und Wine 2015).

In den Alveolaren existiert für einen effizienten Gasaustausch lumenseitig auf der Basallamina ein einschichtiges Plattenepithel, das aus zwei Typen von Alveolarepithelzellen (Pneumozyten) aufgebaut ist. Man unterscheidet dabei die Pneumozyten vom Typ I und Typ II. Typ I-Pneumozyten sind extrem flach und streckenweise weniger als $0,1 \mu\text{m}$ dick. Sie dienen dem Transport der Atemgase. Die Typ II-Pneumozyten besitzen eine kubische Form und sind für die Produktion des Surfactant verantwortlich (Castranova et al. 1988).

untere Atemwege		Gene- ration	Knorpel	Epithel	Zilien	Mukus- Sekretion	Surfactant	glatte Muskulatur	
luftleitende Zone	Trachea	0	dorsal offene Ringe	Säulenepithel (einschichtig & mehrreihig)	Ja	SMG & Becher- zellen	Nein	Ja	ASL
	Bronchien	1-10	dorsal offene Ringe & Plaques	Säulenepithel (einschichtig & mehrreihig)	Ja	SMG & Becher- zellen	Nein	Ja	
	luftleitende Bronchiolen	11-15	Nein	Säulenepithel (einschichtig & mehrreihig)	Ja	Becher- zellen	Nein	Ja	
respiratorische Zone	respiratorische Bronchiolen	16-20	Nein	Säulenepithel (einschichtig & mehrreihig)	teilweise	Club- Zellen	Nein	teilweise	ALF
	Alveolargänge	21-22	Nein	vorwiegend einschichtiges Plattenepithel (Typ I & II)	Nein	Nein	Ja	teilweise	
	Alveolarsäckchen	23	Nein	einschichtiges Plattenepithel (Typ I & II)	Nein	Nein	Ja	Nein	

Abb. 1. Anatomie und Funktion der unteren Atemwege.

Die unteren Atemwege werden in eine luftleitende und eine respiratorische Zone aufgeteilt, die je nach ihren anatomischen Eigenschaften und Funktionen in weitere Bereiche untergliedert werden. Beginnend mit der Bifurkation der Trachea in die Hauptbronchien verzweigen sich die unteren Atemwege 22-mal bis hin zu den Alveolen. Dabei kann jeder Bereich in einem Generationsabschnitt zugeordnet werden. In der gesamten luftleitenden Zone und in den respiratorischen Bronchiolen liegt ein einschichtiges, mehrreihiges Säulenepithel vor und in den Alveolargängen und Alveolarsäckchen ein einschichtiges Plattenepithel. Das mehrreihige Säulenepithel ist lumenseitig mit Zilien besetzt und wird als respiratorisches Flimmerepithel bezeichnet (grün hinterlegt). Das einschichtige Plattenepithel besitzt dagegen keine Zilien mehr und besteht nur noch aus den charakteristischen Typ-I/II-Pneumozyten. Die Typ-II-Pneumozyten sind für die Produktion des Surfactant in den Alveolargängen und Alveolen verantwortlich. In den restlichen Bereichen erfolgt dagegen eine Produktion von Mukus, die von drei unterschiedlichen Zelltypen übernommen wird (rot hinterlegt). In der Trachea und den Bronchien findet die Produktion von Mukus über die submukösen Drüsenzellen (SMG) und Becherzellen statt, in den luftleitenden Bronchiolen ausschließlich durch die Becherzellen und in den respiratorischen Bronchiolen ausschließlich durch die Club-Zellen. Auf dem Atemwegsepithel befindet sich eine konstante Flüssigkeitsschicht, die im Bereich des respiratorischen Flimmerepithels als Atemwegsflüssigkeit (*airway surface liquid*, ASL) und in den Alveolen als Alveolarflüssigkeit (*alveolar lining fluid*, ALF) bezeichnet wird. Die Atemwege sind von der 0.-15. Generation durchgängig und von der 15.-22. Generation teilweise mit glatter Muskulatur ausgekleidet. In den Alveolen liegt keine Muskulatur mehr vor.

Der Bereich von der Trachea bis zu den respiratorischen Bronchiolen ist mit einem einschichtigem, mehrreihigen, hochprismatischen Säulenepithel ausgekleidet. Dieses Plattenepithel ist lumenseitig von der Trachea bis zum Ende der luftleitenden Bronchiolen und zum Teil noch in den respiratorischen Bronchiolen zu 50-90 % mit Zilien besetzt (Widdicombe und Wine 2015) und wird als respiratorisches Flimmerepithel bezeichnet (**Abb. 1**, grün hinterlegt). Im respiratorischen Flimmerepithel werden sogenannte Mucine, dickflüssige Glykoproteine, die

allgemein als Mukus zusammengefasst werden, von drei Zelltypen sekretiert: 1. submuköse Drüsenzellen (*submucosal gland*, SMG), 2. Becherzellen und 3. Club-Zellen (**Abb. 1**, rot hinterlegt). Die SMG lassen sich nur in den knorpeligen Abschnitten der Atemwege finden, also in der Trachea und den Bronchien (Barnes 1990; Coulson und Fryer 2003). Die Becherzellen kommen neben den SMG auch in der Trachea und den Bronchien vor, sind aber im Abschnitt der luftleitenden Bronchiolen als einzige für die Sekretion von Mukus zuständig. Die Club-Zellen sind allein auftretend in den respiratorischen Bronchiolen für die Sekretion von Mukus verantwortlich (Widdicombe und Wine 2015). Des Weiteren sind die Wände der unteren Atemwege von der Trachea bis zu den luftleitenden Bronchiolen mit glatter Muskulatur ausgekleidet, die in den respiratorischen Bronchiolen und Alveolargängen noch teilweise gefunden werden kann, aber spätestens in den Alveolen zu Gunsten eines effizienten Gasaustausches ganz verschwindet (Amrani und Panettieri 2003; Hollenhorst et al. 2011).

Zwischen dem Atemwegsepithel und den eingeatmeten Gasen befindet sich eine konstante Flüssigkeitsschicht, die in ihrer Dicke von der Trachea (~10 µm) bis zu den Alveolen (~0,1 µm) kontinuierlich abnimmt (Widdicombe und Wine 2015). Diese Flüssigkeitsschicht wird im Bereich des respiratorischen Flimmerepithels als Atemwegsflüssigkeit (*airway surface liquid*, ASL) und in den Alveolen als Alveolarflüssigkeit (*alveolar lining fluid*, ALF) bezeichnet (**Abb. 1**, hell- und dunkelblau hinterlegt) (Pilewski und Frizzell 1999; Carroll et al. 2002; Verkman et al. 2003; Fronius et al. 2012; Widdicombe und Wine 2015). Das respiratorische Flimmerepithel bildet in Kombination mit der ASL einen Abwehrmechanismus, der der Reinigung der Atemwege dient und als mukoziliäre Clearance (von lat.: *mucus* - Schleim und eng. *clearance* – Reinigung) bezeichnet wird (siehe 1.1.3 Mukoziliäre Clearance).

1.1.2 Anatomie der Schweinetrachea

Das Objekt, an dem die Versuche in dieser Arbeit durchgeführt wurden, ist das Trachealepithel des Hausschweins (*Sus scrofa domestica*), weswegen im Folgenden auf den anatomischen Aufbau und die Funktion der Schweinetrachea eingegangen werden soll.

Die Anatomie des Bronchialbaums des Menschen ist der des Schweins sehr ähnlich, einschließlich der Trachea (Monteiro und Smith 2014; Judge et al. 2014; Rogers et al. 2008a). Ein Unterschied liegt jedoch in der Verästelung der Verzweigungen des Bronchialbaums vor, die beim Menschen bipodial und beim Schwein monopodial verläuft (Judge et al. 2014). Die Schweinetrachea besitzt jedoch noch eine weitere anatomische Besonderheit. Bereits vor der Bifurkation in die zwei Hauptbronchien (**Abb. 2A**) erfolgt eine Abzweigung von der Trachea in einen weiteren Bronchus, der oberhalb des rechten oberen Lungenlappens liegt (Monteiro

und Smith 2014; Manjunatha und Gupta 2010). Im Schwein ist diese Morphologie normal und wird als „*pig bronchus*“ bezeichnet. Beim Menschen kommt der *pig bronchus* dagegen als Anomalie mit einer Inzidenz von 0,2 % vor und führt zu Komplikationen während der Atmung (Manjunatha und Gupta 2010; O'Sullivan et al. 1998).

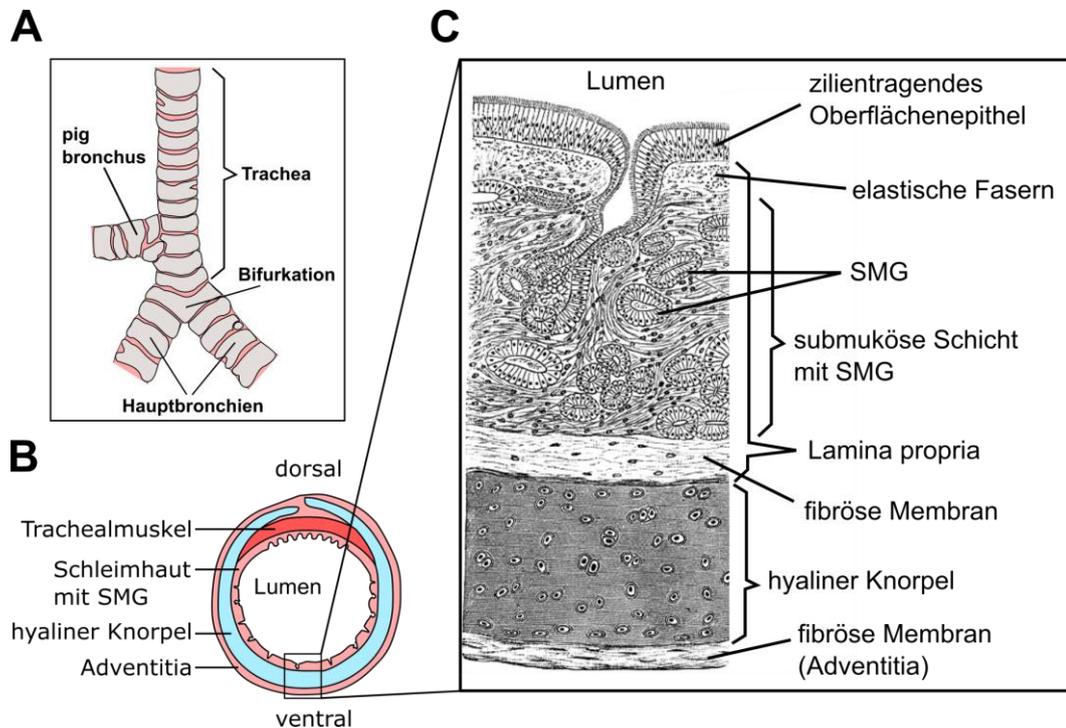


Abb. 2. Anatomie und Aufbau der Schweinetrachea.

A: Schematische Zeichnung einer Schweinetrachea (bis zur Bifurkation in die zwei Hauptbronchien) mit dem für die Spezies Schwein typischen „*pig bronchus*“. Beim *pig bronchus* handelt es sich um eine Abzweigung von der Trachea in einen weiteren Bronchus, die oberhalb der Bifurkation liegt. **B:** Schematische Zeichnung eines Querschnitts durch die Trachea des Schweins. **C:** Vergrößerung aus B: Querschnitt der ventralen Trachealwand. Die Abbildung wurde entnommen aus (Gray und Lewis 1918); Abb. 964¹.

Im Querschnitt ist die Schweinetrachea von innen (Lumen) nach außen aus verschiedenen Schichten aufgebaut (**Abb. 2B&C**). Zuerst kommt das Oberflächenepithel, das aus einem einschichtigen, aber mehrreihigen, hochprismatischen Säulenepithel (ungefähr 20 μm lang und 7 μm breit) besteht und neben den hauptsächlich zilientragenden Epithelzellen auch nicht-zilientragende Epithelzellen, Becherzellen, Neuroendokrine Zellen, Basalzellen und Bürstenzellen enthält (Reid 1960; Jeffery 1983; Reid et al. 2005; Kummer et al. 2008; Krasteva et al. 2011; Gu et al. 2014). Insgesamt kommen bis zu zwölf Typen von Epithelzellen im Oberflä-

¹ Copyright ©: nicht in Copyright seit 1918; Copyright-Region: US

chenepithel vor (Saracino et al. 2013). Alle Zellen des Oberflächenepithels stehen in Kontakt mit der Basallamina, aber nicht alle Zellen erreichen das Lumen. Aus diesem Grund wird das Oberflächenepithel mit dem Zusatz „pseudo-geschichtet“ versehen (Crystal et al. 2008; Puchelle et al. 2006). Unter dem Oberflächenepithel folgt die *Lamina propria*. Innerhalb dieser Gewebeschicht liegen in der sogenannten submukösen Schicht die SMG eingebettet (Widdicombe und Wine 2015). Die SMG bestehen aus vier Kompartimenten: den serösen und den mukösen Zellen der Tubuli, dem Sammelrohr und dem zilientragenden Gang, der seinen Ausgang in das Oberflächenepithel hat (Widdicombe und Wine 2015; Wine und Joo 2004). Jedes Kompartiment hat seine eigenen charakteristischen Eigenschaften für die Produktion und Verarbeitung des Sekrets aus Mukus und Wasser, das die Epitheloberfläche wie ein Schutzfilm überzieht (Rogers 2007). In der *Lamina propria* befinden sich außerdem noch glatte Muskulatur und eine Vielzahl von elastischen Fasern, aber auch Blutgefäße, Lymphgefäße, Nerven und Fibrozyten (ten Hallers et al. 2004). Des Weiteren befinden in der Trachea 32-36 C-förmige hyaline Knorpelringen, die am dorsalen Ende geöffnet und hier mit dem von kranial nach kaudal verlaufenden Trachealmuskel verbunden sind. Die hyalinen Knorpelringe sind unter sich ebenfalls von kranial nach kaudal über starke fibrös-elastische Membranen miteinander verbunden (Krejčí et al. 2013). Dieser Aufbau der Trachea dient dem Schutz vor äußeren Einflüssen und gewährleisten außerdem, dass die Luftwege offen bleiben und beim Einatmen nicht kollabieren (Reznik 1990). Nach außen hin ist die Trachea von einem äußeren Abschlussgewebe aus lockerem Bindegewebe umgeben, der Adventitia. Die Adventitia dient der Verankerung der Trachea im umgebenden Gewebe. Zudem verlaufen in der Adventitia versorgende Blutgefäße und Nerven (ten Hallers et al. 2004).

1.1.3 Mukoziliäre Clearance

Durch die Atmung ist unsere Lunge unweigerlich Umwelteinflüssen ausgesetzt und damit auch inhalierten Partikeln und Pathogenen. Als logische Konsequenz auf die andauernde Gefährdung durch Entzündungen und Infektionen entwickelten unsere Atemwege verschiedene angeborene Abwehrmechanismen (Wanner et al. 1996). Unter diesen Abwehrmechanismen bildet die mukoziliäre Clearance die erste Abwehrlinie und ist deswegen von besonderer Bedeutung für unsere Gesundheit (Munkholm und Mortensen 2014).

Die mukoziliäre Clearance stellt eine Selbstreinigungsfunktion der Lunge dar, mit der sich die Atemwege selbst von inhalierten Partikeln befreien können. Die treibende Kraft der mukoziliären Clearance ist dabei das koordinierte Schlagen der Zilien auf der Epitheloberfläche (**Abb. 3**). Die Zilien sind zu diesem Zweck in einem Flüssigkeitsfilm eingebettet, der dem Epithel

aufliegt und als periziliäre Flüssigkeitsschicht (*periciliary liquid*, PCL) bezeichnet wird (Button et al. 2012). Die PCL besteht aus einem dünnflüssigen Sol und ist mit ca. 5 µm etwas weniger dick als die Zilienlänge von ca. 6 bis 7 µm (Sleigh 1990; Krouse 2001). Auf der PCL „schwimmt“ wiederum eine Mukusschicht, die mit den Spitzen der Zilien in Kontakt stehen sollen (Widdicombe und Wine 2015). Diese ca. 3-5 µm dicke Schicht weist aufgrund der Mucine eine gelartige Struktur auf (Button et al. 2012). Die PCL und die Mukusschicht werden im Bereich des respiratorischen Flimmerepithels allgemein hin als ASL zusammengefasst (Widdicombe und Wine 2015).

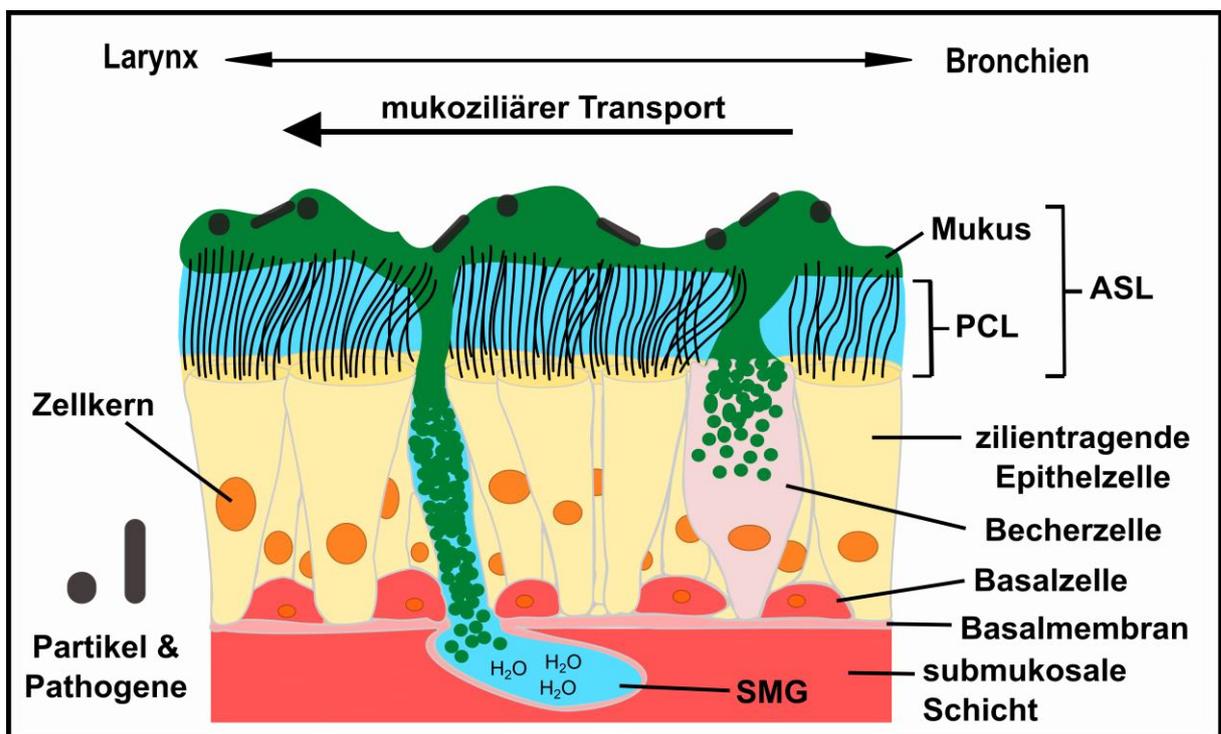


Abb. 3. Mukoziliäre Clearance – angeborener Abwehrmechanismus der Atemwege.

Schematische Darstellung des Trachealepithels. Der Begriff mukoziliäre Clearance beschreibt die Selbstreinigung der Atemwege. Hierzu tragen ein Zusammenspiel von Mukusbildung und der koordinierte Zilienschlag des Epithels wesentlich bei. Die submukösen Drüsenzellen (SMG) sezernieren zusammen mit den Becherzellen den gelartigen Mucus, der sich oberhalb der periziliären Flüssigkeitsschicht (*periciliary liquid*, PCL) verteilt. In dieser Mukusschicht bleiben inhalierte Partikel und Pathogene gefangen. Die PCL besteht dagegen aus einem dünnflüssigen Sol, in dem die Zilien so eingebettet liegen, dass nur noch die Spitzen der Zilien mit dem Mucus in Kontakt stehen. Durch diesen Kontakt wird der koordinierte Zilienschlag auf die Mukusschicht übertragen, so dass es zu einem gerichteten Transport des Mucus in Richtung des Larynx kommt (mukoziliärer Transport). Kleinere Mengen werden verschluckt und gelangen in den Magen, während größere Mengen abgehustet werden. Die Schicht aus PCL und Mucus wird als Atemwegsflüssigkeit (*airway surface liquid*, ASL) zusammengefasst.

Die ASL stellt gegen inhalierte Pathogene die erste Abwehrlinie der Lunge dar und ist ein elementarer Bestandteil der mukoziliären Clearance: 1. werden inhalierte Pathogene im gelartigen Mucus gebunden und erreichen dadurch die Epithelzellen nicht, und 2. werden die im

Mucus gebundenen Pathogene durch den koordinierten Zilienschlag wieder zum Kehlkopf (Larynx) transportiert (mukoziliärer Transport), wo sie letztendlich durch Abschlucken oder Aushusten wieder entfernt werden (Wanner et al. 1996; Munkholm und Mortensen 2014).

Die Effizienz der mukoziliären Clearance wird durch die Regulation des Flüssigkeitsvolumens der ASL bestimmt, die ein problemloses Schlagen der Zilien ermöglicht (Matsui et al. 1998b; Tarran et al. 2001a; Tarran et al. 2001b; Widdicombe und Wine 2015). Bei einer Reduzierung des Flüssigkeitsvolumens der ASL kommt es zu einer krankhaften Ansammlung von dickflüssigem, schlecht hydratisiertem Mucus in den Atemwegen, wodurch der Abtransport der Pathogene durch den gestörten Zilienschlag eingeschränkt wird. Die Folge sind bakterielle Infektionen und chronische Entzündungen der Atemwege (Matsui et al. 1998a; Boucher 2004; Wine 1999; Althaus 2013).

1.1.4 Regulation des ASL-Volumens in der Trachea

Die Regulation des ASL-Volumens in den unteren Atemwegen ist sehr komplex. Sie beinhaltet insgesamt eine Balance zwischen: 1. der glandulären Sekretion von Flüssigkeit und Mucus über die SMG, 2. der Mucus-Freisetzung aus Becherzellen und Club-Zellen und 3. der aktiven Sekretion und Absorption von Flüssigkeit über das Atemwegsoberflächenepithel (Widdicombe und Wine 2015).

In der Trachea sind bis auf die Club-Zellen, die ausschließlich nur in den respiratorischen Bronchiolen vorkommen, alle anderen genannten Zelltypen an der Regulation des ASL-Volumens beteiligt. Die SMG sind in der Trachea mit einer Frequenz von ungefähr 1 mm^{-2} sehr häufig vertreten (Tos 1966; Choi et al. 2000) und sorgen für eine Bereitstellung von viel Flüssigkeit und Mucus (Trout et al. 1998; Joo et al. 2002b). Die SMG sollen in der Trachea und den Bronchien sogar für bis zu 95 % der gesamten Mucus-Produktion verantwortlich sein (Reid 1960). Demnach müssten die Becherzellen für die restliche Mucus-Produktion zuständig sein.

Das Atemwegsoberflächenepithel produziert, im Vergleich zu den SMG und Becherzellen, in der Trachea keinen Mucus, sondern ist an der Regulation des Flüssigkeitsvolumens der ASL beteiligt. Es wird vermutet, dass über das Atemwegsoberflächenepithel die wichtige qualitative Feinregulation des ASL-Volumens stattfindet, die letztendlich die Zusammensetzung und Höhe der ASL maßgeblich bestimmt (Kilburn 1968; Tarran 2004; Martens und Ballard 2010). Diese Feinregulation der ASL über das Atemwegsoberflächenepithel erfolgt durch eine passive Verschiebung von Flüssigkeit über osmotische Triebkräfte, dessen Grundlage der vektorielle Transport von Ionen (Na^+ und Cl^-) durch Ionenkanäle ist. Durch diesen transepithelialen

Ionentransport wird der ASL entweder Flüssigkeit zugeführt oder entzogen (Tarran 2004; Melvin et al. 2005; Lee und Foskett 2014). Die zugrundeliegenden transepithelialen Ionen-transport-Prozesse, die für die Absorption und Sekretion von Flüssigkeit eine bedeutende Rolle spielen, sollen nachfolgend genauer erläutert werden.

1.1.5 Feinregulation des ASL-Volumens durch Ionentransport-Prozesse

Absorption von Flüssigkeit

Die Absorption von Flüssigkeit aus der ASL erfolgt über Na^+ -absorbierende Epithelzellen (**Abb. 4**), die einen Na^+ -Gradienten von der luminalen Seite in Richtung der serosalen Seite aufbauen. Hierbei wird Na^+ passiv durch den luminal lokalisierten epithelialen Na^+ -Kanal (*epithelial Na^+ channel*, ENaC) in die Zelle aufgenommen und dann aktiv (unter Verbrauch von Energie in Form von ATP) durch die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase auf die basolaterale Seite transportiert. Die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase bildet somit die Triebkraft für den vektoriellen Na^+ -Transport (Vinciguerra et al. 2003; Frizzell und Hanrahan 2012). Der basolaterale Transport von Na^+ kann aber auch alternativ über den ebenfalls serosal liegenden Na^+/H^+ -Austauscher erfolgen (*Na^+/H^+ exchanger*, NHE) (Paradiso 1992; Melvin et al. 2005; Hollenhorst et al. 2011). Die Absorption von Na^+ führt dazu, dass das Gegen-Ion Cl^- zur Aufrechterhaltung der Elektroneutralität (NaCl) ebenfalls auf die serosale Seite strömt (die daran beteiligten Transport-Prozesse sind aber noch nicht ganz aufgeklärt). Letztendlich bewirken die entstehenden osmotischen Kräfte von NaCl dann die Absorption von Flüssigkeit über das Atemwegsepithel von der apikalen auf die basolaterale Seite, wodurch das Volumen der ASL reduziert wird.

Sekretion von Flüssigkeit

Die Sekretion von Flüssigkeit in die ASL geschieht dagegen über die Cl^- -sekretierenden Epithelzellen (**Abb. 4**), die als Schlüsselfaktor für eine Cl^- -Sekretion eine sehr hohe intrazelluläre Cl^- -Konzentration aufweisen (Jang und Oh 2014). In den meisten Nicht-Epithelzellen ist die Konzentration von intrazellulärem Cl^- nämlich sehr nah am elektrochemischen Gleichgewicht. Dagegen ist die intrazelluläre Cl^- -Konzentration in den Cl^- -sekretierenden Epithelzellen, aufgrund des in der basolateralen Membran lokalisierten $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$ -Cotransporters 1 (NKCC1), fünfmal so hoch (Begenisich und Melvin 1998; Melvin et al. 2005; Frizzell und Hanrahan 2012). Der zuvor erläuterte Na^+ -Gradient, der über die Na^+ -absorbierenden Epithelzellen aufgebaut wird, soll dabei die Triebkraft für die Cl^- -Aufnahme über den NKCC1 sein. Ein Efflux von Cl^- in das Lumen kann letztendlich aber nur stattfinden, wenn eine vorherige

Aktivierung von apikalen Cl^- -Kanälen stimuliert wird (Begenisich und Melvin 1998; Melvin et al. 2005; Frizzell und Hanrahan 2012). Für diesen Efflux von Cl^- sind hauptsächlich zwei Typen von Cl^- -Kanälen in der apikalen Membran verantwortlich: Zum einen der cAMP-regulierte CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) und zum anderen Ca^{2+} -aktivierte Cl^- -Kanäle (*Ca^{2+} -activated chloride channels*, CaCC), wie Vertreter aus der TMEM16-Kanalfamilie (Galiotta 2009; Hollenhorst et al. 2011; Frizzell und Hanrahan 2012). Findet eine Cl^- -Sekretion über diese zwei Cl^- -Kanäle statt, verursacht dies wiederum eine elektrische Triebkraft (lumennegativ) für eine transepitheliale Na^+ -Sekretion über den parazellulären Weg in das Lumen. Die gemeinsame Akkumulation von NaCl auf der luminalen Seite generiert daraufhin die osmotische Triebkraft für den Wasserfluss auf die apikale Seite. Auf diese Weise entsteht auf der apikalen Seite ein isotonisches Sekretionsprodukt, dass für eine Erhöhung des ASL-Volumens benötigt wird (Boucher 2004; Frizzell und Hanrahan 2012). Findet nach einer Aktivierung der Cl^- -Kanäle eine Sekretion von Cl^- in das Lumen statt, muss diese Entladung jedoch innerhalb der Zelle elektrisch neutralisiert werden. Dies geschieht bei einer Cl^- -Sekretion zeitgleich über den Efflux von K^+ über verschiedene basolateral lokalisierte Ca^{2+} - und/oder cAMP-aktivierte K^+ -Kanäle (Frizzell und Hanrahan 2012). Die Aktivierung von K^+ -Leitfähigkeiten in der basolateralen Membran führt außerdem zu einer Hyperpolarisation der Zelle, die die Triebkraft für eine luminalen Cl^- -Sekretion weiter erhöht (Warth et al. 1999; Frizzell und Hanrahan 2012). Die apikale Cl^- -Leitfähigkeit ist somit mit einer basolateralen K^+ -Leitfähigkeit verbunden (**Abb. 4**).

Zusammenfassend bildet die Akkumulation von NaCl im Lumen der Atemwege die Grundlage für eine luminalen Flüssigkeitssekretion, da sie einen transepithelialen osmotischen Gradienten von der basolateralen Seite ins Lumen entstehen lässt, wodurch Flüssigkeit nachgezogen wird. Dabei spielen die Cl^- -Leitfähigkeit in der apikalen Membran und die K^+ -Leitfähigkeit in der basolateralen Membran eine aktive Rolle für die Sekretion. Eine Flüssigkeitsabsorption auf die basolaterale Seite wird dagegen durch die basolaterale Akkumulation von NaCl bedingt, dessen Grundlage eine transepitheliale Na^+ -Absorption ist. Die transepithelialen Ionentransport-Prozesse über das Atemwegsoberflächenepithel sind somit für die Modulation des ASL-Volumens und letztendlich auch für die Effizienz der mukoziliären Clearance ausschlaggebend.

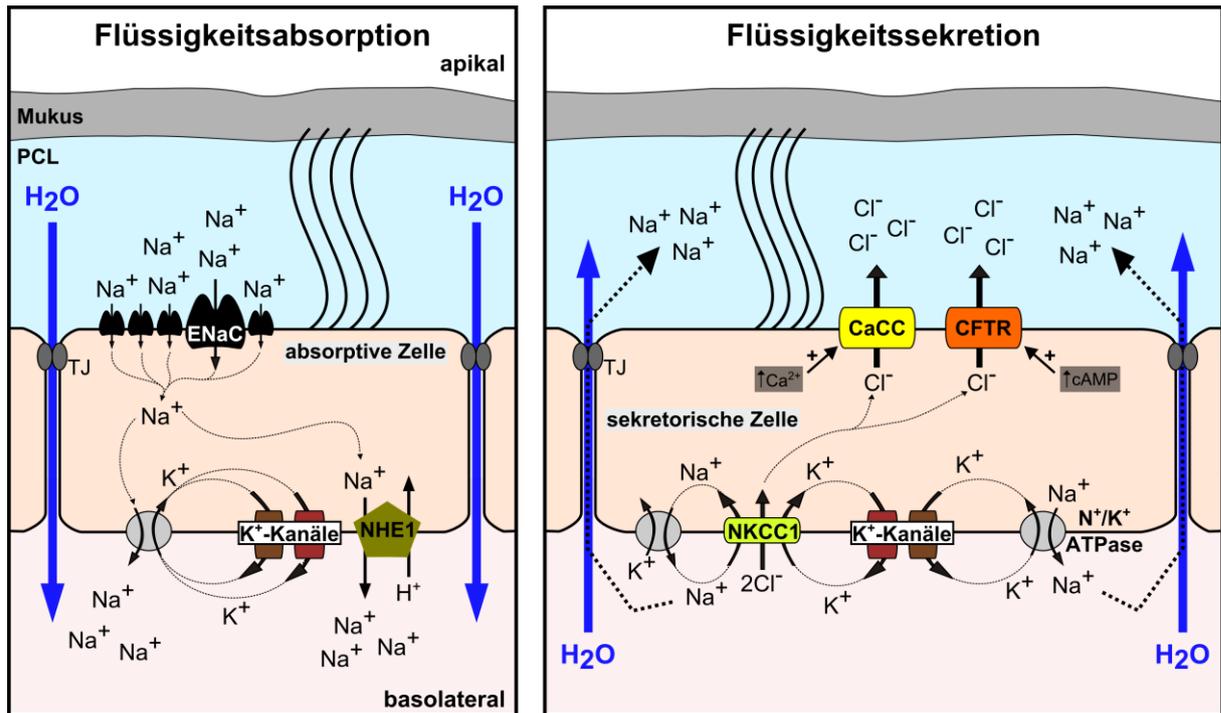


Abb. 4. Absorption und Sekretion von Flüssigkeit durch Ionentransport-Prozesse.

Schematische Darstellung der Ionen- und Flüssigkeitsregulation über Na⁺-absorbierende und Cl⁻-sekretierende Zellen des Atemwegsoberflächenepithels. **Flüssigkeitsabsorption:** Na⁺-absorbierende Zellen bauen mit Hilfe des luminal lokalisierten ENaC, der serosal lokalisierten Na⁺/K⁺-ATPase und des ebenfalls serosal liegenden NHE einen Na⁺-Gradienten in die basolaterale Richtung auf. Der basolateral gerichtete Na⁺-Gradient ist dafür verantwortlich, dass das Gegen-Ion Cl⁻ zur Aufrechterhaltung der Elektroneutralität (NaCl) ebenfalls auf die serosale Seite strömt. Die osmotische Triebkraft der basolateralen NaCl-Akkumulation sorgt dann auf osmotischem Weg dafür, dass Wasser auf die basolaterale Seite nachgezogen wird. **Flüssigkeitssekretion:** In den Cl⁻-sekretierenden Zellen basiert die Flüssigkeitssekretion auf dem primären Eintritt von Cl⁻ in das Zellinnere durch den basolateral lokalisierten NKCC1 und die Na⁺/K⁺-ATPase. Dabei stellt der basolateral gerichtete Na⁺-Gradient (aufgebaut durch die Na⁺-absorbierenden Zellen) die Triebkraft für die Cl⁻-Aufnahme dar. Der anschließende Efflux von Cl⁻ über die apikale Membran erfolgt durch den cAMP-aktivierten CFTR und/oder Ca²⁺-aktivierte CaCC. Angetrieben durch die elektrogene Cl⁻-Sekretion (lumenegative Spannung) erfolgt der größte Teil des transepithelialen Na⁺-Flusses in das Lumen passiv über den parazellulären Weg. Die osmotische Triebkraft der apikalen NaCl-Akkumulation sorgt dann dafür, dass Wasser in das Lumen nachgezogen wird. CFTR: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*; CaCC: *Ca²⁺-activated chloride channel*; NHE: *Na⁺/H⁺-Austauscher*; NKCC1: *Na⁺/K⁺/2 Cl⁻ Cotransporter 1*; ENaC: *epithelial Na⁺ channel*; TJ: *Tight Junctions*.

1.1.6 Mukoziliäre Clearance und zystische Fibrose

Bei schweren Lungenerkrankungen wie der zystischen Fibrose (englisch: *cystic fibrosis*, CF) wird die Bedeutung der Cl⁻-Sekretion für die mukoziliäre Clearance deutlich. CF (auch Mukoviszidose genannt) ist die am häufigsten vorkommende, rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung innerhalb der kaukasischen Bevölkerung (Li und Naren 2010; Lubamba et al. 2012). Die Ursache für CF liegt in einer Mutation im Gen des CFTR Cl⁻-Kanals, wodurch der Cl⁻-Transport gestört ist und eine Dehydratation der Körpersekrete entsteht (Riordan et al. 1989; Wine 1999). CF gilt als eine Multiorganerkrankung, da das CFTR-Protein in vielen

Epithelien exprimiert wird. Der pulmonale Krankheitsverlauf ist jedoch die Hauptursache für die Morbidität und Mortalität bei CF (Lubamba et al. 2012).

Im Atemwegsepithel von CF-Patienten wird je nach Schwere der genetischen Störung kein funktioneller oder ein nur gering funktionsfähiger CFTR Cl^- -Kanal ausgebildet, wodurch letztendlich die Cl^- -Sekretion ins Lumen gestört ist (Wine 1999). Als Konsequenz liegt dann eine Verminderung der Cl^- -Sekretion vor (**Abb. 5**). In Folge dessen kommt es zu einer Reduzierung des ASL-Volumens, die einen ineffizienten Transport von Mukus bedingt und zu einer chronischen Akkumulation von Mukus in den Atemwegen führt (Guggino 2001; Knowles und Boucher 2002). Dadurch wird die mukoziliäre Clearance letztendlich nachhaltig so gestört, dass Pathogene aus den Atemwegen nicht mehr effektiv entfernt werden. CF-Patienten leiden daher an schweren, immer wiederkehrenden Infektionen der Atemwege (Robinson et al. 2000; Knowles und Boucher 2002; Sagel et al. 2011). Eine Störung der mukoziliären Clearance wurde aber auch bei anderen schweren Lungenerkrankungen, wie Asthma und chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) beobachtet (Smaldone et al. 1993; Bhowmik et al. 2009).

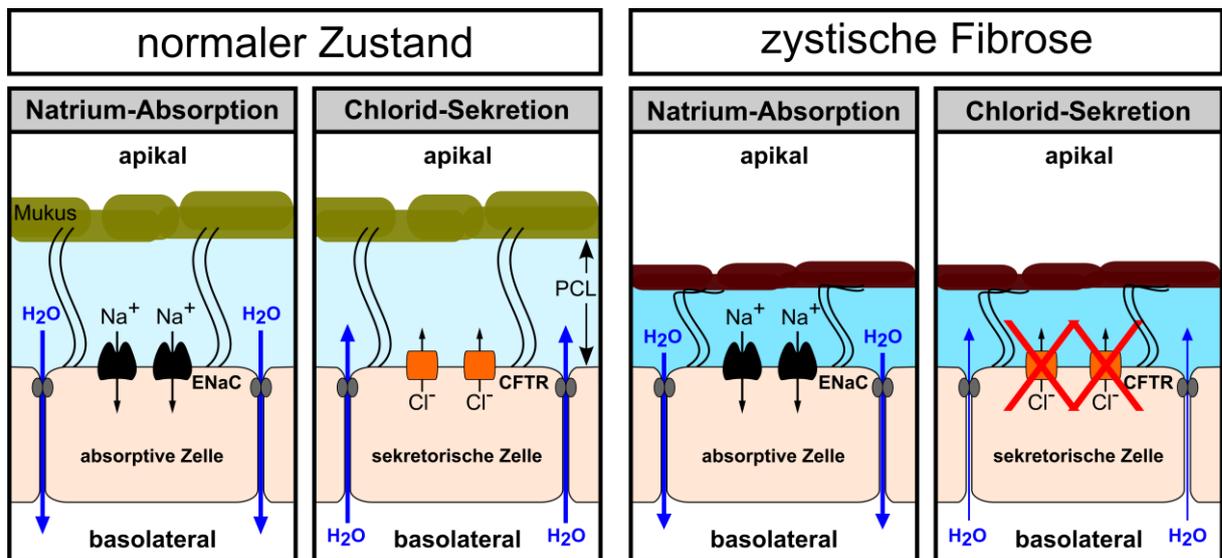


Abb. 5. Mukoziliäre Clearance und zystische Fibrose.

In der gesunden Lunge (linke Abbildung) sorgt ein Gleichgewicht von Na^+ -Absorption und Cl^- -Sekretion für eine korrekte Hydratisierung der periziliären Flüssigkeit und damit für eine effiziente mukoziliäre Clearance. Bei der zystischen Fibrose (rechte Abbildung) liegt in der apikalen Membran, aufgrund einer genetischen Störung, kein funktioneller CFTR Cl^- -Kanal mehr vor. Als Folge ist die Cl^- -Sekretion in das Lumen gestört. Gleichzeitig bleibt die Na^+ -Absorption über den ENaC unverändert. Als Konsequenz kommt es zu einer Reduzierung des PCL-Volumens, wodurch ein Abtransport des Mukus durch die Zilien nicht mehr gewährleistet wird. Dies führt zu einer ineffizienten mukoziliären Clearance und zu einer chronischen Akkumulation von zähflüssigem Mukus in den Atemwegen. CFTR: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*; ENaC: *epithelial Na^+ channel*; PCL: *periciliary liquid*

1.2 Flüssigkeitsregulation in den Atemwegen durch Acetylcholin

Acetylcholin (ACh) gilt als klassischer Überträgerstoff (Neurotransmitter) im zentralen (ZNS) und peripheren Nervensystem (PNS). ACh ist an der Signalübertragung bei allen präganglionären und parasympathischen Nervenfasern sowie einigen sympathischen postganglionären Nervenfasern des vegetativen Nervensystems beteiligt. Zudem ist ACh allgemein für die Signalübertragung an der motorischen Endplatte im somatischen Nervensystem verantwortlich (Macintosh 1941).

In den Atemwegen wird ACh von den respiratorischen parasympathischen Nervenfasern produziert und entlassen (Bergner und Sanderson 2002) und ist hauptsächlich an der Regulation der Atemwegfunktionen beteiligt: im Besonderen für eine starke Verengung der Atemwege (Bronchokonstriktion) und als wichtigster Stimulator für eine Mukus- und Flüssigkeitssekretion (Coulson und Fryer 2003; Kummer et al. 2008).

In den letzten Jahren tauchten vermehrt Hinweise auf, dass auch non-neuronale Zellen der Atemwege, wie die Epithelzellen, in der Lage sind, ACh zu produzieren und auch zu sekretieren (Wessler und Kirkpatrick 2001; Proskocil et al. 2004). Im Einklang damit steht die Identifizierung verschiedener Untereinheiten von muskarinergen und nikotinergen ACh-Rezeptoren im Oberflächenepithel der Atemwege (Maus et al. 1998; Wessler und Kirkpatrick 2008; Kummer et al. 2008; Klein et al. 2009). Für die Funktion von non-neuronalem ACh wird vermutet, dass es als ein autokrines und/oder parakrines Signalmolekül wirken kann (Proskocil et al. 2004; Wessler und Kirkpatrick 2008). Dementsprechend koexistieren in den Atemwegen zwei cholinerge (ACh-) Systeme: Die Entlassung von ACh aus cholinergen parasympathischen Nervenendigungen und die daraus resultierenden Effekte werden unter der Bezeichnung neuronal cholinerges System (NCS) zusammengefasst und die Entlassung von ACh aus non-neuronalen Zellen und die daraus resultierenden Effekte als non-neuronal cholinerges System (NNCS). Das ACh aus neuronalen Quellen wird deswegen passend als neuronales ACh (NACH) und das ACh aus non-neuronalen Quellen folglich als non-neuronales ACh (NNACH) bezeichnet.

1.2.1 ACh-Metabolismus des NCS und NNCS

Im Zytoplasma des Neurons (**Abb. 6**, NCS) wird ACh hauptsächlich durch das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT) aus Cholin und Acetyl-CoA (aus den Mitochondrien) synthetisiert (Wessler und Kirkpatrick 2008). In den Nervenendigungen wird das synthetisierte ACh dann über einen vesikulären ACh-Transporter (VACHT) in Vesikeln gespeichert, die dann auf ei-

nen Trigger hin in den synaptischen Spalt entlassen werden. An der Postsynapse kann ACh dann an zwei Typen von Rezeptoren binden, die entsprechend ihrer Ansprechbarkeit auf Nikotin bzw. Muskarin als nikotinerge und muskarinerge Rezeptoren bezeichnet werden (Barnes 1990; Coulson und Fryer 2003; Wess et al. 2007). Die Wirkung von ACh wird im synaptischen Spalt sehr schnell durch seine enzymatische Spaltung mit Hilfe des membrangebundenen Enzyms Acetylcholinesterase (AChE) beendet. ACh wird dabei in Cholin und Acetat gespalten. Das Cholin kann wieder über Transporter (*high-affinity choline transporter*, CHT) in die Nervenzelle aufgenommen werden und steht damit zur ACh-Synthese wieder zur Verfügung (Kummer et al. 2008).

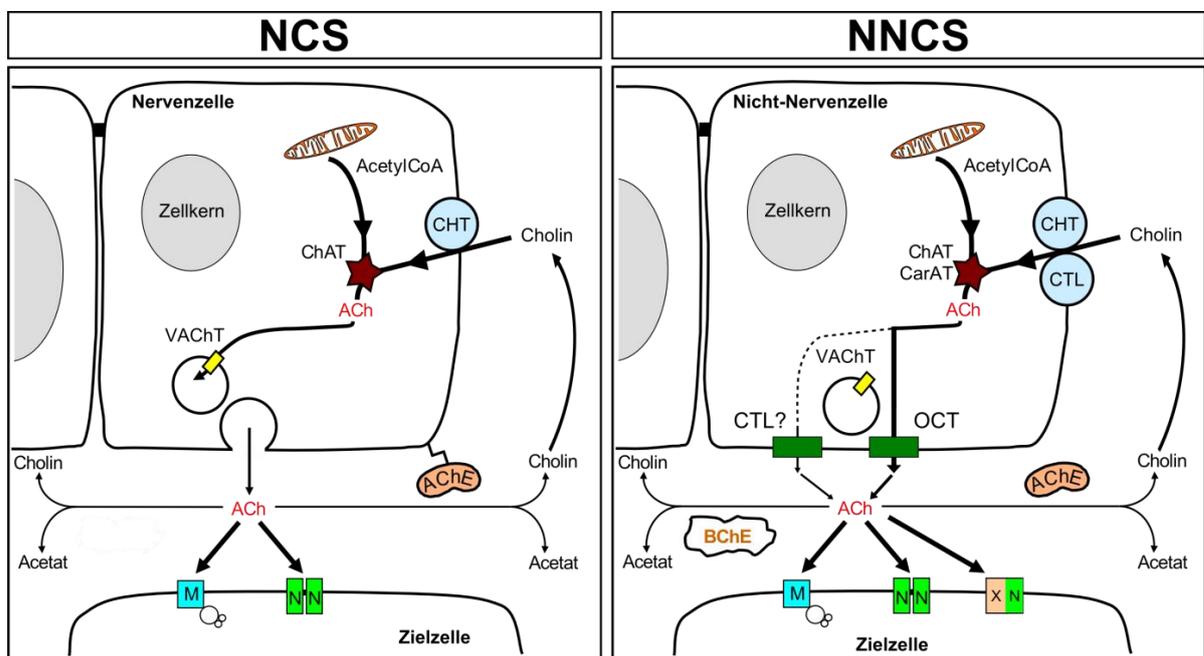


Abb. 6. Der Metabolismus-Kreislauf von ACh im NCS und NNCS.

Die Synthese, Entlassung, Wirkung und Degradation von ACh im neuronal cholinergen System (NCS) und im non-neuronal cholinergen System (NNCS). Genaue Beschreibungen finden sich im Text. Die Abbildung wurde verändert nach Kummer und Krasteva-Christ 2014.

ACh, Acetylcholin; AChE, Acetylcholinesterase (in non-neuronalen Zellen ist die AChE nicht mit der Zellmembran verankert); BChE, Butyrylcholinesterase; CarAT, Carnitin-Acetyltransferase (soll ACh in einigen non-neuronalen Zellen synthetisieren); ChAT, Cholin-Acetyltransferase; CHT, Cholintransporter; CTL, Cholin-Transporter-ähnliche Proteine; M, muskarinerges Acetylcholin-Rezeptor; N, nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor; OCT, organischer Kationen-Transporter; VAcHT, vesikulärer Acetylcholin-Rezeptor (wurde in einigen non-neuronalen Zellen ebenfalls nachgewiesen); X: Untereinheit eines atypischen nAChR.

Für non-neuronale Zellen (**Abb. 6, NNCS**), wie die Epithelzellen der Atemwege, konnte ein vollständig eigener ACh-Metabolismus (Synthese, Entlassung, Wirkung und Degradation) beschrieben werden (Kummer et al. 2008; Kummer und Krasteva-Christ 2014), der viele Gemeinsamkeiten, aber auch einige Unterschiede zum NCS aufweist. Zu den Gemeinsamkeiten

gehören u. a. die Wiederaufnahme von Cholin, die Synthese von ACh inklusive der Speicherung in Vesikeln und die Freisetzung von ACh und die Stimulation von zellulären Effekten durch nikotinerge und muskarinerge Rezeptoren (Kummer et al. 2008; Kummer und Krasteva-Christ 2014). Zu den Unterschieden zählen, dass die Wiederaufnahme von Cholin auch über Cholintransporter-ähnliche Proteine (CTL) realisiert werden kann (Traiffort et al. 2005; Traiffort et al. 2013), dass die Synthese von ACh alternative über die Carnitin-Acetyltransferase (CarAT) möglich ist (Wolf-Johnston et al. 2012; Bader et al. 2014), dass ACh allgemein nicht vesikulär, sondern direkt aus dem Zytoplasma durch die Membran über Organische Kationen-Transporter (OCT) und womöglich auch durch CTL freigesetzt werden kann (Wessler et al. 2001) und dass die Degradation von ACh auch durch die weniger spezifische Butyrylcholinesterase (BChE) erfolgen kann (Darvesh et al. 2003). Eine weitere Gemeinsamkeit beider cholinergen Systeme ist, dass sich die identifizierten nikotinergeren und muskarinergeren Rezeptoren in ihrer Zusammensetzung (Aufbau der Untereinheiten) im Grunde nicht voneinander unterscheiden (Eglen 2006).

Die nikotinergeren ACh-Rezeptoren (nAChR) sind ionotrope Rezeptoren, d.h. sie fungieren selbst als Ionenkanäle, die sich nach einer Bindung von ACh öffnen und zu einer Erhöhung der Durchgängigkeit für positiv geladene Ionen (Na^+ , Ca^{2+} und K^+) führen (siehe **Abb. 7**, links). Sie sind Pentamere, die aus einer homomeren oder heteromeren Kombination von 12 verschiedenen Untereinheiten ($\alpha 2-10$, $\beta 2-4$) aufgebaut sind und eine Vielzahl von verschiedenen Rezeptor-Isoformen bilden können (Albuquerque et al. 2009). Neben den ionotropen nAChR wurden im NNCS aber auch Effekte beobachtet, die auf die Existenz von nAChR mit metabotropen Eigenschaften schließen lassen (Hollenhorst et al. 2012b). Diese metabotrop wirkenden nAChR werden daher als atypische nAChR bezeichnet (siehe **Abb. 6**, NNCS).

Die muskarinergeren ACh-Rezeptoren (mAChR) sind 7-Transmembran G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G protein-coupled receptor*, GPCR) mit metabotroper Wirkungsweise, d.h. nach einer Aktivierung durch ACh stimuliert das am mAChR-gekoppelte intrazellulär liegende G-Protein die Produktion von *Second Messenger* (cAMP, IP_3 , Ca^{2+}), die weitere intrazelluläre Signalwege auslösen (siehe **Abb. 7**, rechts). Insgesamt existieren fünf Subtypen von mAChR, die basierend auf der Reihenfolge ihrer Identifizierung und der Nomenklatur von Caulfield und Birdsall als M1AChR bis M5AChR bezeichnet werden (Caulfield und Birdsall 1998). Der M2- und der M4AChR sind an ein G-Protein der Familie $G_{i/o}$ (G_{α_i} oder G_{α_o}) gekoppelt und lösen generell inhibierende Effekte aus. Diese inhibierenden Effekte werden durch eine Reduzierung des cAMP-Spiegels in der Zelle (Inhibition von Adenylylcyclasen), eine Inhibition spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle oder durch eine Erhöhung des Efflux von K^+ erreicht.

Die M1-, M3- und M5AChR sind dagegen an ein G-Protein der Familie G_q (G_{α_q} oder $G_{\alpha_{11}}$) gekoppelt und erhöhen intrazellulär die IP_3 - und Ca^{2+} -Konzentration über eine Stimulation der Phospholipase C_β (Wess 1996; Lanzafame et al. 2003; Eglén 2005). ACh wirkt demnach über die M1-, M3- und M5AChR als ein Ca^{2+} erhöhender Agonist, was oft stimulierende Effekte nach sich zieht.

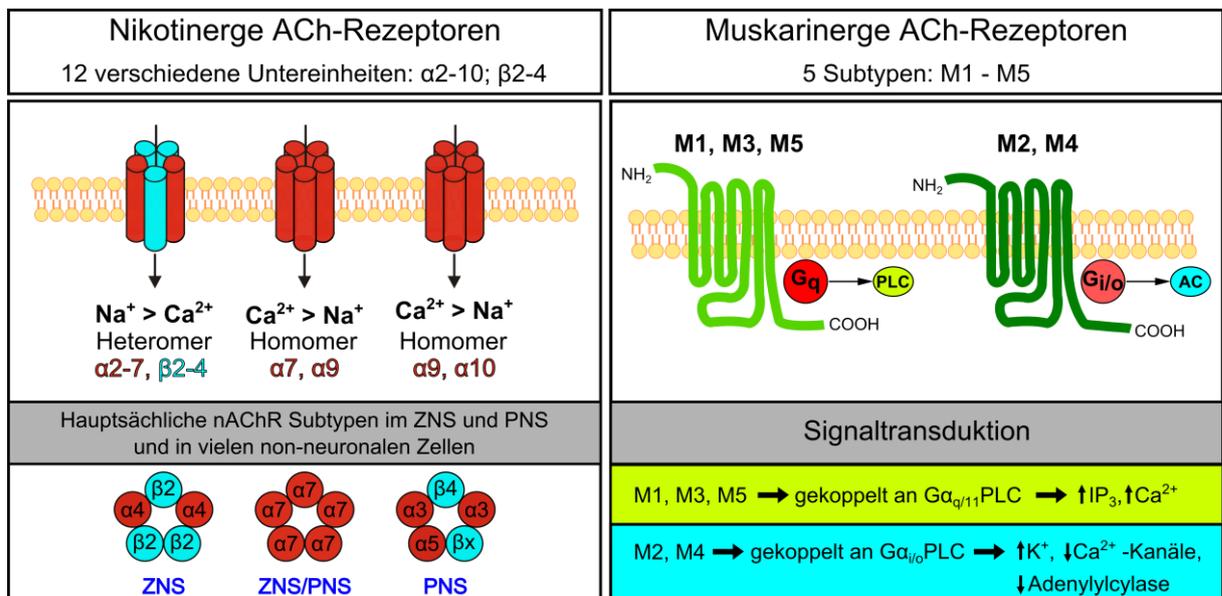


Abb. 7. Aufbau und Struktur der nikotinerger und muskarinerger ACh-Rezeptoren.

Die nikotinergeren ACh-Rezeptoren (links) bilden membranständige Pentamere, die aus insgesamt 12 verschiedenen Untereinheiten ($\alpha 2-10$, $\beta 2-4$) aufgebaut sind. Sie sind ionotrop und erlauben nach einer Aktivierung durch ACh einer Erhöhung der Durchgängigkeit für positiv geladene Ionen (Na^+ , Ca^{2+} und K^+) in die Zelle. Die muskarinergeren ACh-Rezeptoren (rechts) sind 7-Transmembran Rezeptoren, die ihre Wirkung über intrazellulär gekoppelte G-Protein-Familien ausüben. Insgesamt existieren 5 Subtypen: M1- M5 AChR. Der M2- und der M4-Rezeptor sind an ein G-Protein der Familie $G_{i/o}$ (G_{α_i} oder G_{α_o}) gekoppelt und lösen generell inhibierende Effekte aus (Inhibition von Adenylylcyclasen und Ca^{2+} -Kanälen, Stimulation von K^+ -Kanälen). Die M1-, M3- und M5AChR sind dagegen an ein G-Protein der Familie G_q (G_{α_q} oder $G_{\alpha_{11}}$) gekoppelt und erhöhen intrazellulär die IP_3 - und Ca^{2+} -Konzentration. PLC: Phospholipase; AC: Adenylylcyclasen; PNS: Peripheres Nervensystem; ZNS: Zentrales Nervensystem.

In den Atemwegen reguliert ACh, unabhängig von seiner Herkunft (neuronal und/oder non-neuronal), über eine hauptsächlichliche Stimulation des M3AChR eine Sekretion von Flüssigkeit und Mukus (Coulson und Fryer 2003; Buels und Fryer 2011; Alagha et al. 2014). Die durch den M3AChR eingeleitete Signaltransduktion ist dafür von zentraler Bedeutung und soll im Folgenden genauer erläutert werden.

Wie oben schon erwähnt, handelt es sich beim dem G-Protein des M3AChR Rezeptors um die Subfamilie der G_q -Protein. Diese bewirken eine Stimulation des PLC_β/IP_3 -Signalwegs (siehe auch **Abb. 8**), der der vorherrschende Signalweg für eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ist (Billington und Penn 2002). In diesem Signalweg spaltet die Phospholipase

C_{β} (PLC_{β}) das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP_3). DAG bleibt an der Plasmamembran gebunden und agiert selbst als *Second Messenger*, um z. B. den Proteinkinase C (PKC)-Signalweg zu aktivieren, der die Phosphorylierung von Membrankanälen und anderen Proteinen bewirkt. IP_3 hat dagegen eine wasserlösliche Struktur und wird in das Zytoplasma entlassen. IP_3 diffundiert zu IP_3 -Rezeptoren (IP_3R), die auf der Oberfläche des ER und anderen intrazellulären Ca^{2+} -Speichern liegen. Die IP_3R sind Ionenkanäle (ionotrop) und spezifisch für den Durchlass von Ca^{2+} -Ionen. Die Aktivierung der IP_3R durch IP_3 verursacht daher eine schnelle Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration werden unter anderem Ca^{2+} -abhängige Ionenkanäle in der Plasmamembran reguliert, wie Ca^{2+} -abhängige Cl^- und K^+ -Kanäle. Sowohl IP_3 als auch DAG wirken nur kurzzeitig, werden in einem komplexen Zyklus metabolisiert und zur Synthese von PIP_2 wieder verwendet (Kan et al. 2014; Bjarnadóttir et al. 2006; Fredriksson et al. 2003; Pierce et al. 2002).

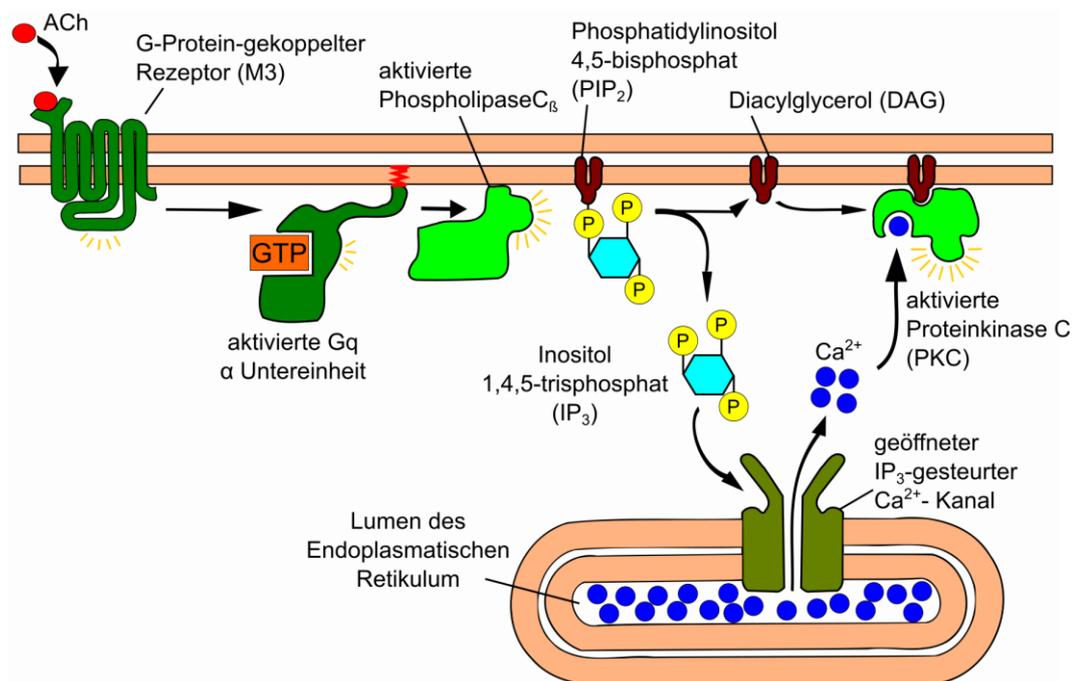


Abb. 8. PLC_{β}/IP_3 -Signalweg für luminal appliziertes ACh.

ACh bindet an der luminalen Membranseite an den M3AChR Rezeptor. Dies führt zur Aktivierung α Untereinheit der G_q und zu einer Stimulierung der intrazellulär, membrangebundenen Phospholipase C_{β} (PLC_{β}). Die PLC_{β} wiederum spaltet ein Phospholipid (Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP_2)) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP_3). DAG verbleibt an der Plasmamembran und agiert als *Second Messenger*. IP_3 wird ins Zytoplasma entlassen und bindet an IP_3 Rezeptoren an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Die IP_3 Rezeptoren sind selektiv für Ca^{2+} , das in großen Mengen im ER vorliegt. Die Aktivierung der IP_3 Rezeptoren führt daher zu einem Ausstrom von Ca^{2+} aus dem ER, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration zunimmt. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung von Ca^{2+} -sensitiven Ionenkanälen wie Ca^{2+} -sensitive K^+ Kanäle in der basolateralen Membran oder Ca^{2+} sensitive Cl^- Kanäle in der apikalen Membran.

1.2.2 ACh und die Regulation des Ionentransports

Wie bereits erwähnt (siehe 1.2 Flüssigkeitsregulation in den Atemwegen durch Acetylcholin), stellt NACH einen der stärksten Stimulatoren für eine Mukus- und Flüssigkeitssekretion in den Atemwegen dar (Coulson und Fryer 2003; Kummer et al. 2008). Das aus den Nerven freigesetzte NACH aktiviert dabei post-junktionale mAChR, die in der basolateralen Membran der SMG lokalisiert sind (Kunzelmann et al. 2002; Maus et al. 1998). So führt die Aktivierung des M1- und M3AChR durch NACH zu einer SMG-abhängigen Sekretion von Flüssigkeit und Mukus in den knorpeligen Abschnitten des Atemwegsepithels (Barnes 1990; Coulson und Fryer 2003). Diese neuronal cholinerge Regulation der glandulären Flüssigkeitssekretion konnte in den knorpeligen Abschnitten des Atemwegsepithels, u. a. der Trachea, sowohl bei Katzen, Schweinen, Schafen und Mäusen als auch beim Menschen beobachtet werden (Quinton 1979; Acevedo 1994; Ballard et al. 1999; Joo et al. 2002b; Ianowski et al. 2007; Lee und Foskett 2010a, 2010b). Weiterhin konnte in diesen Arbeiten gezeigt werden, dass die SMG-abhängige Flüssigkeitssekretion auf einer Aktivierung einer transepithelialen Cl^- -Sekretion über den CFTR basiert. Bestätigt wurde dies in CF-Atemwegen, in denen durch eine Stimulation mit cAMP-erhöhenden Agonisten – die eine CFTR-abhängige Cl^- -Sekretion aktivieren – fast keine SMG-abhängige Flüssigkeitssekretion mehr beobachtet werden konnte (Joo et al. 2002a; Salinas et al. 2005). Demnach ist für eine Flüssigkeitssekretion in den Atemwegen eine ACh-induzierte Cl^- -Sekretion über den cAMP-regulierten CFTR von zentraler Bedeutung. Jedoch wurde in CF-Atemwegen ebenfalls festgestellt, dass durch cholinerge Agonisten – die eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirken – eine CFTR-unabhängige Flüssigkeitssekretion durch die SMG erzeugt werden kann (Joo et al. 2002a; Ianowski et al. 2007; Lee und Foskett 2010a, 2010b). Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass die Cl^- -Sekretion alternativ auch über die Aktivität von CaCC stattfinden kann, und nicht ausschließlich über eine Beteiligung des CFTR erfolgen muss. Ein besseres Verständnis der Mechanismen der Stimulation einer CFTR-unabhängigen Flüssigkeitssekretion durch cholinerge Agonisten könnte daher eine große therapeutische Bedeutung für eine Verbesserung der mukoziliären Clearance bei CF-Patienten haben.

Die Beobachtung, dass ACh aus neuronalen Quellen eine Cl^- - bzw. Flüssigkeitssekretion in den SMG stimuliert, legt zudem die Vermutung nahe, dass NNACH – als ein autokriner und/oder parakriner Mediator – in der Lage ist, eine transepitheliale Cl^- - bzw. Flüssigkeitssekretion über die in der apikalen Membran der Epithelzellen identifizierten n/mAChR zu stimulieren (Trout et al. 1998; Hollenhorst et al. 2012c). Es besteht sogar die Annahme,

dass NNACH als ein luminal sekretionsförderndes Signalmolekül agieren könnte, so wie es bei extrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) oder Uridintriphosphat (UTP) der Fall ist (Klapproth et al. 1997; Proskocil et al. 2004). Für epithelial produziertes NNACH wurde gezeigt, dass es in ausreichenden Mengen im Flüssigkeitsfilm der Atemwege nachgewiesen werden kann (Hollenhorst et al. 2012c) und in die Regulation des Ionen- und Wassertransports und der mukoziliären Clearance involviert ist (Wessler und Kirkpatrick 2008; Hollenhorst et al. 2012c; Kummer und Krasteva-Christ 2014; Grando et al. 2015). Dabei wird vermutet, dass der Flüssigkeitsfilm in den Atemwegen, der durch den Zilienschlag weitergetragen wird, als ein Transportmittel für das NNACH dient (Kummer und Krasteva-Christ 2014). Die Arbeitsgruppe Fronius war zudem in der Lage, durch eine luminale ACh-Applikation einen neuen Mechanismus für eine Cl^- -Sekretion über Ca^{2+} -abhängige Cl^- - und K^+ -Kanäle zu beschreiben, die hauptsächlich über eine Aktivierung des M3AChR induziert wird (Hollenhorst et al. 2012c). Des Weiteren konnte in einer weiteren Studie derselben Arbeitsgruppe erstmals eine funktionelle Aktivität von nAChR in der apikalen Membran der Epithelzellen nachgewiesen werden, einschließlich der möglichen Existenz atypischer nAChR (Hollenhorst et al. 2012b).

Die Entdeckung des NNCS in den Atemwegsepithelzellen mit dem gesamten ACh-Metabolismus (ACh-Produktion, -Entlassung, -Wirkung und -Degradierung) könnte daher auch eine neue therapeutische Funktion des cholinergen Systems für viele Atemwegserkrankungen eröffnen, indem das NNCS unabhängig von einer neuronalen Regulation angesteuert wird (Kummer et al. 2008; Kummer und Krasteva-Christ 2014). Die Rolle des NNCS in den Atemwegen hinsichtlich einer Regulation des Ionentransports ist aber noch unzureichend erforscht.

1.3 Ziel der Arbeit und Vorgehensweise

Ionentransport-Prozesse über das Atemwegsepithel, besonders eine Cl^- -Sekretion, sind für die Regulation des Flüssigkeitsvolumens der ASL und für eine effektive mukoziliäre Clearance verantwortlich. Die zugrundeliegenden homöostatischen Mechanismen zur Regulierung der Ionentransport-Prozesse sind bisher jedoch nur teilweise verstanden. Für ACh aus neuronalen Quellen ist bekannt, dass es in den Atemwegen eine Flüssigkeitssekretion aktiviert, die auf einer Änderung von Ionenleitfähigkeiten, besonders einer Sekretion von Cl^- basiert. Zusätzlich wurde mit der Entdeckung des NNCS in den Atemwegen ein neues Forschungsfeld eröffnet, in dem ACh als ein autokrines/parakrines Signalmolekül wirkt und in der Lage ist, den transepithelialen Ionentransport zu modulieren. Die Beobachtung, dass bei CF-

Lungengewebe eine ACh-aktivierte Flüssigkeitssekretion vorliegt, lässt zudem auf die Stimulation einer möglichen CFTR-unabhängigen Cl^- -Sekretion schließen. NNACH könnte daher, durch die Aktivierung einer alternativen Cl^- -Sekretion, einen positiven Effekt auf die Erhöhung der Flüssigkeitssekretion in den Atemwegen besitzen.

Aus den angeführten Gründen wurde die pharmakologische Wirkung von ACh auf den transepithelialen Ionentransport an Trachealpräparaten des Schweins mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik untersucht. Hierzu wurde ACh auf die luminale Seite der Trachealpräparate appliziert, um non-neuronale Effekte zu simulieren.

Folgende detaillierte Fragestellungen wurden untersucht:

- I. Kann durch luminal appliziertes ACh eine Veränderung des transepithelialen Ionentransports im Trachealepithel des Schweins beobachtet werden?
- II. Welche nikotinergen und muskarinergen ACh-Rezeptoren sind an der Veränderung des transepithelialen Ionentransports beteiligt?
- III. Wie erfolgt die Signaltransduktion bei einer Aktivierung von muskarinergen ACh-Rezeptoren?
- IV. Welche Ionenkanäle sind bei einer Veränderung des ACh-vermittelten transepithelialen Ionentransports beteiligt?

2. Material und Methoden

2.1 Tierethik

Alle Tierversuche wurden im Einverständnis mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Schweinetracheen von gesunden, adulten Schweinen (~100 kg, unabhängig vom Geschlecht) wurden von einem lokalen Schlachthaus (Metzgerei Manz, Rechtenbach, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden von den Mitarbeitern des Schlachthauses zuerst elektrisch betäubt und anschließend durch Ausbluten getötet. Nach der Fleischbeschau durch einen lokalen Veterinärmediziner wurden ausschließlich intakte Tracheen herausgeschnitten und in einer mit Eis gefüllten Thermobox ins Labor transportiert.

2.2 Das Versuchstier: Hausschwein

Das Hausschwein (*Sus scrofa domestica*) ist die domestizierte Form des Wildschweins (*Sus scrofa*) und bildet mit ihm eine einzige Art. Es gehört damit zur Familie der Echten Schweine (*Suidae*) aus der Ordnung der Paarhufer (*Artiodactyla*). Die Systematik des Hausschweins nach Linnaeus, 1758, lautet wie folgt:

Überordnung:	Höhere Säugetiere (<i>Laurasiatheria</i>)
Ordnung:	Paarhufer (<i>Artiodactyla</i>)
Unterordnung:	Schweineartige (<i>Suina</i>)
Familie:	Echte Schweine (<i>Suidae</i>)
Art:	Wildschwein (<i>Sus scrofa</i>)
Unterart:	Hausschwein (<i>Sus scrofa domestica</i>)

2.2 Experimentelle Ringer-Lösungen

Bei den mit HEPES gepufferten Ringer-Lösungen (Schweine-Ringer, EGTA-Ringer, Hoch K^+ -Ringer) wurde der pH-Wert mit NaOH in Abhängigkeit von der gewünschten Temperatur auf 7,4 eingestellt. Dagegen wurde der pH-Wert der physiologischen Bikarbonat (HCO_3^-)-Ringer-Lösung durch eine kontinuierliche Begasung mit O_2/CO_2 (95/5 %) auf 7,4 gehalten. Der Schweine-Ringer kam bei der Gewebe-Isolation und den Ussing-Kammer-Experimenten zum Einsatz. Der Bikarbonat-Ringer, der EGTA-Ringer und der Hoch K^+ -Ringer wurden bei Untersuchungen in den Ussing-Kammer-Experimenten verwendet (siehe **Tab. 1**).

Tab. 1. Ringer-Lösungen

Abkürzung	Schweine-Ringer [mM]	HCO ₃ -Ringer [mM]	EGTA Ringer [mM]	Hoch K ⁺ -Ringer [mM]	Firma
NaCl	130	117	130	20	Roth
KCl	2,7	4,7	2,7	112,7	Sigma
KH ₂ PO ₄	1,5	1,2	1,5	1,5	Serva
CaCl ₂	1	2,5		1	Merck
MgCl ₂	0,5	-	0,5	0,5	Roth
HEPES	10	-	10	10	Roth
D-Glucose	10	11	10	10	Roth
NaHCO ₃	-	25	-	-	Serva
MgSO ₄	-	1,2	-	-	Merck
EGTA	-	-	1	-	Sigma

NaCl: Natriumchlorid; KCl: Kaliumchlorid; KH₂PO₄: Kaliumdihydrogenphosphat Monopotasiumphosphat; CaCl₂: Calciumchlorid; MgCl₂: Magnesiumchlorid; HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; NaHCO₃: Natrium-Bikarbonat; MgSO₄: Magnesiumsulfat; EGTA: Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure

2.3 Gewebe-Isolation (Trachealepithel)

Die Schweinetracheen wurden mehrmals mit gekühltem Schweine-Ringer (4 °C) gewaschen, anschließend longitudinal aufgeschnitten und mit Nadeln in einer Wachsschale flächig aufgespannt, sodass die apikale Seite nach oben zeigte. Die Wachsschale war mit gekühltem Schweine-Ringer gefüllt, sodass die Trachea komplett mit Flüssigkeit bedeckt war. Dann wurde die auf den Knorpelringen aufliegende Gewebsschicht (zilientragendes Oberflächenepithel mit submukösen Drüsen) mit Hilfe eines Skalpellts vorsichtig von den Knorpelringen präpariert (**Abb. 9A**). Das erhaltene Gewebe wurde dann direkt in einem Plastikring fixiert (**Abb. 9B**) und für die Ussing-Kammer-Experimente verwendet oder in gekühltem Schweine-Ringer bis zur Verwendung gelagert. Alle verwendeten Trachealpräparate wurden am Tag der Präparation in der Ussing-Kammer gemessen.

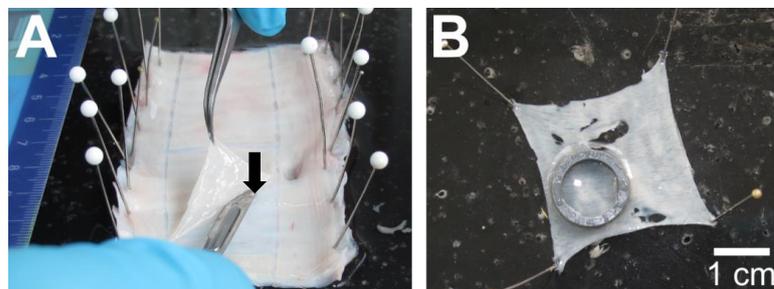


Abb. 9. Präparation der Schweinetrachea.

A: Aufgespannte Trachea: Präparation des epithelialen Gewebes von den Knorpelringen mit Hilfe eines Skalpellts. Die Öffnung in der Trachea (schwarzer Pfeil) zeigt die Abzweigung in den *pig bronchus*. **B:** Aufgespanntes epitheliales Gewebe in einem Plastikring fixiert.

2.4 Ussing-Kammer Experimente

Die Ussing-Kammer wurde in den 1940er Jahren von dem dänischen Physiologen Hans Ussing entwickelt. Mit dieser Messmethode kann der aktive Transport von Elektrolyten, Nährstoffen und Medikamenten über epitheliale Gewebe bestimmt werden (Clarke 2009). Mit ihrer Hilfe untersuchten Ussing und Zerahn 1951 erstmals erfolgreich das Phänomen des aktiven NaCl-Transports in der isolierten Froschhaut (Ussing und Zerahn 1951). Dabei wendeten sie erstmals die revolutionäre Technik der Spannungsklemme (*voltage-clamp*) an. Die Grundlage der Spannungsklemme bildet der vektorielle Transport von Ionen über ein polar aufgebautes, epitheliales Gewebe und die damit einhergehenden Ladungsverschiebungen, die ein transepitheliales Potential (V_T) generieren. Mit Hilfe des V_T kann jedoch nur eine qualitative Aussage über die Netto-Transportrichtung gemacht werden, allerdings keine quantitative Aussage über die transportierten Ionen. Um diese postulieren zu können, wird dem V_T ein Kompensationsstrom entgegengesetzt, mit dem die Spannung über dem Epithel auf einen vorgegebenen Wert (0 mV) geklemmt wird. Dieser entgegengesetzte Strom entspricht nun quantitativ dem transportierten Ionenfluss und wird als Kurzschlussstrom (I_{SC} , *short circuit current*; in der Einheit μA pro Fläche) bezeichnet.

2.4.1 Aufbau und Funktion der verwendeten Ussing-Kammer

Die in dieser Arbeit verwendete Ussing-Kammer (**Abb. 10**) bestand aus zwei Kompartimenten, die durch das zuvor präparierte Trachealepithel voneinander getrennt wurden. Die apikale und basolaterale Halbzelle konnten unabhängig voneinander über ein gravitationsbetriebenes Perfusionssystem mit Ringer-Lösung bzw. darin gelösten Pharmaka perfundiert werden. Durch höher gelegene Ablauföffnungen konnte die Ringer-Lösung die Kammerhälften wieder verlassen und aufgefangen werden.

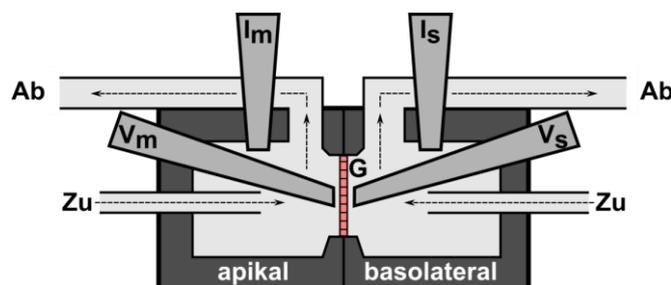


Abb. 10. Schematische Darstellung der verwendeten Ussing-Kammer.

Das Gewebe (G) trennte die apikale von der basolateralen Halbzelle der Ussing-Kammer ab. Für eine kontinuierliche Perfusion besaß jedes Kompartiment einen Zu- und Ablauf (Zu, Ab). Zur elektrischen Ableitung war die Ussing-Kammer mit gewebnahen Potentialelektroden (V_m , V_s) und gewebsernen Stromelektroden (I_m , I_s) ausgestattet.

Um den Ionentransport über das Epithel bestimmen zu können, wurde die Ussing-Kammer mit vier Elektroden ausgestattet, zwei Potentialelektroden (V_m , V_s) und zwei Stromelektroden (I_m , I_s). Die längeren Potentialelektroden lagen dicht an dem zu messenden Gewebe an, während die kurzen Stromelektroden so in der Ussing-Kammer platziert wurden, dass sie denselben Abstand zum Gewebe hatten.

Als Elektroden wurden modifizierte 200 μ l Pipettenspitzen verwendet (**Abb. 11**). Das erste Drittel der Pipettenspitzen wurde mit Agar (2 % Agar in 3 M KCl) befüllt. Die KCl-Agarbrücke wurde dann mit 3 M KCl-Lösung überschichtet, in die das chlorierte Ende eines Silberdrahtes eingetaucht wurde. Die Chlorierung des Silberdrahtes erfolgte für 10 s bei 5 V in einer 0.1 M HCl-Lösung. Eine abgeschnittene 1 ml Spritzenspitze und der Gummistopfen der 1 ml Spritze halfen dabei, den Silberdraht in der KCl-Lösung zu fixieren. Für jede Messung wurden ausschließlich frisch hergestellte Elektroden verwendet, deren Eigenpotential in der Schweine-Ringerlösung kleiner als $\pm 1,0$ mV war.

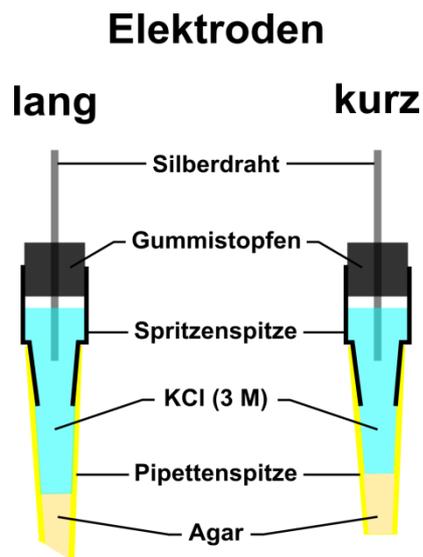


Abb. 11. Aufbau der Potential- und Stromelektroden.

Links ist eine lange Potentialelektrode zu sehen, die dem Gewebe nahe anliegt und das Potential misst, und rechts eine kurze Stromelektrode, die den Gegenstrom auf das Gewebe appliziert, um das Potential auf 0 zu klemmen.

2.4.2 Messablauf und Messtechnik

Das isolierte Trachealgewebe wurden in einem mit feinen Nadeln bestückten Plastikring fixiert. Von jeder Trachea wurde mindestens ein Paar dieser Präparationen gewonnen: ein Ring, um die Wirkung einer Substanz zu testen, während der andere Ring als „Kontrolle“ (z. Bsp.: DMSO-Applikation) fungierte. Nachdem die Geweberinge in die Ussing-Kammer eingesetzt

waren, wurde das Gewebe von beiden Seiten mit Ringerlösung umspült und die Elektroden (Ag/AgCl Silberdrähte in 2 % Agar und 3 M KCl) mit dem *Voltage-Clamp*-Verstärker (Warner Instruments, *Dual Channel Epithelial Voltage Clamp, Model EC-825A*, Connecticut, USA) verbunden. Daraufhin wurde in der Leerlaufspannung (*open-circuit voltage*, OCV) die spontane transepitheliale Spannung (V_T , Lumen negativ) gemessen. Nach 10-30 Minuten wurde dann auf 0 mV geklemmt und der dafür benötigte Kurzschlussstrom (*short circuit current*, I_{SC}) gemessen. Der I_{SC} repräsentiert einen Summenstrom aus allen transepithelialen Strömen durch spannungsunabhängige Ionenkanäle, inklusive parazellulärer Leckströme, die aus einer mangelnden Integrität des Epithels resultieren. Spannungspulse von 5 mV (Dauer: 1 s) wurden alle 30 s appliziert, um durch die resultierende Auslenkung des I_{SC} (ΔI_{Puls}) den Widerstand (R_T) nach dem Ohm'schen Gesetz zu berechnen ($R_T (\Omega) = U (V) / \Delta I_{Puls} (\mu A)$). Der I_{SC} wurde durch einen analogen Schreiber (Phillips, Amsterdam, Niederlande) und über ein *PowerLab*-Interface an einem Computer mit dem Aufzeichnungsprogramm LabChart 7 (beide ADInstruments, Oxford, Vereinigtes Königreich) aufgezeichnet. Ein positiver I_{SC} Wert repräsentiert einen Fluss von positiven Ladungen von der luminalen (apikalen) Seite auf die serosale (basolaterale) Seite des Gewebes, oder den Fluss von negativen Ladungen in die entgegengesetzte Richtung. Die Ussing-Kammer begrenzte die effektive Messfläche auf 0,5 cm² und alle gemessenen Werte (I_{SC} und R_T) wurden auf 1 cm² umgerechnet.

Das Trachealepithel des Schweins benötigte eine ungefähre Äquilibrierungszeit von 30-60 min, bevor der I_{SC} einen stabilen Wert erreichte. Anschließend konnte mit dem Experiment begonnen werden. Alle Experimente wurden bei 37 °C durchgeführt. Hierzu wurden die Ringerlösungen, bevor sie in die Ussing-Kammer gelangten, über ein Wasserbad erwärmt.

2.5 Verwendete Substanzen

Die folgenden Substanzen wurden als Stammlösungen angesetzt (siehe auch **Tab. 2**). Amilorid wurde appliziert, um den transepithelialen Na⁺-Transport zu blocken. Acetylcholin, Carbachol, Nikotin, DMPP, Muskarin und Pilocarpin wurden als AChR-Agonisten eingesetzt. Mecamylamin, Atropin, Pirenzepin und 4-DAMP wurden als AChR-Antagonisten verwendet. 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) und Forskolin wurden dazu verwendet, den CFTR zu aktivieren, und der CFTR Kanalblocker II Glycin Hydrazid (GlyH-101), um den CFTR zu blocken. Mit ATP wurden purinerge P2Y-Rezeptoren stimuliert, um eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zu erzielen. CaCC wurden mit Tanninsäure inhibiert. Die Inhibition der SERCA erfolgte mit Thapsigargin, 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone (DTBHQ) und Cyclopiazonsäure (CPA). IP₃-Rezeptoren wurden mit 2-APB und RyR-

Rezeptoren mit Rutheniumrot inhibiert. Als K_{Ca} -Kanalblocker wurden Iberitoxin, Charybdotoxin, Clotrimazol, TRAM 34, Apamin und UCL 1684 eingesetzt. Ba^{2+} (appliziert als $BaCl_2$) wurde als allgemeiner K^+ -Kanalblocker verwendet und Mannitol, um einer Erhöhung der Lösungsosmolarität durch $BaCl_2$ entgegenzuwirken.

Tab. 2. Verwendete Substanzen

INF oder Name	Gelöst in	CAS-Nummer	Hersteller
2-APB	DMSO	524-95-8	Tocris Bioscience
4-DAMP	DMSO	1952-15-4	Sigma-Aldrich
Acetylcholin	dH ₂ O	60-31-1	Sigma-Aldrich
Amilorid	dH ₂ O	2016-88-8	Sigma-Aldrich
Apamin	dH ₂ O	24345-16-2	Smartox
ATP	dH ₂ O	34369-07-8	Sigma-Aldrich
Atropin	dH ₂ O	51-55-8	Sigma-Aldrich
BaCl₂	dH ₂ O	10326-27-9	Riedel de Haen
Carbachol	dH ₂ O	51-83-2	Sigma-Aldrich
Charybdotoxin	dH ₂ O	95751-30-7	Smartox
Clotrimazol	DMSO	23593-75-1	Sigma-Aldrich
CPA	DMSO	18172-33-3	Santa Cruz Biotechnology
D609	dH ₂ O	83373-60-8	Santa Cruz Biotechnology
DMPP	dH ₂ O	54-77-3	Sigma-Aldrich
DMSO	-----	67-68-5	Sigma-Aldrich
DTBHQ	DMSO	88-58-4	Sigma-Aldrich
Forskolin	DMSO	66575-29-9	AppliChem
GlyH-101	DMSO	328541-79-3	Merck
Iberitoxin	dH ₂ O	129203-60-7	Smartox
IBMX	DMSO	28822-58-4	Sigma-Aldrich
Mannitol	dH ₂ O	69-65-8	Sigma-Aldrich
MDL 12330A	DMSO	40297-09-4	Tocris Bioscience
Mecamylamin	dH ₂ O	826-39-1	Sigma-Aldrich
Muskarin	DMSO	2936-25-6	Santa Cruz Biotechnology
Nikotin	dH ₂ O	65-31-6	Sigma-Aldrich
Pilokarpin	dH ₂ O	54-71-7	TCI
Pirenzepin	dH ₂ O	29868-97-1	Sigma-Aldrich
Rutheniumrot	dH ₂ O	11103-72-3	Sigma-Aldrich
Tanninsäure	dH ₂ O	1401-55-4	Sigma-Aldrich
Thapsigargin	DMSO	67526-95-8	Serva
TRAM 34	DMSO	289905-88-0	Sigma-Aldrich
U-73122	DMSO	112648-68-7	Santa Cruz Biotechnology
UCL 1684	DMSO	199934-16-2	Tocris Bioscience

INF = Internationaler Freiname; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland; Tocris Bioscience, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland; TCI, Zwijndrecht, Niederlande; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA; Merck, Darmstadt, Deutschland; AppliChem, Darmstadt, Deutschland; Smartox, Saint Martin d'Hères, Frankreich; Serva, Heidelberg, Deutschland; Fluka, Steinheim, Deutschland; Riedel de Haen, Seelze, Deutschland

2.6 Auswertung der Daten und Statistik

In der vorliegenden Arbeit werden alle Daten als Mittelwert (*mean*) \pm Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) präsentiert. “n” steht dabei für die Anzahl der untersuchten Trachealgewebe und entspricht der Anzahl der verwendeten Tiere.

Die Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsverteilung der erhaltenen Messdaten auf eine Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Die statistischen Vergleiche innerhalb einer Gruppe (Vorher/Nachher-Vergleich von Mittelwerten \pm SEM) wiesen alle eine Normalverteilung auf und wurden daher mit dem gepaarten t-Test nach Student ermittelt und als Säulendiagramm dargestellt. Für statistische Vergleiche zwischen zwei unterschiedlichen Gruppen wurde bei einer Normalverteilung der Messdaten der ungepaarte t-Test nach Student und bei einer Nicht-Normalverteilung der nicht-parametrische Mann-Whitney *U*-Test angewendet. Die Darstellung zweier unterschiedlicher Gruppen erfolgte als Streudiagramm. Experimente zwischen zwei unterschiedlichen Gruppen wurden an unterschiedlichen Präparationen von denselben Tracheen/Tieren durchgeführt. Bei Experimenten mit Präparationen von nicht denselben Tracheen/Tieren wurde dies in den Abbildungsunterschriften kenntlich gemacht. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % (P-Wert $\leq 0,05$) galt als statistisch signifikant und wurde entsprechend mit einem Stern kenntlich gemacht (* = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$; *** = $P \leq 0,001$). Zur Auswertung der ACh-induzierten Ströme wurde immer der höchste Stromwert in Gegenwart von ACh (Strompeak) mit dem Stromwert vor der Gabe von ACh (Grundstrom) verglichen. Alle angewendeten statistischen Vergleiche wurden in den Abbildungsunterschriften kenntlich gemacht.

Die Verarbeitung der Daten erfolgte mit den Programmen *Microsoft Word 2010*, *Excel 2010* und *Graphpad Prism* (Version 5.02). Die graphische Bearbeitung der Stromkurven und der Balkendiagramme geschah mit Hilfe des vektorbasierten Programms *Inkscape* (Version 0.48).

3. Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische Charakterisierung des Schweinetrachealepithels

In der vorliegenden Arbeit wurde der Kurzschlussstrom (I_{SC} , *short circuit current*) in Trachealepithelpräparaten von ausgewachsenen Schweinen mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik bestimmt. Direkt nach dem Einsetzen des Trachealepithels in die Ussing-Kammer wurde das spontane transepitheliale Potential (V_T , Lumen negativ) gemessen. Dieses betrug durchschnittlich $-6,3 \pm 0,5$ mV ($n = 89$). Nach dem Klemmen des Potentials auf 0 mV und einer darauffolgenden Äquilibrierungszeit von 10-30 Minuten lag der basale Isc bei $99,6 \pm 3,9$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n = 89$) und der durchschnittliche Widerstand (R_T) bei $173,9 + 6,1$ $\Omega * \text{cm}^2$ ($n = 89$).

Tab. 3. Elektrophysiologische Charakterisierung des Schweinetrachealepithels

V_T	$-6,3 \pm 0,5$ mV	$n = 89$
I_{SC}	$99,6 \pm 3,9$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	
R_T	$173,9 + 6,1$ $\Omega * \text{cm}^2$	

V_T : transepitheliales Potential; I_{SC} : *short circuit current*, Kurzschlussstrom; R_T : transepithelialer Widerstand

3.2 Pharmakologische Wirkung von luminal appliziertem ACh

3.2.1 Der Einfluss von luminal appliziertem ACh auf den transepithelialen Ionen-transport

Die Gabe von ACh (100 μM) auf die luminal Seite der Schweinetrachea verursachte einen transienten Anstieg des I_{SC} (**Abb. 12A**). Der ACh-induzierte Anstieg des I_{SC} war zum Grundstrom signifikant erhöht (vor ACh: $108,2 \pm 7,2$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit ACh: $121,2 \pm 7,2$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t- Test, $P < 0,001$; $n = 30$; **Abb. 12B**). Eine Messreihe zur Bestimmung der halbmaximalen Konzentration (*half maximal effective concentration*, EC_{50})² zeigte, dass der ACh-induzierte Stromanstieg (ΔI_{ACh}) dosisabhängig war und die EC_{50} bei 164 μM lag (**Abb. 12C**).

² Die EC_{50} ist definiert als die Konzentration eines Agonisten, die eine Antwort auf halber Strecke zwischen der Baseline und der Maximal-Antwort induziert.

Zudem induzierte auch die Gabe des ACh-Analoges Carbachol (100 μM , luminal) einen signifikanten Anstieg des I_{sc} (vor Carbachol: $116,8 \pm 9,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit Carbachol: $126,9 \pm 10,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t- Test, $P < 0,05$; $n = 5$; **Abb. 12D**). Insgesamt konnte durch die luminale Applikation cholinergischer Agonisten ein Anstieg des I_{sc} in der Schweinetrachea verzeichnet werden. Nachfolgend wird der ACh-induzierte Stromanstieg als ACh-Effekt bezeichnet.

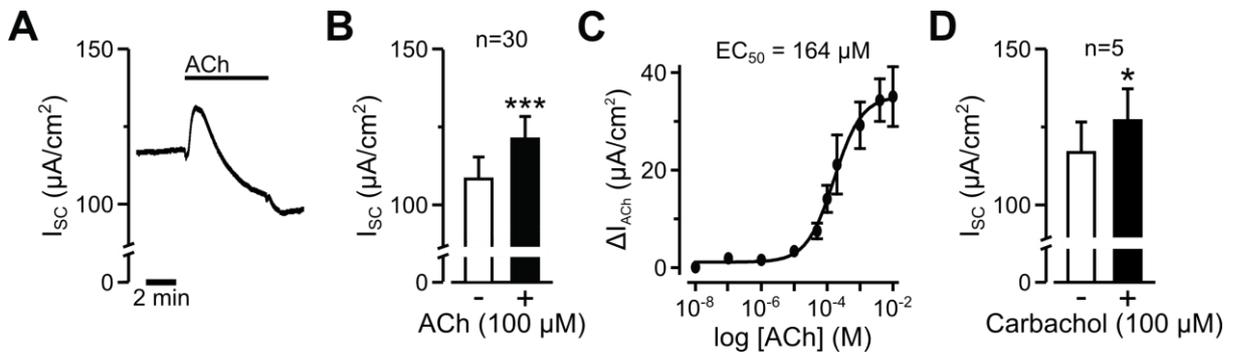


Abb. 12. Luminales ACh induziert einen Anstieg des I_{sc} in der Schweinetrachea.

A: Die luminale Applikation von Acetylcholin (ACh, 100 μM) führte zu einem transienten Anstieg des I_{sc} . **B:** Der Vergleich des höchsten Stromwertes in Gegenwart von ACh (+) mit dem Stromwert vor der Gabe von ACh (-) war signifikant (gepaarter t-Test, ***: $P < 0,001$). **C:** Der ACh-induzierte Stromanstieg (ΔI_{ACh}) war mit einer halbmaximalen Konzentration (EC_{50}) von 164 μM dosisabhängig. Die verwendeten Konzentrationen von ACh zur Bestimmung des EC_{50} lagen zwischen 10 nM und 10 mM (alle $n = 5$). **D:** Der cholinerge Agonist Carbachol (100 μM , luminal) induzierte ebenfalls einen signifikanten Anstieg des I_{sc} (gepaarter t-Test, *: $P < 0,05$). Verändert nach (Dittrich et al. 2015).

3.2.2 Die Beteiligung von mAChR und nAChR am ACh-Effekt

Zunächst wurde eine Beteiligung von mAChR am ACh-Effekt untersucht. Hierzu wurden die muskarinergen AChR-Agonisten Muskarin (Brown 2006; Akk und Auerbach 1999) und Pilocarpin (Wang et al. 1999) verwendet. Die Applikation von Muskarin (100 μM , luminal) bewirkte einen transienten Anstieg des I_{sc} (**Abb. 13A**). Dieser Anstieg war signifikant (vor Muskarin: $84,8 \pm 6,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit Muskarin: $93,8 \pm 5,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t- Test, $P < 0,001$; $n = 9$; **Abb. 13B**). Ähnliche Ergebnisse wurden mit der Applikation von Pilocarpin (100 μM , luminal) erzielt (vor Pilocarpin: $60,0 \pm 8,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit Pilocarpin: $69,2 \pm 9,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, gepaarter t- Test, $P < 0,001$; $n = 7$; **Abb. 13C**). Die beobachteten I_{sc} -Anstiege mit Muskarin und Pilocarpin deuten auf die Aktivierung von mAChR in der Schweinetrachea hin.

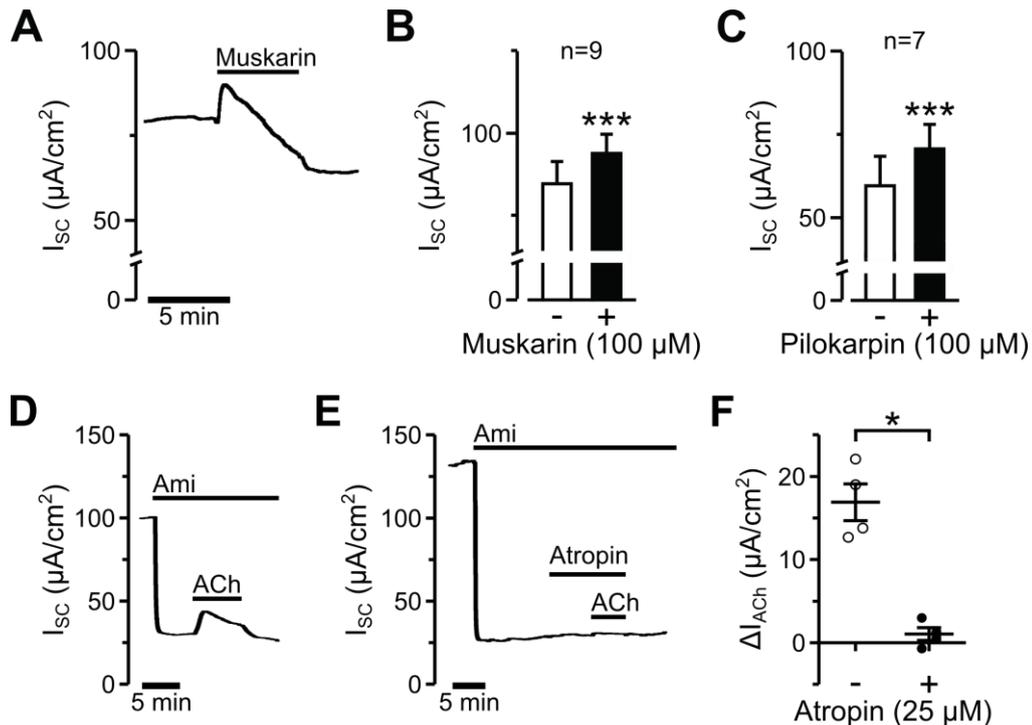


Abb. 13. Muskarinerge ACh-Rezeptoren sind am ACh-Effekt beteiligt.

A, B: Die luminal Applikation von Muskarin (100 µM) erhöhte den I_{sc} signifikant (gepaarter t-Test, ***: $P < 0,001$). **C:** Auch die Applikation des muskarinergen Agonisten Pilocarpin (100 µM, luminal) führte zu einem signifikanten Stromanstieg (gepaarter t-Test, ***: $P < 0,001$). **D, E:** Die Applikation von ACh (100 µM, luminal) in Abwesenheit und Anwesenheit von Atropin (25 µM, luminal), einem nicht-selektiven Antagonisten der muskarinergen ACh-Rezeptoren. Die Experimente erfolgten in Gegenwart von Amilorid (Ami, 10 µM, luminal). **F:** Der ACh-Effekt (ΔI_{ACh}) war in Anwesenheit von Atropin (+) im Vergleich zu den Messungen in Abwesenheit von Atropin (-) signifikant reduziert (Mann-Whitney U-Test, *: $P < 0,05$; beide $n = 4$). Verändert nach (Dittrich et al. 2015).

Als nächstes wurde der ACh-Effekt (100 µM, luminal) in Abwesenheit (**Abb. 13D**) und Anwesenheit von Atropin (25 µM, luminal; **Abb. 13E**) bestimmt. Atropin ist ein nicht-selektiver Antagonist der mAChR (Moulton und Fryer 2011). Die Experimente wurden zudem in Gegenwart des ENaC-Inhibitors Amilorid (10 µM, luminal) durchgeführt, um einen Anstieg des I_{sc} über die Zeit entgegen zu wirken. Die Anwesenheit von Amilorid hatte keinen Einfluss auf den ACh-induzierten Stromanstieg (siehe 3.4.1 Die Beteiligung von Na^+ -resorbierenden Ionenkanälen). Die Anwesenheit von Atropin reduzierte den ACh-Effekt (ΔI_{ACh}) signifikant (ohne Atropin: $16,9 \pm 2,2 \mu A/cm^2$, $n = 4$; mit Atropin: $1,1 \pm 0,8 \mu A/cm^2$, $n = 4$; Mann-Whitney U-Test, $P < 0,05$; **Abb. 13F**). Dies bestätigte die Beteiligung von mAChR am ACh-Effekt.

In den Atemwegen wird besonders den M1- und M3AChR eine Rolle bei der Regulation der Mukus- und Flüssigkeitssekretion zugesagt (Gautam et al. 2004; Culp et al. 1996). Aus diesem Grund wurden Dosis-Inhibierungskurven mit dem selektiven M1AChR-Antagonisten Pirenzepin (Eşkazan et al. 1999; Yang et al. 1988) und dem M3AChR-Antagonisten 4-DAMP

(Brown et al. 2013b; Michel et al. 1989) erstellt (**Abb. 14A&B**). Bei diesen Experimenten wurde ACh (100 μ M, luminal) in Anwesenheit ($I_{\text{ACh_Antagonist}}$) und Abwesenheit ($I_{\text{ACh_Kontrolle}}$) des jeweiligen Antagonisten appliziert. Die ACh-Effekte wurden daraufhin so in Relation gesetzt ($I_{\text{ACh_Antagonist}}/I_{\text{ACh_Kontrolle}}$), dass sich bei einer Inhibition durch den Antagonisten ein Wert < 1 ergab und die halbmaximale inhibierende Konzentration (*half maximal inhibitory concentration*, IC_{50})³ des Antagonisten bestimmt werden konnte. Alle Experimente wurden in Gegenwart von Amilorid (10 μ M, luminal) durchgeführt. In diesen Experimenten inhibierte 4-DAMP den ACh-Effekt mit einem IC_{50} von 49,3 nM wesentlich effektiver als Pirenzepin mit einem IC_{50} von 69,1 μ M. Dieses pharmakologische Profil deutet auf eine stärkere Beteiligung des M3AChR an der Stromstimulation durch luminales ACh hin.

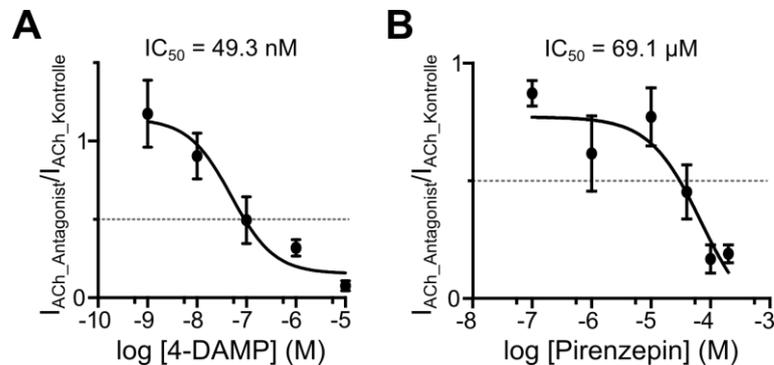


Abb. 14. Der muskarinerge M3AChR ist maßgeblich am ACh-Effekt beteiligt.

A, B: Dosis-Inhibierungskurven mit 4-DAMP (M3AChR-Antagonist) und Pirenzepin (M1AChR-Antagonist). Die Gabe von 4-DAMP inhibierte den ACh-Effekt (100 μ M, luminal) mit einer halbmaximalen inhibierenden Konzentration (IC_{50}) von 49,3 nM (A) und Pirenzepin mit einem IC_{50} von 69,1 μ M (B). Die Konzentrationen für 4-DAMP lagen zwischen 1 nM und 10 μ M ($n \geq 5$) und für Pirenzepin zwischen 100 nM und 200 μ M ($n \geq 4$). Verändert nach (Dittrich et al. 2015).

Weiterhin wurde untersucht, ob auch nAChR am ACh-Effekt beteiligt sind. Hierzu wurden Experimente mit dem nikotinergen AChR-Agonisten Nikotin durchgeführt (Brown 2006; Akk und Auerbach 1999). Bei der Applikation von Nikotin (100 μ M, luminal) konnte keine signifikante Veränderung des I_{SC} registriert werden (vor Nikotin: $119,1 \pm 10,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit Nikotin: $121,7 \pm 10,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t-Test, $P = 0,091$; $n = 8$). Die darauffolgende Applikation von ACh (100 μ M, luminal) resultierte jedoch in einem signifikanten Anstieg des I_{SC} (ΔI_{ACh} : $13,5 \pm 2,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t-Test, $P < 0,001$; $n = 8$; **Abb. 15A&B**), und bestätigte die Fähigkeit des Gewebes auf ACh zu reagieren.

³ Die IC_{50} definiert die Konzentration eines Antagonisten, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird.

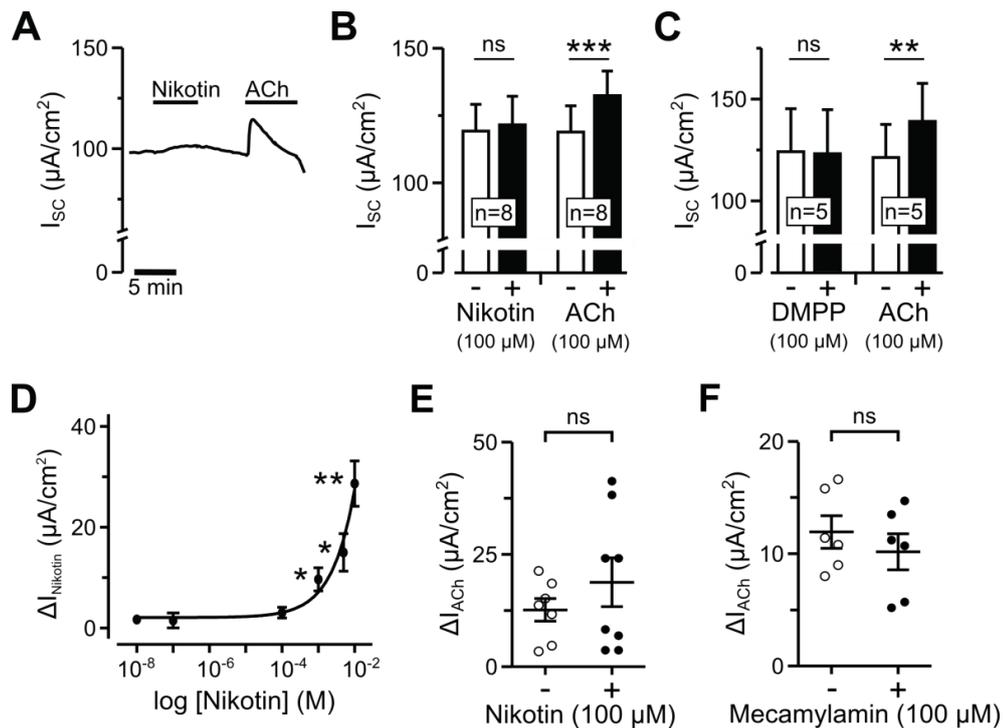


Abb. 15. Nikotinerge ACh-Rezeptoren sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.

A, B: Die Applikation von Nikotin (100 μM , luminal) verursachte keine signifikante Veränderung des I_{sc} , wohingegen eine anschließende Applikation von Acetylcholin (ACh, 100 μM , luminal) einen signifikanten Anstieg des I_{sc} bewirkte (beide gepaarter t-Test, ns: $P = 0,091$; ***: $P < 0,001$). **C:** Auch der Membran-impermeable nikotinerge ACh-Rezeptor-Agonist DMPP (100 μM , luminal) führte zu keiner signifikanten Veränderung des I_{sc} (gepaarter t-Test, ns: $P = 0,169$). Die anschließende ACh-Applikation (100 μM , luminal) führte zu einem signifikanten Anstieg des I_{sc} (gepaarter t-Test, **: $P < 0,01$). **D:** Dosis-Wirkungskurve von luminal appliziertem Nikotin. Signifikante Anstiege des Nikotin-induzierten Stroms ($\Delta I_{Nicotin}$) wurden mit Konzentrationen von 1, 5 und 10 mM Nikotin erreicht (alle gepaarter t-Test, *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$). Die Konzentrationen für Nikotin lagen zwischen 10 nM und 10 mM ($n \geq 5$). **E, F:** Die ACh-Effekte (ΔI_{ACh} , 100 μM , luminal) waren weder in Gegenwart von Nikotin (+, 100 μM , luminal, ns: $P = 0,346$; $n = 8$) noch in Gegenwart von Mecamylamin (+, 100 μM , luminal, ns: $P = 0,433$; $n = 6$) zu den entsprechenden ACh-Kontrollen ohne Nikotin (-; $n = 7$) und Mecamylamin (-; $n = 6$) unterschiedlich (alle ungepaarter t-Test). Verändert nach (Dittrich et al. 2015).

In einem weiteren Experiment wurde der nAChR-Agonist DMPP (Prado und Segalla 2004) auf die luminal Seite des Epithels appliziert. Aber auch die Applikation von DMPP (100 μM , luminal) führte zu keiner signifikanten Veränderung des I_{sc} (vor DMPP: $124,0 \pm 21,2 \mu A/cm^2$; mit DMPP: $123,3 \pm 21,2 \mu A/cm^2$; gepaarter t-Test, $P = 0,169$; $n = 5$), während eine darauffolgende ACh-Applikation (100 μM , luminal) einen signifikanten Anstieg des I_{sc} induzierte (ΔI_{ACh} : $17,8 \pm 3,3 \mu A/cm^2$; gepaarter t-Test, $P < 0,01$; $n = 5$; **Abb. 15C**).

Es ist jedoch zu erwähnen, dass mit Konzentrationen von 1, 5 und 10 mM Nikotin ein signifikanter Anstieg des I_{sc} beobachtet werden konnte (**Abb. 15D**). Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, in denen der ACh-Effekt (ΔI_{ACh} , 100 μM , luminal) in Gegenwart von jeweils Nikotin (100 μM , luminal; **Abb. 15E**) und Mecamylamin (100 μM , luminal; **Abb. 15F**) be-

stimmt wurde. Mecamylamin ist ein nicht-selektiver nAChR-Antagonist (Bacher et al. 2009). Bei diesen Experimenten war der ΔI_{ACh} weder in Gegenwart von Nikotin, noch in Gegenwart von Mecamylamin zu den entsprechenden ACh-Kontrollen ohne Nikotin/Mecamylamin signifikant verändert (ohne Nikotin: $12,6 \pm 2,5 \mu A/cm^2$, $n = 7$; mit Nikotin: $18,8 \pm 5,4 \mu A/cm^2$, $n = 8$; ungepaarter t-Test, $P = 0,346$; **Abb. 15E** / ohne Mecamylamin: $11,9 \pm 1,4 \mu A/cm^2$, $n = 6$; mit Mecamylamin: $10,2 \pm 1,6 \mu A/cm^2$, $n = 6$; ungepaarter t-Test, $P = 0,433$; **Abb. 15F**). Zusammengefasst weisen die Experimente mit den nikotinergeren Agonisten und Antagonisten darauf hin, dass die nAChR nicht am ACh-Effekt beteiligt sind.

3.3 Ca^{2+} -Abhängigkeit des luminalen ACh-Effekts

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der luminale ACh-Effekt auf einer wesentlichen Aktivierung des M3AChR in den Schweinetrachealepithelzellen beruht (siehe **Abb. 14**). Zudem ist allgemein akzeptiert, dass eine Bindung von ACh an den M3AChR eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induziert (Nathanson 2000; Pierce et al. 2002; Fredriksson et al. 2003). Im Folgenden wurde daher mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik versucht Einblicke in die M3AChR-abhängige intrazelluläre Signaltransduktion in den Atemwegsepithelzellen zu erhalten, die durch luminal appliziertes ACh aktiviert und reguliert werden.

3.3.1 Die Beteiligung einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration am ACh-Effekt aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern

Ein Ausstrom von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ist für viele Ca^{2+} -abhängige Signalwege relevant, da auf diese Weise die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration schnell und effektiv erhöht wird (Treiman et al. 1998). Die Bindung von ACh an den M3AChR stellt einen extrazellulären Stimulus dar, der in der Folge einen schnellen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über den $PLC\beta/IP_3$ -Signalweg verursacht (Kan et al. 2014; Bjarnadóttir et al. 2006; Fredriksson et al. 2003; Pierce et al. 2002). Deswegen wurde indirekt mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik überprüft, ob luminal appliziertes ACh eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration stimuliert.

Zunächst wurde die Aufnahme von intrazellulärem Ca^{2+} in das ER durch eine Inhibition der SERCA (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} -ATPase) verhindert. SERCA sind Ca^{2+} -Pumpen in der Membran des ER, deren Hauptfunktion darin besteht, Ca^{2+} -Ionen aus dem In-

terzellularraum in das Innere des ER zu pumpen, wodurch die Ca^{2+} -Konzentration im Interzellularraum gering gehalten wird (East 2000). Sollte der ACh-Effekt auf einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration basieren, so müsste eine vorherige Erhöhung dieser, u.a. durch eine Inhibition der SERCA, den ACh-Effekt inhibieren. Die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erfolgte mittels drei selektiver SERCA-Inhibitoren: Thapsigargin, der meist verwendete SERCA-Inhibitor in Säugetierzellen (Treiman et al. 1998), sowie DTBHQ und CPA, für die ebenfalls eingehend gezeigt wurde, dass sie selektive SERCA-Inhibitoren sind (Michelangeli und East 2011; Darby et al. 1993).

Thapsigargin

In den Kontrollen (ohne Thapsigargin) induzierte die Applikation von ACh (200 μM , luminal) einen signifikanten Stromanstieg (vor ACh: $99,1 \pm 10,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit ACh: $113,6 \pm 9,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t-Test, $P < 0,001$; $n = 7$; **Abb. 16A**). In den parallel durchgeführten Experimenten hatte die Applikation von Thapsigargin (1 μM , bilateral) keinen Einfluss auf den I_{sc} (vor Thapsigargin: $93,1 \pm 9,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; nach Thapsigargin: $95,8 \pm 9,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t-Test, $P = 0,328$; $n = 7$; **Abb. 16B**). Die anschließende Applikation von ACh (200 μM , luminal) induzierte einen geringen Anstieg des I_{sc} , der aber signifikant zum Grundstrom erhöht war (vor ACh: $84,9 \pm 6,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit ACh: $89,9 \pm 6,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t-Test, $P < 0,01$; $n = 7$). Beim Vergleich der ACh-Effekte mit und ohne Thapsigargin wurde in Anwesenheit von Thapsigargin eine signifikante Reduzierung festgestellt (ohne Thapsigargin: $14,5 \pm 1,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit Thapsigargin: $4,9 \pm 1,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; Mann-Whitney U-Test, $P < 0,01$; **Abb. 16C**).

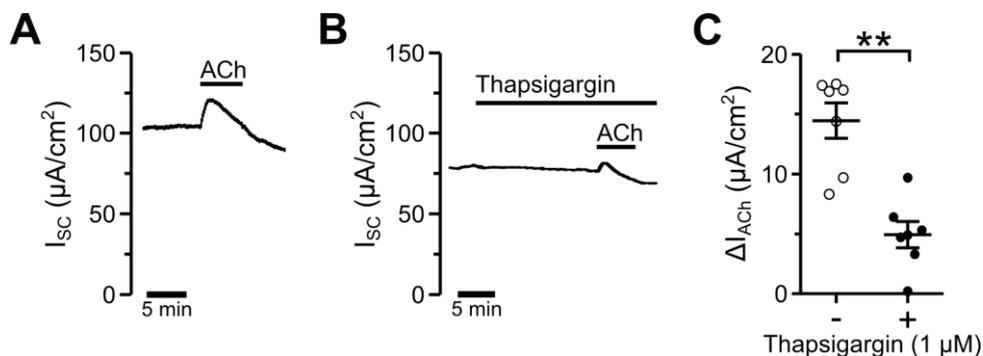


Abb. 16. Der SERCA-Inhibitor Thapsigargin reduziert den ACh-Effekt.

A, B: ACh-Effekt (200 μM , luminal) ohne und mit dem *sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} -ATPase (SERCA)-Inhibitor Thapsigargin (1 μM , bilateral). Die Applikation von Thapsigargin führte zu keiner Veränderung des I_{sc} (gepaarter t-Test, $P = 0,328$, $n = 7$). **C:** Der ACh-Effekt (ΔI_{ACh}) war in Gegenwart von Thapsigargin (+) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ohne Thapsigargin (-) signifikant reduziert (Mann-Whitney U-Test, **: $P < 0,01$, beide $n = 7$).

DTBHQ

In den Kontrollen (ohne DTBHQ) induzierte die Applikation von ACh (100 μ M, luminal) einen signifikanten Stromanstieg (vor ACh: $126,1 \pm 19,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit ACh: $139,4 \pm 17,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t-Test, $P < 0,01$; $n = 6$; **Abb. 17A**). In den parallel durchgeführten Experimenten führte die Applikation von DTBHQ (10 μ M, luminal) zunächst zu einem signifikanten Abfall des I_{SC} (vor DTBHQ: $123,2 \pm 10,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; nach DTBHQ: $85,7 \pm 5,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t-Test, $P < 0,01$; $n = 6$; **Abb. 17B**). Nach Erreichen eines Plateaus induzierte die anschließende Applikation von ACh (100 μ M, luminal) einen signifikanten Anstieg des I_{SC} (vor ACh: $85,7 \pm 5,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit ACh: $94,3 \pm 6,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t-Test, $P < 0,05$; $n = 6$). Beim Vergleich der ACh-Effekte mit und ohne DTBHQ konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (ohne DTBHQ: $13,3 \pm 3,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit DTBHQ: $8,6 \pm 2,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; ungepaarter t-Test, $P = 0,270$; **Abb. 17C**).

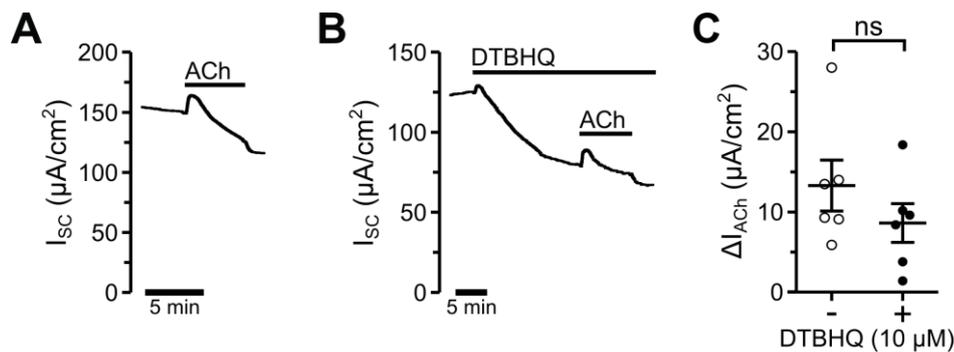


Abb. 17. In Gegenwart des SERCA-Inhibitors DTBHQ ist der ACh-Effekt unverändert.

A, B: ACh-Effekt (100 μ M, luminal) ohne und mit dem selektiven SERCA-Inhibitor DTBHQ (10 μ M, luminal). Die Applikation von DTBHQ führte zu einem signifikanten Abfall des I_{SC} (gepaarter t-Test, $P < 0,01$, $n = 6$) **C:** Der ACh-Effekt (ΔI_{ACh}) war in Gegenwart von DTBHQ (+) verglichen mit den Kontrollbedingungen ohne DTBHQ (-) nicht signifikant reduziert (ungepaarter t-Test, ns: $P = 0,270$, beide $n = 6$).

CPA

In den Kontrollen (ohne CPA) induzierte die Applikation von ACh (100 μ M, luminal) einen signifikanten Stromanstieg (vor ACh: $95,0 \pm 23,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit ACh: $102,6 \pm 24,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t-Test, $P < 0,01$; $n = 5$; **Abb. 18A**). In den parallel durchgeführten Experimenten hatte die Applikation von CPA (10 μ M, luminal) einen signifikanten Anstieg des I_{SC} zur Folge (vor CPA: $109,5 \pm 25,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; Strompeak mit CPA: $136,2 \pm 25,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t-Test, $P < 0,05$; $n = 5$; **Abb. 18B**). Nach Erreichen eines Plateaus induzierte die anschließende Applikation von ACh (100 μ M, luminal) einen weiteren signifikanten Stromanstieg (vor ACh: $83,8 \pm 19,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit ACh: $89,8 \pm 18,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t-Test, $P < 0,01$; $n = 5$). Beim Vergleich der ACh-Effekte ohne und mit CPA wurde kein signifikanter Unterschied festge-

stellt (ohne CPA: $17,6 \pm 1,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; mit CPA: $5,9 \pm 1,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; Mann-Whitney U-Test, $P = 0,346$; **Abb. 18C**).

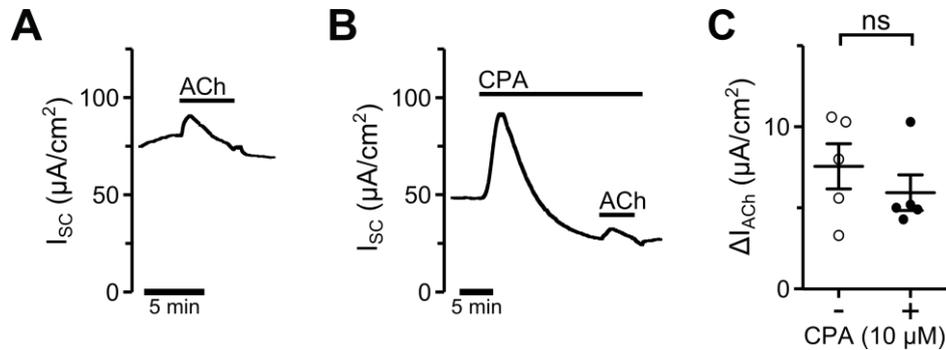


Abb. 18. In Gegenwart des SERCA-Inhibitors CPA ist der ACh-Effekt unverändert.

A, B: ACh-Effekt (100 μM , luminal) ohne und mit dem spezifischen SERCA-Inhibitor CPA (10 μM , luminal). Die Applikation von CPA verursachte einen signifikanten Anstieg des I_{sc} (gepaarter t-Test, $P < 0,05$, $n = 5$). **C:** Der ACh-Effekt (ΔI_{ACh}) war in Gegenwart von CPA (+) verglichen zu der Kontrolle ohne CPA (-) nicht verändert (Mann-Whitney U-Test, ns: $P = 0,346$, beide $n = 5$).

Zusammengefasst war der ACh-Effekt sensitiv gegenüber einer Blockierung der SERCA mit Thapsigargin, während der Einsatz der SERCA-Inhibitoren DTBHQ und CPA zu keiner signifikanten Veränderung des ACh-Effektes führte. Aufgrund dieser uneinheitlichen Ergebnisse bleibt die Beteiligung einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern am ACh-Effekt in den Trachealepithelzellen des Schweins unklar.

3.3.2 Die Beteiligung eines Ca^{2+} -Einstroms aus dem Extrazellularraum am ACh-Effekt

Eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kann auch über einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum erfolgen. Diese Möglichkeit zur Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht. Hierzu wurde das Ca^{2+} in der Ringerlösung durch EGTA ersetzt (bilateral EGTA-Ringer, siehe **Tab. 1**). Der ACh-Effekt (100 μM , luminal) war jedoch trotz der Entfernung von Ca^{2+} aus der Ringerlösung nicht signifikant verändert (mit bilateral Ca^{2+} : $9,3 \pm 2,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 5$; ohne bilateral Ca^{2+} : $8,0 \pm 1,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 4$; Mann-Whitney U-Test, $P = 0,905$; **Abb. 19A-C**). Der luminale ACh-Effekt war somit nicht von einem Ca^{2+} -Einstrom aus Extrazellularraum abhängig.

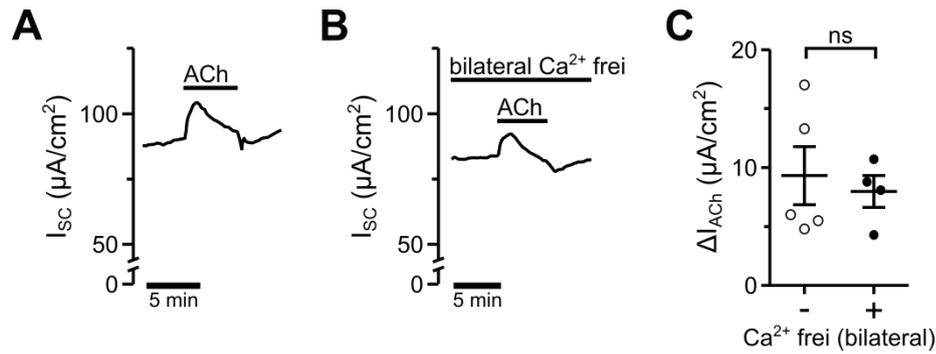


Abb. 19. Der ACh-Effekt ist unabhängig von einem extrazellulären Ca²⁺-Einstrom.
A, B: ACh-Effekt (100 μM, luminal) mit und ohne Ca²⁺ in der Ringerlösung (bilateral). **C:** Eine Entfernung von Ca²⁺ aus der Ringerlösung (+, bilateral, n = 4) führte zu keiner signifikanten Veränderung des ACh-Effektes (ΔI_{ACh}) im Vergleich zur Kontrolle (-, n = 5) mit Ca²⁺ in der Ringerlösung (Mann-Whitney U-Test, ns: P = 0,905).

3.3.3 Die Beteiligung der Phospholipase C_β am ACh-Effekt

Das an den M3AChR gekoppelte G_q-Protein bewirkt intrazellulär eine Stimulation der Phospholipase C_β (PLC_β) (Kan et al. 2014). Um zu überprüfen, ob die PLC_β am ACh-Effekt beteiligt ist, wurde diese in den Schweinetrachealpräparaten jeweils mit den PLC-Inhibitor U-73122 und D609 inhibiert (Son et al. 2004). In Anwesenheit von U-73122 (5 μM, luminal) konnte keine signifikante Veränderung des ACh-Effektes (100 μM, luminal) beobachtet werden (ohne U-73122: 10,6 ± 1,8 μA/cm², n = 7; mit U-73122: 14,7 ± 4,9 μA/cm², n = 7; ungepaarter t-Test, P = 0,447; **Abb. 20A-C**). Dagegen konnte in Anwesenheit von D609 (100 μM, bilateral) eine signifikante Reduzierung des ACh-Effektes (100 μM, luminal) festgestellt werden (ohne D609: 12,6 ± 1,8 μA/cm², n = 6; mit D609: 1,8 ± 0,6 μA/cm², n = 6; ungepaarter t-Test, P < 0,001; **Abb. 20D-F**).

Die Gabe von D609 führte jedoch zu einem starken Abfall des I_{sc} (**Abb. 20E**) und es stellte sich die Frage, ob das Gewebe nach der Gabe von D609 noch vital war. Zur Überprüfung der Vitalität des Gewebes wurde das sekretionsfördernde Signalmolekül ATP (100 μM, luminal) in An- und Abwesenheit von D609 (100 μM, bilateral) appliziert. Zunächst fiel der I_{sc} durch die Gabe von D609 stark ab und durch die additive Gabe von ATP konnte keine Veränderung des I_{sc} beobachtet werden. Mit dem Auswaschen von D609 stieg der Strom jedoch wieder an und die darauffolgende Gabe von ATP führte zu einem transienten Anstieg des I_{sc} (**Abb. 20G**). Der ATP-induzierte Stromanstieg nach dem Auswaschen von D609 bestätigte, dass das Gewebe vital blieb und weiterhin auf sekretionsfördernde Mittel reagieren konnte.

Zusammengefasst bleibt aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse mit den beiden PLC-Inhibitoren U-73122 und D609 eine Beteiligung der PLC_β am luminalem ACh-Effekt nicht eindeutig belegbar.

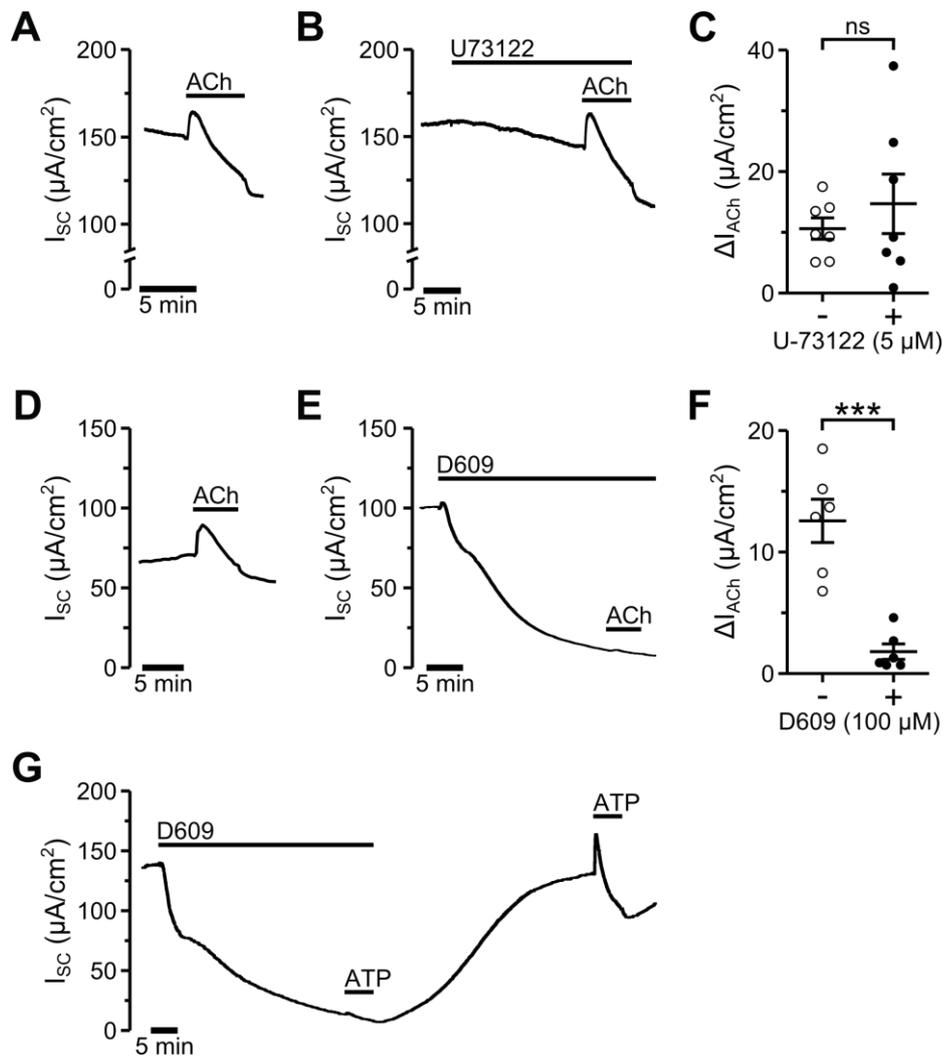


Abb. 20. Die Beteiligung der Phospholipase C_β am ACh-Effekt ist nicht eindeutig.

A, B: ACh-Effekt (100 μM, luminal) in Abwesenheit und Anwesenheit des Phospholipase C_β (PLC)-Inhibitors U-73122 (5 μM, luminal). **C:** Der ACh-Effekt (ΔI_{ACh}) war in Gegenwart von U-73122 (+) verglichen zu den Kontrollbedingungen ohne U-73122 (-) nicht signifikant verändert (ungepaarter t-Test, ns: P = 0,447; beide n = 7). **D, E:** ACh-Effekt (100 μM, luminal) in Abwesenheit und Anwesenheit des PLC-Inhibitors D609 (100 μM, bilateral). **F:** Der ΔI_{ACh} war in Gegenwart von D609 (+) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ohne D609 (-) signifikant reduziert (ungepaarter t-Test, ***: P < 0,001; beide n = 6). **G:** Stromspur einer Messung mit D609 (100 μM, bilateral) und des sekretionsfördernden Signalmoleküls Adenosintriphosphat (ATP, 100 μM, luminal) zur Überprüfung der Vitalität des Gewebes. In Gegenwart von D609 führte die Applikation von ATP zu keinem transienten Anstieg des I_{sc} , während nach dem Auswaschen von D609 dieser wieder zu beobachten war.

3.3.4 Die Beteiligung von Ca²⁺-freisetzenden Ionenkanälen am ACh-Effekt

Es ist bekannt, dass die Stimulation der PLC_β die Produktion des *Second Messenger* IP₃ trigert (Bjarnadóttir et al. 2006). Der *Second Messenger* IP₃ diffundiert wiederum zum ER und aktiviert dort IP₃-Rezeptoren (IP₃R), eine große Familie von Ca²⁺-freisetzenden Ionenkanälen (Nixon et al. 1994). Eine Aktivierung der IP₃R bewirkt dann eine Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER und einen Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration (Nixon et al. 1994). Um zu

untersuchen, ob die IP₃R am luminalen ACh-Effekt beteiligt sind, wurde der IP₃R-Inhibitor 2-APB (Maruyama et al. 1997) verwendet.

Die Inkubation mit 2-APB (100 µM, luminal) führte zunächst zu einem signifikanten Abfall des I_{SC} (von 87,4 ± 16,3 µA/cm² auf 32,4 ± 4,4 µA/cm²; gepaarter t-Test, P < 0,01; n = 9). Nach Erreichen eines Stromplateaus wurde auf der luminalen Seite ACh (200 µM) hinzugefügt und der ΔI_{ACh} bestimmt (**Abb. 21B**). Der ΔI_{ACh} in Gegenwart von 2-APB wurde mit dem ΔI_{ACh} unter Kontrollbedingungen (ohne 2-APB; **Abb. 21A**) verglichen. Die statistische Auswertung der ACh-Effekte ergab keinen signifikanten Unterschied (ohne 2-APB: 12,9 ± 2,7 µA/cm², n = 9; mit 2-APB: 8,5 ± 1,1 µA/cm², n = 9; ungepaarter t-Test, P = 0,155; **Abb. 21C**). Ein Nachweis einer Beteiligung von IP₃R am luminalen ACh-Effekt konnte anhand dieser Experimente nicht erbracht werden.

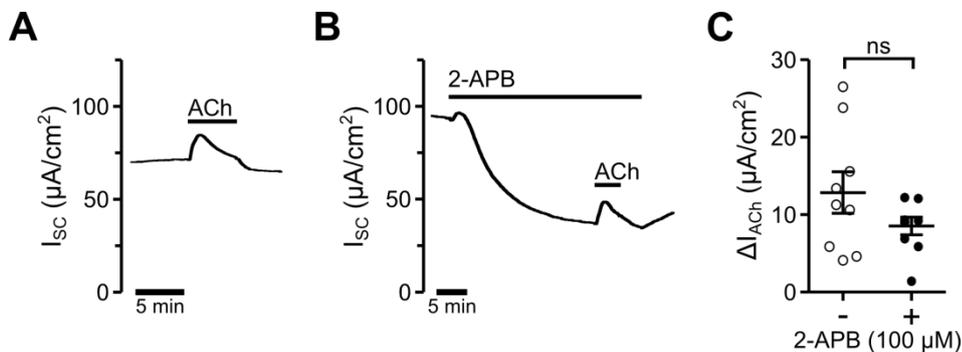


Abb. 21. IP₃-Rezeptoren sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.

A, B: ACh-Effekt (200 µM, luminal) in Abwesenheit und Anwesenheit des IP₃-Rezeptor-Inhibitors 2-APB (100 µM, luminal). **C:** Der ACh-Effekt (ΔI_{ACh}) war in Anwesenheit von 2-APB (+) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ohne 2-APB (-) nicht signifikant verändert (ungepaarter t-Test, ns: P = 0,155, beide n = 9).

In den nachfolgenden Experimenten wurde die Effektivität des verwendeten IP₃R-Inhibitors 2-APB getestet. Es ist bekannt, dass die luminal Applikation von ATP auf Atemwegsepithelzellen eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration induziert, die auf einer Aktivierung von IP₃R beruht (Lazarowski et al. 2011a; Lazarowski et al. 2011b). Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob der Effekt von ATP in Gegenwart von luminalem 2-APB (100 µM) reduziert wird. In den Kontrollmessungen (ohne 2-APB) erhöhte die Applikation von ATP (100 µM, luminal) den I_{SC} signifikant (vor ATP: 91,5 ± 18,0 µA/cm²; mit ATP: 122,6 ± 25,9 µA/cm²; gepaarter t-Test, P < 0,05; n = 7; **Abb. 22A**). Wurden die Experimente in Anwesenheit von 2-APB durchgeführt, so führte die Applikation von ATP (100 µM, luminal) ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg des I_{SC} (vor ATP: 27,8 ± 4,8 µA/cm²; mit ATP: 33,9 ± 4,9 µA/cm²; gepaarter t-Test, P < 0,01; n = 7; **Abb. 22B**). Der Vergleich der ATP-induzierten Stromanstiege (ΔI_{ATP}) zeigte jedoch, dass der ΔI_{ATP} in Gegenwart von 2-APB

signifikant reduziert war (ohne 2-APB: $31,1 \pm 9,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 7$; mit 2-APB: $6,1 \pm 1,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 7$; Mann-Whitney U-Test, $P < 0,01$; **Abb. 22C**). Anhand dieser Ergebnisse konnte die Effektivität von 2-APB als Inhibitor für die IP_3R bestätigt werden.

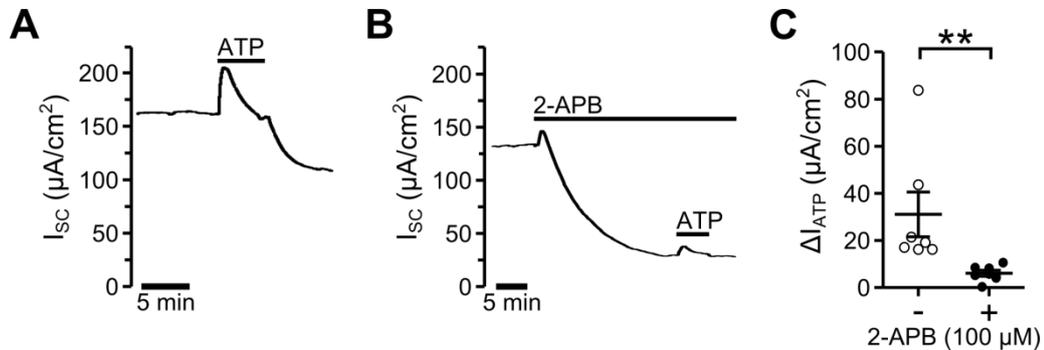


Abb. 22. IP_3 -Rezeptoren sind am ATP-induzierten Anstieg des I_{sc} beteiligt.

A, B: Luminale Applikation von Adenosintriphosphat (ATP, $100 \mu\text{M}$) in Abwesenheit und Anwesenheit des IP_3 -Rezeptor-Inhibitors 2-APB ($100 \mu\text{M}$, luminal). **C:** Der ATP-induzierte Stromanstieg (ΔI_{ATP}) war in Anwesenheit (+) von 2-APB zu den Kontrollbedingungen ohne 2-APB (-) signifikant reduziert (Mann-Whitney U-Test. **: $P < 0,01$, beide $n = 7$).

Eine weitere Familie Ca^{2+} -freisetzender Ionenkanäle sind die Ryanodin-Rezeptoren (RyR). Die RyR können schnell und effektiv Ca^{2+} aus dem ER freisetzen (Zorzato et al. 1990) und kommen ubiquitär vor allem im sarkoplasmatischen Retikulum der Skelettmuskulatur vor (Lanner et al. 2010; Giannini et al. 1995; Kuwajima et al. 1992). Die RyR wurden zudem in unterschiedlichen Epithelien, wie im Colon von Ratten (Prinz und Diener 2008) und im Trachealepithel von Schweinen (Kim et al. 1997) nachgewiesen. Eine Funktion der RyR für eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER im Atemwegsepithel ist jedoch nicht eindeutig belegt.

Um eine Beteiligung der RyR am ACh-Effekt zu untersuchen, wurde der RyR-Inhibitor Rutheniumrot verwendet (Ozawa 2001; van de Put et al. 1993). In den Untersuchungen wurde der ACh-Effekt ($200 \mu\text{M}$, luminal) unter Kontrollbedingungen (ohne Rutheniumrot) sowie in Anwesenheit von Rutheniumrot ($50 \mu\text{M}$, bilateral) bestimmt (**Abb. 23A&B**). Der statistische Vergleich der ACh-Effekte ergab aber keinen signifikanten Unterschied (ohne Rutheniumrot: $8,6 \pm 2,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; $n = 6$; mit Rutheniumrot: $11,0 \pm 3,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 6$; ungepaarter t-Test, $P = 0,581$; **Abb. 23C**). Demzufolge konnte eine Beteiligung der RyR am luminalen ACh-Effekt nicht nachgewiesen werden.

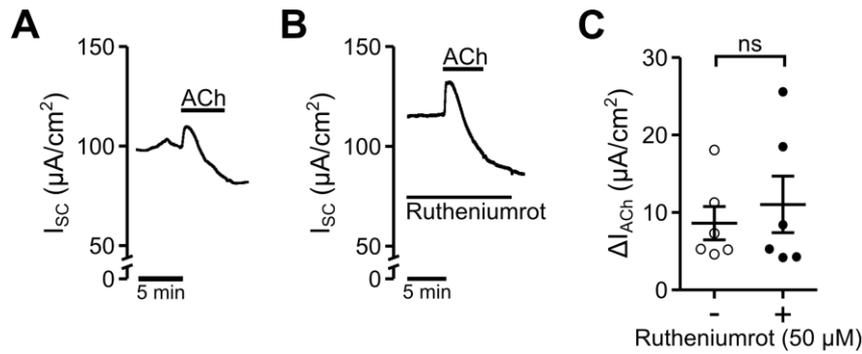


Abb. 23. Ryanodin-Rezeptoren sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.

A, B: ACh-Effekt (200 μM , luminal) in Abwesenheit und Anwesenheit des RyR-Rezeptor-Inhibitors Rutheniumrot (50 μM , bilateral). **C:** Der ACh-Effekt (ΔI_{ACh}) war in Anwesenheit (+) von Rutheniumrot im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ohne Rutheniumrot (-) nicht signifikant unterschiedlich (ungepaarter t-Test, ns: $P = 0,581$, beide $n = 6$).

3.3.5 Die Beteiligung eines cAMP-abhängigen Signalwegs am ACh-Effekt

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können außer der $\text{PLC}\beta$ auch Adenylylcyclasen stimulieren, die den *Second Messenger* zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat (cAMP) aus ATP katalysieren (Pierce et al. 2002). Die Signaltransduktion über den *Second Messenger* cAMP aktiviert ihrerseits wiederum verschiedene Signalwege. So ist die Aktivität der Proteinkinase A, die u. a. Ionenkanäle durch eine Phosphorylierung stimuliert, von der cAMP-Konzentration abhängig (Cooper 2003). Daher wurde die Möglichkeit untersucht, ob ein cAMP-abhängiger Signalweg am ACh-Effekt beteiligt sein könnte. Hierzu wurden die Trachealpräparate mit MDL-12330A (MDL), einem zellpermeablen und irreversiblen Inhibitor von Adenylylcyclasen (Urbach und Harvey 2001), inkubiert (**Abb. 24A-C**). Die Inkubation mit MDL (50 μM , luminal) führte zunächst zu einem Abfall des I_{SC} (**Abb. 24B**). Nach Erreichen eines Stromplateaus wurde auf der luminalen Seite ACh (100 μM) hinzugefügt (**Abb. 24B**). Der ACh-Effekt (ΔI_{ACh}) in Gegenwart von MDL wurde mit dem ΔI_{ACh} unter Kontrollbedingungen (ohne MDL; **Abb. 24A**) verglichen. Die statistische Auswertung der ACh-Effekte ergab keinen signifikanten Unterschied (ohne MDL: $8,4 \pm 2,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 4$; mit MDL: $10,1 \pm 2,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 4$; Mann-Whitney U-Test, $P = 0,886$; **Abb. 24C**). Demzufolge scheinen cAMP-katalysierende Adenylylcyclasen nicht am luminalen ACh-Effekt beteiligt zu sein.

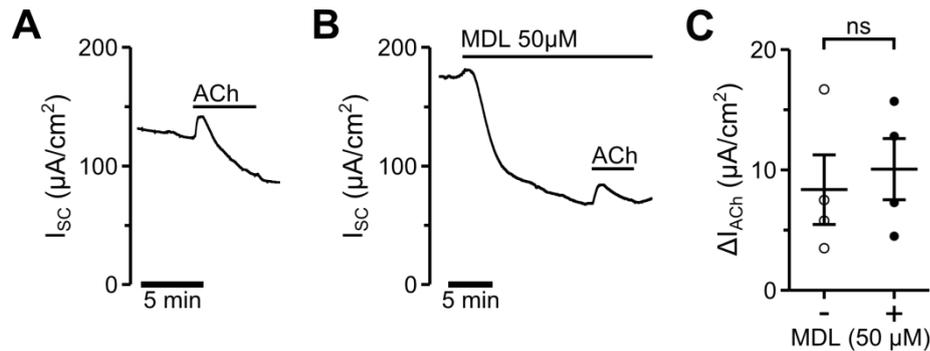


Abb. 24. Adenylylcyclasen sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.

A, B: ACh-Effekt (100 μM , luminal) ohne und in Gegenwart des Adenylylcyclasen-Inhibitors MDL-12330A (MDL; 50 μM , luminal). **C:** Der ACh-Effekt (ΔI_{ACh}) war in Gegenwart von MDL (+) im Vergleich zu den Kontrollbedingungen ohne MDL (-) nicht signifikant verändert (Mann-Whitney U-Test, ns: $P = 0,886$, beide $n = 4$).

3.4 Beteiligung von Ionenkanälen am luminalem ACh-Effekt

Der in dieser Arbeit detektierte ACh-vermittelte Anstieg des I_{sc} könnte prinzipiell auf eine Sekretion von Cl^- auf die luminal Seite, eine Resorption von Na^+ auf die basolaterale Seite sowie eine Sekretion von K^+ auf die basolaterale Seite des Epithels zurückzuführen sein. Im Folgenden wurde im Schweinetrachealepithel eine Beteiligung von luminalen Cl^- und Na^+ -Ionenkanälen sowie von basolateralen K^+ -Ionenkanälen am ACh-Effekt untersucht.

3.4.1 Die Beteiligung von Na^+ -resorbierenden Ionenkanälen

Der epitheliale Natrium-Kanal (ENaC) spielt in der apikalen Membran von Atemwegsepithelien durch die Absorption von Na^+ eine große Rolle für die Flüssigkeitshomöostase (Althaus 2013; Garty und Palmer 1997). Um zu überprüfen, ob der ENaC am ACh-Effekt beteiligt ist, wurde der ENaC-Kanalblocker Amilorid appliziert (Garty und Palmer 1997).

Die luminal Applikation von Amilorid (10 μM) führte zu einem sofortigen Abfall des I_{sc} (von $119,1 \pm 10,8 \mu A/cm^2$ auf $38,4 \pm 3,9 \mu A/cm^2$, gepaarter t-Test, $P < 0,001$; $n = 11$; **Abb. 25B**). Die anschließende Applikation von ACh (100 μM , luminal) induzierte einen transienten Anstieg des I_{sc} (vor ACh: $38,4 \pm 3,9 \mu A/cm^2$; mit ACh: $53,3 \pm 4,7 \mu A/cm^2$; gepaarter t-Test, $P < 0,001$, $n = 11$; **Abb. 25B**). Ein Vergleich der ACh-Effekte in Gegenwart von Amilorid mit Kontroll-ACh-Effekten ohne Amilorid (von anderen Trachealpräparationen/Donoren; **Abb. 25A**) zeigte keine signifikanten Unterschiede (ohne Amilorid: $13,0 \pm 1,7 \mu A/cm^2$, $n = 11$; mit Amilorid: $14,9 \pm 1,7 \mu A/cm^2$, $n = 11$; ungepaarter t-Test, $P = 0,656$; **Abb. 25C**). Anhand dieser Ergebnisse konnte eine Beteiligung des ENaC am ACh-Effekt ausgeschlossen werden.

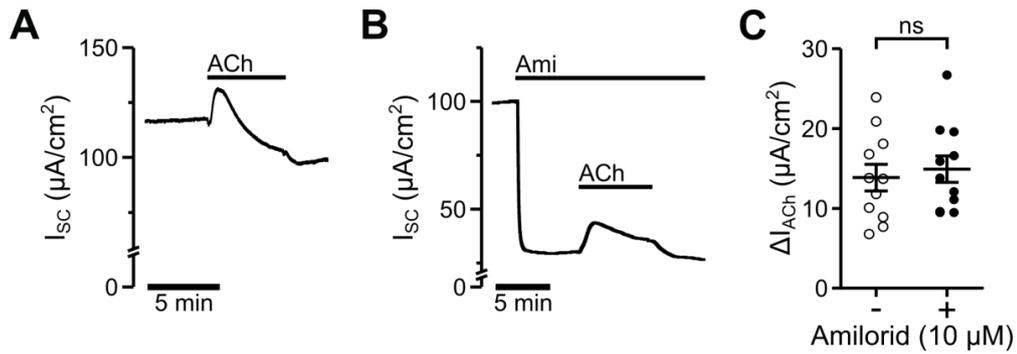


Abb. 25. Der ENaC ist nicht am ACh-Effekt beteiligt.

A, B: Der ACh-Effekt (100 μM, luminal) ohne und in Gegenwart des ENaC-Kanalblocker Amilorid (Ami, 10 μM, luminal). Die Applikation von Ami verursachte einen rapiden Abfall des I_{sc} . **C:** Der ACh-vermittelte Stromanstieg (ΔI_{ACh}) ohne Amilorid (-) unterschied sich nicht signifikant zu dem ΔI_{ACh} in Gegenwart von Amilorid (+) (ungepaarter t-Test, ns: $P = 0,656$, beide $n = 11$). Die verwendeten Trachealpräparate in den Experimenten aus A und B stammten von unterschiedlichen Tracheen/Donoren.

Andere Na^+ -resorbierende Ionenkanäle wie die apikal lokalisierten zyklischen Nukleotid-gesteuerten Kationenkanäle (*cyclic nucleotide-gated cation channels*, CNG) könnten auch für eine Na^+ -Resorption im Atemwegsepithel verantwortlich sein (Schwiebert et al. 1997; Hollenhorst et al. 2011). Nachfolgend wurde überprüft, ob Na^+ -resorbierende Ionenkanäle am luminalen ACh-Effekt beteiligt sind. Für diese Untersuchungen wurde auf der luminalen Seite des Epithels Na^+ durch N-Methyl-D-Glukamin ($NMDG^+$) in der Ringerlösung ausgetauscht (siehe **Tab. 1**). $NMDG^+$ verhält sich osmotisch wie Na^+ -Ionen, kann aber aufgrund seiner Größe nicht durch Na^+ -resorbierende Kanäle diffundieren (Wang et al. 2009; Edinger et al. 2012). Durch die luminal Entfernung von Na^+ kann die Beteiligung von Na^+ -leitenden Ionenkanälen am ACh-Effekt untersucht werden.

ACh (100 μM, luminal) wurde in Anwesenheit und Abwesenheit des $NMDG^+$ -Ringers (luminal) appliziert (**Abb. 26A&B**). Bei den Experimenten in Abwesenheit von $NMDG^+$ wurde ACh in Gegenwart von Amilorid (luminal, 10 μM) appliziert. Der Vergleich der ACh-Effekte (ΔI_{ACh}) mit und ohne $NMDG^+$ ergab keinen signifikanten Unterschied (ohne $NMDG^+$: $7,0 \pm 2,1 \mu A/cm^2$, $n = 5$; mit $NMDG^+$: $8,5 \pm 2,5 \mu A/cm^2$, $n = 5$; ungepaarter t-Test, $P = 0,671$; **Abb. 26C**). Demnach ist der luminal ACh-Effekt nicht auf eine Resorption von Na^+ zurückzuführen.

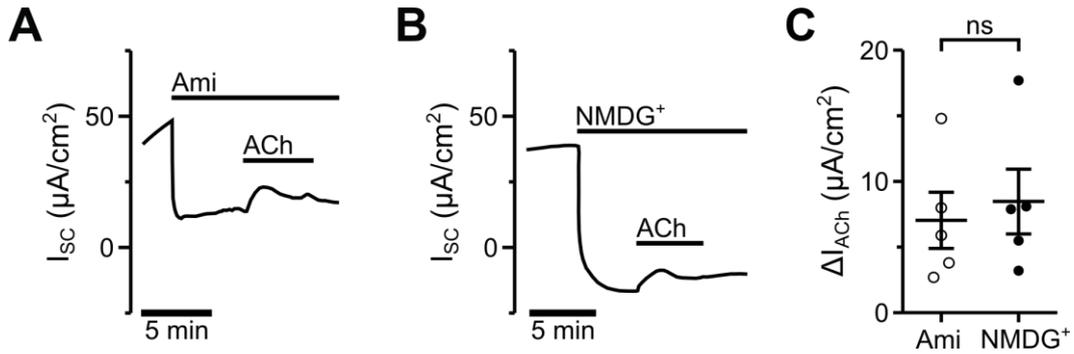


Abb. 26. Na⁺-resorbierende Ionenkanäle sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.

A: Der ACh-Effekt (100 μM , luminal) unter Kontrollbedingungen (ohne NMDG⁺). Die luminal Applikation des ENaC-Kanalblockers Amilorid (Ami, 10 μM) verursachte einen rapiden Abfall des I_{sc} . Nach Erreichen eines Plateaus induzierte die anschließende Applikation von ACh einen Anstieg des I_{sc} . **B:** Der ACh-Effekt (100 μM , luminal) in Gegenwart von NMDG⁺. Die luminal Applikation von NMDG⁺ verursachte einen rapiden Abfall des I_{sc} . Nach Erreichen eines Plateaus induzierte die anschließende Applikation von ACh einen Anstieg des I_{sc} . **C:** Die ACh-Effekte (ΔI_{ACh}) in Anwesenheit von Amilorid (Ami) waren im Vergleich zu den ΔI_{ACh} in Anwesenheit von NMDG⁺ nicht signifikant verschieden (ungepaarter t-Test, ns: $P = 0,671$, beide $n = 5$).

3.4.2 Die Beteiligung von Cl⁻ sekretierenden Ionenkanälen

Die Beteiligung des CFTR am ACh-Effekt

Zunächst wurde die Funktion des CFTR in den Trachealpräparaten verifiziert, dessen Aktivierung über eine Phosphorylierung durch cAMP-abhängige Proteinkinasen und über eine intrazelluläre ATP-Bindestelle erfolgt (Moran 2010; Gadsby und Nairn 1999; Sheppard und Welsh 1999). Zur Stimulation der CFTR-Aktivität wurde die cAMP-Konzentration mit den sekretionsfördernden Pharmaka IBMX und Forskolin (I/F, 100/10 μM) erhöht (Schultz et al. 1999) und zur anschließenden Bestimmung der CFTR-Aktivität der selektive CFTR-Kanalblocker GlyH 101 (GlyH, 50 μM) verwendet (Melis et al. 2014; Muanprasat et al. 2004). Alle Experimente fanden zudem in Gegenwart von Amilorid (Ami, 10 μM) statt.

Die luminal Applikation von I/F führte zu einem Anstieg des I_{sc} und nach Erreichen eines Stromplateaus verursachte die luminal Zugabe von GlyH einen Abfall des I_{sc} (**Abb. 27A**). Parallel wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Applikationsreihenfolge von I/F und GlyH gewechselt wurde. Hier reduzierte die luminal Applikation von GlyH den I_{sc} und die darauffolgende luminal Gabe von I/F führte zu einem Anstieg des I_{sc} (**Abb. 27B**). Zur Bestimmung der Aktivität des CFTR wurden der I/F-induzierte Stromanstieg ($\Delta I_{I/F}$) mit und ohne GlyH sowie der GlyH-induzierte Stromabfall (ΔI_{GlyH}) mit und ohne I/F verglichen (**Abb. 27C&D**). Dabei stellte sich heraus, dass der $\Delta I_{I/F}$ durch GlyH signifikant reduziert wurde (ohne GlyH: $32,4 \pm 6,4 \mu A/cm^2$, $n = 6$; mit GlyH: $13,1 \pm 3,7 \mu A/cm^2$, $n = 6$; ungepaarter t-Test, $P < 0,05$; **Abb. 27C**) und der ΔI_{GlyH} in Gegenwart von I/F signifikant erhöht war (ohne I/F: $3,7 \pm 1,3 \mu A/cm^2$, $n = 6$; mit I/F: $14,1 \pm 3,4 \mu A/cm^2$, $n = 6$; ungepaarter t-Test, $P < 0,05$;

Abb. 27D). Die Daten weisen darauf hin, dass (1) der CFTR in der luminalen Membran vorhanden ist, (2) die Aktivität des CFTR unter basalen, nicht sekretionsfördernden Bedingungen relativ gering ist und (3) durch sekretionsfördernde Pharmaka die Aktivität des CFTR gesteigert werden kann.

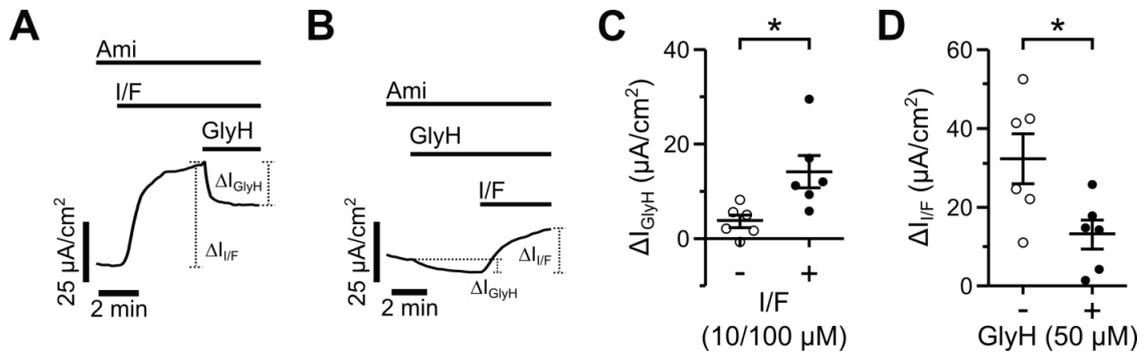


Abb. 27. Der CFTR ist in der Schweinetrachea vorhanden und aktivierbar.

Alle Experimente wurden in Gegenwart von Amilorid (Ami, 10 μM , luminal) durchgeführt. **A, B:** Um eine Erhöhung der cAMP-Konzentration und damit einhergehend eine Aktivierung des CFTR zu bewirken, wurde IBMX/Forskolin (I/F, 100/10 μM , luminal) appliziert. Die Ermittlung der CFTR-Aktivität erfolgte durch eine Applikation des CFTR-Kanalblockers GlyH-101 (GlyH, 50 μM , luminal). Die I/F-sensitiven Ströme ($\Delta I_{I/F}$) und GlyH-sensitiven Ströme (ΔI_{GlyH}) wurden in den Stromkurven markiert. **C:** Die GlyH-sensitiven Ströme (ΔI_{GlyH}) waren in Gegenwart von I/F (+) signifikant erhöht im Vergleich zu ohne I/F (-) (ungepaarter t-Test, *: $P < 0,05$; $n = 6$). **D:** Ebenso waren die I/F-induzierten Ströme ($\Delta I_{I/F}$) in Gegenwart von GlyH (+) signifikant reduziert im Vergleich zu ohne GlyH (-) (ungepaarter t-Test, *: $P < 0,05$; $n = 6$). Verändert nach (Dittrich et al. 2015).

Nachdem der CFTR in der Schweinetrachea funktionell nachgewiesen werden konnte, wurde eine Beteiligung des CFTR am luminalen ACh-Effekt untersucht. Zu diesem Zweck wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Aktivität des CFTR in Abhängigkeit von luminalem ACh untersucht wurde. Bei all diesen Experimenten war Amilorid (10 μM , luminal) anwesend. Zuerst wurde der ACh-Effekt mit und ohne GlyH bestimmt (**Abb. 28A&B**). Dabei konnte beim Vergleich der ACh-Effekte (ΔI_{ACh}) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (ohne GlyH: $11,3 \pm 2,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 5$; mit GlyH: $10,1 \pm 2,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 5$; ungepaarter t-Test, $P = 0,711$; **Abb. 28C**). In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob durch die Anwesenheit von luminalem ACh (100 μM) die Aktivität des CFTR beeinflusst wird. Hierzu wurden nacheinander I/F (100/10 μM , luminal) und GlyH (50 μM , luminal) in Abwesenheit und Anwesenheit von ACh appliziert (**Abb. 28D&E**). Die I/F- und dann GlyH-abhängigen Veränderungen des Stroms (ΔI_{SC}) wurden anschließend miteinander verglichen (**Abb. 28C**). Dabei konnte weder in Abwesenheit von ACh noch in Gegenwart von ACh ein signifikanter Unterschied im ΔI_{SC} bei den Applikationen von I/F (ohne ACh: $54,1 \pm 5,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 6$; mit ACh: $47,2 \pm 6,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 6$; ungepaarter t-Test, $P = 0,419$) und GlyH (ohne ACh: $-38,0 \pm$

5,3 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 6$; mit ACh: $-34,3 \pm 5,9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 6$; ungepaarter t-Test, $P = 0,648$) festgestellt werden (**Abb. 28F**).

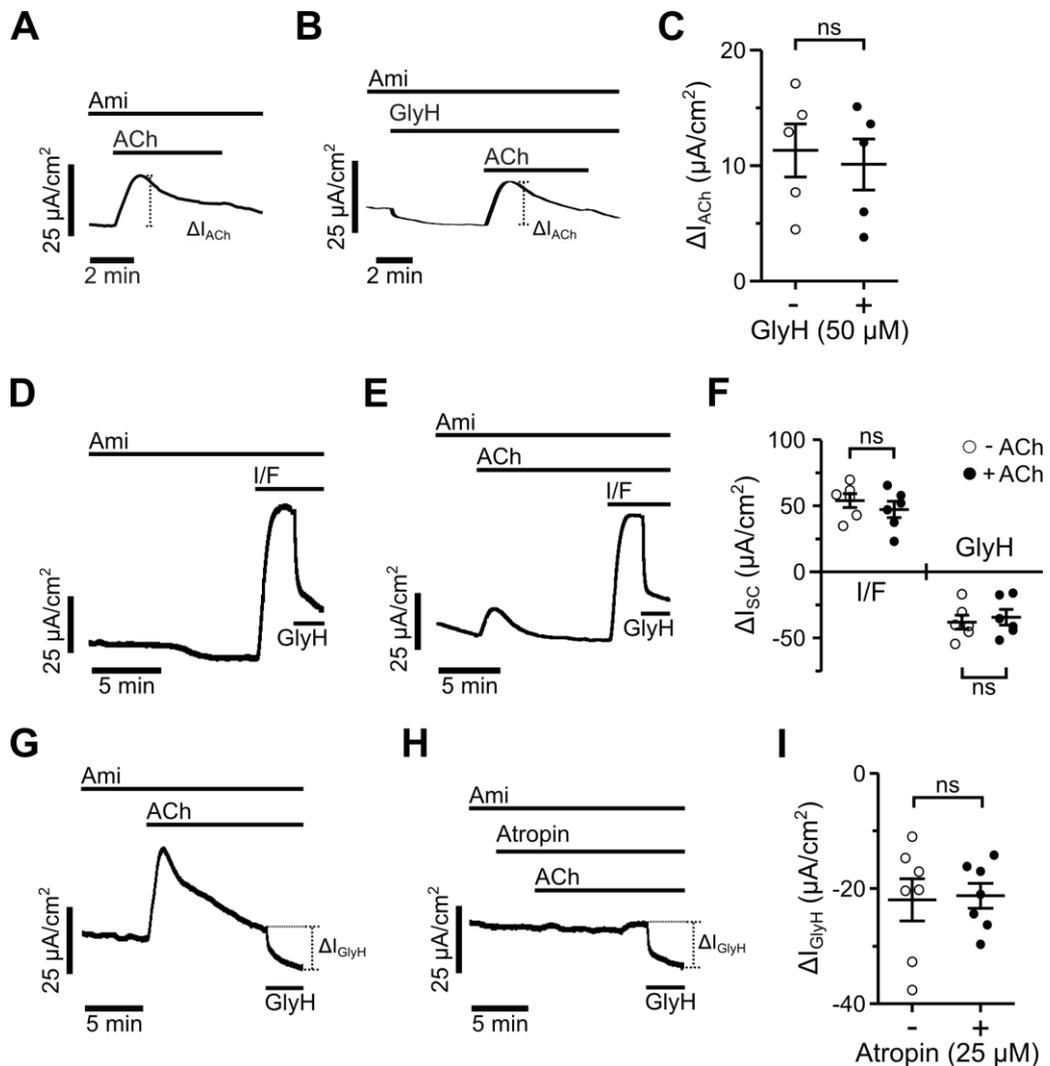


Abb. 28. Der CFTR ist nicht am ACh Effekt beteiligt.

Alle Experimente wurden in Gegenwart von Amilorid (Ami, 10 μM , luminal) durchgeführt. **A, B:** Die Applikation von ACh (100 μM , luminal) induzierte in Abwesenheit und Anwesenheit des CFTR-Kanalblockers GlyH-101 (GlyH, 50 μM) einen Anstieg des I_{sc} (ΔI_{ACh}). **C:** Der ΔI_{ACh} aus den in A und B dargestellten Experimenten war in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (+) von GlyH nicht signifikant verändert (ungepaarter t-Test, ns: $P = 0,711$; beide $n = 5$). **D&E:** In Abwesenheit und Anwesenheit von ACh (100 μM , luminal) erhöhte die Applikation von IBMX/Forskolin (I/F, 100/10 μM , luminal) den I_{sc} und die darauffolgende Gabe von GlyH (50 μM , luminal) reduzierte den I_{sc} . **F:** Beim Vergleich der I/F- und GlyH-induzierten Ströme (ΔI_{sc}) konnten in Abwesenheit (weiße Kreise, $n = 6$) und in Anwesenheit von ACh (schwarze Kreise, $n = 6$) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (I/F: ns: $P = 0,419$; GlyH: ns: $P = 0,648$; beide ungepaarter t-Test). **G&H:** Die GlyH-sensitiven Ströme (ΔI_{GlyH}) wurden nach einer Stimulation mit ACh allein und nach einer Stimulation mit ACh in Gegenwart von Atropin (25 μM , luminal) bestimmt. In Gegenwart von Atropin (H) war der ACh-Effekt vollständig inhibiert. **I:** Der ΔI_{GlyH} war ohne (-) und mit (+) Atropin nicht signifikant verändert (ungepaarter t-Test, ns: $P = 0,872$; beide $n = 7$). Verändert nach (Dittrich et al. 2015).

Zudem wurde eine Bestimmung der GlyH-sensitiven Ströme (ΔI_{GlyH}) nach einer Stimulation mit ACh allein (**Abb. 28G**) und nach einer Stimulation mit ACh in Gegenwart von Atropin (25 μM , luminal) durchgeführt (**Abb. 28H**). Weil ACh eine Aktivierung von mAChR bewirkt, sollte bei einem möglichen Link dieser Rezeptoren zum CFTR der ΔI_{GlyH} in Gegenwart von Atropin verändert sein. Der ΔI_{GlyH} war jedoch ohne und mit Atropin nicht signifikant verändert (ohne Atropin: $-22,0 \pm 3,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 7$; mit Atropin: $-21,3 \pm 2,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 7$; ungepaarter t-Test, $P = 0,872$; **Abb. 28I**). Zu beachten ist, dass der ACh-Effekt in Gegenwart von Atropin vollständig inhibiert war und demnach keine Stimulation von mAChR durch ACh stattfand (**Abb. 28G**), während bei den Messungen ohne Atropin ein ACh-Effekt stattfand (**Abb. 28H**). Demnach konnte keine Regulation des CFTR durch eine Stimulation von mAChR mit luminalem ACh nachgewiesen werden.

Die Beteiligung von CaCC am ACh-Effekt

Die Aktivität von CaCC wird hauptsächlich über die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reguliert (Tian et al. 2012; Kunzelmann et al. 2012; Hartzell et al. 2005). Zum funktionellen Nachweis der CaCC in der Schweinetrachea wurde daher luminal ATP appliziert, da – wie zuvor erwähnt (siehe 3.3.4 Die Beteiligung von Ca^{2+} -freisetzenden Ionenkanälen am ACh-Effekt) – die luminal Applikation von ATP eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induziert. Zum Nachweis der CaCC-Aktivität wurde Tanninsäure (*tannic acid*, TA) verwendet. TA ist ein pflanzlicher Gerbstoff, der in Rotwein und grünem Tee enthalten ist und die Cl^- -Sekretion über alle CaCC-Subtypen inhibiert (Namkung et al. 2011; Namkung et al. 2010).

In den Kontrollmessungen erhöhte die luminal Applikation von ATP (100 μM) den I_{SC} transient (von $14,4 \pm 6,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $49,9 \pm 15,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t-Test, $P < 0,05$; $n = 6$; **Abb. 29A**). Als nächstes wurde ATP (100 μM , luminal) in Gegenwart des selektiven CaCC-Kanalblockers TA (100 μM , luminal) appliziert (**Abb. 29B**). In Gegenwart von TA induzierte die Applikation von ATP nur noch einen geringen Anstieg des I_{SC} (von $11,3 \pm 2,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $13,9 \pm ,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; gepaarter t-Test, $P < 0,01$; $n = 6$; **Abb. 29B**). Die statistische Analyse der ATP-induzierten Ströme (ΔI_{ATP}) zeigte, dass in Gegenwart von TA der ΔI_{ATP} signifikant reduziert war (ohne TA: $35,6 \pm 9,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 6$; mit TA: $2,7 \pm 0,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 6$; ungepaarter t-Test, $P < 0,01$; **Abb. 29C**). Nach diesen Ergebnissen stimuliert die luminal Applikation von ATP eine Aktivierung von CaCC in der Schweinetrachea.

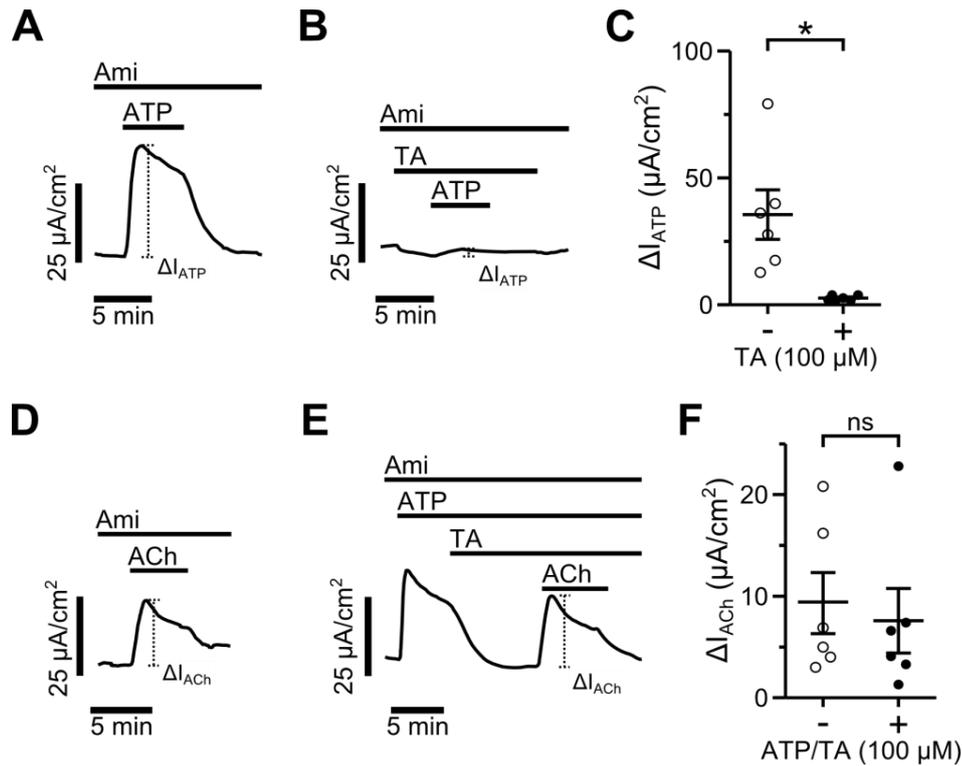


Abb. 29. CaCC sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.

Alle Experimente wurden in Gegenwart von Amilorid (Ami, 10 μM , luminal) durchgeführt. ATP, der CaCC-Kanalblocker Tanninsäure (TA, 100 μM) und ACh (100 μM) wurden auf die luminal Seite appliziert. **A&B:** Die Applikation von ATP in Abwesenheit und Anwesenheit des CaCC-Kanalblockers TA. Die Applikation von ATP erhöhte den I_{SC} in Abwesenheit von TA transient. In Gegenwart von TA führte die Applikation von ATP zu keiner Änderung des I_{SC} . **C:** Vergleich der ATP-induzierten Ströme (ΔI_{ATP}) aus den in A und B dargestellten Experimenten. Der ΔI_{ATP} war in Gegenwart von TA (+) im Vergleich zu den Kontrollen ohne TA (-) signifikant reduziert (ungepaarter t-Test, *: $P < 0,01$; beide $n = 6$). **D, E:** Die Applikation von ACh in Abwesenheit und Anwesenheit von ATP und TA. Die Applikation von ACh erhöhte den I_{SC} transient (D). In Gegenwart von ATP und TA führte die Applikation von ACh (E) ebenfalls zu einem Anstieg des I_{SC} . **F:** Vergleich der ACh-induzierten Ströme (ΔI_{ACh}) aus den in A und B dargestellten Experimenten. In Abwesenheit (-) und Anwesenheit (+) von ATP und TA konnte kein signifikanter Unterschied im ΔI_{ACh} festgestellt werden (Mann-Whitney U-Test, ns: $P = 0,818$, beide $n = 6$).

Nachfolgend wurde überprüft, ob die CaCC am ACh-Effekt im Trachealepithel des Schweins beteiligt sind. In Kontrollmessungen (ohne ATP und TA) führte die Applikation von ACh (100 μM , luminal) zu einem typischen ACh-Effekt (**Abb. 29D**). Dieser ACh-Effekt wurde auch in Gegenwart von ATP und TA (beide 100 μM , luminal) beobachtet (**Abb. 29E**). Die ACh-induzierten Ströme (ΔI_{ACh}) waren dabei in Anwesenheit und Abwesenheit von ATP und TA nicht signifikant unterschiedlich (ohne ATP/TA: $9,3 \pm 3,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 6$; mit ATP/TA: $7,6 \pm 3,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 6$; Mann-Whitney U-Test, $P = 0,818$; **Abb. 29F**). Durch die Experimente konnte eine Beteiligung von CaCC am ACh-Effekt ausgeschlossen werden.

3.4.3 Die Beteiligung von basolateralen K⁺-Kanälen am ACh-Effekt

Um die Beteiligung von basolateralen K⁺-Kanälen am ACh-Effekt in der Schweinetrachea zu untersuchen, wurde die basolaterale K⁺-Leitfähigkeit durch die Anwesenheit eines Hoch-K⁺-Ringers (112,7 mM, basolateral, siehe **Tab. 1**) elektrisch ausgeschaltet. Zunächst führte die Applikation des Hoch-K⁺-Ringers zu einem rapiden Abfall des I_{SC}, der für eine Inhibition von basolateralen K⁺-Kanälen spricht. Nach Erreichen eines Plateaus induzierte die luminal Applikation von ACh (100 μM) nur noch einen geringen Anstieg des I_{SC} (**Abb. 30B**). In parallel durchgeführten Kontrollmessungen in Anwesenheit des Schweine-Ringer (bilateral) wurde ebenfalls der ACh-Effekt bestimmt (**Abb. 30A**). Der Vergleich der ACh-Effekte (ΔI_{ACh}) zeigte, dass der ΔI_{ACh} in Anwesenheit des basolateralen Hoch-K⁺-Ringers signifikant reduziert war (ohne Hoch-K⁺: $8,8 \pm 1,6 \mu A/cm^2$, n = 5; mit Hoch-K⁺: $1,0 \pm 1,7 \mu A/cm^2$, n = 5; ungepaarter t-Test, P < 0,05; **Abb. 30C**). Die Beteiligung einer basolateralen K⁺-Leitfähigkeit am ACh-Effekt konnte anhand dieser Experimente bestätigt werden.

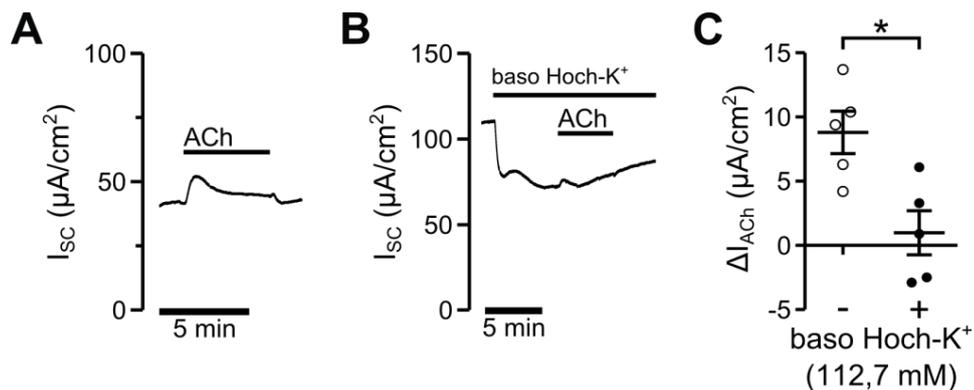


Abb. 30. Eine basolaterale K⁺-Leitfähigkeit ist am ACh-Effekt beteiligt.

A: ACh-Effekt (100 μM, luminal) in Anwesenheit des Schweine-Ringers (bilateral). **B:** ACh-Effekt (100 μM, luminal) in Gegenwart eines Hoch-K⁺-Ringers (112,7 mM, basolateral). Die basolaterale Applikation des Hoch-K⁺-Ringers verursachte einen Abfall des I_{SC}. Nach dem Erreichen eines Plateaus induzierte die Applikation von ACh einen geringen Anstieg des I_{SC}. **C:** Vergleich der ACh-Effekte (ΔI_{ACh}) in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (+) des Hoch-K⁺-Ringers. In Gegenwart des Hoch-K⁺-Ringers war der ACh-Effekt signifikant reduziert (ungepaarter t-Test, *P < 0,01, beide n = 5).

Als nächstes wurde versucht, die Identität der beteiligten K⁺-Kanäle am ACh-Effekt zu bestimmen. ACh wirkt über den M3AChR als ein Ca²⁺-erhöhender Agonist. Dies ist allgemein bekannt (Nakamura et al. 2013; Exton 1986), auch wenn in der vorliegenden Arbeit ein Nachweis hierfür nicht gelang (siehe 3.3 Ca²⁺-Abhängigkeit des luminalen ACh-Effekts). Um eine mögliche Beteiligung von Ca²⁺-aktivierten K⁺-Kanälen (K_{Ca}-Kanäle) am ACh-Effekt näher zu untersuchen, kam zunächst der allgemeine K⁺-Kanalblocker Ba²⁺ (appliziert als BaCl₂) zum Einsatz (Maguire et al. 1999). Für BaCl₂ konnte gezeigt werden, dass es neben

Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen auch cAMP-aktivierte K^+ -Kanäle inhibiert (Cowley und Linsdell 2002; Mall et al. 2000). Da Ba^{2+} als BaCl_2 vorlag und dies bei der eingesetzten Konzentration von 5 mM zu einer Erhöhung der Lösungsosmolarität führte, wurden die Trachealpräparate mit 15 mM Mannitol (basolateral) vorinkubiert. Die Gabe von BaCl_2 (5 mM, basolateral) führte zu einem Abfall des I_{SC} , der die Inhibition von basolateralen K^+ -Kanälen anzeigte. Die anschließende Applikation von ACh (100 μM , luminal) resultierte jedoch in einem Anstieg des I_{SC} (**Abb. 31B**). Der ermittelte ACh-Effekt in Gegenwart von BaCl_2 war dabei im Vergleich zum ACh-Effekt in den Kontrollexperimenten (ohne BaCl_2 ; **Abb. 31A**) nicht signifikant verändert (ohne BaCl_2 : $9,8 \pm 2,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 5$; mit BaCl_2 : $8,0 \pm 2,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $n = 5$; ungepaarter t-Test, $P = 0,611$; **Abb. 31C**).

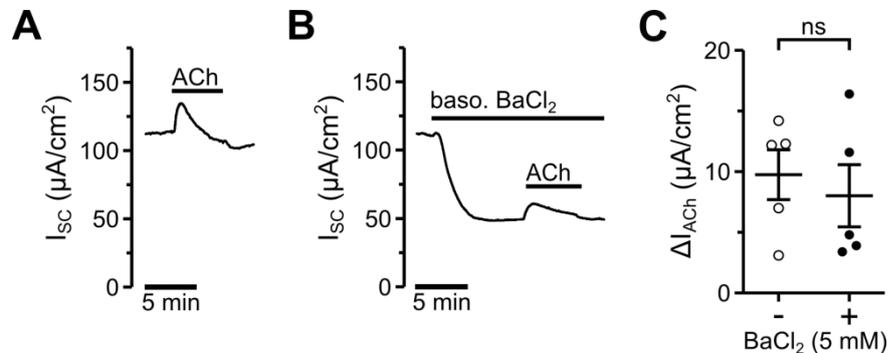


Abb. 31. Der K^+ -Kanalblocker Ba^{2+} hat keine Auswirkungen auf den ACh-Effekt.

A: Der ACh-Effekt (100 μM , luminal) unter Kontrollbedingungen (ohne BaCl_2). **B:** Der ACh-Effekt (100 μM , luminal) in Gegenwart von Ba^{2+} (appliziert als BaCl_2 ; 5 mM, basolateral). Die Applikation von BaCl_2 bewirkte einen Abfall des I_{SC} . Nach Erreichen eines Plateaus führte die Applikation von ACh zu einem Anstieg des I_{SC} . **C:** Vergleich der ACh-Effekte (ΔI_{ACh}) in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (+) von BaCl_2 . In Gegenwart von BaCl_2 war der ACh-Effekt nicht signifikant verändert (ungepaarter t-Test, ns: $P = 0,611$, beide $n = 5$). Die Messungen wurden unter Kontrollbedingungen (ohne BaCl_2) und in Anwesenheit von BaCl_2 mit basolateral 15 mM Mannitol vorinkubiert.

In weiteren Experimenten wurde versucht, mit selektiven Kanalblockern eine Beteiligung von K_{Ca} -Kanälen am ACh-Effekt zu identifizieren. Die K_{Ca} -Kanäle gehören zur K^+ -Kanal-Familie mit 6 Transmembran-Domänen (Cox 2005; Stocker 2004; Moczydlowski 2004; Magleby 2003; Lingle 2002) und werden im Menschen basierend auf ihrer Leitfähigkeit für K^+ wiederum in die Subklassen BK (*big conductance*)-, IK (*intermediate conductance*)- und SK (*small conductance*)-Kanäle eingeteilt (Wei et al. 2005).

Zur Untersuchung einer Beteiligung der BK-, IK- und SK-Kanäle am ACh-Effekt wurde eine Reihe bekannter und in ihrer Wirkung etablierter Kanalblocker verwendet (Alexander et al. 2013). Für die Inhibition des BK-Kanäle wurde ein Cocktail aus den Skorpion-Peptidtoxinen Iberiotoxin (IbTX, 100 nM) und Charybdotoxin (CTX, 100 nM) appliziert. Die IK-Kanäle

wurde jeweils mit dem Antimykotikum Clotrimazol (20 μM) und dem Clotrimazol-Analog TRAM 34 (10 μM) inhibiert. Die SK-Kanäle zeichnen sich durch ihre Sensitivität gegenüber dem Bienen-Peptidtoxin Apamin aus. Neben Apamin (1 μM) wurde auch noch der hoch potente Nicht-Peptid-Blocker UCL 1684 (10 μM) verwendet, um die SK-Kanäle zu blocken. Zudem befand sich vor und während der Applikation der Peptidtoxine (IbTX, CTX und Apamin) Bovines Serumalbumin (BSA, 1%) im basolateralen Schweine-Ringer, da die Anwesenheit von BSA die Wirkung der Peptidtoxine erhöht (Goebel-Stengel et al. 2011).

Letztendlich konnte bei allen Experimenten keine Veränderung des ACh-Effekts (100 μM , luminal) durch die basolaterale Anwesenheit der BK-, IK- und SK-Kanalblocker beobachtet werden (**Abb. 32**). Anhand dieser Ergebnisse konnte eine Beteiligung von basolateral lokalisierten BK-, IK- und SK-Kanälen am luminalen ACh-Effekt nicht bestätigt werden.

	Inhibitor	$\Delta I_{\text{ACh}} (\mu\text{A}/\text{cm}^2)$		P	n	T
		-	+			
BK-Kanäle	IbTX + CTX	11,7 \pm 5,1	9,4 \pm 2,1	0,682	6	a
IK-Kanäle	Clotrimazole	6,5 \pm 0,9	6,7 \pm 1,2	---	3	c
	TRAM34	11,6 \pm 1,1	12,4 \pm 2,5	---	3	c
SK-Kanäle	Apamin	12,0 \pm 4,3	13,2 \pm 4,3	0,701	7	b
	UCL1684	20,0 \pm 4,8	21,6 \pm 7,2	0,862	6	a

a = ungepaarter t-Test nach Student; b = Mann-Whitney U-Test; c = n zu gering, keine statistische Auswertung möglich

Abb. 32. Basolaterale K_{Ca} -Kanäle sind nicht am ACh-Effekt beteiligt.

Die Tabelle zeigt die Stromwerte der ACh-Effekte (ΔI_{ACh}) ohne (-) und mit den jeweiligen Kanalblockern (+) für die BK (*big conductance*), IK (*intermediate conductance*) und SK (*small conductance*)-Kanäle, mit den dazugehörigen Irrtumswahrscheinlichkeiten (P-Werte), der Anzahl der jeweiligen Experimente (n) und des verwendeten statistischen Tests (T). Die ACh-Effekte in Gegenwart der BK-, IK- und SK-Kanalblocker (+) waren zu den jeweiligen ACh-Effekten unter Kontrollbedingungen (ohne die Kanalblocker, -) nicht verändert. Die Trachealpräparate wurden vor der Gabe von ACh (100 μM , luminal) basolateral mindestens 15 min lang mit den Kanalblockern für die BK-, IK- und SK-Kanäle inkubiert. Iberitoxin (IbTX, 100 nM), Charybdotoxin (CTX, 100 nM), Clotrimazol (20 μM), TRAM 34 (10 μM), Apamin (1 μM), UCL 1684 (10 μM).

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Applikation von ACh auf die luminal Seite des Trachealepithels des Schweins induzierte eine Veränderung des transepithelialen Ionentransports, der aus einem transienten Anstieg des I_{sc} bestand (ACh-Effekt). Dieser ACh-Effekt wurde durch die luminal Applikation von muskarinergen Agonisten nachgeahmt, während nikotinerge Agonisten keine Veränderung

des I_{SC} induzierten. Bei einer genaueren Bestimmung der involvierten Subtypen mAChR wurde hauptsächlich eine Beteiligung des M3AChR am ACh-Effekt identifiziert.

Für die Ca^{2+} -Abhängigkeit des luminalen ACh-Effekts konnte ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum ausgeschlossen werden, während eine Beteiligung von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern unklar blieb. Es konnte jedoch ein Hinweis dafür erbracht werden, dass das G_q -Protein des M3AChR eine mögliche Kopplung mit der PLC_β eingeht. Eine direkte Beteiligung von putativ Ca^{2+} -freisetzenden Ionenkanälen des ER über den PLC_β/IP_3 -Signalweg konnte aber nicht nachgewiesen werden: der luminal ACh-Effekt war trotz einer Inhibition der IP_3R und der RyR unverändert. Ein cAMP-abhängiger Signalweg am ACh-Effekt konnte ausgeschlossen werden.

Bei den Ionenkanalleitfähigkeiten, die durch luminal appliziertes ACh reguliert werden, konnte eine Beteiligung apikaler Cl^- -Leitfähigkeiten durch den CFTR oder CaCC nicht nachgewiesen werden, dafür aber eine Korrelation mit einer basolateralen K^+ -Leitfähigkeit. Die am ACh-Effekt beteiligten K^+ -Kanäle konnten jedoch nicht genauer identifiziert werden.

4. Diskussion

4.1 Das Schwein als Untersuchungsmodell für den transepithelialen Ionentransport

In dieser Studie wurden isolierte Tracheen von Schweinen verwendet, die ein exzellentes Tiermodell für biomedizinische Untersuchungen darstellen, da Schweine und Menschen sowohl im Säuglings- als auch im Erwachsenenalter hinsichtlich ihrer Anatomie, Physiologie, Biochemie, Pathologie und Pharmakologie sehr ähnlich sind (Haworth und Hislop 1981). So sollen die Organe des Schweins, die aufgrund ihrer Größe, Form und Funktion sehr gut geeignet für den Menschen sind, in Zukunft durch die Xenotransplantation⁴ den chronischen Mangel an menschlichen Spenderorganen beheben (Cooper et al. 2016). Dies gilt auch für die Lunge des Schweins (Rogers et al. 2008a; Rogers et al. 2008b), die bereits für eine Xenotransplantation erprobt wurde (Kubicki et al. 2015).

In Bezug auf eine Untersuchung des transepithelialen Ionentransports in den proximalen Regionen der unteren Atemwege des Menschen eignet sich die Trachea von Schweinen besonders als Modell. Bei einem Vergleich der bioelektrischen Eigenschaften von *in vitro* trachealen Atemwegsepithelien aus dem Menschen, dem Schwein, der Maus und dem Frettchen konnten viele Übereinstimmungen zwischen dem Menschen und dem Schwein festgestellt werden (Liu et al. 2007). So zeigten das Schwein und der Mensch einen ähnlich starken Amilorid-sensitiven Na⁺-Transport. Der cAMP-sensitive Cl⁻-Transport fiel jedoch im Schwein wesentlich stärker aus (Liu et al. 2007). Dennoch konnten beim Schwein und Mensch viele Gemeinsamkeiten im cAMP-sensitiven Cl⁻-Transport gefunden werden (Liu et al. 2007).

Die überzeugendsten Beweise für die Ähnlichkeit des transepithelialen Ionentransports von Schweinen und Menschen kommen allerdings von kürzlich generierten CFTR-defizienten Schweinen (Rogers et al. 2008b). Diese wiesen nach der Geburt einen ähnlichen Defekt im Cl⁻-Transport mit dem dazugehörigen CF-Krankheitsverlauf auf wie er beim Menschen mit CF beobachtet wird (Rogers et al. 2008b). So wurden bei neugeborenen CF-Schweinen außer in der Lunge, auch im Darm, im Pankreas und der Leber dieselben Anomalitäten wie in vielen menschlichen CF-Patienten beobachtet (Rogers et al. 2008b). Des Weiteren konnte direkt nach der Geburt der CF-Schweine keine pathologischen CF-Symptome (Entzündungen und

⁴ Dies umfasst die Übertragung tierischer Zellen, Gewebe oder ganzer Organe auf den Menschen.

Mucus-Akkumulierung) in der Lunge entdeckt werden, was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass auch beim Menschen die CF-Symptome nicht direkt nach der Geburt, sondern erst nach einigen Monaten oder sogar erst Jahren auftreten (Rogers et al. 2008b). Dies wurde dann in einer weiteren Studie bestätigt, die zeigte, dass CF-Schweine innerhalb der ersten Monate nach der Geburt damit beginnen, eine CF-typische Lungenerkrankung auszubilden (Stoltz et al. 2010). Interessanterweise wurde dabei festgestellt, dass die Lungen der CF-Schweine direkt nach der Geburt weniger steril waren als die Wildtyp-Kontrollen: Die mukoziliäre Clearance in den CF-Schweinen war also bereits nach der Geburt von Beginn an gestört, obwohl noch keine pathologischen CF-Symptome vorlagen (Stoltz et al. 2010). Die Ergebnisse von Stoltz et al. 2010 bekräftigen damit die Theorie, dass durch die Störung der mukoziliären Clearance, die Bakterien nicht ausreichend aus der Lunge gereinigt werden können und dass diese Bakterienansiedlung für die Auslösung der Entzündungen und Mucus-Akkumulierung in den Atemwegen verantwortlich ist. Insgesamt kann das Schwein, nativ oder gentechnisch verändert, als ein probates Modell zur Untersuchung des transepithelialen Ionentransports und der Untersuchung der Störungen der mukoziliären Clearance in CF angesehen werden. Dazu ist ein weiterer Vorteil der Schweinetrachea ihre Größe, die eine leichte Präparation des Trachealgewebes mit entsprechend großen Trachealpräparaten erlaubt. Diese können unkompliziert in die verwendete Ussing-Kammer eingesetzt werden.

4.2 Pharmakologische Wirkung von luminal appliziertem ACh

4.2.1 Luminal appliziertes ACh induziert einen Anstieg des I_{sc} in der Schweinetrachea

In der vorliegenden Arbeit wurde der Neurotransmitter ACh auf die luminale Seite des Trachealepithels von Schweinen appliziert, um etwaige Effekte von non-neuronalem ACh auf den I_{sc} nachzuahmen. Die Applikation von ACh stimulierte dabei einen transienten Anstieg des I_{sc} (ACh-Effekt), der dosisabhängig mit einem EC_{50} von 164 μ M verlief (siehe **Abb. 12A-C**). Zudem konnte der ACh-Effekt durch den unspezifischen AChR-Agonisten Carbachol imitiert werden (siehe **Abb. 12D**). In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe konnten im Trachealepithel von Mäusen ähnliche Effekte mit luminal appliziertem ACh (100 μ M) und Carbachol (100 μ M) beobachtet werden (Hollenhorst et al. 2012c). Jedoch lag der EC_{50} -Wert für ACh in der Schweinetrachea mit 164,0 μ M eine 10er Potenz höher als in der Maus-trachea mit einem EC_{50} -Wert von 23,3 μ M (Hollenhorst et al. 2012c). Demnach reagierte das

Schweinetrachealepithel im Vergleich zum Mastrachealepithel weniger sensitiv auf die Gabe ACh.

4.2.2 mAChR und nicht nAChR sind am ACh-Effekt beteiligt

Zunächst sollte geklärt werden, ob mAChR oder nAChR durch luminal appliziertes ACh aktiviert werden. Übereinstimmend mit Studien in der Mastrachea (Hollenhorst et al. 2012a) konnte der ACh-Effekt in den Schweinetrachealpräparaten durch Muskarin (100 μ M) nachgeahmt werden und auch der muskarinerge Agonist Pilocarpin induzierte einen vergleichbaren Stromanstieg (siehe **Abb. 13A-C**). Weiterhin konnte der ACh-Effekt durch den nicht-selektiven mAChR-Antagonisten Atropin (siehe **Abb. 13D-F**) und durch die selektiven mAChR-Antagonisten 4-DAMP (M3AChR) und Pirenzepin (M1AChR) geblockt werden (siehe **Abb. 14A&B**). Bei der Inhibition durch die mAChR-Antagonisten zeigte sich, dass der ACh-Effekt wesentlich durch den M3AChR vermittelt wird, da die benötigte Konzentration zur Inhibition des ACh-Effekts von 4-DAMP (IC_{50} : 49,3 nM) weitaus geringer war als die benötigte Konzentration von Pirenzepin (IC_{50} : 69,1 μ M). Dies deckt sich mit Ergebnissen aus Experimenten mit M1- und M3AChR Knockout-Mäusen, bei denen ebenfalls eine übergeordnete Rolle des M3AChR am ACh-Effekt ermittelt werden konnte (Hollenhorst et al. 2012c). Weiterhin wurde eine stärkere Inhibition mit 4-DAMP (im Vergleich zu Pilocarpin) bei Kontraktionsstudien in der Mastrachea beobachtet (Garssen et al. 1993) und auch die Zilienschlag-Frequenz erhöhte sich durch eine Aktivierung von M3AChR in der Mastrachea (Klein et al. 2009). Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung des M3AChR in den Atemwegen von Säugetieren.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass nAChR nicht am luminalem ACh-Effekt beteiligt sind. Die luminale Applikation von Nikotin (100 μ M) sowie des nAChR-Agonisten DMPP (100 μ M) zeigten keine Effekte auf den I_{sc} . Zudem blieb der ACh-Effekt auch in Gegenwart von Nikotin oder Mecamylamin (nicht-selektiver nAChR Antagonist) unverändert (siehe **Abb. 15E&F**). Die fehlende Beteiligung von nAChR im Schweinetrachealepithel war überraschend, da in vorherigen elektrophysiologischen Studien an Mastracheen mit Nikotin und auch mit DMPP eine Aktivierung von Ionenleitfähigkeiten erzielt werden konnte (Hollenhorst et al. 2012b; Hollenhorst et al. 2012c). Nikotin-induzierte Stromanstiege wurden zudem auch in isolierten Bronchialepithelzellen aus Rhesus-Makaken (Fu et al. 2009) und aus dem Menschen (Maus et al. 1998) nachgewiesen. In einer Studie am proximalen Colon von Ferkeln konnten jedoch Ergebnisse erzielt werden, die sich hinsichtlich einer fehlenden Beteiligung von nAChR am ACh-Effekt mit den erzielten Ergebnissen aus den Trachealpräparaten

des Schweins in dieser Arbeit decken. So wurde im proximalen Colon der Ferkel auch eine Stimulation des I_{SC} mit Carbachol nachgewiesen, die in Gegenwart von Atropin vollständig inhibiert werden konnte, jedoch in Gegenwart des nikotinergeren Antagonisten Hexamethonium unverändert blieb (Pfannkuche et al. 2012). Demnach scheinen nAChR im proximalen Colon des Ferkels nicht an einer Stimulation des I_{SC} durch Carbachol beteiligt zu sein. Zusammen mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit deutet dies darauf hin, dass in Epithelien des Schweins nur mAChR und keine nAChR durch physiologische ACh-Konzentrationen stimuliert werden.

Es sei aber erwähnt, dass bei sehr hohen Konzentrationen von Nikotin (≥ 1 mM) ein signifikanter Anstieg des I_{SC} beobachtet werden konnte (siehe **Abb. 15D**). Anhand dieser Daten kann eine funktionelle Anwesenheit von nAChR im Atemwegsepithel nicht völlig ausgeschlossen werden. Es ist bekannt, dass eine chronische Exposition mit Nikotin die Funktion der nAChR im Gehirn verändern kann, so wie es bei der Nikotinsucht durch Tabakkonsum beobachtet wurde (Wüllner et al. 2008). Bei dieser Nikotin-abhängigen Veränderung findet im Grunde eine Hochregulation der nAChR statt (Govind et al. 2009). So konnte bei menschlichen Plattenepithelkarzinomen aus der Lunge gezeigt werden, dass bei einer längeren Stimulation mit Nikotin (in Konzentrationen, die im Plasma des durchschnittlichen Rauchers vorliegen: 1 nM bis 10 μ M) die Aktivität der nAChR hochreguliert wurde (Brown et al. 2013a). Eine Hochregulation der nAChR durch eine chronische Stimulation mit Nikotin wurde zudem auch bei Bronchialepithelzellen von Rhesus-Makaken festgestellt (Fu et al. 2009), und eine Hochregulation des $\alpha 7$ nAChR wurde sowohl in normalen als auch in Lungenkrebs-Zelllinien des Menschen nachgewiesen (Plummer et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit fand jedoch keine vorherige chronische Exposition der Schweinetracheen mit Nikotin oder DMPP statt und auch die Applikationen mit Nikotin oder DMPP in den Ussing-Kammer-Experimenten erfolgten nur über einen äußerst kurzen Zeitraum (< 10 min). Es besteht daher die Möglichkeit, dass die nAChR erst bei einer länger andauernden Stimulation mit nikotinergeren Agonisten die Regulation des transepithelialen Ionentransports beeinflussen. Eine mögliche Hochregulation der nAChR müsste in nachfolgenden Studien untersucht werden.

Naheliegender für den beobachteten Stromanstieg, als Reaktion auf die hohen Nikotinkonzentrationen (≥ 1 mM; siehe **Abb. 15D**), könnte eine Stimulierung von Bittergeschmacks-Rezeptoren sein, die auf der mukosalen Seite von Bürstenzellen in der Trachea exprimiert werden (Krasteva et al. 2011; Krasteva et al. 2012). Das Alkaloid Nikotin ist ein typischer Bitterstoff, der über die Bittergeschmacks-Rezeptoren wahrgenommen werden kann und eine intrazelluläre Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration stimuliert, wodurch u. a. der monovalent-

spezifische Kationenkanal TRPM5 (*transient receptor potential ion channel member 5*) aktiviert wird (Finger und Kinnamon 2011; Hofmann et al. 2003). Die Ca^{2+} -abhängige Öffnung von TRPM5 könnte daher für den beobachteten Stromanstieg, als Reaktion auf die hohen Nikotin-Konzentrationen, verantwortlich sein.

Zusammengefasst werden in den knorpeligen Atemwegen von gesunden Schweinen durch luminal appliziertes ACh vor allem mAChR aktiviert, darunter hauptsächlich der M3AChR, während nAChR bei der Aktivierung des transepithelialen Ionentransports im Vergleich zu den mAChR keine Rolle spielen.

4.3 Ca^{2+} -Abhängigkeit des luminalen ACh-Effekts

4.3.1 Eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration am ACh-Effekt konnte nicht nachgewiesen werden

Die Entlassung von Ca^{2+} aus dem ER über den $\text{PLC}\beta/\text{IP}_3$ -Signalweg (siehe auch **Abb. 8**) ist von einer aktiven Sequestrierung von Ca^{2+} in das ER abhängig, ein Vorgang der von den SERCA übernommen wird, die unter Energieverbrauch Ca^{2+} in das Innere des ER pumpen (Burk et al. 1989). Demnach kann bei der Inhibierung der SERCA-Aktivität eine Repletion von Ca^{2+} in das ER nicht mehr stattfinden, wodurch die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol ansteigt. Dies hat wiederum zur Folge, dass intrazelluläre Signalwege, die allgemein auf einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration basieren, zunächst ausgelöst werden und anschließend (durch die fehlende Repletion von Ca^{2+}) nicht nochmal stattfinden können. In der vorliegenden Arbeit wurden drei selektive SERCA-Inhibitoren verwendet, um die Beteiligung einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration am luminalen ACh-Effekt nachzuweisen. Dabei konnte nur mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin der ACh-Effekt signifikant reduziert werden (siehe **Abb. 16**), während der ACh-Effekt in Gegenwart der SERCA-Inhibitoren DTBHQ (siehe **Abb. 17**) und CPA (siehe **Abb. 18**) unverändert blieb. Obwohl es sich bei Thapsigargin um einen hoch-potenten und nicht-kompetitiven Inhibitor von Ca^{2+} -ATPasen handelt (Treiman et al. 1998), der schon in zahlreichen Studien in Epithelzellen verwendet wurde, um eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bei intrazellulären Signalwegen nachzuweisen (Luo et al. 1999; Ogura 2002; Montiel et al. 2001; Lieb et al. 2002), hatte die Applikation von Thapsigargin keinen nachweislichen Einfluss auf den basalen I_{SC} (siehe **Abb. 16B**). Jedoch wird bei einer erfolgreichen Inhibition der SERCA-Aktivität ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induziert (Salathe et al. 1997; Salathe et al.

2001; Parekh und Putney 2005) und dies wäre wiederum, aufgrund einer Stimulierung von Ca^{2+} -abhängigen Ionenkanälen (Berg et al. 2012), als ein Anstieg des I_{SC} sichtbar. Ein Thapsigargin-bedingter I_{SC} -Anstieg konnte aber nur bei zwei der sieben durchgeführten Messungen beobachtet werden. Im Vergleich hierzu konnte bei den Experimenten mit DTBHQ oder auch CPA eine Veränderung des basalen I_{SC} verzeichnet werden, die die Wirkung der beiden SERCA-Inhibitoren bestätigte: Bei der Applikation von DTBHQ (siehe **Abb. 17B**) konnte ein Abfall des I_{SC} beobachtet werden und bei der Applikation von CPA (siehe **Abb. 18B**) ein transienter Anstieg des I_{SC} . Dabei ging der beobachtete transiente I_{SC} -Anstieg bei der Inhibition der SERCA-Aktivität mit CPA noch am konformsten mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und einer möglichen Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Ionenkanälen (z.B.: CaCC) einher. Nichtsdestotrotz war der ACh-Effekt weder bei den Experimenten mit CPA (siehe **Abb. 18C**) noch bei den Experimenten mit DTBHQ (siehe **Abb. 17C**) signifikant verändert.

Eine mögliche Erklärung für die alleinige Reduzierung des ACh-Effekts durch Thapsigargin (siehe **Abb. 16**) könnte die Inhibition eines Ca^{2+} -Einstroms aus dem Extrazellulärraum in die Zelle sein, der für Thapsigargin neben der Inhibition der SERCA-Aktivität ebenfalls beschrieben wurde (Mason et al. 1991; Treiman et al. 1998). Ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum wurde zudem nach einer Aktivierung des M3AChR bereits mehrfach beobachtet (Salathe et al. 1997; Salathe et al. 2001; Parekh und Putney 2005; Prakriya und Lewis 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch die Beteiligung eines Ca^{2+} -Einstroms aus dem Extrazellulärraum am luminalen ACh-Effekt durch eine bilaterale Ca^{2+} -Entfernung aus der Ringerlösung nicht nachgewiesen werden (siehe **Abb. 19**). Darüber hinaus wurde auch für die SERCA-Inhibitoren DTBHQ und CPA beschrieben, dass sie einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum hemmen können (Mason et al. 1991; Treiman et al. 1998). Jedoch war der ACh-Effekt mit diesen beiden SERCA-Inhibitoren ebenfalls nicht beeinträchtigt (siehe **Abb. 17C** und **Abb. 18C**).

Es bleibt festzuhalten, dass eine Inhibition des ACh-Effekts mit Thapsigargin im Grunde nicht ausreicht, um eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration am ACh-Effekt für zutreffend zu erklären; sie kann aber auch nicht zur Gänze ausgeschlossen werden. Es sind daher weitere Experimente notwendig, um ein besseres Verständnis über die Rolle der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration am luminalen ACh-Effekt in den Schweinetrachealepithelzellen zu erlangen.

4.3.2 Ca^{2+} -freisetzende Ionenkanäle sind nicht am ACh-Effekt beteiligt

Nach einer Aktivierung des M3AChR durch ACh stimuliert das an den M3AChR gekoppelte intrazelluläre liegende G_q -Protein die PLC_β , die wiederum durch die Hydrolyse von PIP_2 die intrazelluläre Konzentration von IP_3 und DAG erhöht (Pierce et al. 2002). Mit dem PLC-Inhibitor D609 konnte in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung der PLC am luminalen ACh-Effekt belegt werden (siehe **Abb. 20D-F**). Der PLC-Inhibitor U-73122 hatte hingegen keine Auswirkungen auf den ACh-Effekt (siehe **Abb. 20A-C**). Ein Grund für das Ausbleiben einer Inhibition des ACh-Effekts durch U-73122 könnte die geringe verwendete Konzentration von $5 \mu\text{M}$ im Vergleich zu der Konzentration von D609 mit $100 \mu\text{M}$ gewesen sein. Jedoch konnte auch mit höheren Konzentrationen von U-73122 ($100 \mu\text{M}$) in menschlichen Calu-3-Atemwegsepithelzellen keine Inhibition der PLC_β erzielt werden, während D609 ($100 \mu\text{M}$) die PLC_β erfolgreich inhibierte (Sato et al. 1998). Auch in einer weiteren Studie an Calu-3-Atemwegsepithelzellen war U-73122 ($100 \mu\text{M}$) nicht in der Lage eine ATP-induzierte Stimulation zu unterbinden, ganz im Gegensatz zu D609 ($100 \mu\text{M}$) (Son et al. 2004).

Son et al. (2004) erklärten sich die unterschiedliche Wirkung von U73122 und D609 anhand deren Spezifität für die PLC, die in zwei Typen eingeteilt wird: die Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) und Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC). In den meisten zellulären Systemen wird die Mobilisierung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern über die Aktivierung der PI-PLC getriggert. Dieses Enzym spaltet PIP_2 in die beiden *Second Messenger* DAG und IP_3 , und IP_3 stimuliert wiederum die Ca^{2+} -Entlassung aus dem ER über IP_3R (Berridge 1987, 1993). Diese Möglichkeit der Ca^{2+} -Mobilisierung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern über IP_3R wurde in den Atemwegen für eine M3AChR-abhängige Kontraktion der glatten Muskulatur gezeigt (Penn und Benovic 2008). In einigen zellulären Systemen wird eine Ca^{2+} -Mobilisierung, die nicht aus IP_3 -sensitiven Ca^{2+} -Speichern stammt, durch die PC-PLC stimuliert (Leprêtre et al. 1994; Macrez-Leprêtre et al. 1996). Das Enzym PC-PLC spaltet dabei anstelle von PIP_2 das Phospholipid Phosphatidylcholin, um die *Second Messenger* DAG und Phosphocholin zu generieren. Der *Second Messenger* IP_3 entsteht dabei nicht (Leprêtre et al. 1994; Macrez-Leprêtre et al. 1996). Die PC-PLC stellt demnach einen alternativen Weg für eine Produktion von DAG dar (Besterman et al. 1986).

Weil in der vorliegenden Arbeit der luminal ACh-Effekt nur durch den PC-PLC-Inhibitor D609 inhibiert werden konnte, deuten diese Daten auf die Möglichkeit hin, dass der M3AChR intrazellulär über sein G_q -Protein mit der PC-PLC gekoppelt ist und dadurch DAG und Phosphocholin produziert werden und kein IP_3 . Dies steht im Gegensatz zu den Erkenntnissen aus

der glatten Muskulatur der Atemwege, wo der M3AChR über die PI-PLC die Produktion von IP_3 und DAG stimuliert und dann eine Entlassung von Ca^{2+} über die IP_3R aus dem ER induziert (Penn und Benovic 2008). Tatsächlich konnte am luminalen ACh-Effekt mit dem IP_3R -Inhibitor 2-APB kein Nachweis für eine Entlassung von Ca^{2+} durch IP_3R aus dem ER in den Schweinetrachealpräparaten festgestellt werden (siehe **Abb. 21**). Im Vergleich dazu inhibierte 2-APB in derselben Konzentration einen Anstieg des I_{SC} , der durch eine luminale Applikation von ATP induziert wurde (siehe **Abb. 22**). Für ATP ist bekannt, dass es in Atemwegsepithelzellen eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt, die auf einer Aktivierung von IP_3R beruht (Lazarowski et al. 2011a; Lazarowski et al. 2011b). Demnach liegt in der Schweinetrachea eine Beteiligung von IP_3R am luminalen ACh-Effekt nicht vor. Die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration muss deswegen über alternative Ca^{2+} -freisetzende Ionenkanäle erfolgen. Neben den IP_3R wurde deswegen auch die Beteiligung von RyR, einer alternativen Familie Ca^{2+} -freisetzender Ionenkanäle, am luminalen ACh-Effekt untersucht (siehe **Abb. 23**). Die RyR kommen ubiquitär vor allem im sarkoplasmatischen Retikulum der Skelettmuskulatur vor (Lanner et al. 2010; Giannini et al. 1995; Kuwajima et al. 1992). Sie wurden aber auch in unterschiedlichen Epithelien wie im Colon von Ratten (Prinz und Diener 2008) und im Trachealepithel von Schweinen (Kim et al. 1997) nachgewiesen. Für die RyR ist bekannt, dass sie schnell und effektiv Ca^{2+} aus dem ER freisetzen können (Zorzato et al. 1990), aber auch bei der Ca^{2+} -Entlassung aus anderen internen Ca^{2+} -Speichern, wie Mitochondrien, eine Rolle spielen (Szalai et al. 2000; Csordás und Hajnóczky 2009; Santo-Domingo und Demaurex 2010). Es liegen sogar Hinweise vor, dass IP_3 -sensitive und RyR-sensitive Ca^{2+} -Speicher im Schweinetrachealepithel co-exprimiert vorliegen (Kim et al. 1997). Jedoch konnte in der vorliegenden Studie mit der Verwendung des RyR-Inhibitor Rutheniumrot keine Beteiligung der RyR am luminalen ACh-Effekt in den Schweinetrachealpräparaten nachgewiesen werden (siehe **Abb. 23**).

Insgesamt deuten die gewonnenen Daten in dieser Arbeit auf keine Beteiligung von IP_3R und RyR am luminalen ACh-Effekt im Schweinetrachealepithel hin. Andere Ca^{2+} -freisetzenden Ionenkanäle, die intrazellulär durch DAG und/oder Phosphocholin reguliert werden, könnten jedoch am luminalen ACh-Effekt beteiligt sein. Dies müsste in weiterführenden Studien untersucht werden.

4.3.3 Ein cAMP-abhängiger Signalweg ist nicht am ACh-Effekt beteiligt

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob ein cAMP-abhängiger Signalweg an dem ACh Effekt beteiligt ist. Es existieren multiple Mechanismen für eine mAChR-

vermittelte Stimulation von Adenylylcyclasen, die eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels herbeiführen (Nathanson 2000). Das G_q-Protein des M3AChR kann durch die Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration eine Aktivierung von Calmodulin-sensitiven Adenylylcyclasen bewirken (Choi et al. 1992). Des Weiteren kann eine Überexpression von G_q-gekoppelten mAChR eine Aktivierung von Adenylylcyclasen stimulieren (Migeon und Nathanson 1994). Als eine weitere Möglichkeit kann eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels über DAG erfolgen. DAG aktiviert den PKC-Signalweg, der wiederum bestimmte Isoformen von Adenylylcyclasen durch eine Phosphorylierung aktiviert (Hurley 1999). In dieser Arbeit konnte durch die Verwendung des nicht-selektiven Adenylylcyclasen-Inhibitors MDL 12330A (50 µM) allerdings dargelegt werden, dass ein Signalweg über cAMP-katalysierende Adenylylcyclasen nicht am luminalen ACh-Effekt beteiligt ist (siehe **Abb. 24**).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit mittels elektrophysiologischer Messungen gezeigt werden, dass die luminale Applikation von ACh den M3AChR stimuliert (siehe **Abb. 14**). Es wurde schon mehrfach in der Literatur belegt, dass die Aktivierung des M3AChR eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zur Folge hat (Nathanson 2000; Pierce et al. 2002; Fredriksson et al. 2003). In dieser Arbeit konnte eine Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration in Folge eines Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellularraum ausgeschlossen werden. Demnach scheint ein Ca²⁺-Einstrom aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern als wahrscheinlich. Jedoch konnte eine Beteiligung von IP₃R des ER oder RyR (die ebenfalls im ER oder in alternativen Ca²⁺-Speichern wie Mitochondrien eine Entlassung von Ca²⁺ regulieren) am luminalen ACh-Effekt pharmakologisch nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnten durch eine Unterbindung der Repletion von Ca²⁺ in das ER (Inhibition der SERCA) keine eindeutigen Beweise dafür erbracht werden, dass der luminale ACh-Effekt auf einer Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern basiert. Des Weiteren konnten erste Hinweise erbracht werden, dass die Stimulation des M3AChR vermutlich zu einer Aktivierung der PC-PLC führt. Bei dieser Signalkaskade werden die *Second Messenger* DAG und Phosphocholin gebildet, aber nicht der *Second Messenger* IP₃. Daher könnte eine alternative Ca²⁺-Mobilisierung, die nicht aus IP₃-sensitiven Ca²⁺-Speichern stammt, sondern durch DAG und/oder Phosphocholin stimuliert wird, möglich sein. Dies müsste in weiterführenden Studien untersucht werden. Die Erkenntnisse über die Ca²⁺-Abhängigkeit des luminalen ACh-Effekts, die in dieser Arbeit aus den Experimenten gewonnen wurden, sind in **Abb. 33** nochmal zusammengefasst.

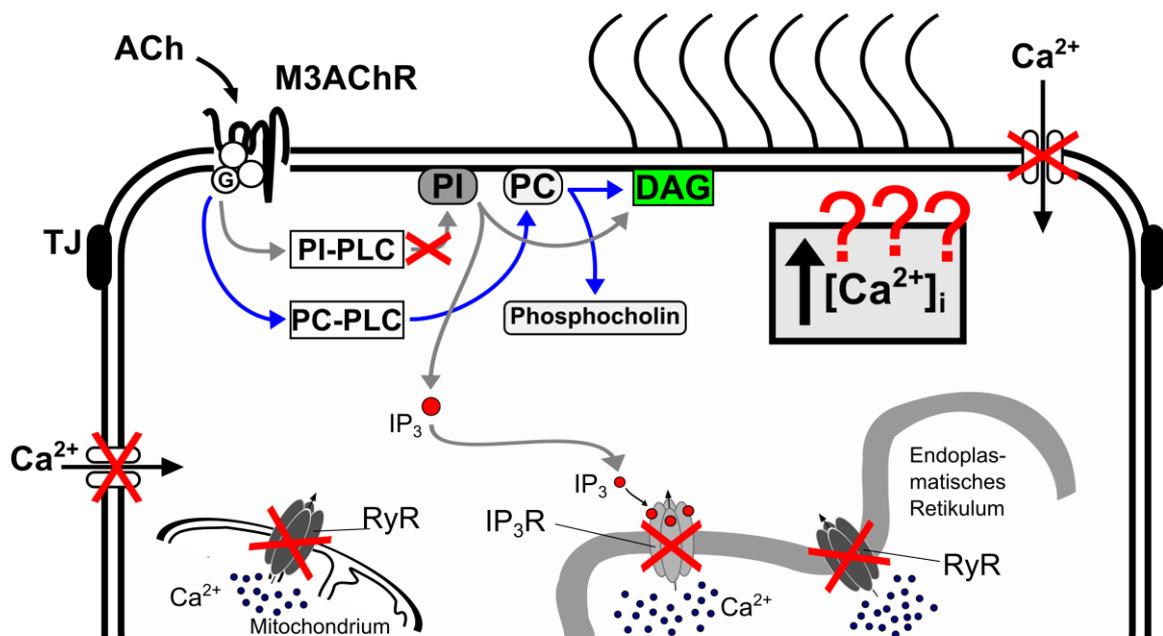


Abb. 33. Übersicht der Ca^{2+} -Abhängigkeit des luminalen ACh-Effekts.

Die Initiierung einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach einer Aktivierung des M3AChR durch luminal appliziertes ACh konnte für das Trachealepithel des Schweins nicht nachgewiesen werden. Es kann nur gemutmaßt werden, ob über luminal appliziertes ACh eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration stattfindet (drei Fragezeichen). Die blauen Pfeile zeigen den Weg der Aktivierung innerhalb der Signaltransduktion des M3AChR. Hierbei kommt es zu einer Stimulation der PC-PLC, in dessen Folge die *Second Messenger* DAG und Phosphocholin aus dem Phospholipid Phosphatidylcholin gebildet werden. Eine Beteiligung der PI-PLC wurde ausgeschlossen. Die roten Kreuze markieren Möglichkeiten zur Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, die für luminal appliziertes ACh ausgeschlossen werden konnten. ACh: Acetylcholin; PLC: Phospholipase C; PI: Phosphatidylinositol; PI-PLC: Phosphatidylinositol-spezifische PLC; PC: Phosphatidylcholin; PC-PLC: Phosphatidylcholin-spezifische PLC; TJ: Tight Junction; DAG: Diacylglycerol; RYR: Ryanodin-Rezeptor; IP_3 : Inositoltrisphosphat; IP_3R : IP_3 -Rezeptor; $[\text{Ca}^{2+}]_i$: intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration; M3AChR: muskarinerges ACh-Rezeptor Subtyp 3, G-Protein gekoppelt.

Insgesamt kann aus den oben beschriebenen Gründen nur gemutmaßt werden, ob über luminal appliziertes ACh eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration induziert wird. Zudem eignet sich die in dieser Arbeit verwendete elektrophysiologische Messmethode der Ussing-Kammer nicht für eine detaillierte Untersuchung der Ca^{2+} Abhängigkeit des ACh-Effekts. Es bedarf weiterer Untersuchungen und anderer Methoden, wie z.B. die Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über Fluoreszenzfarbstoffe (Ca^{2+} -Fura-2-Komplex), um die Mechanismen der Wirkung von luminal appliziertem ACh auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in Schweinetrachealepithelzellen hinreichend zu untersuchen.

4.4 Beteiligung von Ionenkanälen am luminalen ACh-Effekt

4.4.1 Na⁺-resorbierende Ionenkanäle sind nicht am ACh-Effekt beteiligt

Eine passive Na⁺-Absorption über apikal lokalisierte Na⁺-absorbierende Ionenkanäle ist für den Aufbau des transepithelialen Na⁺-Gradienten entscheidend. Eine Stimulation dieser Na⁺-Absorption kann zu einer Erhöhung des I_{SC} führen, so wie diese auch bei der Applikation von luminalem ACh beobachtet wurde. Der ACh-Effekt verlief jedoch, wie die Versuche mit dem ENaC-Kanalblocker Amilorid zeigten (siehe **Abb. 25**), unabhängig von einer Beteiligung des ENaC. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus der Maustrachea (Hollenhorst et al. 2012c). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in einer anderen Studie an der Maustrachea erzielt, in der gezeigt werden konnte, dass die basolaterale Applikation von Carbachol in Gegenwart von Amilorid unverändert blieb (Kunzelmann et al. 2002). Zudem war auch bei elektrophysiologischen Experimenten an der Schafrachea ein ACh-induzierter I_{SC}-Anstieg (basolaterale Applikation) in Gegenwart von Amilorid nicht verändert (Acevedo 1994). Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit mit Na⁺-freier Ringerlösung (luminale Seite) gezeigt werden, dass der ACh-Effekt von apikalen Na⁺-absorbierenden Ionenkanälen unabhängig verläuft (siehe **Abb. 26**). Nach diesen Ergebnissen kann eine Beteiligung von Na⁺-absorbierenden Ionenkanälen, wie dem ENaC, am ACh-Effekt ausgeschlossen werden.

4.4.2 Cl⁻-sekretierende Ionenkanäle sind nicht am ACh-Effekt beteiligt

In den Atemwegen wird eine Cl⁻-Sekretion über den cAMP-abhängigen CFTR und über den TMEM16A aus der Familie der CaCC ausgeführt (Hartzell et al. 2005; Cuthbert 2011; Huang et al. 2012; Mall und Galietta 2015). Die Expression der Membranproteine CFTR (Trezise und Buchwald 1991; Engelhardt et al. 1992; Jiang und Engelhardt 1998) und TMEM16A (Huang et al. 2009) wurde in der apikalen Membran der zilientragenden und nicht-zilientragenden Epithelzellen nachgewiesen. Kürzlich wurde in einer Studie gezeigt (Billet et al. 2013), dass eine direkte Stimulation des M3AChR mit Carbachol den CFTR aktivieren kann: zum einen durch eine Ca²⁺-abhängige Erhöhung des cAMP-Spiegels und zum anderen durch die konventionelle Phosphorylierung über die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA). Die Erkenntnis aus der vorliegenden Arbeit, dass der luminale ACh-Effekt auf einer Stimulation des M3AChR basiert (siehe **Abb. 14**), lässt vermuten, dass ein Teil der ACh-induzierten Stromantwort durch den CFTR vermittelt werden könnte. Des Weiteren wird über eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration auch die Aktivität von CaCC reguliert

(Tian et al. 2012; Kunzelmann et al. 2012; Hartzell et al. 2005). Studien mit TMEM16A Knockout-Mäusen konnten eine Reduzierung der Cl^- -Sekretion im Trachealepithel nachweisen und damit bestätigen, dass neben dem CFTR auch CaCC eine aktive Rolle in der Cl^- -Sekretion spielen (Ousingsawat et al. 2009; Rock et al. 2009). Weitere Studien in den Atemwegen von CFTR-defizienten Schweinen und auch Mäusen konnten zudem darlegen, dass durch cholinerge Agonisten eine CFTR-unabhängige Flüssigkeitssekretion herbeigeführt werden kann (Joo et al. 2002a; Ianowski et al. 2007). Aus diesem Grund könnte ein Teil des ACh-Effekts in der Schweinetrachea auch auf einer Aktivität von CaCC basieren. Die Entdeckung, dass CaCC wie der TMEM16A im Oberflächenepithel der Atemwege exprimiert werden und funktionell an der Cl^- -Sekretion in Epithelien beteiligt sind, belebt zudem das Interesse an CaCC als putative therapeutische Targets für eine Behandlung von CF-Patienten (Verkman und Galietta 2009; Berg et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Existenz des CFTR und von CaCC in den Schweinetrachealpräparaten pharmakologisch bestätigt werden. Die Erhöhung der CFTR-Aktivität erfolgte mit den sekretionsfördernden Mitteln IBMX und Forskolin (I/F), für die bekannt ist, dass sie den CFTR durch eine Erhöhung der cAMP-Konzentration innerhalb der Zelle aktivieren (Seamon et al. 1983; He et al. 1998; Schultz et al. 1999). Mit dem in Schweinen hochaffinen und effizienten CFTR-Kanalblocker GlyH-101 (Muanprasat et al. 2004; Melis et al. 2014) konnte anschließend erwiesen werden, dass der CFTR an einem Teil des I/F-induzierten I_{SC} -Anstiegs beteiligt war (siehe **Abb. 27**). Die Erhöhung der CaCC-Aktivität erfolgte mit ATP, das über P2Y-Rezeptoren als ein Ca^{2+} -erhöhender Agonist wirkt (Lazarowski et al. 2011a; Lazarowski et al. 2011b) und dadurch die CaCC-Aktivität steigert (Tian et al. 2012; Kunzelmann et al. 2012; Hartzell et al. 2005). Durch den Einsatz des sehr potenten CaCC-Kanalblockers Tanninsäure, der sämtliche CaCC-Subtypen inhibieren soll (Namkung et al. 2011; Namkung et al. 2010), konnte dann verifiziert werden, dass der gesamte ATP-induzierte I_{SC} -Anstieg auf einer Aktivierung von CaCC basierte (siehe **Abb. 29A-C**). Der CFTR und die CaCC waren demnach im Schweinetrachealepithel funktionell vorhanden und besaßen zudem das Potential, an der ACh-induzierten Stromantwort beteiligt zu sein. Jedoch konnte durch die Verwendung des CFTR-Kanalblockers GlyH-101 kein Beweis dafür gefunden werden, dass der CFTR die ACh-induzierte Antwort vermittelt (siehe **Abb. 28A-C**) oder dass die I/F- und GlyH-sensitiven Ströme in Gegenwart von ACh in irgendeiner Form verändert waren (siehe **Abb. 28D-I**). Gleichermäßen konnte durch den Einsatz des CaCC-Kanalblockers keine Verbindung der CaCC-Aktivität mit der ACh-induzierten Antwort ermittelt werden (siehe **Abb. 29D-F**).

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Aktivität des CFTR und CaCC durch luminal appliziertes ACh in der Schweinetrachea nicht verändert wird. Das NNCS ist demnach nicht direkt an einer Regulierung der CFTR- und CaCC-Aktivität (kurzfristigen Cl^- -Sekretion) in den Atemwegen beteiligt. Durch die hier erzielten Ergebnisse kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass das NNCS im menschlichen Atemwegsepithel nicht an der Pathogenese von CF beteiligt ist, so wie zuvor angenommen (Wessler et al. 2007). Weitere Studien sind nötig, um zu bestimmen, ob das NNCS in Atemwegen längerfristige Effekte auf die CFTR- und CaCC-Aktivität besitzt und ob durch das NNCS die Pathogenese von CF beeinflusst werden kann.

Es besteht zudem die Möglichkeit, dass der luminale ACh-Effekt auf einer Aktivierung einer alternativen, nicht CFTR- oder CaCC-basierten Cl^- -Sekretion basiert. GlyH-101 gilt als hochaffiner und effizienter CFTR-Kanalblocker in Schweinen (Muanprasat et al. 2004; Melis et al. 2014). Dies geht aus Studien an Schweineepithelien hervor, bei denen CFTR-abhängige Ströme durch GlyH-101 in ähnlichen Konzentrationen wie in der vorliegenden Studie geblockt wurden (Rogers et al. 2008b; Liu et al. 2007; Chen et al. 2010) sowie aus einer weiteren Studie, die zeigte, dass im Atemwegsepithel von CFTR-defizienten Schweinen eine Inhibition von CFTR-abhängigen Strömen durch GlyH-101 ausbleibt (Chen et al. 2010). Auch in der vorliegenden Studie erwies sich die Anwendung von GlyH-101 zur Reduzierung des I/F-induzierten I_{sc} -Anstiegs als effektiv, jedoch war GlyH-101 in der verwendeten Konzentration (50 μM) nicht in der Lage, den gesamten I/F-induzierten Strom zu inhibieren (siehe **Abb. 27**). Dieses Phänomen einer restlichen I/F-induzierten Stromstimulation wurde auch in anderen Spezies, einschließlich dem Schwein, nach einer Applikation von GlyH-101 festgestellt (Liu et al. 2007). In dieser Studie konnte der restliche I/F-induzierte Strom (nach der Applikation von GlyH-101) durch die basolaterale Zugabe des NKCC-Kanalblockers Bumetanid geblockt werden. Dies bestätigte, dass der restliche I/F-induzierte Strom auf eine transepitheliale Cl^- -Sekretion zurückzuführen war (Liu et al. 2007). Der in der vorliegenden Arbeit registrierte restliche I/F-induzierte Strom könnte demnach auf einer Aktivierung einer alternativen, nicht CFTR- oder CaCC-basierten Cl^- -Sekretion resultieren. Es wäre sehr interessant herauszufinden, ob diese verbleibende transepitheliale Cl^- -Sekretion für den ACh-Effekt verantwortlich ist und welche Cl^- -sekretierenden Kanäle daran beteiligt sein könnten. Mögliche Kandidaten, die für eine potentielle ACh-induzierte transepitheliale Cl^- -Sekretion in Frage kommen, wurden in der Literatur beschrieben. Ein cAMP-aktivierter Cl^- -Kanal, der nicht dem CFTR entspricht, wurde in intestinalen Paneth-Zellen gemessen (Tsumura et al. 1998). Ein anderer Cl^- -Kanal, der durch cGMP aktiviert wird und sogar von einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -

Konzentration abhängig ist – aber pharmakologische und biophysikalische Eigenschaften aufweist, die sehr stark von den Eigenschaften von „konventionellen“ CaCC abweichen – wurde funktionell in verschiedenen vaskulären glatten Muskelzellen nachgewiesen (Matchkov et al. 2004; Piper und Large 2004). Weiterhin wurden auswärts gerichtete, pH- und Ca^{2+} -sensitive Cl^- -Ströme in Calu-3-Atemwegsepithelzellen gemessen, die dem ClC-K aus der Cl^- -Kanal (ClC) -Familie zugeordnet werden konnten (Mummery et al. 2005). Diese stellen zudem den ersten funktionellen Nachweis eines ClC-K in der Lunge dar (Mummery et al. 2005).

4.4.3 Basolaterale K^+ -Kanäle sind am ACh-Effekt beteiligt

Basolaterale K^+ -Kanäle bestimmen maßgeblich das Membranpotential einer Zelle, denn sie sorgen dafür, dass in die Zelle gebrachtes K^+ (über die Na^+/K^+ -ATPase und den NKCC1) wieder entfernt wird (Black und Barnes 1990; Rudy 1988). Die Aktivierung einer basolateralen K^+ -Leitfähigkeit hilft zudem, die elektrische Triebkraft für die apikale Cl^- -Sekretion aufrecht zu erhalten (Frizzell und Hanrahan 2012). Die Aktivierung apikaler Anionen-Kanäle bewirkt eine starke Erhöhung der Cl^- -Leitfähigkeit, wodurch sich das apikale Membranpotential dem Cl^- -Gleichgewichtspotential annähert. Dadurch würde die apikale Cl^- -Sekretion allmählich zum Erliegen kommen. Jedoch stimulieren *Second Messenger*-Signalwege, die auch für die Aktivierung apikaler Anionen-Kanäle verantwortlich sind, ebenso eine Aktivierung von basolateralen K^+ -Kanälen. Die Aktivierung der basolateralen K^+ -Leitfähigkeit sorgt daraufhin für eine Repolarisation der Membran in Richtung des K^+ -Gleichgewichtspotentials. Die Depolarisation der Membran, verursacht durch die Aktivierung der Cl^- -Leitfähigkeit, wird dadurch wieder ausgeglichen. Als Konsequenz kommt es zu einer Aufrechterhaltung der elektrischen Triebkraft für die apikale Cl^- -Sekretion (Frizzell und Hanrahan 2012). Die Notwendigkeit einer Aktivierung der basolateralen K^+ -Leitfähigkeit für die Cl^- -Sekretion wird auch durch eine Inhibition der K^+ -Leitfähigkeit, beispielsweise mit dem allgemeinen K^+ -Kanalblocker Ba^{2+} , ersichtlich. Ba^{2+} inhibiert die Anionen-Sekretion durch eine Depolarisierung des Membranpotentials in Richtung des chemischen Gleichgewichts für Cl^- in der apikalen Membran, wodurch die Sekretion von Cl^- geblockt wird (Smith und Frizzell 1984; Welsh und McCann 1985; Maguire et al. 1999).

Das Anlegen einer basolateralen Hoch- K^+ -Ringerlösung bestätigte eine wesentliche Beteiligung einer basolateralen K^+ -Leitfähigkeit am luminalen ACh-Effekt (siehe **Abb. 30**). Jedoch konnte mit dem allgemeinen K^+ -Kanalblocker Ba^{2+} eine Veränderung des luminalen ACh-Effekts in der Schweinetrachea nicht beobachtet werden (siehe **Abb. 31**), obwohl für Ba^{2+} in der Literatur beschrieben ist, dass es auch cAMP-aktivierte und Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle

inhibiert (Cowley und Linsdell 2002; Mall et al. 2000). In dieser Arbeit wurde eine Ba^{2+} -Konzentration von 5 mM auf die basolaterale Seite der Trachealpräparate appliziert, die bei der Applikation einen Stromabfall induzierte und damit die Inhibition der K^+ -Kanäle anzeigte. In anderen Ussing-Kammer-Studien an Calu-3-Atemwegsepithelzellen (Cowley und Linsdell 2002) und menschlichem nasalen Gewebe (Mall et al. 2003) wurden wie in der vorliegenden Arbeit ähnliche Konzentrationen von Ba^{2+} (5 mM) verwendet, die sich zur Inhibition der basolateralen K^+ -Leitfähigkeit als effektiv erwiesen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in der Schweinetrachea eine höhere Konzentration von Ba^{2+} nötig ist, um eine Inhibition der basolateralen K^+ -Leitfähigkeit zu erzielen. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass die ACh-induzierte basolaterale K^+ -Leitfähigkeit in den Schweinetrachealepithelzellen gegenüber einer Inhibition mit dem allgemeinen K^+ -Kanallocker Ba^{2+} insensitiv sein könnte. Eine Unterstützung für diese Annahme resultiert aus einer Studie mit T84-Zellen, einer menschlichen Darmkrebsepithel-Zelllinie, bei der eine Carbachol-induzierte Erhöhung des Isc mit Ba^{2+} (5 mM) nicht geblockt werden konnte (Wong et al. 1990). In dieser Studie wurde durch Carbachol eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nachgewiesen (Wong et al. 1990), die für die Stimulation der basolateralen K^+ -Leitfähigkeit verantwortlich sein soll. In einer anderen Studie an T84-Zellen wurde mittels Patch-Clamp-Technik eine Carbachol-induzierte Stimulation einer Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Leitfähigkeit für die T84-Zellen bestätigt (Devor et al. 1990).

Eine basolaterale Ba^{2+} -insensitive K^+ -Leitfähigkeit ist für die Ca^{2+} -aktivierten SK-Kanäle bekannt (Gallin 1989), während dieses Selektionsprofil für Ca^{2+} -aktivierte BK-Kanäle nicht zutrifft (Latorre und Miller 1983). In dieser Arbeit wurde daher versucht, eine Beteiligung von Ca^{2+} -aktivierten SK-Kanälen am luminalen ACh-Effekt zu überprüfen (siehe **Abb. 32**). Zusätzlich wurde auch eine Beteiligung von Ca^{2+} -aktivierten IK- und SK-Kanälen am luminalen ACh-Effekt untersucht (siehe **Abb. 32**). Einzelne Mitglieder der BK-, IK- und SK-Kanäle wurden bereits in Atemwegsepithelzellen nachgewiesen (Vergara et al. 1998; Thompson-Vest et al. 2006; Bardou et al. 2009) und könnten daher potentiell durch eine luminale Applikation von ACh stimuliert werden. Obwohl jedoch mehrere selektive Kanallocker für die einzelnen BK-, IK- und SK-Kanäle verwendet wurden, konnte kein Nachweis für eine Beteiligung von Ba^{2+} -insensitiven SK-Kanälen oder auch von BK- und IK-Kanäle am luminalen ACh-Effekt aufgezeigt werden (siehe **Abb. 32**). Darunter waren auch Experimente mit Clotrimazol, einem Blocker der $K_{Ca3.1}$ -Kanäle aus der Familie der IK-Kanäle (Wulff und Castle 2010), der in der Mastrachea zu einer Reduzierung des luminalen ACh-Effekts führte (Hollenhorst et al. 2012c). Anhand dieser Ergebnisse konnte eine Beteiligung von basolateral lokalisierten K_{Ca} -

Kanälen aus den BK-, IK- und SK- Kanalfamilien am luminalen ACh-Effekt in der Schweine-trachea nicht nachgewiesen werden. Dennoch kann die Beteiligung anderer Ca^{2+} -regulierter K^+ -Kanäle nicht ausgeschlossen werden, weil die Aufhebung des K^+ -Gleichgewichtspotentials mit dem Anlegen einer basolateralen Hoch- K^+ -Ringerlösung zu einer Inhibition des luminalen ACh-Effekts führte.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse vermuten, dass in den Atemwegen luminal appliziertes ACh nicht direkt in einer Regulierung der CFTR- und CaCC-Aktivität involviert ist, die zu einer kurzfristigen Cl^- -Sekretion führt. Stattdessen könnte durch luminal appliziertes ACh vielmehr eine alternative, cAMP/ Ca^{2+} -stimulierte Cl^- -Sekretion aktiviert werden, die unabhängig vom CFTR oder von CaCC verläuft. Weiterhin konnte die Beteiligung einer basolateralen K^+ -Leitfähigkeit durch luminal appliziertes ACh nachgewiesen werden, die für die Aufrechterhaltung einer apikalen Cl^- -Sekretion in der Schweinetrachea wichtig ist. Die molekulare Identität der basolateralen K^+ -Kanäle blieb aber genauso unklar wie die der apikalen Cl^- -Kanäle. Zukünftige Studien sollten die molekulare Identität der K^+ -Kanäle und Cl^- -Kanäle aufklären, die durch luminal appliziertes ACh stimuliert werden.

4.5 Moduliert luminal appliziertes ACh den basalen elektrogenen Ionentransport?

In den Atemwegen wird dem NNCS eine Rolle in der Elektrolyt/Flüssigkeits-Homöostase zugesagt (Hollenhorst et al. 2012a; Hollenhorst et al. 2012b; Hollenhorst et al. 2012c). Unterstützt wird diese Annahme durch die Erkenntnisse, dass die Atemwegsepithelzellen einen eigenen ACh-Metabolismus besitzen (ChaT zur Synthese von ACh, OCT zum Transport von ACh aus den Epithelzellen heraus und apikal lokalisierte ACh-Rezeptoren, um auf non-neuronal entlassenes ACh reagieren zu können (Kummer et al. 2008; Kummer und Krasteva-Christ 2014)). Zudem konnte ACh massenspektrometrisch in der Atemwegsflüssigkeit detektiert werden (Hollenhorst et al. 2012c). Darauffolgend wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Atemwegsflüssigkeit ein Transportmedium für non-neuronal entlassenes ACh darstellen könnte (Hollenhorst et al. 2012c). Es ergab sich daher die Frage, ob von den Epithelzellen entlassenes ACh in der Lage ist, den basalen epithelialen Ionentransport zu verändern und so die Elektrolyt/Flüssigkeits-Homöostase in den Atemwegen zu modulieren.

Bei der Applikation des muskarinergen Antagonisten Atropin (10 μM) konnte keine Veränderung des I_{sc} beobachtet werden, die auf eine Veränderung des basalen Ionentransports schließen lassen könnte (siehe **Abb. 13**). Der anschließend ausbleibende luminal ACh-Effekt in

Gegenwart von Atropin bestätigte jedoch die funktionelle Beteiligung von mAChR an der Wahrnehmung von exogenem ACh. Ebenfalls konnte durch die luminale Applikation des nikotinergeren Antagonisten Mecamylamin (100 μM) keine Veränderung des basalen I_{SC} festgestellt werden (siehe **Abb. 15**). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass non-neuronal entlassenes ACh nicht an einer Modulation des basalen, elektrogenen Ionentransports über apikal lokalisierte mAChR oder auch nAChR beteiligt ist. Ähnliche Effekte wurden in der Mastrachea beobachtet, bei der die bilaterale Applikation von Atropin (25 μM) ebenfalls keine Veränderung des basalen Ionentransports induzierte (Hollenhorst et al. 2012a). Auch im proximalen Colon des Schweins wurde durch die basolaterale Applikation von Atropin (10 μM) keine Veränderung des basalen Ionentransports registriert (Pfannkuche et al. 2012). Weiterhin konnte in der Mastrachea der Effekt von Nikotin durch Mecamylamin vollständig geblockt werden, jedoch führte auch hier die Gabe des Blockers zu keiner Veränderung des basalen I_{SC} (Hollenhorst et al. 2012b).

In Bezug auf eine Aufrechterhaltung der Elektrolyt/Flüssigkeits-Homöostase in den Atemwegen müsste eine kontinuierliche luminale Ausschüttung von NNACH mit einer damit einhergehenden einheitlichen Stimulation von n/mAChR erfolgen. Demnach hätte bei der Inhibition der n/mAChR eine Veränderung des basalen I_{SC} eintreten müssen. Da diese Effekte auf den basalen I_{SC} ausblieben, sprechen die Daten dafür, dass das NNCS keine Rolle für die Elektrolyt/Flüssigkeits-Homöostase in den Atemwegen spielt. Jedoch sind weitere Forschungen nötig, um dies nachhaltig zu bestätigen. Im Besonderen sollte überprüft werden, ob durch eine längerfristige Inkubation mit n/mAChR-Antagonisten eine Veränderung des basalen I_{SC} zu beobachten ist. Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass unter physiologischen Bedingungen der Atemwegsoberfläche ein Flüssigkeitsfilm aufliegt, der nur wenige μM dick ist, während das Trachealpräparat in der Ussing-Kammer technisch bedingt von mehreren Millimetern Flüssigkeit umspült wird, wodurch sich die Liganden-Konzentration sicherlich um mindestens das 1000-fache verdünnt. Weiterhin könnten *in vivo*-Experimente Aufschluss darüber geben, ob das NNCS in den Atemwegen für eine Regulation der Elektrolyt/Flüssigkeits-Homöostase verantwortlich ist.

4.6 Schlussfolgerung und physiologische Relevanz von luminal appliziertem ACh

In der vorliegenden Arbeit an Schweinetrachealpräparaten konnte gezeigt werden, dass tracheale Atemwegsepithelzellen über eine Aktivierung von apikal lokalisierten M3AChR auf luminales ACh reagieren. Eine Regulation des basalen Ionentransports durch eine kontinuier-

liche Freisetzung von NNACH aus den Epithelzellen in das Lumen konnte nicht nachgewiesen, aber auch nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Ob die Freisetzung von NNACH aus den Atemwegsepithelzellen getriggert wird oder kontinuierlich erfolgt (oder auch beides gleichzeitig) muss daher in weiteren Studien noch geklärt werden. Dies könnte für eine Regulation der Elektrolyt/Flüssigkeits-Homöostase in den Atemwegen wichtig sein.

Ein mögliches Szenario für eine getriggerte Freisetzung von NNACH könnte eine vorausgegangene Detektion von inhalierten Pathogenen sein. Tatsächlich konnte so eine Funktion für NNACH in den Atemwegen bereits beschrieben werden (Krasteva et al. 2011; Kummer und Krasteva-Christ 2014). Kürzlich wurde im Tracheobronchialepithel von Mäusen nachgewiesen, dass die schon länger bekannte chemisch-sensorische Bürstenzelle - die in der Trachea und den Bronchien vieler Säugetiere, darunter in Schweinen (Jeffery und Reid 1975) und auch im Menschen (DiMaio et al. 1990) beschrieben wurde - ein neuer cholinerges Zelltyp ist, also die Fähigkeit besitzt, NNACH zu synthetisieren und darüber hinaus auch freizusetzen (Krasteva et al. 2011; Kummer und Krasteva-Christ 2014). Zudem wurde gezeigt, dass die Bürstenzelle auf der mukosalen Seite Bittergeschmacks-Rezeptoren exprimiert, die der Wahrnehmung von bakteriellen Bitterstoffen dienen (Krasteva et al. 2011; Krasteva et al. 2012). Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass die Bürstenzellen eine Absicherung der unteren Atemwege übernehmen, indem sie die chemischen Komponenten der luminalen Atemwegsflüssigkeit in der Trachea und den Bronchien „schmecken“ (Sbarbati und Osculati 2006; Tiziano et al. 2010; Krasteva et al. 2011; Kummer und Krasteva-Christ 2014). Hierzu sollen die zu Beginn einer bakteriellen Kolonisierung bereits früh entlassenen Bitterstoffe, wie Quorum sensing-Signalmoleküle von Gramnegativen Pathogenen (Sbarbati und Osculati 2006), von den Bürstenzellen detektiert werden, woraufhin die Bürstenzellen protektive Antworten und neuronale Reflexe einleiten.

Die Einleitung dieser protektiven Antworten und neuronalen Reflexe erfolgt über NNACH, dass in den Bürstenzellen synthetisiert, vesikulär gespeichert und höchstwahrscheinlich auch über vesikuläre Exozytose auf die basolaterale Seite entlassen wird (Kummer et al. 2008; Kummer und Krasteva-Christ 2014). Das von den Bürstenzellen entlassene NNACH wird dann von vagalen, sensorischen Nervenfasern detektiert, für die gezeigt werden konnte, dass sie bis an die trachealen Bürstenzellen heranreichen und zudem die nikotinerge AChR-Untereinheit $\alpha 3$ exprimieren (Krasteva et al. 2011). In derselben Arbeit wurde auch festgestellt, dass ein großer Teil der Bürstenzellen nicht direkt von vagalen, sensorischen Nervenfasern innerviert werden (Krasteva et al. 2011). Die Autoren dieser Studie vermuten daher, dass die Entlassung von NNACH über nicht-innervierte Bürstenzellen für eine Initiierung von pa-

rakrinen Effekten über das Atemwegsepithel verantwortlich sein könnte, wie eine Stimulierung der Sekretion von Flüssigkeit sowie Mukus (Krasteva et al. 2011); was bereits schon früher angenommen wurde (Racke und Matthiesen 2004). Belege hierfür kommen von Experimenten an Rattentracheen, bei denen die Gabe von Bitterstoffen tatsächlich eine Sekretion von Atemwegsflüssigkeit einleitete (Boschi et al. 2008).

Demnach könnte die Detektion von bakteriellen Bitterstoffen über die chemisch-sensorischen Bürstenzellen und die cholinerge Weiterleitung dieses Warnsignals an vagale, sensorische Nervenfasern oder an die direkte Umgebung (parakrin) eine Möglichkeit für das Atemwegsepithel darstellen, mit der eine frühe epitheliale Abwehrreaktion eingeleitet werden kann. Dadurch würde sich das Atemwegsepithel frühzeitig eingedrungenen Pathogenen entledigen, bevor diese eine Populationsdichte erreichen, die im Stande ist destruktive Biofilme auf Oberflächen zu bilden (Tizzano et al. 2010).

Aufgrund dieser Feststellungen kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch eine mukosale Entlassung von NNACH aus den Bürstenzellen und den zilientragenden Epithelzellen stattfindet. Das auf die mukosale Seite entlassene NNACH würde dann von den in der apikalen Membran der Atemwegsepithelzellen lokalisierten M3AChR detektiert werden. Die Aktivierung der M3AChR würde wiederum in den Atemwegen eine Cl^- und Flüssigkeitssekretion sowie eine Erhöhung der Zilienschlagfrequenz stimulieren, wodurch die Effektivität der mukoziliären Clearance erhöht und eingedrungene Pathogene effektiver entfernt würden. Jedoch muss, trotz der Erkenntnisse dieser Arbeit, dass durch luminal appliziertes ACh die transepithelialen Ionenleitfähigkeiten in den Atemwegsepithelzellen verändert werden, in zukünftigen Studien geklärt werden, ob das NNCS tatsächlich über eine mukosale Entlassung von NNACH Effekte auf die Atemwegsfunktionen ausübt und ob diese Effekte unabhängig von einer neuronalen Kontrolle stattfinden.

5 Literaturverzeichnis

- Acevedo, M.** (1994): Effect of acetyl choline on ion transport in sheep tracheal epithelium. In: *Pflügers Archiv: European journal of physiology* **427**, 543–546.
- Akk, G.; Auerbach, A.** (1999): Activation of muscle nicotinic acetylcholine receptor channels by nicotinic and muscarinic agonists. In: *British journal of pharmacology* **128**, 1467–1476.
- Alagha, K.; Palot, A.; Sofalvi, T.; Pahus, L.; Gouitaa, M.; Tummino, C. et al.** (2014): Long-acting muscarinic receptor antagonists for the treatment of chronic airway diseases. In: *Therapeutic advances in chronic disease* **5**, 85–98.
- Albuquerque, E. X.; Pereira, E. F.; Alkondon, M.; Rogers, S. W.** (2009): Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. In: *Physiological reviews* **89**, 73–120.
- Alexander, S. P.; Benson, H. E.; Faccenda, E.; Pawson, A. J.; Sharman, J. L.; Catterall, W. A. et al.** (2013): The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: ion channels. In: *British journal of pharmacology* **170**, 1607–1651.
- Althaus, M.** (2013): ENaC inhibitors and airway re-hydration in cystic fibrosis: state of the art. In: *Current molecular pharmacology* **6**, 3–12.
- Amrani, Y.; Panettieri, R. A.** (2003): Airway smooth muscle: contraction and beyond. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* **35**, 272–276.
- Bacher, I.; Wu, B.; Shytle, D. R.; George, T. P.** (2009): Mecamylamine - a nicotinic acetylcholine receptor antagonist with potential for the treatment of neuropsychiatric disorders. In: *Expert opinion on pharmacotherapy* **10**, 2709–2721.
- Bader, S.; Klein, J.; Diener, M.** (2014): Choline acetyltransferase and organic cation transporters are responsible for synthesis and propionate-induced release of acetylcholine in colon epithelium. In: *European Journal of Pharmacology* **733**, 23–33.
- Ballard, S. T.; Trout, L.; Bebök, Z.; Sorscher, E. J.; Crews, A.** (1999): CFTR involvement in chloride, bicarbonate, and liquid secretion by airway submucosal glands. In: *The American journal of physiology* **277**, L694-699.
- Bardou, O.; Trinh, N. T.; Brochiero, E.** (2009): Molecular diversity and function of K⁺ channels in airway and alveolar epithelial cells. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **296**, L145-155.

- Barnes, P. J.** (1990): Muscarinic receptors in airways: recent developments. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **68**, 1777–1785.
- Begenisich, T.; Melvin, J. E.** (1998): Regulation of chloride channels in secretory epithelia. In: *The Journal of membrane biology* **163**, 77–85.
- Berg, J.; Yang, H.; Jan, L. Y.** (2012): Ca²⁺-activated Cl⁻ channels at a glance. In: *Journal of cell science* **125**, 1367–1371.
- Bergner, A.; Sanderson, M. J.** (2002): Acetylcholine-induced calcium signaling and contraction of airway smooth muscle cells in lung slices. In: *The Journal of general physiology* **119**, 187–198.
- Berridge, M. J.** (1987): Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. In: *Annual review of biochemistry* **56**, 159–193.
- Berridge, M. J.** (1993): Inositol trisphosphate and calcium signalling. In: *Nature* **361**, 315–325.
- Besterman, J. M.; Duronio, V.; Cuatrecasas, P.** (1986): Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: a pathway for generation of a second messenger. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 6785–6789.
- Bhowmik, A.; Chahal, K.; Austin, G.; Chakravorty, I.** (2009): Improving mucociliary clearance in chronic obstructive pulmonary disease. In: *Respiratory medicine* **103**, 496–502.
- Billet, A.; Luo, Y.; Balghi, H.; Hanrahan, J. W.** (2013): Role of tyrosine phosphorylation in the muscarinic activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). In: *The Journal of biological chemistry* **288**, 21815–21823.
- Billington, C. K.; Penn, R. B.** (2002): M3 muscarinic acetylcholine receptor regulation in the airway. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* **26**, 269–272.
- Bjarnadóttir, T. K.; Gloriam, D. E.; Hellstrand, S. H.; Kristiansson, H.; Fredriksson, R.; Schiöth, H. B.** (2006): Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. In: *Genomics* **88**, 263–273.
- Black, J. L.; Barnes, P. J.** (1990): Potassium channels and airway function: new therapeutic prospects. In: *Thorax* **45**, 213–218.
- Boschi, F.; Nicolato, E.; Benati, D.; Marzola, P.; Sbarbati, A.** (2008): Drug targeting of airway surface liquid: a pharmacological MRI approach. In: *Biomedicine & Pharmacotherapy* **62**, 410–419.

- Boucher, R. C.** (2004): New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. In: *The European respiratory journal* **23**, 146–158.
- Brown, D. A.** (2006): Acetylcholine. In: *British journal of pharmacology* **147 Suppl 1**, S120–126.
- Brown, K. C.; Perry, H. E.; Lau, J. K.; Jones, D. V.; Pulliam, J. F.; Thornhill, B. A. et al.** (2013a): Nicotine induces the up-regulation of the $\alpha 7$ -nicotinic receptor ($\alpha 7$ -nAChR) in human squamous cell lung cancer cells via the Sp1/GATA protein pathway. In: *The Journal of biological chemistry* **288**, 33049–33059.
- Brown, S. M.; Koarai, A.; Sturton, R. G.; Nicholson, A. G.; Barnes, P. J.; Donnelly, L. E.** (2013b): A role for M(2) and M(3) muscarinic receptors in the contraction of rat and human small airways. In: *European Journal of Pharmacology* **702**, 109–115.
- Buels, K. S.; Fryer, A. D.** (2011): Muscarinic receptor antagonists: effects on pulmonary function. In: *Handbook of experimental pharmacology* **208**, 317–341.
- Burk, S. E.; Lytton, J.; MacLennan, D. H.; Shull, G. E.** (1989): cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca^{2+} pump. In: *The Journal of biological chemistry* **264**, 18561–18568.
- Button, B.; Cai, L.-H.; Ehre, C.; Kesimer, M.; Hill, D. B.; Sheehan, J. K. et al.** (2012): A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. In: *Science (New York, N.Y.)* **337**, 937–941.
- Carroll, N. G.; Mutavdzic, S.; James, A. L.** (2002): Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma. In: *Thorax* **57**, 677–682.
- Castranova, V.; Rabovsky, J.; Tucker, J. H.; Miles, P. R.** (1988): The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. In: *Toxicology and applied pharmacology* **93**, 472–483.
- Caulfield, M. P.; Birdsall, N. J.** (1998): International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Pharmacological reviews* **50**, 279–290.
- Chen, J.-H.; Stoltz, D. A.; Karp, P. H.; Ernst, S. E.; Pezzulo, A. A.; Moninger, T. O. et al.** (2010): Loss of anion transport without increased sodium absorption characterizes newborn porcine cystic fibrosis airway epithelia. In: *Cell* **143**, 911–923.

- Choi, E. J.; Wong, S. T.; Hinds, T. R.; Storm, D. R.** (1992): Calcium and muscarinic agonist stimulation of type I adenylylcyclase in whole cells. In: *The Journal of biological chemistry* **267**, 12440–12442.
- Choi, H. K.; Finkbeiner, W. E.; Widdicombe, J. H.** (2000): A comparative study of mammalian tracheal mucous glands. In: *Journal of anatomy* **197 Pt 3**, 361–372.
- Clarke, L. L.** (2009): A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **296**, G1151-1166.
- Cooper, D. K.; Ekser, B.; Ramsoondar, J.; Phelps, C.; Ayares, D.** (2016): The role of genetically engineered pigs in xenotransplantation research. In: *The Journal of pathology* **238**, 288–299.
- Cooper, D. M.** (2003): Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. In: *The Biochemical journal* **375**, 517–529.
- Coulson, F. R.; Fryer, A. D.** (2003): Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. In: *Pharmacology & therapeutics* **98**, 59–69.
- Cowley, E. A.; Linsdell, P.** (2002): Characterization of basolateral K⁺ channels underlying anion secretion in the human airway cell line Calu-3. In: *The Journal of physiology* **538**, 747–757.
- Cox, D. H.** (2005): The BKCa channel's Ca²⁺-binding sites, multiple sites, multiple ions. In: *The Journal of general physiology* **125**, 253–255.
- Crystal, R. G.; Randell, S. H.; Engelhardt, J. F.; Voynow, J.; Sunday, M. E.** (2008): Airway epithelial cells: current concepts and challenges. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* **5**, 772–777.
- Csordás, G.; Hajnóczky, G.** (2009): SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS. In: *Biochimica et biophysica acta* **1787**, 1352–1362.
- Culp, D. J.; Luo, W.; Richardson, L. A.; Watson, G. E.; Latchney, L. R.** (1996): Both M1 and M3 receptors regulate exocrine secretion by mucous acini. In: *The American journal of physiology* **271**, C1963-1972.
- Cuthbert, A. W.** (2011): New horizons in the treatment of cystic fibrosis. In: *British journal of pharmacology* **163**, 173–183.
- Darby, P. J.; Kwan, C. Y.; Daniel, E. E.** (1993): Use of calcium pump inhibitors in the study of calcium regulation in smooth muscle. In: *Biological signals* **2**, 293–304.

- Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C.** (2003): Neurobiology of butyrylcholinesterase. In: *Nature reviews. Neuroscience* **4**, 131–138.
- Devor, D. C.; Simasko, S. M.; Duffey, M. E.** (1990): Carbachol induces oscillations of membrane potassium conductance in a colonic cell line, T84. In: *The American journal of physiology* **258**, C318–326.
- DiMaio, M. F.; Kattan, M.; Ciurea, D.; Gil, J.; Dische, R.** (1990): Brush cells in the human fetal trachea. In: *Pediatric pulmonology* **8**, 40–44.
- Dittrich, N. P.; Kummer, W.; Clauss, W. G.; Fronius, M.** (2015): Luminal acetylcholine does not affect the activity of the CFTR in tracheal epithelia of pigs. In: *International immunopharmacology* **29**, 166–172.
- East, J. M.** (2000): Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps: recent advances in our understanding of structure/function and biology (review). In: *Molecular membrane biology* **17**, 189–200.
- Edinger, R. S.; Bertrand, C. A.; Rondandino, C.; Apodaca, G. A.; Johnson, J. P.; Butterworth, M. B.** (2012): The epithelial sodium channel (ENaC) establishes a trafficking vesicle pool responsible for its regulation. In: *PloS one* **7**, 1–11.
- Eglen, R. M.** (2005): Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. In: *Progress in medicinal chemistry* **43**, 105–136.
- Eglen, R. M.** (2006): Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. In: *Autonomic & autacoid pharmacology* **26**, 219–233.
- Engelhardt, J. F.; Yankaskas, J. R.; Ernst, S. A.; Yang, Y.; Marino, C. R.; Boucher, R. C. et al.** (1992): Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. In: *Nature genetics* **2**, 240–248.
- Eşkazan, E.; Aker, R.; Onat, F.; Köseoğlu, S.; Gören, M. Z.; Hasanoğlu, A.** (1999): Effect of pirenzepine, a muscarinic M1 receptor antagonist, on amygdala kindling in rat. In: *Epilepsy research* **37**, 133–140.
- Exton, J. H.** (1986): Mechanisms involved in calcium-mobilizing agonist responses. In: *Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research* **20**, 211–262.
- Finger, T. E.; Kinnamon, S. C.** (2011): Taste isn't just for taste buds anymore. In: *F1000 biology reports* **3**, 1–7.

- Florens, M.; Sapoval, B.; Filoche, M.** (2011): An anatomical and functional model of the human tracheobronchial tree. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **110**, 756–763.
- Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L.-G.; Schiöth, H. B.** (2003): The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. In: *Molecular pharmacology* **63**, 1256–1272.
- Frizzell, R. A.; Hanrahan, J. W.** (2012): Physiology of epithelial chloride and fluid secretion. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**, 1–19.
- Fronius, M.; Clauss, W. G.; Althaus, M.** (2012): Why Do We have to Move Fluid to be Able to Breathe? In: *Frontiers in physiology* **3**, 1–9.
- Fu, X. W.; Lindstrom, J.; Spindel, E. R.** (2009): Nicotine activates and up-regulates nicotinic acetylcholine receptors in bronchial epithelial cells. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* **41**, 93–99.
- Gadsby, D. C.; Nairn, A. C.** (1999): Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. In: *Physiological reviews* **79**, S77-S107.
- Galiotta, L. J.** (2009): The TMEM16 protein family: a new class of chloride channels? In: *Biophysical journal* **97**, 3047–3053.
- Gallin, E. K.** (1989): Evidence for a Ca²⁺-activated inwardly rectifying K⁺ channel in human macrophages. In: *The American journal of physiology* **257**, C77-85.
- Garsen, J.; van Loveren, H.; Gierveld, C. M.; Van der Vliet, H; Nijkamp, F. P.** (1993): Functional characterization of muscarinic receptors in murine airways. In: *British journal of pharmacology* **109**, 53–60.
- Garty, H.; Palmer, L. G.** (1997): Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. In: *Physiological reviews* **77**, 359–396.
- Gautam, D.; Heard, T. S.; Cui, Y.; Miller, G.; Bloodworth, L.; Wess, J.** (2004): Cholinergic stimulation of salivary secretion studied with M1 and M3 muscarinic receptor single- and double-knockout mice. In: *Molecular pharmacology* **66**, 260–267.
- Giannini, G.; Conti, A.; Mammarella, S.; Scrobogna, M.; Sorrentino, V.** (1995): The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. In: *The Journal of cell biology* **128**, 893–904.

- Goebel-Stengel, M.; Stengel, A.; Taché, Y.; Reeve, J. R.** (2011): The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. In: *Analytical biochemistry* **414**, 38–46.
- Govind, A. P.; Vezina, P.; Green, W. N.** (2009): Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. In: *Biochemical pharmacology* **78**, 756–765.
- Grando, S. A.; Kawashima, K.; Kirkpatrick, C. J.; Kummer, W.; Wessler, I.** (2015): Recent progress in revealing the biological and medical significance of the non-neuronal cholinergic system. In: *International immunopharmacology* **29**, 1–7.
- Gray, H.; Lewis, W. H.** (1918): Anatomy of the human body. First published in London in 1858 under title: Anatomy, descriptive and surgical. 20th ed., thoroughly revisited and re-edited. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Gu, X.; Karp, P. H.; Brody, S. L.; Pierce, R. A.; Welsh, M. J.; Holtzman, M. J.; Ben-Shahar, Y.** (2014): Chemosensory functions for pulmonary neuroendocrine cells. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* **50**, 637–646.
- Guggino, W. B.** (2001): Cystic fibrosis salt/fluid controversy: in the thick of it. In: *Nature Medicine* **7**, 888–889.
- Hartzell, C.; Putzier, I.; Arreola, J.** (2005): Calcium-activated chloride channels. In: *Annual review of physiology* **67**, 719–758.
- Haworth, S. G.; Hislop, A. A.** (1981): Adaptation of the pulmonary circulation to extra-uterine life in the pig and its relevance to the human infant. In: *Cardiovascular research* **15**, 108–119.
- He, Z.; Raman, S.; Guo, Y.; Reenstra, W. W.** (1998): Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activation by cAMP-independent mechanisms. In: *The American journal of physiology* **275**, C958-966.
- Hofmann, T.; Chubanov, V.; Gudermann, T.; Montell, C.** (2003): TRPM5 is a voltage-modulated and Ca²⁺-activated monovalent selective cation channel. In: *Current biology: CB* **13**, 1153–1158.
- Hofmann, W.; Koblinger, L.; Martonen, T. B.** (1989): Structural differences between human and rat lungs: implications for Monte Carlo modeling of aerosol deposition. In: *Health physics* **57**, 41–46.

- Hollenhorst, M. I.; Lips, K. S.; Kummer, W.; Fronius, M.** (2012a): Nicotine-induced activation of soluble adenylyl cyclase participates in ion transport regulation in mouse tracheal epithelium. In: *Life sciences* **91**, 1009–1012.
- Hollenhorst, M. I.; Lips, K. S.; Weitz, A.; Krasteva, G.; Kummer, W.; Fronius, M.** (2012b): Evidence for functional atypical nicotinic receptors that activate K⁺-dependent Cl⁻ secretion in mouse tracheal epithelium. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* **46**, 106–114.
- Hollenhorst, M. I.; Lips, K. S.; Wolff, M.; Wess, J.; Gerbig, S.; Takats, Z. et al.** (2012c): Luminal cholinergic signalling in airway lining fluid: a novel mechanism for activating chloride secretion via Ca²⁺-dependent Cl⁻ and K⁺ channels. In: *British journal of pharmacology* **166**, 1388–1402.
- Hollenhorst, M. I.; Richter, K.; Fronius, M.** (2011): Ion transport by pulmonary epithelia. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**, 1–16.
- Huang, F.; Rock, J. R.; Harfe, B. D.; Cheng, T.; Huang, X.; Jan, Y. N.; Jan, L. Y.** (2009): Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 21413–21418.
- Huang, F.; Zhang, H.; Wu, M.; Yang, H.; Kudo, M.; Peters, C. J. et al.** (2012): Calcium-activated chloride channel TMEM16A modulates mucin secretion and airway smooth muscle contraction. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 16354–16359.
- Hurley, J. H.** (1999): Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. In: *The Journal of biological chemistry* **274**, 7599–7602.
- Ianowski, J. P.; Choi, J. Y.; Wine, J. J.; Hanrahan, J. W.** (2007): Mucus secretion by single tracheal submucosal glands from normal and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice. In: *The Journal of physiology* **580**, 301–314.
- Jang, Y.; Oh, U.** (2014): Anoctamin 1 in secretory epithelia. In: *Cell calcium* **55**, 355–361.
- Jeffery, P. K.** (1983): Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. In: *The American review of respiratory disease* **128**, S14-20.
- Jeffery, P. K.; Reid, L.** (1975): New observations of rat airway epithelium: a quantitative and electron microscopic study. In: *Journal of anatomy* **120**, 295–320.

- Jiang, Q.; Engelhardt, J. F.** (1998): Cellular heterogeneity of CFTR expression and function in the lung: implications for gene therapy of cystic fibrosis. In: *European journal of human genetics: EJHG* **6**, 12–31.
- Joo, N. S.; Irokawa, T.; Wu, J. V.; Robbins, R. C.; Whyte, R. I.; Wine, J. J.** (2002a): Absent secretion to vasoactive intestinal peptide in cystic fibrosis airway glands. In: *The Journal of biological chemistry* **277**, 50710–50715.
- Joo, N. S.; Saenz, Y.; Krouse, M. E.; Wine, J. J.** (2002b): Mucus secretion from single submucosal glands of pig. Stimulation by carbachol and vasoactive intestinal peptide. In: *The Journal of biological chemistry* **277**, 28167–28175.
- Judge, E. P.; Hughes, J. M.; Egan, J. J.; Maguire, M.; Molloy, E. L.; O'Dea, S.** (2014): Anatomy and bronchoscopy of the porcine lung. A model for translational respiratory medicine. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* **51**, 334–343.
- Kan, W.; Adjobo-Hermans, M.; Burroughs, M.; Faibis, G.; Malik, S.; Tall, G. G.; Smrcka, A. V.** (2014): M3 muscarinic receptor interaction with phospholipase C β 3 determines its signaling efficiency. In: *The Journal of biological chemistry* **289**, 11206–11218.
- Kilburn, K. H.** (1968): A hypothesis for pulmonary clearance and its implications. In: *The American review of respiratory disease* **98**, 449–463.
- Kim, Y. K.; Cho, H. J.; Kim, W. T.; Cho, K. S.** (1997): Caffeine- and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ releases in the microsomes of tracheal epithelial cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* **230**, 247–250.
- Klapproth, H.; Reinheimer, T.; Metzen, J.; Münch, M.; Bittinger, F.; Kirkpatrick, C. J. et al.** (1997): Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **355**, 515–523.
- Klein, M. K.; Haberberger, R. V.; Hartmann, P.; Faulhammer, P.; Lips, K. S.; Krain, B. et al.** (2009): Muscarinic receptor subtypes in cilia-driven transport and airway epithelial development. In: *The European respiratory journal* **33**, 1113–1121.
- Knowles, M. R.; Boucher, R. C.** (2002): Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. In: *The Journal of clinical investigation* **109**, 571–577.
- Krasteva, G.; Canning, B. J.; Hartmann, P.; Veres, T. Z.; Papadakis, T.; Mühlfeld, C. et al.** (2011): Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 9478–9483.

- Krasteva, G.; Canning, B. J.; Papadakis, T.; Kummer, W.** (2012): Cholinergic brush cells in the trachea mediate respiratory responses to quorum sensing molecules. In: *Life sciences* **91**, 992–996.
- Krejčí, J.; Nechvatalova, K.; Blahutkova, M.; Faldyna, M.** (2013): The respiratory tract in pigs and its immune system: A review. In: *Veterinární medicína* **58**, 206–220.
- Krouse, M. E.** (2001): Is cystic fibrosis lung disease caused by abnormal ion composition or abnormal volume? In: *Journal of General Physiology* **118**, 219–222.
- Kubicki, N.; Laird, C.; Burdorf, L.; Pierson, R. N.; Azimzadeh, A. M.** (2015): Current status of pig lung xenotransplantation. In: *International journal of surgery* **23**, 247–254.
- Kummer, W.; Krasteva-Christ, G.** (2014): Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology. In: *Current opinion in pharmacology* **16**, 43–49.
- Kummer, W.; Lips, K. S.; Pfeil, U.** (2008): The epithelial cholinergic system of the airways. In: *Histochemistry and cell biology* **130**, 219–234.
- Kunzelmann, K.; Schreiber, R.; Cook, D.** (2002): Mechanisms for the inhibition of amiloride-sensitive Na⁺ absorption by extracellular nucleotides in mouse trachea. In: *Pflügers Archiv: European journal of physiology* **444**, 220–226.
- Kunzelmann, K.; Schreiber, R.; Kmit, A.; Jantarajit, W.; Martins, J. R.; Faria, D. et al.** (2012): Expression and function of epithelial anoctamins. In: *Experimental physiology* **97**, 184–192.
- Kuwajima, G.; Futatsugi, A.; Niinobe, M.; Nakanishi, S.; Mikoshiba, K.** (1992): Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons. In: *Neuron* **9**, 1133–1142.
- Lanner, J. T.; Georgiou, D. K.; Joshi, A. D.; Hamilton, S. L.** (2010): Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, 1–21.
- Lanzafame, A. A.; Christopoulos, A.; Mitchelson, F.** (2003): Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. In: *Receptors & channels* **9**, 241–260.
- Latorre, R.; Miller, C.** (1983): Conduction and selectivity in potassium channels. In: *The Journal of membrane biology* **71**, 11–30.
- Lazarowski, E. R.; Sesma, J. I.; Seminario, L.; Esther, C. R.; Kreda, S. M.** (2011a): Nucleotide release by airway epithelia. In: *Sub-cellular biochemistry* **55**, 1–15.

- Lazarowski, E. R.; Sesma, J. I.; Seminario-Vidal, L.; Kreda, S. M.** (2011b): Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release. In: *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* **61**, 221–261.
- Lee, R. J.; Foskett, J. K.** (2010a): cAMP-activated Ca²⁺ signaling is required for CFTR-mediated serous cell fluid secretion in porcine and human airways. In: *The Journal of clinical investigation* **120**, 3137–3148.
- Lee, R. J.; Foskett, J. K.** (2010b): Mechanisms of Ca²⁺-stimulated fluid secretion by porcine bronchial submucosal gland serous acinar cells. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **298**, L210-231.
- Lee, R. J.; Foskett, J. K.** (2014): Ca²⁺ signaling and fluid secretion by secretory cells of the airway epithelium. In: *Cell calcium* **55**, 325–336.
- Leprêtre, N.; Mironneau, J.; Morel, J. L.** (1994): Both alpha 1A- and alpha 2A-adrenoreceptor subtypes stimulate voltage-operated L-type calcium channels in rat portal vein myocytes. Evidence for two distinct transduction pathways. In: *The Journal of biological chemistry* **269**, 29546–29552.
- Li, C.; Naren, A. P.** (2010): CFTR chloride channel in the apical compartments: spatiotemporal coupling to its interacting partners. In: *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro* **2**, 161–177.
- Lieb, T.; Frei, C. W.; Frohock, J. I.; Bookman, R. J.; Salathe, M.** (2002): Prolonged increase in ciliary beat frequency after short-term purinergic stimulation in human airway epithelial cells. In: *The Journal of physiology* **538**, 633–646.
- Lingle, C. J.** (2002): Setting the stage for molecular dissection of the regulatory components of BK channels. In: *The Journal of general physiology* **120**, 261–265.
- Liu, X.; Luo, M.; Zhang, L.; Ding, W.; Yan, Z.; Engelhardt, J. F.** (2007): Bioelectric properties of chloride channels in human, pig, ferret, and mouse airway epithelia. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* **36**, 313–323.
- Lubamba, B.; Dhooghe, B.; Noel, S.; Leal, T.** (2012): Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. In: *Clinical biochemistry* **45**, 1132–1144.
- Luo, S. F.; Pan, S. L.; Wu, W. B.; Wang, C. C.; Chiu, C. T.; Tsai, Y. J.; Yang, C. M.** (1999): Bradykinin-induced phosphoinositide hydrolysis and Ca²⁺ mobilization in canine cultured tracheal epithelial cells. In: *British journal of pharmacology* **126**, 1341–1350.

- Macintosh, F. C.** (1941): The distribution of acetylcholine in the peripheral and the central nervous system. In: *The Journal of physiology* **99**, 436–442.
- Macrez-Leprêtre, N.; Morel, J. L.; Mironneau, J.** (1996): Effects of phospholipase C inhibitors on Ca^{2+} channel stimulation and Ca^{2+} release from intracellular stores evoked by alpha 1A- and alpha 2A-adrenoceptors in rat portal vein myocytes. In: *Biochemical and biophysical research communications* **218**, 30–34.
- Magleby, K. L.** (2003): Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. In: *The Journal of general physiology* **121**, 81–96.
- Maguire, D.; MacNamara, B.; Cuffe, J. E.; Winter, D.; Doolan, C. M.; Urbach, V. et al.** (1999): Rapid responses to aldosterone in human distal colon. In: *Steroids* **64**, 51–63.
- Mall, M.; Gonska, T.; Thomas, J.; Schreiber, R.; Seydewitz, H. H.; Kuehr, J. et al.** (2003): Modulation of Ca^{2+} -activated Cl^- secretion by basolateral K^+ channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. In: *Pediatric research* **53**, 608–618.
- Mall, M.; Wissner, A.; Schreiber, R.; Kuehr, J.; Seydewitz, H. H.; Brandis, M. et al.** (2000): Role of $\text{K}_v\text{LQT1}$ in cyclic adenosine monophosphate-mediated Cl^- secretion in human airway epithelia. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* **23**, 283–289.
- Mall, M. A.; Galiotta, L. J.** (2015): Targeting ion channels in cystic fibrosis. In: *Journal of cystic fibrosis* **14**, 561–570.
- Manjunatha, Y. C.; Gupta, A. K.** (2010): Tracheal bronchus (pig bronchus). In: *Indian journal of pediatrics* **77**, 1037–1038.
- Martens, C. J.; Ballard, S. T.** (2010): Effects of secretagogues on net and unidirectional liquid fluxes across porcine bronchial airways. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **298**, L270-276.
- Maruyama, T.; Kanaji, T.; Nakade, S.; Kanno, T.; Mikoshiba, K.** (1997): 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -induced Ca^{2+} release. In: *Journal of biochemistry* **122**, 498–505.
- Mason, M. J.; Garcia-Rodriguez, C.; Grinstein, S.** (1991): Coupling between intracellular Ca^{2+} stores and the Ca^{2+} permeability of the plasma membrane. Comparison of the effects of thapsigargin, 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-hydroquinone, and cyclopiazonic acid in rat thymic lymphocytes. In: *The Journal of biological chemistry* **266**, 20856–20862.

- Matchkov, V. V.; Aalkjaer, C.; Nilsson, H.** (2004): A cyclic GMP-dependent calcium-activated chloride current in smooth-muscle cells from rat mesenteric resistance arteries. In: *The Journal of general physiology* **123**, 121–134.
- Matsui, H.; Grubb, B. R.; Tarran, R.; Randell, S. H.; Gatzky, J. T.; Davis, C. W.; Boucher, R. C.** (1998a): Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. In: *Cell* **95**, 1005–1015.
- Matsui, H.; Randell, S. H.; Peretti, S. W.; Davis, C. W.; Boucher, R. C.** (1998b): Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. In: *The Journal of clinical investigation* **102**, 1125–1131.
- Maus, A. D.; Pereira, E. F.; Karachunski, P. I.; Horton, R. M.; Navaneetham, D.; Macklin, K. et al.** (1998): Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. In: *Molecular pharmacology* **54**, 779–788.
- Melis, N.; Tauc, M.; Cougnon, M.; Bendahhou, S.; Giuliano, S.; Rubera, I.; Durantou, C.** (2014): Revisiting CFTR inhibition: a comparative study of CFTRinh-172 and GlyH-101 inhibitors. In: *British journal of pharmacology* **171**, 3716–3727.
- Melvin, J. E.; Yule, D.; Shuttleworth, T.; Begenisich, T.** (2005): Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. In: *Annual review of physiology* **67**, 445–469.
- Michel, A. D.; Stefanich, E.; Whiting, R. L.** (1989): Direct labeling of rat M₃-muscarinic receptors by [³H]4DAMP. In: *European Journal of Pharmacology* **166**, 459–466.
- Michelangeli, F.; East, J. M.** (2011): A diversity of SERCA Ca²⁺ pump inhibitors. In: *Biochemical Society transactions* **39**, 789–797.
- Migeon, J. C.; Nathanson, N. M.** (1994): Differential regulation of cAMP-mediated gene transcription by m1 and m4 muscarinic acetylcholine receptors. Preferential coupling of m4 receptors to Gi alpha-2. In: *The Journal of biological chemistry* **269**, 9767–9773.
- Moczydlowski, E. G.** (2004): BK channel news: full coverage on the calcium bowl. In: *The Journal of general physiology* **123**, 471–473.
- Monteiro, A.; Smith, R. L.** (2014): Bronchial tree Architecture in Mammals of Diverse Body Mass. In: *International Journal of Morphology* **32**, 312–316.

- Montiel, M.; Pavía, J.; Marsigliante, S.; Jiménez, E.** (2001): Activation of muscarinic acetylcholine receptors induces Ca^{2+} mobilization in FRT cells. In: *Cellular signalling* **13**, 207–212.
- Moran, O.** (2010): Model of the cAMP activation of chloride transport by CFTR channel and the mechanism of potentiators. In: *Journal of theoretical biology* **262**, 73–79.
- Moulton, B. C.; Fryer, A. D.** (2011): Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and COPD. In: *British journal of pharmacology* **163**, 44–52.
- Muanprasat, C.; Sonawane, N. D.; Salinas, D.; Taddei, A.; Galletta, L. J.; Verkman, A. S.** (2004): Discovery of glycine hydrazone pore-occluding CFTR inhibitors: mechanism, structure-activity analysis, and *in vivo* efficacy. In: *The Journal of general physiology* **124**, 125–137.
- Mummery, J. L.; Killey, J.; Linsdell, P.** (2005): Expression of the chloride channel CLC-K in human airway epithelial cells. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* **83**, 1123–1128.
- Munkholm, M.; Mortensen, J.** (2014): Mucociliary clearance: pathophysiological aspects. In: *Clinical physiology and functional imaging* **34**, 171–177.
- Nakamura, K.; Hamada, K.; Terauchi, A.; Matsui, M.; Nakamura, T.; Okada, T.; Mikoshiba, K.** (2013): Distinct roles of M1 and M3 muscarinic acetylcholine receptors controlling oscillatory and non-oscillatory $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. In: *Cell calcium* **54**, 111–119.
- Namkung, W.; Phuan, P.-W.; Verkman, A. S.** (2011): TMEM16A inhibitors reveal TMEM16A as a minor component of calcium-activated chloride channel conductance in airway and intestinal epithelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* **286**, 2365–2374.
- Namkung, W.; Thiagarajah, J. R.; Phuan, P.-W.; Verkman, A. S.** (2010): Inhibition of Ca^{2+} -activated Cl^- channels by gallotannins as a possible molecular basis for health benefits of red wine and green tea. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**, 4178–4186.
- Nathanson, N. M.** (2000): A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6245–6247.

- Nixon, G. F.; Mignery, G. A.; Somlyo, A. V.** (1994): Immunogold localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle. In: *Journal of muscle research and cell motility* **15**, 682–700.
- Ogura, T.** (2002): Acetylcholine increases intracellular Ca^{2+} in taste cells via activation of muscarinic receptors. In: *Journal of neurophysiology* **87**, 2643–2649.
- O'Sullivan, B. P.; Frassica, J. J.; Rayder, S. M.** (1998): Tracheal bronchus: a cause of prolonged atelectasis in intubated children. In: *Chest* **113**, 537–540.
- Ousingsawat, J.; Martins, J. R.; Schreiber, R.; Rock, J. R.; Harfe, B. D.; Kunzelmann, K.** (2009): Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca^{2+} -dependent chloride transport. In: *The Journal of biological chemistry* **284**, 28698–28703.
- Ozawa, T.** (2001): Ryanodine-sensitive Ca^{2+} release mechanism in non-excitabile cells (Review). In: *International journal of molecular medicine* **7**, 21–25.
- Paradiso, A. M.** (1992): Identification of Na^+ - H^+ exchange in human normal and cystic fibrotic ciliated airway epithelium. In: *The American journal of physiology* **262**, L757-764.
- Parekh, A. B.; Putney, J. W.** (2005): Store-operated calcium channels. In: *Physiological reviews* **85**, 757–810.
- Penn, R. B.; Benovic, J. L.** (2008): Regulation of heterotrimeric G protein signaling in airway smooth muscle. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* **5**, 47–57.
- Pfannkuche, H.; Mauksch, A.; Gäbel, G.** (2012): Modulation of electrogenic transport processes in the porcine proximal colon by enteric neurotransmitters. In: *Journal of animal physiology and animal nutrition* **96**, 482–493.
- Pierce, K. L.; Premont, R. T.; Lefkowitz, R. J.** (2002): Seven-transmembrane receptors. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 639–650.
- Pilewski, J. M.; Frizzell, R. A.** (1999): Role of CFTR in airway disease. In: *Physiological reviews* **79**, S215-255.
- Piper, A. S.; Large, W. A.** (2004): Single cGMP-activated Ca^{+} -dependent Cl^{-} channels in rat mesenteric artery smooth muscle cells. In: *The Journal of physiology* **555**, 397–408.
- Plummer, H. K.; Dhar, M.; Schuller, H. M.** (2005): Expression of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in human lung cells. In: *Respiratory research* **6**, 1–9.

- Prado, W. A.; Segalla, D. K.** (2004): Antinociceptive effects of bethanechol or dimethylphenylpiperazinium in models of phasic or incisional pain in rats. In: *Brain research* **1018**, 272–282.
- Prakriya, M.; Lewis, R. S.** (2015): Store-Operated Calcium Channels. In: *Physiological reviews* **95**, 1383–1436.
- Prinz, G.; Diener, M.** (2008): Characterization of ryanodine receptors in rat colonic epithelium. In: *Acta physiologica (Oxford, England)* **193**, 151–162.
- Proskocil, B. J.; Sekhon, H. S.; Jia, Y.; Savchenko, V.; Blakely, R. D.; Lindstrom, J.; Spindel, E. R.** (2004): Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. In: *Endocrinology* **145**, 2498–2506.
- Puchelle, E.; Zahm, J.-M.; Tournier, J.-M.; Coraux, C.** (2006): Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* **3**, 726–733.
- Quinton, P. M.** (1979): Composition and control of secretions from tracheal bronchial submucosal glands. In: *Nature* **279**, 551–552.
- Racke, K.; Matthiesen, S.** (2004): The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* **17**, 181–198.
- Reid, L.** (1960): Measurement of the bronchial mucous gland layer: a diagnostic yardstick in chronic bronchitis. In: *Thorax* **15**, 132–141.
- Reid, L.; Meyrick, B.; Antony, V. B.; Chang, L.-Y.; Crapo, J. D.; Reynolds, H. Y.** (2005): The mysterious pulmonary brush cell: a cell in search of a function. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* **172**, 136–139.
- Reznik, G. K.** (1990): Comparative anatomy, physiology, and function of the upper respiratory tract. In: *Environmental health perspectives* **85**, 171–176.
- Riordan, J. R.; Rommens, J. M.; Kerem, B.; Alon, N.; Rozmahel, R.; Grzelczak, Z. et al.** (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. In: *Science (New York, N.Y.)* **245**, 1066–1073.
- Robinson, M.; Eberl, S.; Tomlinson, C.; Daviskas, E.; Regnis, J. A.; Bailey, D. L. et al.** (2000): Regional mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis. In: *Journal of aerosol medicine: the official journal of the International Society for Aerosols in Medicine* **13**, 73–86.

- Rock, J. R.; O'Neal, W. K.; Gabriel, S. E.; Randell, S. H.; Harfe, B. D.; Boucher, R. C.; Grubb, B. R.** (2009): Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca^{2+} -regulated Cl^- secretory channel in mouse airways. In: *The Journal of biological chemistry* **284**, 14875–14880.
- Rogers, C. S.; Abraham, W. M.; Brogden, K. A.; Engelhardt, J. F.; Fisher, J. T.; McCray, P. B. et al.** (2008a): The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **295**, L240-263.
- Rogers, C. S.; Stoltz, D. A.; Meyerholz, D. K.; Ostedgaard, L. S.; Rokhlina, T.; Taft, P. J. et al.** (2008b): Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. In: *Science (New York, N.Y.)* **321**, 1837–1841.
- Rogers, D. F.** (2007): Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. In: *Respiratory care* **52**, 1134–1149.
- Rudy, B.** (1988): Diversity and ubiquity of K channels. In: *Neuroscience* **25**, 729–749.
- Sagel, S. D.; Davis, S. D.; Campisi, P.; Dell, S. D.** (2011): Update of respiratory tract disease in children with primary ciliary dyskinesia. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* **8**, 438–443.
- Salathe, M.; Ivonnet, P. I.; Lieb, T.; Bookman, R. J.** (2001): Agonist-stimulated calcium decreases in ovine ciliated airway epithelial cells: role of mitochondria. In: *The Journal of physiology* **531**, 13–26.
- Salathe, M.; Lipson, E. J.; Ivonnet, P. I.; Bookman, R. J.** (1997): Muscarinic signaling in ciliated tracheal epithelial cells: dual effects on Ca^{2+} and ciliary beating. In: *The American journal of physiology* **272**, L301-310.
- Salinas, D.; Haggie, P. M.; Thiagarajah, J. R.; Song, Y.; Rosbe, K.; Finkbeiner, W. E. et al.** (2005): Submucosal gland dysfunction as a primary defect in cystic fibrosis. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 431–433.
- Santo-Domingo, J.; Demaurex, N.** (2010): Calcium uptake mechanisms of mitochondria. In: *Biochimica et biophysica acta* **1797**, 907–912.
- Saracino, L.; Zorzetto, M.; Inghilleri, S.; Pozzi, E.; Stella, G. M.** (2013): Non-neuronal cholinergic system in airways and lung cancer susceptibility. In: *Translational lung cancer research* **2**, 284–294.

- Sato, E.; Koyama, S.; Okubo, Y.; Kubo, K.; Sekiguchi, M.** (1998): Acetylcholine stimulates alveolar macrophages to release inflammatory cell chemotactic activity. In: *The American journal of physiology* **274**, L970-979.
- Sbarbati, A.; Osculati, F.** (2006): Allelochemical communication in vertebrates: kairomones, allomones and synomones. In: *Cells, tissues, organs* **183**, 206–219.
- Schultz, B. D.; Singh, A. K.; Devor, D. C.; Bridges, R. J.** (1999): Pharmacology of CFTR chloride channel activity. In: *Physiological reviews* **79**, S109-144.
- Schwiebert, E. M.; Potter, E. D.; Hwang, T. H.; Woo, J. S.; Ding, C.; Qiu, W. et al.** (1997): cGMP stimulates sodium and chloride currents in rat tracheal airway epithelia. In: *The American journal of physiology* **272**, C911-922.
- Seamon, K. B.; Daly, J. W.; Metzger, H.; de Souza, N. J.; Reden, J.** (1983): Structure-activity relationships for activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin and its derivatives. In: *Journal of medicinal chemistry* **26**, 436–439.
- Sheppard, D. N.; Welsh, M. J.** (1999): Structure and function of the CFTR chloride channel. In: *Physiological reviews* **79**, S23-45.
- Sleigh, M. A.** (1990): Ciliary adaptations for the propulsion of mucus. In: *Biorheology* **27**, 527–532.
- Smaldone, G. C.; Foster, W. M.; O'Riordan, T. G.; Messina, M. S.; Perry, R. J.; Langenback, E. G.** (1993): Regional impairment of mucociliary clearance in chronic obstructive pulmonary disease. In: *Chest* **103**, 1390–1396.
- Smith, P. L.; Frizzell, R. A.** (1984): Chloride secretion by canine tracheal epithelium: IV. Basolateral membrane K permeability parallels secretion rate. In: *The Journal of membrane biology* **77**, 187–199.
- Snowball, J.; Ambalavanan, M.; Whitsett, J.; Sinner, D.** (2015): Endodermal Wnt signaling is required for tracheal cartilage formation. In: *Developmental biology* **405**, 56–70.
- Son, M.; Ito, Y.; Sato, S.; Ishikawa, T.; Kondo, M.; Nakayama, S. et al.** (2004): Apical and basolateral ATP-induced anion secretion in polarized human airway epithelia. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* **30**, 411–419.
- Stocker, M.** (2004): Ca²⁺-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. In: *Nature reviews. Neuroscience* **5**, 758–770.

- Stoltz, D. A.; Meyerholz, D. K.; Pezzulo, A. A.; Ramachandran, S.; Rogan, M. P.; Davis, G. J. et al.** (2010): Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. In: *Science translational medicine* **2**, 1–8.
- Szalai, G.; Csordás, G.; Hantash, B. M.; Thomas, A. P.; Hajnóczky, G.** (2000): Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. In: *The Journal of biological chemistry* **275**, 15305–15313.
- Tarran, R.** (2004): Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* **1**, 42–46.
- Tarran, R.; Grubb, B. R.; Gatzky, J. T.; Davis, C. W.; Boucher, R. C.** (2001a): The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. In: *The Journal of general physiology* **118**, 223–236.
- Tarran, R.; Grubb, B. R.; Parsons, D.; Picher, M.; Hirsh, A. J.; Davis, C. W.; Boucher, R. C.** (2001b): The CF salt controversy: *in vivo* observations and therapeutic approaches. In: *Molecular cell* **8**, 149–158.
- ten Hallers, E. J.; Rakhorst, G.; Marres, H. A.; Jansen, J. A.; van Kooten, T. G.; Schutte, H. K. et al.** (2004): Animal models for tracheal research. In: *Biomaterials* **25**, 1533–1543.
- Thompson-Vest, N.; Shimizu, Y.; Hunne, B.; Furness, J. B.** (2006): The distribution of intermediate-conductance, calcium-activated, potassium (IK) channels in epithelial cells. In: *Journal of anatomy* **208**, 219–229.
- Tian, Y.; Schreiber, R.; Kunzelmann, K.** (2012): Anoctamins are a family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. In: *Journal of cell science* **125**, 4991–4998.
- Tizzano, M.; Gulbransen, B. D.; Vandenbeuch, A.; Clapp, T. R.; Herman, J. P.; Sibhatu, H. M. et al.** (2010): Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 3210–3215.
- Tos, M.** (1966): Development of the tracheal glands in man. Number, density, structure, shape, and distribution of mucous glands elucidated by quantitative studies of whole mounts. In: *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* **68**, 1–130.
- Traiffort, E.; O'Regan, S.; Ruat, M.** (2013): The choline transporter-like family SLC44: properties and roles in human diseases. In: *Molecular aspects of medicine* **34**, 646–654.

- Traiffort, E.; Ruat, M.; O'Regan, S.; Meunier, F. M.** (2005): Molecular characterization of the family of choline transporter-like proteins and their splice variants. In: *Journal of neurochemistry* **92**, 1116–1125.
- Treiman, M.; Caspersen, C.; Christensen, S. B.** (1998): A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. In: *Trends in pharmacological sciences* **19**, 131–135.
- Trezise, A. E.; Buchwald, M.** (1991): *In vivo* cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. In: *Nature* **353**, 434–437.
- Trout, L.; Gatzky, J. T.; Ballard, S. T.** (1998): Acetylcholine-induced liquid secretion by bronchial epithelium: role of Cl^- and HCO_3^- transport. In: *The American journal of physiology* **275**, L1095-1099.
- Tsumura, T.; Hazama, A.; Miyoshi, T.; Ueda, S.; Okada, Y.** (1998): Activation of cAMP-dependent Cl^- currents in guinea-pig paneth cells without relevant evidence for CFTR expression. In: *The Journal of physiology* **512 (Pt 3)**, 765–777.
- Urbach, V.; Harvey, B. J.** (2001): Rapid and non-genomic reduction of intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ induced by aldosterone in human bronchial epithelium. In: *The Journal of physiology* **537**, 267–275.
- Ussing, H. H.; Zerahn, K.** (1951): Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Reprinted from Acta. Physiol. Scand. 23: 110-127, 1951. In: *Journal of the American Society of Nephrology* **10**, 2056–2065.
- van de Put, F. H.; Hoenderop, J. G.; De Pont, J. J.; Willems, P. H.** (1993): Ruthenium red selectively depletes inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium stores in permeabilized rabbit pancreatic acinar cells. In: *The Journal of membrane biology* **135**, 153–163.
- Vergara, C.; Latorre, R.; Marrion, N. V.; Adelman, J. P.** (1998): Calcium-activated potassium channels. In: *Current opinion in neurobiology* **8**, 321–329.
- Verkman, A. S.; Song, Y.; Thiagarajah, J. R.** (2003): Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease. In: *American journal of physiology. Cell physiology* **284**, C2-15.
- Vinciguerra, M.; Deschênes, G.; Hasler, U.; Mordasini, D.; Rousselot, M.; Doucet, A. et al.** (2003): Intracellular Na^+ controls cell surface expression of Na,K-ATPase via a cAMP-

independent PKA pathway in mammalian kidney collecting duct cells. In: *Molecular biology of the cell* **14**, 2677–2688.

Wang, H.; Shi, H.; Lu, Y.; Yang, B.; Wang, Z. (1999): Pilocarpine modulates the cellular electrical properties of mammalian hearts by activating a cardiac M3 receptor and a K⁺ current. In: *British journal of pharmacology* **126**, 1725–1734.

Wang, Z.; Wong, N. C.; Cheng, Y.; Kehl, S. J.; Fedida, D. (2009): Control of voltage-gated K⁺ channel permeability to NMDG⁺ by a residue at the outer pore. In: *The Journal of general physiology* **133**, 361–374.

Wanner, A.; Salathé, M.; O'Riordan, T. G. (1996): Mucociliary clearance in the airways. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* **154**, 1868–1902.

Warth, R.; Hamm, K.; Bleich, M.; Kunzelmann, K.; von Hahn, T.; Schreiber, R. et al. (1999): Molecular and functional characterization of the small Ca²⁺-regulated K⁺ channel (rSK4) of colonic crypts. In: *Pflügers Archiv: European journal of physiology* **438**, 437–444.

Wei, A. D.; Gutman, G. A.; Aldrich, R.; Chandy, K. G.; Grissmer, S.; Wulff, H. (2005): International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. In: *Pharmacological reviews* **57**, 463–472.

Welsh, M. J.; McCann, J. D. (1985): Intracellular calcium regulates basolateral potassium channels in a chloride-secreting epithelium. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 8823–8826.

Wess, J. (1996): Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Critical reviews in neurobiology* **10**, 69–99.

Wess, J.; Eglén, R. M.; Gautam, D. (2007): Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. In: *Nature reviews. Drug discovery* **6**, 721–733.

Wessler, I.; Bittinger, F.; Kamin, W.; Zepp, F.; Meyer, E.; Schad, A.; Kirkpatrick, C. J. (2007): Dysfunction of the non-neuronal cholinergic system in the airways and blood cells of patients with cystic fibrosis. In: *Life sciences* **80**, 2253–2258.

Wessler, I.; Kirkpatrick, C. J. (2008): Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. In: *British journal of pharmacology* **154**, 1558–1571.

- Wessler, I.; Roth, E.; Deutsch, C.; Brockerhoff, P.; Bittinger, F.; Kirkpatrick, C. J.; Kilbinger, H.** (2001): Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. In: *British journal of pharmacology* **134**, 951–956.
- Wessler, I. K.; Kirkpatrick, C. J.** (2001): The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* **14**, 423–434.
- Widdicombe, J. H.; Wine, J. J.** (2015): Airway Gland Structure and Function. In: *Physiological reviews* **95**, 1241–1319.
- Wine, J. J.** (1999): The genesis of cystic fibrosis lung disease. In: *The Journal of clinical investigation* **103**, 309–312.
- Wine, J. J.; Joo, N. S.** (2004): Submucosal glands and airway defense. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* **1**, 47–53.
- Wolf-Johnston, A. S.; Hanna-Mitchell, A. T.; Buffington, C. A.; Shinde, S.; Roppolo, J. R.; Mayer, E.; Birder, L. A.** (2012): Alterations in the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in esophageal epithelium. In: *Life sciences* **91**, 1065–1069.
- Wong, S. M.; Tesfaye, A.; DeBell, M. C.; Chase, H. S.** (1990): Carbachol increases basolateral K^+ conductance in T84 cells. Simultaneous measurements of cell $[Ca]$ and gK explore calcium's role. In: *The Journal of general physiology* **96**, 1271–1285.
- Wulff, H.; Castle, N. A.** (2010): Therapeutic potential of $K_{Ca}3.1$ blockers: recent advances and promising trends. In: *Expert review of clinical pharmacology* **3**, 385–396.
- Wüllner, U.; Gündisch, D.; Herzog, H.; Minnerop, M.; Joe, A.; Warnecke, M. et al.** (2008): Smoking upregulates $\alpha 4\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors in the human brain. In: *Neuroscience letters* **430**, 34–37.
- Yang, C. M.; Farley, J. M.; Dwyer, T. M.** (1988): Acetylcholine-stimulated chloride flux in tracheal submucosal gland cells. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **65**, 1891–1894.
- Zorzato, F.; Fujii, J.; Otsu, K.; Phillips, M.; Green, N. M.; Lai, F. A. et al.** (1990): Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. In: *The Journal of biological chemistry* **265**, 2244–2256.

6. Anhang

6.1 Verzeichnis der Abkürzungen

Tab. 4. Verwendete Abkürzungen und ihre Bedeutung

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl borate
4-DAMP	1,1-Dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium iodide
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AChR	Acetylcholin-Rezeptoren
ALF	<i>alveolar lining fluid</i>
ASL	<i>airway surface liquid</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Ba ²⁺	Barium
BaCl ₂	Bariumchlorid
BSA	Bovines Serumalbumin
ca	Zirka
Ca ²⁺	Calcium
CaCC	Ca ²⁺ -abhängige Cl ⁻ -Kanäle
Calu-3	<i>Cultured Human Airway Epithelial Cells</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CF	<i>cystic fibrosis</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid
ClC	<i>chloride-channel-family</i>
cm ²	Quadratzentimeter
CNG	<i>cyclic nucleotide-gated cation channels</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CPA	cyclopiazonic acid

DAG	Diacylglycerol
dH ₂ O	Einfach destilliertes Wasser
DMPP	Dimethylphenylpiperazinium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTBHQ	2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ENaC	<i>epithelial sodium channel</i> (epithelialer Natrium-Kanal)
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> , lat.: und andere
g	Gramm
GlyH-101	Glycin Hydrazid-101 (CFTR Inhibitor II)
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
I	elektrische Stromstärke
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
I _m	mukosale Stromelektroden
IP ₃	Inositol 1,4,5-Trisphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptoren
I _s	serosale Stromelektroden
I _{sc}	<i>short-circuit current</i>
k	Kilo
K ⁺	Kalium
M	Molar
mAChR	muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Anzahl der durchgeführten Experimente
N	Anzahl der verwendeten Donoren
Na ⁺	Natrium
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-Pumpe
NACH	neuronales ACh
nAChR	nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren
NaOH	Natriumhydroxid
NCS	neuronales cholinerges System
NKCC	Na ⁺ /K ⁺ /2a Co-Transporter

NMDG	N-Methyl-D-Glukamin
NNACh	non-neuronales ACh
NNCS	non-neuronales cholinerges System
ns	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
OCV	<i>open-circuit voltage</i>
P2Y-Rezeptoren	Familie von purinergen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren
PC	Phosphatidylcholin
PC-PLC	Phosphatidylcholin-spezifische PLC
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI-PLC	Phosphatidylcholin-spezifische PLC
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC _β	Phospholipase C _β
R	elektrischer Widerstand
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RyR	Ryanodin-Rezeptoren
s	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
Tab.	Tabelle
TRAM-34	1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole
TRPM5	<i>transient receptor potential ion channel member 5</i>
U	elektrische Spannung
u. a.	unter anderem
UCL 1684	6,12,19,20,25,26-Hexahydro-5,27:13,18:21,24-trietheno-11,7-metheno-7H-dibenzo [b,n] [1,5,12,16]tetraazacyclotricosine-5,13-dium dibromide
US	<i>United States</i>
V	Volt
V _m	mukosale Potentialelektroden
V _s	serosale Potentialelektroden

Δ	Delta, Symbol für die Differenz
Ω	Ohm

Tab. 5. Verwendete Größenordnungen.

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

6.2 Curriculum Vitae

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

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

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

6.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation, aber auch während meiner gesamten Doktorandenzeit unterstützt und motiviert haben.

Herrn Prof. em. Dr. Wolfgang Clauss und Herrn Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan danke ich für die bereitwillige Übernahme meiner Betreuung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes zur Verfassung dieser Dissertation. Vielen Dank, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, bei Ihnen am Institut für Tierphysiologie zu forschen und zu arbeiten.

Beim LOEWE-Schwerpunkt "Non-Neuronale Cholinerge Systeme", unter der Koordination von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer, bedanke ich mich hinsichtlich der Finanzierung meines Promotionsprojektes.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Martin Fronius für seine ausgiebige Betreuung und Unterstützung bei meinem Promotionsprojekt, die zeitweise aus dem über 18.000 km entfernten Neuseeland erfolgten. Durch sein stetiges kritisches Hinterfragen und seine konstruktive Kritik verhalf er mir zu einer durchdachten These und Fragestellung. Vielen Dank für die Zeit und Mühen, die Du in meine Arbeit investiert hast und auch für die Möglichkeit, meine eigenen Ideen umsetzen zu dürfen.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Dr. Mike Althaus bedanken, der mich während meiner Dissertation aufgrund seiner langjährigen Erfahrungen umfangreich unterstützt hat. Dank seiner herausragenden Expertise konnte er mich immer wieder in meiner Recherche und bei meinen Fragen unterstützen.

Mein Dank gilt auch nicht weniger Dr. Katrin Richter, Dr. Constanze Vitzthum, Dr. Fenja Knöpp und Lukas Wichmann und Fabrizio Santangelo. Sie lasen in zahlreichen Stunden Korrektur und konnten immer wieder aufzeigen, wo weiterer Erklärungsbedarf bestand. Ein weiteres Dankeschön geht auch an alle anderen Kollegen des Instituts, Anja, Mirjam, Frau Eichelmann, Johannes, Sigg, Herrn Seehagen-Rabenau.

Insgesamt möchte ich mich bei allen für die wundervolle Zeit bedanken, die wir gemeinsam im Labor, Büro, beim gemeinsamen Mittagessen, auf Tagungen und auch in unserer Freizeit hatten.

Nicht zuletzt gebührt meiner Familie Dank, ohne welche dieses ganze Unternehmen schon im Vorhinein niemals zustande gekommen wäre.

6.4 Selbstständigkeitserklärung

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

Gießen, den _____

Datum

Unterschrift