

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

Charakterisierung der Mechanosensitivität des CFTR Cl⁻ Kanals

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

vorgelegt von
Constanze Vitzthum

Gießen, April 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Clauss

2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Diener

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
<i>SUMMARY</i>	3
1. EINLEITUNG	5
1.1 Das Lungenepithel und pulmonaler Ionentransport	5
1.1.1 Mukoviszidose	7
1.2 Die Regulationsmechanismen des CFTR Proteins	9
1.3 Mechanische Reize und Mechanotransduktion	11
1.3.1 Mechanische Kräfte in der Lunge	13
1.4 Bearbeitete Fragestellung	15
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Das Versuchstier: der Afrikanische Krallenfrosch <i>Xenopus laevis</i>	17
2.1.1 Tier- und Gewebepräparation	18
2.2 Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1 Herstellung der hCFTR cRNA	20
2.2.2 Generierung der hCFTR Mutanten	25
2.2.3 Mikroinjektion der cRNA	27
2.3 Elektrophysiologische Methoden	28
2.3.1 Die <i>two-electrode voltage-clamp</i> (TEVC) Methode	28
2.3.2 Die modifizierte Ussing-Kammer	32
2.4 Messung des Volumens von <i>Xenopus</i> Oozyten	34
2.5 Modifizierung der Zytoskelettelemente von <i>Xenopus</i> Oozyten	35
2.5.1 Mikrotubuli	35
2.5.2 Aktinfilamente	36
2.6 Modifizierung der Membranfluidität von <i>Xenopus</i> Oozyten	36
2.7 Datenverarbeitung und Statistik	37
2.8 Verwendete Lösungen und Chemikalien	38
3. ERGEBNISSE	40
3.1 Der Einfluss von Scherkraft auf den humanen CFTR	40

3.1.1 Simultane Applikation von SK und Forskolin/IBMX	41
3.2 Der Einfluss der Zellschrumpfung auf den humanen CFTR	42
3.3 Der Einfluss von Membrandehnung auf den humanen CFTR	45
3.3.1 Erhöhung des Zellvolumens durch Inkubation in einer hypo-osmotischen Lösung	46
3.3.2 Erhöhung des Zellvolumens durch die Injektion einer intrazellulär analogen Lösung	51
3.3.3 Wiederholbarkeit der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität	53
3.4 Auswirkungen der ΔF508 und G551D Mutationen auf die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität	59
3.4.1 Δ F508 hCFTR	60
3.4.2 G551D hCFTR	64
3.5 Die Applikation von hydrostatischen Druck auf das native pulmonale Epithel von <i>Xenopus</i>	68
3.5.1 Untersuchungen zur Beteiligung des CFTR am HD-induzierten Effekt	71
3.6 Beteiligung der Membranfluidität an der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivierung	74
3.6.1 Erhöhung der Membranfluidität mit Methyl- β -Cyclodextrin	74
3.6.2 Verringerung der Membranfluidität mit wasserlöslichem Cholesterol	76
3.6.3 Korrelation zwischen Zellvolumen und hCFTR Aktivität bei Oozyten mit veränderter Membranfluidität	78
3.7 Beteiligung des Zytoskeletts an der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivierung	80
3.7.1 Das Mikrotubuli-Zytoskelett	80
3.7.2 Das Aktin-Zytoskelett	86
4. DISKUSSION	95
4.1 <i>Xenopus</i> als Modellorganismus?	95
4.1.1 Die <i>Xenopus</i> Oozyten als Expressionssystem	95
4.1.2 Die <i>Xenopus</i> Lunge als Modell für alveolare Ionentransportprozesse	96
4.2 Der Einfluss von SK auf die Aktivität des humanen CFTR	97
4.3 Zellvolumenregulation und CFTR	98
4.4 Membrandehnung reguliert die Aktivität des CFTR <i>in vitro</i>	100
4.5 Die Dehnung des pulmonalen Epithels von <i>Xenopus</i> durch hydrostatischen Druck aktiviert den CFTR	101

4.6 Mögliche Mechanismen der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivierung	102
4.6.1 Beteiligung der Membranfluidität an der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität	103
4.6.2 Die Zytoskelettelemente sind an der Mechanosensitivität des hCFTR beteiligt	105
4.6.3 Verknüpfungsstellen zwischen dem hCFTR und dem Zytoskelett	106
4.6.4 Die Extrazelluläre Matrix könnte an der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivierung beteiligt sein	109
4.7 Schlussfolgerung und physiologische Relevanz der Mechanosensitivität des CFTR	110
5. LITERATURVERZEICHNIS	111
<hr/>	
6. VERZEICHNISSE	123
<hr/>	
6.1 Abbildungsverzeichnis	123
6.2 Tabellenverzeichnis	126
7. ANHANG	127
<hr/>	
7.1 Sequenzierungs-Ergebnisse der hCFTR Mutanten	131
7.1.1 Δ F508 hCFTR	131
7.1.2 G551D hCFTR	132
7.1.3 Δ TRL hCFTR	133
8. DANKSAGUNG	135
<hr/>	
9. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	136

Zusammenfassung

Der *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) ist ein Cl^- -leitender Ionenkanal, der in der apikalen Membran verschiedener Epithelien des menschlichen Körpers, wie z.B. Lunge, Darm, Pankreas und Schweißdrüsen, lokalisiert ist. Durch Mutationen des CFTR-Gens kommt es zu Fehlfunktionen des CFTR Cl^- Kanals. Deren Konsequenz sind Störungen der Elektrolyt- und Flüssigkeitshomöostase, welche im Krankheitsbild der Mukoviszidose resultieren, einer autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankung. Der CFTR ist in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, die dauerhaft in Bewegung und somit mechanischen Kräften ausgesetzt sind. In der Lunge resultieren aus den Atembewegungen mechanischen Kräfte, wie Scherkraft (SK) und Dehnung. Es gibt erste Hinweise darauf, dass die Aktivität des CFTR durch mechanische Stimuli reguliert werden kann. Darüber hinaus ist aus Studien anderer mechanosensitiver Ionenkanäle bekannt, dass sowohl die Membranzusammensetzung als auch die Verbindungen mit dem Zytoskelett an der Wahrnehmung und Weiterleitung mechanischer Kräfte beteiligt sein können.

Basierend auf diesen Hinweisen waren die Ziele der vorliegenden Arbeit:

- 1) die Untersuchung von SK und/oder Dehnung als adäquater mechanischer Stimulus der Regulation der CFTR Aktivität,
- 2) die Verifizierung der mechanosensitiven Aktivierung des CFTR in einem nativen Epithel sowie 3) die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen einer mechanosensitiven CFTR Aktivierung.

Ziel 1) Der humane CFTR (hCFTR) wurde heterolog in Oozyten des Afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* exprimiert. Die Aktivität des hCFTR wurde durch Forskolin und IBMX (F/I) induziert und ohne sowie mit dem mechanischen Stimulus mittels der *two-electrode voltage-clamp* (TEVC)-Technik bestimmt. In dieser Arbeit konnte kein Einfluss von SK, in einer physiologisch relevanten Größenordnung ($1,3 \text{ dyn/cm}^2$), auf die Aktivität des hCFTR nachgewiesen werden. Somit ist die SK als adäquater Stimulus für die mechanosensitive hCFTR Regulierung auszuschließen. Die Membrandehnung erfolgte über die Erhöhung des Oozytenvolumens entweder durch osmotische Zellschwellung oder durch Injektion einer intrazellulär analogen Lösung. Durch den Dehnungsstimulus (osmotisch oder Injektion) erhöhte sich die F/I-induzierte hCFTR Aktivierung. Des Weiteren wurde die hCFTR Aktivität unmittelbar durch den Dehnungsstimulus erhöht, wenn der hCFTR mit F/I vorstimuliert wurde. Dieser Effekt konnte durch den hCFTR Blocker CFTR_{inh}-172 inhibiert werden. Die Deh-

nungs-induzierte Aktivierung konnte zudem auch bei den zwei häufigen CFTR Mutationen, $\Delta F508$ und G551D, nachgewiesen werden und war unverändert im Vergleich zum Wildtyp hCFTR.

Ziel 2) Um die Dehnungs-sensitive CFTR Aktivität in einem nativen pulmonalen Epithel zu untersuchen, wurden Ussing-Kammer-Experimente mit Lungenpräparaten von *Xenopus* durchgeführt. Die Dehnung des Epithels wurde durch eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks (HD; 5 cm und 10 cm Flüssigkeitssäule) induziert. Unter Kontrollbedingungen resultierte die Applikation von HD in einem Stromabfall und in einer Aktivierung der Cl^- Sekretion. In Anwesenheit des CFTR-Inhibitors GlyH-101 war der HD-induzierte Stromabfall vergrößert, was die Dehnungs-sensitive Aktivierung des CFTR unter Kontrollbedingungen bestätigt.

Ziel 3) Um zu überprüfen, ob die Membranfluidität an der Mechanosensitivität des hCFTR beteiligt ist, wurde die Membranfluidität von hCFTR-exprimierenden Oozyten pharmakologisch erhöht (Methyl- β -Cyclodextrin) oder reduziert (Cholesterol). Die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität war sowohl bei erhöhter als auch reduzierter Membranfluidität verringert im Vergleich zu unbehandelten Oozyten. Dies weist daraufhin, dass die Membranzusammensetzung an der Dehnungswahrnehmung des hCFTR beteiligt ist.

Zur Überprüfung einer möglichen Beteiligung von Zytoskelettelementen an der Dehnungswahrnehmung des hCFTR, wurden Aktinfilamente und Mikrotubuli pharmakologisch destabilisiert und stabilisiert. Die Destabilisierung der Aktinfilamente (Cytochalsin D) sowie der Mikrotubuli (Colchicin) hatte keine Änderung der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität zur Folge. Im Gegensatz dazu führte die Stabilisierung der Aktinfilamente (Phalloidin) und der Mikrotubuli (Paclitaxel) zu einer verringerten Dehnungswahrnehmung des hCFTR. Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden drei C-terminale Aminosäuren (Threonin, Arginin, Leucin; TRL) des hCFTR deletiert, da diese einen Verknüpfungspunkt zum Zytoskelett darstellen. Die Dehnungswahrnehmung dieser ΔTRL hCFTR Mutante war signifikant vermindert im Vergleich zum Wildtyp hCFTR. Diese Ergebnisse zeigten zum ersten Mal, dass ein intaktes Zytoskelett und die Aktin-Bindestelle am C-Terminus des hCFTR notwendig für die Wahrnehmung des Dehnungsstimulus des hCFTR sind.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Dehnung sowohl im *in vitro* System der *Xenopus* Oozyten als auch in einem nativen Lungenepithel der adäquate mechanische Stimulus für die Regulierung der CFTR Aktivität ist. Die zugrundeliegenden Mechanismen offenbarten eine wichtige Rolle der Membranfluidität und des Zytoskeletts bei der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität im Expressionssystem der Oozyten.

Summary

The *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) is a Cl^- conducting ion channel, which is located in the apical membrane of various epithelia of the human body including those of the lung, intestine, pancreas or sweat glands. Mutations of the CFTR gene result in malfunction of the CFTR Cl^- channel and, consequently, lead to dysfunction of electrolyte and fluid homeostasis. That are described by the disease pattern of cystic fibrosis, an autosomal recessively inherited metabolic disorder. A variety of CFTR expressing tissues are permanently in motion and thus exposed to mechanical forces. In the lung, mechanical forces including shear force (SF) and strain occur during the breathing movements. Beside known factors (e.g. ATP, protein kinases) there is preliminary evidence that mechanical forces could also represent a factor that influences CFTR activity. As known from other mechanosensitive ion channels, the membrane composition and a connection with the cytoskeleton could be involved in the detection and transmission of mechanical forces. Based on recent knowledge, and to further explore if the CFTR is a mechanosensitive channel and how it senses mechanical forces, the aims of the present doctoral thesis were:

- 1) to determine if SF and/or strain are adequate mechanical stimuli for regulating CFTR activity,
- 2) to verify mechanical activation of CFTR in a native epithelium, as well as
- 3) to characterise the underlying mechanisms of the mechanically-induced CFTR activation.

Aim 1) The human CFTR (hCFTR) was heterologously expressed in oocytes of the African clawed frog *Xenopus laevis*. The activity of hCFTR was measured by the *two-electrode voltage-clamp* technique (TEVC) and CFTR-mediated currents were elicited by the application of forskolin and IBMX (F/I) in absence and presence of a mechanical stimulus. SF in a physiological relevant range ($1,3 \text{ dyn/cm}^2$) had no influence of hCFTR activity and seems not to be the adequate stimulus for a mechanosensitive hCFTR regulation. By contrast, membrane strain was induced by increasing the oocyte's volume either by osmotic cell swelling or by injection with an intracellular analogous solution. The strain stimulus (osmotic or injection) increased the F/I-induced hCFTR activation. Further, hCFTR activity was directly augmented by the strain stimulus (injection) after pre-stimulation with F/I and this effect could be inhibited with the CFTR blocker CFTR_{inh}-172. The strain response in channels carrying the common mutations ΔF508 and G551D was similar compared to wild type CFTR. These results identified membrane strain as a regulator of hCFTR activity.

Aim 2) The strain-induced CFTR activation was further assessed in Ussing chamber measurements using freshly dissected *Xenopus* lung preparations. Tissues were mechanically stimulated by exposure to hydrostatic pressure (HP) due to increasing the fluid column at the apical side of the chamber to either 5 cm or 10 cm. Under control conditions HP decreased the ion currents and activated a Cl^- secretion. Application of the CFTR inhibitor GlyH-101 augmented the HP-induced current decrease, confirming a strain-sensitive activation of CFTR under control conditions.

Aim 3) To examine a possible impact of membrane fluidity in strain-sensing of hCFTR the membrane cholesterol of oocytes was pharmacologically increased (with methyl- β -cyclodextrin) or decreased (with cholesterol). The strain-induced hCFTR activity was lowered by both strategies compared with untreated oocytes. This indicates that the membrane composition participates in sensation of strain by hCFTR.

In order to investigate on a putative role of the cytoskeleton in the strain-sensing of hCFTR the actin and tubulin filaments were pharmacologically destabilized or stabilized. The destabilisation of actin filaments (with cytochalasin D) as well as tubulin filaments (with colchicine) had no influence in the strain-sensing of hCFTR. By contrast, stabilization of both actin (with phalloidin) and tubulin filaments (with paclitaxel) led to a decrease in the strain-sensing of hCFTR. It is known that the C-terminus of hCFTR is connected to actin cytoskeletal elements. Using site-directed mutagenesis, the three C-terminal amino acids threonine (T), arginine (R) and leucine (L) were deleted (ΔTRL) and this ΔTRL hCFTR mutant was subsequently expressed in *Xenopus* oocytes to compare the strain-sensing with wild type hCFTR. With this approach a significantly reduced strain-induced effect of ΔTRL hCFTR was detected. These results identify for the first time that the strain-sensing of hCFTR requires an intact cytoskeleton as well as the actin-binding motif at the C-terminal end of hCFTR.

In conclusion, these data demonstrate activation of CFTR *in vitro* and in a native pulmonary epithelium in response to membrane strain. The underlying mechanisms revealed an essential role of the membrane fluidity as well as the cytoskeleton in the strain-sensing of hCFTR in the oocyte expression system.

1. Einleitung

1.1 Das Lungenepithel und pulmonaler Ionentransport

Das Lungenepithel von luftatmenden Vertebraten grenzt die Außenwelt vom Körperinneren ab und fungiert somit als eine Barriere. Demzufolge muss das Lungenepithel eine Schutzfunktion übernehmen, um die Lunge vor eingeatmeten Pathogenen und Fremdpartikeln zu bewahren. Um diesen Schutz zu gewährleisten, liegt dem gesamten pulmonalen Epithel eine dünne mehrschichtige Flüssigkeitsschicht (*pulmonary liquid layer*) auf (Daniels und Orgeig 2003). Es wird dabei zwischen der Flüssigkeitsschicht der oberen Atemwege (*airway surface liquid*: ASL) und des Alveolarepithels (*alveolar lining fluid*: ALF; Hollenhorst *et al.* 2011) unterschieden.

In den oberen Atemwegen, zu denen die luftleitenden Strukturen wie Nase, Trachea und Bronchien zählen (Hollenhorst *et al.* 2011), besteht die Flüssigkeitsschicht aus drei Komponenten. Man unterscheidet die obere Mukusschicht, den *Surfactant* und die periziliäre Flüssigkeitsschicht (*pericilliary liquid*: PCL), die direkt auf den Zilien-tragenden Epithelzellen aufliegt (Rubin 2002). Die *Surfactant*-Schicht besteht aus oberflächenaktiven Substanzen, wie Phospholipiden und Proteinen, die von Becherzellen, Zilien-tragenden Zellen und Clara-Zellen sezerniert werden können (Hollenhorst *et al.* 2011). Die oberste Schicht des ASL bildet der Mukus. Dieser besteht hauptsächlich aus dem Glykoprotein Mucin und wirkt durch die Vernetzung der Mukus-Proteine als eine Art Filter. So werden inhalierte Schadstoffe, wie Pathogene oder andere Partikel, im Mukus fixiert. Durch eine koordinierte Bewegung der Zilien wird der Mukus mitsamt den darin enthaltenen Fremdkörper in Richtung Pharynx abtransportiert und schließlich durch Abschlucken in den Magen beseitigt (Pilewski und Frizzell 1999). Dieser Selbstreinigungsprozess der Lunge wird als *mucociliary clearance* bezeichnet (Pilewski und Frizzell 1999; Hollenhorst *et al.* 2011) und ist wichtig für die Immunantwort. Daher ist eine strikte Regulation der Zusammensetzung und Viskosität der ASL essentiell, um eine optimale Schlagbewegung der Zilien zu gewährleisten (Pilewski und Frizzell 1999). Darüber hinaus sind noch weitere immunreaktive Substanzen im ASL zu finden, wie Makrophagen, Neutrophile und die *Surfactant*-Proteine A (SP-A) und D (SP-D; Hollenhorst *et al.* 2011).

Im unteren respiratorischen Teil der Lunge, dem Alveolarepithel, findet bei luftatmenden Vertebraten der Gasaustausch statt. Dem Alveolarepithel liegt ebenfalls ein Flüssigkeitsfilm

(ALF) auf (O'Grady und Lee 2003). Dieser entsteht durch die Infiltration von Flüssigkeit in den alveolaren Raum, welche aus dem vorherrschenden Druckgradienten zwischen Blutgefäßen und den Alveolen resultiert (Hollenhorst *et al.* 2011). Um einen effizienten Gasaustausch über die Blut-Luft-Schranke zu gewährleisten, wird durch die Na^+ Reabsorption die infiltrierte Flüssigkeit aus den Alveolen entfernt (*alveolar fluid clearance*; Hollenhorst *et al.* 2011). In der ALF sind darüber hinaus *Surfactant*-Proteine lokalisiert, die für eine Reduzierung der Oberflächenspannung sorgen und somit ein Kollabieren der Alveolen verhindern (Hollenhorst *et al.* 2011). Des Weiteren spielt die ALF auch eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, da diese beispielsweise Alveolarmakrophagen und immunreaktive Cytokine beinhaltet (Hollenhorst *et al.* 2011). Sowohl die Produktion und Freisetzung von Cytokinen (Andreeva *et al.* 2007) als auch die Sezernierung der *Surfactant*-Proteine (Mutlu und Sznajder 2005) wird von den Alveolaren Typ II (ATII) Zellen bewerkstelligt. Diese kubischen Zellen bedecken ca. 5% der Alveolaroberfläche (Hollenhorst *et al.* 2011). Die großen, flachen Alveolar Typ I (ATI) Zellen sind hingegen hauptsächlich am Gasaustausch beteiligt und kleiden ca. 95% der Alveolaroberfläche aus (Mutlu und Sznajder 2005; Andreeva *et al.* 2007).

Die Flüssigkeitsschichten, die das pulmonale Epithel bedecken (ASL und ALF), werden hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, Höhe und Viskosität streng reguliert, um 1.) eine effektive Selbstreinigung (*mucociliary clearance*) bzw. eine wirkungsvolle Abwehrfunktion und 2.) einen effizienten Gasaustausch im Alveolarepithel zu gewährleisten. Die Zusammensetzung der ASL und der AFL wird überwiegend durch transepitheliale Na^+ , Cl^- und K^+ Ionen-transportprozesse vermittelt (Matthay *et al.* 2002b), die im Folgenden näher beschrieben werden sollen. Über sogenannte epitheliale Na^+ Kanäle (*epithelial Na^+ channels*: ENaC) und *cyclic nucleotide-gated* (CNG) Kationenkanäle in der apikalen Membran von Epithelzellen werden Na^+ Ionen passiv in die Zelle aufgenommen. Angetrieben wird die passive Aufnahme durch die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ ATPase, die aktiv drei Na^+ Ionen im Austausch gegen zwei K^+ Ionen aus der Zelle pumpt. Durch diesen Vorgang wird ein elektrochemischer Gradient für Na^+ Ionen über dem Epithel aufrechterhalten. Dieser generiert wiederum einen osmotischen Gradienten über dem Epithel, dem H_2O passiv folgt und somit die Flüssigkeitsresorption aus den Atemwegen und den Alveolen ermöglicht (Matthay *et al.* 2002b). Der transepitheliale Transport von Cl^- Ionen ist ebenfalls an der transepithelialen Flüssigkeitsbewegung beteiligt. In der apikalen Membran der pulmonalen Epithelzellen sind Ca^{2+} -aktivierte Cl^- Kanäle (CaCC; Jang und Oh 2014) und der *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR; Riordan *et al.* 1989) für die Sekretion von Cl^- Ionen verantwortlich. Damit verbunden ist eine vermehrte Flüssigkeitssekretion in das Lungenlumen. Al-

lerdings wird die Funktion des CFTR im Alveolarepithel kontrovers diskutiert, nachdem einige Studien eine CFTR-vermittelte Absorption von Cl^- Ionen zeigten (Fang *et al.* 2002; Fang *et al.* 2006). Dies würde wiederum eine Flüssigkeitsabsorption aus den Alveolen nach sich ziehen, die in einer Reduzierung der ALF resultieren würde. Die Aufnahme von Cl^- Ionen in die Epithelzelle kann über basolateral lokalisierte $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ Co-Transporter (NKCC; Tessier *et al.* 1990) und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Anionen-Austauscher (Al-Bazzaz *et al.* 2001) stattfinden. Die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten, der für den transepithelialen Ionen- bzw. Flüssigkeitstransport benötigt wird, ist essentiell. Dieser wird in erster Linie durch die Na^+/K^+ ATPase aufrechterhalten. Zudem gewährleisten K^+ Kanäle, dass das Membranpotential negativ bleibt (Bardou *et al.* 2009), was eine Grundvoraussetzung für die Na^+ Absorption sowie die Cl^- Sekretion ist. Eine Störung der Ionentransportprozesse bedingt Änderungen der pulmonalen Flüssigkeitsschichten (ASL und ALF), die zu pathologischen Funktionsstörungen und zur Ausbildung schwerer Krankheiten führen können, wie z. B. pulmonale Ödeme. Hierbei unterscheidet man zwischen interstitiellen pulmonalen Ödemen und dem alveolaren Ödem. Bei letzterem führt ein Ungleichgewicht zwischen Flüssigkeitsreabsorption und -infiltration im alveolaren Bereich, z. B. durch eine verminderte Na^+ Absorption, zu einer Erhöhung der ALF, die nachfolgend den Austausch der Atemgase beeinträchtigt (Sznajder 2001). Demgegenüber führt eine Reduzierung der ALF, bedingt durch eine gestörte CFTR-vermittelte Cl^- Sekretion, zu einer Erhöhung der Viskosität und damit einhergehend zu einer Beeinträchtigung des Selbstreinigungsprozesses der Lunge (Pilewski und Frizzell 1999). Diese pathologische Veränderung des pulmonalen Ionentransports wird mit dem Krankheitsbild der Mukoviszidose assoziiert, das im folgenden Abschnitt detaillierter beschrieben wird.

1.1.1 Mukoviszidose

Mukoviszidose ist die am häufigsten vorkommende, rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit innerhalb der kaukasischen Bevölkerung (Li und Naren 2010; Lubamba *et al.* 2012). Die Erkrankung wird durch eine genetische Veränderung des CFTR-Gens bedingt (Kerem *et al.* 1989; Riordan *et al.* 1989), welches für ein Protein codiert, das überwiegend für den Transport von Cl^- (Gadsby *et al.* 2006; Li und Naren 2010), Bicarbonat (Quinton 2008) und Glutathion (Linsdell und Hanrahan 1998) in exokrinen Epithelien verantwortlich ist. Mukoviszidose gilt als eine Multiorganerkrankung, da das CFTR-Protein in der Lunge (Ratjen und Döring 2003), Pankreas (Wang *et al.* 2013), Schweißdrüsen (Quinton 2007), Geschlechtsorganen (Ahmad *et al.* 2013), Speicheldrüsen (Catalan *et al.* 2010), Intestinum (Pratha *et al.* 2000;

Russo *et al.* 2003), sowie in Leber- und Gallengängen (Martin *et al.* 2012; Kelly und Buxbaum 2015) exprimiert wird. Der Grunddefekt der Mukoviszidose ist der gestörte Cl^- Transport, der in einer Dehydratation der Körpersekrete resultiert. Dies führt beispielsweise zur Insuffizienz des Pankreas, zu intestinalen Resorptionsstörungen und zu chronischen Atemwegsobstruktionen. Obwohl die Funktion zahlreicher Organe beeinflusst wird, ist der pulmonale Krankheitsverlauf der Hauptgrund für die Morbidität und Mortalität der Mukoviszidose. Studien zeigten, dass die periziliäre Flüssigkeitsschicht der ASL in Bronchialzellen von Mukoviszidose-Patienten im Vergleich zum gesunden Atemwegsepithel reduziert ist (Tarran *et al.* 2005; Tarran *et al.* 2006). Zudem ist die Viskosität des Mukus erhöht, wodurch die Effizienz des Zilienschlags der Epithelzellen vermindert wird, sodass die *mucoiliary clearance* nur noch beeinträchtigt stattfinden kann. Die Ansammlung von Mukus bietet einen optimalen Nährboden für Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae*, die chronische Infektionen des Atemwegsepithels hervorrufen (Döring und Ratjen 2006). Dies führt zu einer zunehmenden Fibrosierung der Lunge, sodass das Lungengewebe langfristig zerstört wird und folglich die Atmung und den Gasaustausch bei Mukoviszidose-Patienten erschwert (Boucher 2004). Seit der Identifizierung des CFTR-Gens 1989 (Riordan *et al.* 1989), wurden bis heute knapp 2000 Mutationen beschrieben (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>; Stand 30.03.2015), die in sechs Mutationsklassen eingeteilt werden (Lubamba *et al.* 2012). Bei den Mutationen der Klasse I findet keine Synthese des CFTR-Proteins durch Stop-Codons oder Spleiß-Defekte statt. CFTR-Mutanten der Klasse II werden synthetisiert, aber aufgrund von Fehlfaltungen, mangelnden Glykosylierungen und Defekten bei der Freisetzung durch das Endoplasmatische Retikulum (ER), wird ein überwiegender Teil der Proteine jedoch über den Ubiquitin-Protease-Weg degradiert und somit nicht in die Plasmamembran eingebaut. Zu dieser Mutationsklasse zählt die ΔF508 Mutation, die mit ca. 66% die am häufigsten auftretende CFTR Mutation in Nordeuropa und Nordamerika ist (O'Sullivan und Freedman 2009). Bei der ΔF508 CFTR Mutation fehlt, bedingt durch eine Deletion von drei Basenpaaren, die Aminosäure Phenylalanin (F) an Position 508. Die Mutationen der Klassen III bis VI synthetisieren ein CFTR Protein, welches in die Plasmamembran eingebaut wird. Allerdings beeinträchtigen Fehlregulationen (Klasse III), eine verminderte Cl^- Leitfähigkeit (Klasse IV), fehlerhafte Synthese oder Reifung des Proteins (Klasse V) und eine verringerte Membranstabilität (Klasse VI) die Funktion des CFTR Proteins als Ionenkanal. Die Krankheitsausprägung und der -verlauf der Mukoviszidose können, bedingt durch die verschiedenen Mutationen des CFTR-Gens bzw. Proteins, sehr unterschiedlich sein (O'Sullivan und Freedman 2009; Lubamba *et al.*

2012). Bei den Mutationen der Klasse I bis III und VI gibt es keinen oder lediglich geringe funktionelle CFTR Kanäle in der apikalen Membran, sodass diese Mutationen mit einer schweren Krankheitsausprägung assoziiert sind (O'Sullivan und Freedman 2009; Lubamba *et al.* 2012). Die Klasse IV und V Mutationen besitzen eine Restfunktion des CFTR, die meist in einem milderem Krankheitsbild resultieren (Proesmans *et al.* 2008; Lubamba *et al.* 2012).

Da die Charakterisierung der mechanosensitiven Regulation des CFTR Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, soll nachfolgend der Aufbau des CFTR Proteins und dessen Regulierung näher erläutert werden.

1.2 Die Regulationsmechanismen des CFTR Proteins

Der CFTR ist ein integrales, transmembranes Glykoprotein bestehend aus 1480 Aminosäuren und wird der ATP-bindenden Kasette (*ATP-binding cassette*: ABC)-Transportfamilie zugeordnet (Gadsby *et al.* 2006; Lubamba *et al.* 2012). Die Proteinstruktur des CFTR umfasst zwei membranspannende Domänen (MSD), bestehend aus jeweils sechs transmembranen Helices (Abb. 1). Jede der beiden MSD ist intrazellulär mit einer Nukleotid-Bindedomäne (NBD1 und NBD2) assoziiert, welche mit ATP interagieren können (Gadsby *et al.* 2006; Lubamba *et al.* 2012). Über die Regulatorische Domäne (R-Domäne) wird die NBD1 mit der MSD2 verbunden. Die R-Domäne umfasst insgesamt 10 Konsensstellen für die Phosphorylierung durch verschiedene Proteinkinasen, wie die Proteinkinase A (PKA) und die Proteinkinase C (PKC; Lubamba *et al.* 2012). Die R-Domäne und die Funktion als ATP-abhängiger Cl⁻ Kanal machen den CFTR innerhalb der ABC-Superfamilie einzigartig (Lubamba *et al.* 2012).

1.3 Mechanische Reize und Mechanotransduktion

Damit sich lebende Zellen an mechanische Stimuli aus ihrer Umgebung anpassen können, müssen sie die Fähigkeit besitzen, mechanische Stimuli wahrzunehmen (Mechanorezeption) und diese anschließend in biochemische und elektrochemische Signale umwandeln zu können. Dieser Prozess wird als Mechanotransduktion definiert (Ingber 2006; Brierley 2010). Alle Organismen von den Archeen bis hin zu den Mammalia, sind in der Lage mechanische Kräfte wahrzunehmen und weiterzuleiten (Orr *et al.* 2006). Daher scheint die Mechanotransduktion eine universelle Fähigkeit zu sein, die sich durch die evolutionäre Entwicklung zieht (Ingber 2006; Orr *et al.* 2006). Allgemein unterscheidet man zwischen drei verschiedenen mechanischen Kräften, die auf Zellen wirken können: 1) Druck, 2) Dehnung und 3) Scherkraft (Wirtz und Dobbs 2000; Fredberg und Kamm 2006; Fronius 2012). Druck und Scherkraft (SK) beschreiben eine Kraft, die auf eine bestimmte Fläche wirkt, lediglich der Vektor der Krafteinwirkung ist unterschiedlich (Wirtz und Dobbs 2000; Fronius 2012). Wirkt die Kraft vertikal auf eine Oberfläche bewirkt Druck eine Deformation der Zellen und damit einhergehend eine Dehnung der Zellmembran (Fronius 2012). Die SK entsteht durch die tangentielle Bewegung von Partikeln (z. B. Luft oder Flüssigkeit) an der Epitheloberfläche und dies bedingt eine Verformung und damit einhergehend eine Ausscherung der Epithelzellen. Alle eukaryotischen Organismen verfügen für die Wahrnehmung und Weiterleitung mechanischer Kräfte über verschiedene Mechanosensoren (Abb. 2), d.h. zelluläre Strukturen, die an dem Mechanotransduktionsprozess beteiligt sind. Die Kraftübertragung von benachbarten Zellen wird über den Zell-Zell-Adhäsionskomplex ermöglicht. Zu diesen zählen sowohl Zelladhäsionsmoleküle (Cadherine, Selektine oder Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie) als auch Zellkontakte (Desmosomen, *tight junctions*, *gap junctions* und *adhering junctions*; Ingber 2006; Jaalouk und Lammerding 2009). Zudem kann der Zellkern als Mechanosensor fungieren, wodurch die Transkriptionsmaschinerie und damit einhergehend die Genexpression beeinflusst werden kann (Ingber 2006; Jaalouk und Lammerding 2009). Darüber hinaus gilt auch der Zell-Matrix-Adhäsionskomplex als wichtiger Mechanosensor (Jaalouk und Lammerding 2009). Aber auch die extrazelluläre Matrix (EZM) mit ihrem dichten Netzwerk aus Glykoproteinen (Kollagen, Elastin), Adhäsionsproteinen (Laminin, Fibronectin) und Glykosaminoglykanen (Hyaluronsäure) besitzt mechanosensorische Fähigkeiten (Humphrey *et al.* 2014). Die Übertragung mechanischer Stimuli auf die Zelle wird über verschiedene Integrine (Fibronectin, Laminin und Kollagen) gewährleistet, die einen fokalen Adhäsionskomplex ausbilden über den das Zytoskelett mit der EZM verbunden ist (Jaalouk

und Lammerding 2009; Bukoreshtliev *et al.* 2013). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Oberflächenstrukturen (Glykokalix, Zilien und Stereozilien) an der Wahrnehmung mechanischer Stimuli beteiligt sein können (Ingber 2006; Jaalouk und Lammerding 2009). Aber auch Ionenkanäle und Rezeptoren stellen wichtige Mechanosensoren dar.

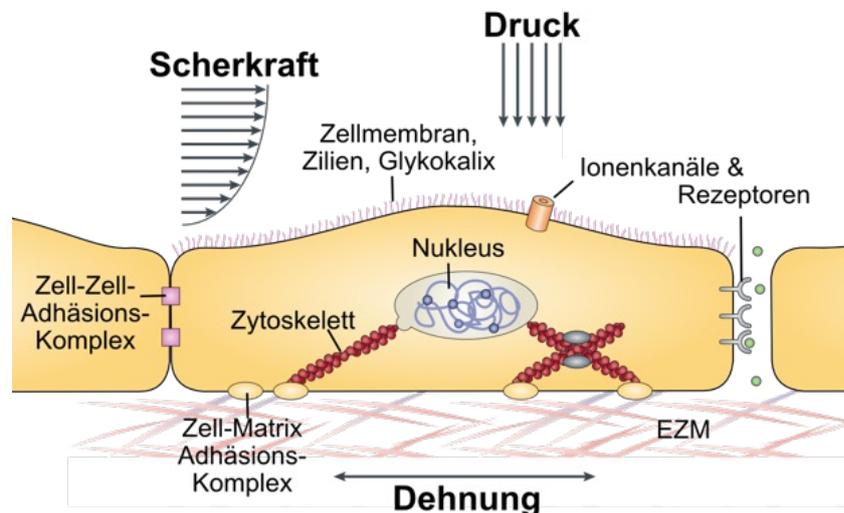


Abb. 2: Schematische Darstellung verschiedener zellulärer und extrazellulärer Komponenten, die als Mechanosensoren fungieren und an dem Mechanotransduktionsprozess beteiligt sein können.

Mechanische Kräfte wie Druck, Scherkraft und Dehnung können auf eine Zelle einwirken. Zahlreiche zelluläre Strukturen können an der Wahrnehmung und Weiterleitung der mechanischen Stimuli beteiligt sein. Dazu gehört die Zellmembran und andere Oberflächenstrukturen, wie Zilien und die Glykokalix, membrangebundene Proteine (Ionenkanäle und Rezeptoren), Verknüpfungen zwischen Zellen (Zell-Zell-Adhäsionskomplex) sowie mit der Extrazellulären Matrix (EZM) über den fokalen Zell-Matrix-Adhäsionskomplex. Aber auch intrazelluläre Strukturen, wie das Zytoskelett und der Nucleus können als Mechanosensoren fungieren. Die Abbildung wurde verändert nach Jaalouk und Lammerding 2009.

Mechanosensitive Ionenkanäle gelten als mechano-elektrische molekulare Schalter, die mechanische Stimuli in bioelektrische Signale umwandeln können (Martinac 2004). Sie sind in allen drei Domänen lebender Organismen (Bakterien, Archeen und Eukaryoten) zu finden, was auf einen frühen evolutionären Ursprung dieser Mechanosensoren hinweist (Martinac 2004). Studien an den Modelorganismen *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* haben mehrere Ionenkanalfamilien als Mechanosensoren identifiziert (Brierley 2010). Zu diesen zählen u.a. Ionenkanäle der Degenerin/ENaC (DEG/ENaC)-Familie und *Transient Receptor Potential* (TRP) Kanäle (Gillespie und Walker 2001; Brierley 2010).

In Hinblick auf mechanosensitive Ionenkanäle werden in der Literatur bislang zwei Modelle diskutiert, welche die Wahrnehmung von mechanischen Stimuli durch Ionenkanäle erklären:

- 1) Das *Bilayer*-Modell geht davon aus, dass mechanische Stimuli zu einer Deformation der Zellmembran oder zu Veränderungen der Membranspannung führen und sich, die in der Zellmembran verankerten Ionenkanäle, einer Konformationsänderung unterziehen, wodurch diese geöffnet werden (Markin und Martinac 1991; Martinac 2004; Ursell *et al.* 2008).
- 2) Das *Tethered*-Modell besagt, dass der Ionenkanal Verknüpfungspunkte mit intrazellulären Komponenten des Zytoskeletts und/oder mit Molekülen der Extrazellulären Matrix besitzt, die für die Detektion und Weiterleitung der mechanischen Stimuli auf den Ionenkanal essentiell sind (Markin und Martinac 1991; Hamill und Martinac 2001; Martinac 2004).

In der vorliegenden Arbeit sollte eine mechanosensitive Regulation der CFTR Aktivität untersucht werden. Der CFTR Cl^- Kanal ist in vielen Epithelien des menschlichen Körpers exprimiert, die fortwährend in Bewegung und folglich mechanischen Kräften ausgesetzt sind. Dies wird besonders deutlich am Beispiel der Lunge, bei der mechanische Kräfte eine wichtige Rolle für die Physiologie aber auch für die Pathophysiologie spielen.

1.3.1 Mechanische Kräfte in der Lunge

Das Atmen ist ein dynamischer Prozess und die Lunge wird während eines jeden Atemzuges gedehnt und gestaucht. Daher ist die Atmung mit verschiedenen mechanischen Kräften assoziiert, zu denen Druck, Dehnung und SK zählen (Fredberg und Kamm 2006; Fronius 2012). Die Dehnung ist die hauptsächliche physikalische Kraft in den alveolaren Regionen der Lunge (Fronius 2012). Die Kontraktion der Atemmuskulatur führt zum Anheben des Brustkorbs. Dadurch entsteht im Alveolarraum ein negativer Druck, der den Einstrom von Luft aus der Atmosphäre bewirkt. Während der Expiration erschlafft die Atemmuskulatur, der Brustkorb verkleinert sich und es entsteht ein positiver Druck auf das Alveolarepithel, der die Luft aus den Lungen presst. Während der Ruheatmung entstehen Drücke von ca. 5 cm H_2O , die bei tiefen Atembewegungen auf ca. 30 cm H_2O ansteigen können (Fronius 2012). Des Weiteren wirkt in Folge des Vorbeiströmens der Luft SK am Epithel der Atemwege (Nasen- und Mundhöhle, Luftröhre und Bronchien; Tarran *et al.* 2006). Auch in der distalen Lunge tritt SK auf, die durch Dehnung des Alveolarepithels und der daraus resultierenden Bewegung der ALF über den Epithelzellen entsteht (Fronius 2012).

Diese mechanischen Stimuli, Dehnung und SK, spielen eine wichtige Rolle für die Funktion der Lunge (Abb. 3). Es ist bekannt, dass mechanische Stimuli beispielsweise an der fötalen Entwicklung und dem Wachstum der Lunge beteiligt sind (Kitterman 1996; Liu und Post 2000). Während des Reifeprozesses der Lunge im Mutterleib findet eine Cl^- -vermittelte Flüssigkeitsresorption statt. Diese Cl^- Sekretion bedingt einen osmotischen Druck, der die Lunge ausdehnt und ist erforderlich, um die Entwicklung der Lunge zu stimulieren (Olver *et al.* 2004). Darüber hinaus ist die Dehnung ein wichtiger Stimulus bei der Differenzierung von ATI und ATII Zellen (Wirtz und Dobbs 2000; Edwards 2001). Neben der Beeinflussung der Zelldifferenzierung und der fötalen Lungenentwicklung, gibt es Hinweise für die Beteiligung von mechanischen Kräften an der Produktion und Sekretion von *Surfactant*-Proteinen durch ATII Zellen (Edwards 2001). Des Weiteren können Dehnungskräfte die Apoptose in ATII Zellen auslösen (Edwards 2001) und sie sind an der Freisetzung von verschiedenen Signalmolekülen, wie cAMP, cGMP, Ca^{2+} und ATP beteiligt (Liu *et al.* 1999; Wirtz und Dobbs 2000; Button *et al.* 2007). Auch die *mucociliary clearance* wird nachweislich durch mechanische Stimuli reguliert (Tarran *et al.* 2006; Winters *et al.* 2007).

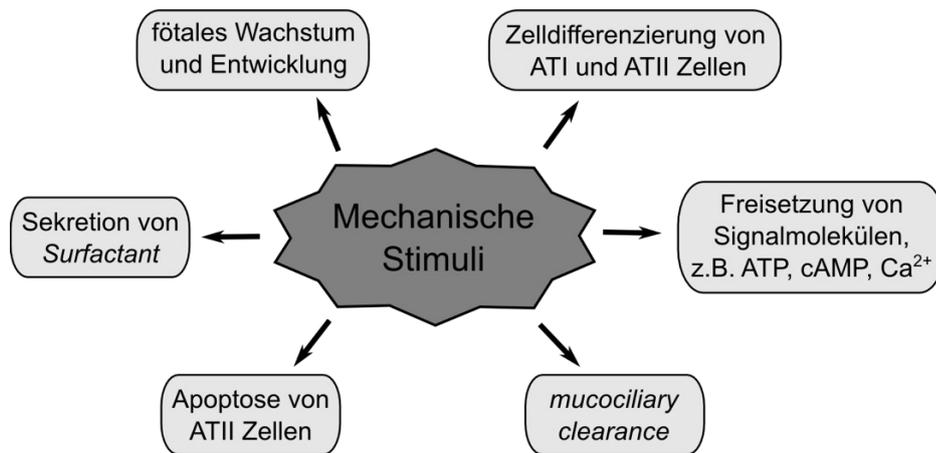


Abb. 3: Der Einfluss von mechanischen Stimuli auf die Funktion und Physiologie der Lunge.

Unter physiologischen Bedingungen sind mechanische Kräfte an einer Vielzahl von pulmonalen Funktionen beteiligt und für diese essentiell.

ATI und II: Alveolare Typ I und II Zellen; ATP: Adenosintri-phosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; Die Abbildung wurde verändert nach Fronius 2012.

Neben den zahlreichen positiven Effekten der mechanischen Kräfte für die Lungenphysiologie (siehe Abb. 3), sind erhöhte mechanische Kräfte in der Lunge (Druck) mit pathophysiologischen Veränderung, insbesondere pulmonalen Ödemen, assoziiert (Fronius 2012). Ein Beispiel hierfür sind die Beatmungs-induzierten Lungenschädigungen (*ventilator-induced lung injury*: VILI). Diese können bei Patienten mit verschiedenen Lungenerkrankungen (*acute lung injury*: ALI; *acute respiratory distress syndrome*: ARDS) auftreten, die ihren Sauerstoffbedarf nicht eigenständig decken können (Frank und Matthay 2003). Die primäre Ursache des VILI basiert auf einer Überdehnung des Alveolarepithels, was nachfolgend zum Flüssigkeitsinflux in die Alveolen führt (Hollenhorst *et al.* 2011). Ein weiteres Beispiel für die Bildung von pulmonalen Ödemen ist zurückzuführen auf eine Erhöhung des linksatrialen Drucks. Dadurch erhöht sich wiederum der Druck in der pulmonalen Vene und dies führt zur pulmonalen Hypertonie (Boyce und Waxman 2003). Der erhöhte Druck in der Lungenzirkulation führt zur Flüssigkeitsinfiltration und –ansammlung im Luftraum (Fronius 2012). Darüber hinaus sind Lungenödeme aber auch auf einer Änderung von pulmonalen Ionentransportprozessen zurückzuführen (Matthay *et al.* 2002a). Dies lässt vermuten, dass erhöhte mechanische Stimuli direkte Auswirkungen auf den epithelialen Ionentransport haben können.

1.4 Bearbeitete Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Aktivität des CFTR Cl^- Kanals durch mechanische Kräfte reguliert werden kann. Eine mechanosensitive Regulation des CFTR ist naheliegend, da der CFTR in vielen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert ist, die stetig in Bewegung und somit mechanischen Kräften ausgesetzt sind. In einer früheren Arbeit am Institut für Tierphysiologie der JLU Gießen wurde gezeigt, dass apikal applizierter hydrostatischer Druck im Lungenepithel von *Xenopus laevis* in einer erhöhten Cl^- Sekretion resultierte (Bogdan *et al.* 2008). Der verantwortliche Cl^- Kanal wurde in der Arbeit von Bogdan und Kollegen allerdings noch nicht identifiziert. Erste Hinweise auf eine mechanosensitive CFTR Regulierung lieferte eine Studie an kultivierten Atemwegsepithelzellen und im intestinalen Epithel von Mäusen (Zhang *et al.* 2010).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob SK und/oder Dehnung einen Einfluss auf die Aktivität des CFTR haben. Für diese Zielsetzung wurde das *Xenopus* Oozyten Expressionsmodell gewählt und mittels Mikroelektroden-Ableitung (*two-electrode voltage-clamp*) wurde der Effekt von SK und Dehnung auf die Aktivität des humanen CFTR (hCFTR) elektrophysiologisch untersucht. Um eine mechanosensitive Aktivierung des CFTR in einem pulmonalen

Epithel zu verifizieren, wurden Lungenpräparate von *Xenopus* für transepitheliale Ionentransportmessungen in einer modifizierten Ussing-Kammer verwendet. Die modifizierte Ussing-Kammer ermöglichte eine mechanische Dehnung des eingespannten Epithels durch die Applikation von hydrostatischem Druck (Bogdan *et al.* 2008). Ein weiteres Ziel bestand darin, die zugrundeliegenden Mechanismen der mechanosensitiven Aktivierung des hCFTR zu erforschen. Basierend auf dem *Bilayer*- und dem *Tethered*-Modell wurde eine Beteiligung der Membranfluidität und des Zytoskeletts an der Wahrnehmung der Dehnungskraft auf den hCFTR untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Das Versuchstier: der Afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis*

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen dieser Arbeit wurden Gewebe und Zellen von ausgewachsenen weiblichen Afrikanischen Krallenfröschen (*Xenopus laevis*) verwendet. *Xenopus* gehört zur Familie der zungenlosen Froschlurche (*Pipidae*; Hilken *et al.* 1997). Das ursprüngliche Verbreitungsgebiet von *Xenopus* umfasst den Südwesten Afrikas. Allerdings ist die Art als Neozoon auf dem restlichen afrikanischen Kontinent und in Frankreich zu finden (Fouquet und Measey 2006). Der Krallenfrosch lebt vorwiegend in stehenden Gewässern oder am Boden von schlammigen Seen und er kann während der Trockenzeit in Schlammsschichten überdauern. Die aquatische Lebensweise der Tiere erkennt man an dem abgeflachten Körperbau, den seitlich abstehenden Schwimextremitäten, den noch oben stehenden Augen und an deutlich ausgeprägten Seitenlinien-Papillen. Das namensgebende Charakteristikum sind die drei schwarzen Hornkrallen an den hinteren Phallangen.

Die hier verwendeten Krallenfrösche wurden als Wildfänge von der Firma *Xenopus Express* (Le Bourg, Frankreich) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppen von max. 11 Tieren in 250 l Kunststoffbecken. Jedes Becken verfügte über einen kontinuierlichen Wasserdurchlauf und das Wasser wurde mittels Druckluft mit Sauerstoff angereichert. Die Wassertemperatur wurde durch einen Aquarium-Regelheizer (Eheim Jäger, Deizisau, Deutschland) auf 20°C temperiert. Als Rückzugs- und Versteckmöglichkeiten befanden sich in den Becken halbierte Tontöpfe. Die Fütterung der Krallenfrösche erfolgte einmal wöchentlich mit handelsüblichen Fischfutter (Taubenhaus Lang, Langgöns, Deutschland), das zuvor für mindestens 30 min in Wasser eingeweicht wurde. Zwei Tage nach der Fütterung wurde ein kompletter Wasserwechsel durchgeführt und sowohl Beckenwände als auch Tontöpfe wurden gründlich gereinigt. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich überwacht und protokolliert. Die Haltung, Fütterung und Tötung der Krallenfrösche wurde gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt und war vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (JLU-Nummer 400_M und 478_M).

2.1.1 Tier- und Gewebepräparation

In dieser Arbeit wurden zum einen *Xenopus* Oozyten für die *two-electrode voltage-clamp* (TEVC) Experimente genutzt. Zum anderen wurden die Lungen der Krallenfrösche in Ussing-Kammer-Messungen eingesetzt. Die Krallenfrösche wurden zunächst in einem Eimer mit 4-7°C kaltem Wasser für mindestens 20 min gehalten, um eine langsame Verringerung der Körpertemperatur zu erreichen. Nachfolgend wurden die Tiere für weitere 20 min in Eiswasser platziert und anschließend das Gehirn mechanisch mit einer Stanze zerstört sowie das Rückenmark sondiert. Zunächst wurde ventral die Haut der Tiere und die darunter befindliche Muskelschicht durchtrennt. Anschließend erfolgte die Entnahme der Ovarien, die direkt in Kultur-Oozytenringer (KulORi; siehe Material und Methoden 2.8) überführt wurden. Bei der Entnahme der dorsal liegenden Lungen war darauf zu achten, dass die Lungenflügel vorsichtig mit einer Pinzette am distalen Ende gegriffen wurden. Die bindegewebigen Verwachsungen der Lungen mit Leber sowie der Körperwand wurden durchtrennt und mit einem Schnitt durch den Bronchus wurde der Lungenflügel frei präpariert. Die Lungen wurden entweder direkt präpariert oder bei 4-7°C in Normal-Ringerlösung (NRS; siehe Material und Methoden 2.8) bis zur Präparation am nächsten Tag aufbewahrt.

Präparation der *Xenopus* Lungen

Vor der Präparation der Lungen wurden mit NRS etwaige anhaftende Blutreste abgespült und die Lungen wurden anschließend in eine Wachsschale überführt. Über den Hauptbronchus wurde der Lungenflügel von proximal nach distal vorsichtig mit einer Schere aufpräpariert. Anschließend wurde das Gewebe mittels Nadeln aufgespannt (Abb. 4B) und mit zwei benadelten Kunststoffringen versehen. Nach dem Durchtrennen des Gewebes wurden die passenden Gegenstücke der Ringe aufgesetzt. Das so fixierte Lungenepithel war bereit für den Einbau in die Ussing-Kammer. Aus einem Lungenflügel erhielt man zwei Präparate mit einer Messfläche von jeweils 0,5 cm².

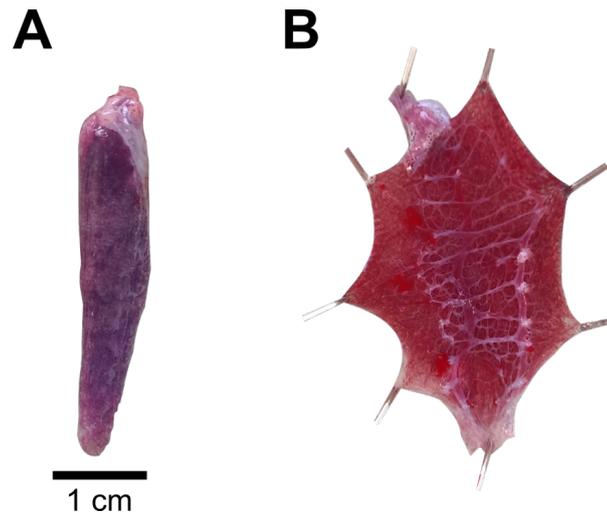


Abb. 4: Die Lunge von *Xenopus laevis*.

A Der frisch entnommene Lungenflügel mit seinem sackförmigen Aufbau. Der distale Teil der Lunge zeigt nach unten. **B** Flächig aufpräparierte Lunge, die mit Nadeln fixiert wurde.

Vereinzelnung der *Xenopus* Oozyten

Die Oozyten, die in dieser Arbeit für Ganzzell-Ableitungen mittels der TEVC-Methode verwendet wurden, mussten zunächst von den anhaftenden Bindegewebsresten befreit werden. Dazu wurden die Ovarienlappen mit Hilfe zweier Pinzetten in kleine Stücke zerzupft und für 90 min in einer Kollagenase-Lösung (1,5 mg/ml KulORi; Serva, Heidelberg, Deutschland) auf einem Schüttler (IKA Schüttler MTS4, Janke und Kunkel, Staufen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Oozyten mit Ca^{2+} -freier Ringerlösung (Ca^{2+} -frei ORi; siehe Material und Methoden 2.8) gewaschen, um Kollagenase und Gewebsreste zu entfernen. Daran schloss sich eine 10-minütige Inkubation der Oozyten in Ca^{2+} -frei ORi an, um anheftende Follikelzellen zu entfernen. Nach einem erneuten Waschschrift mit KulORi wurden die vereinzelt Oozyten der Stadien V und VI (Dumont 1972) unter einem Binokular aussortiert. Die Oozyten besaßen einen Durchmesser von ca. 1 - 1,3 mm und wiesen einen charakteristischen hellen animalen und einen dunklen vegetalen Pol auf. Es wurden lediglich Oozyten aussortiert, die eine gleichmäßige Pigmentierung beider Pole aufwiesen. Die Zellen wurden bis zur cRNA-Injektion in KulORi bei 16°C in einem Brutschrank aufbewahrt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung der hCFTR cRNA

Um den Einfluss von mechanischen Kräften auf die Aktivität des humanen CFTR Cl⁻ Kanal (hCFTR) untersuchen zu können, musste für die heterologe Expression in *Xenopus* Oozyten zunächst die cRNA synthetisiert werden.

Die kodierende Sequenz des hCFTR lag bereits als cDNA in dem pGEM-HE Vektor vor, der freundlicherweise von Frau Prof. Blanche Schwappach (Georg-August-Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt wurde. Der pGEM-HE Vektor besitzt dasselbe Grundgerüst wie alle anderen pGEM-Konstrukte (pGEM-T, pGEM4, pGEM-T *easy*) und umfasst eine ungefähre Größe von 3.000 Basenpaaren. Des Weiteren enthielt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz, die virale Promotersequenz der T7-Polymerase und eine Poly(A)-Sequenz. Für die Linearisierung besaß der Vektor eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym MluI (Abb. 5).

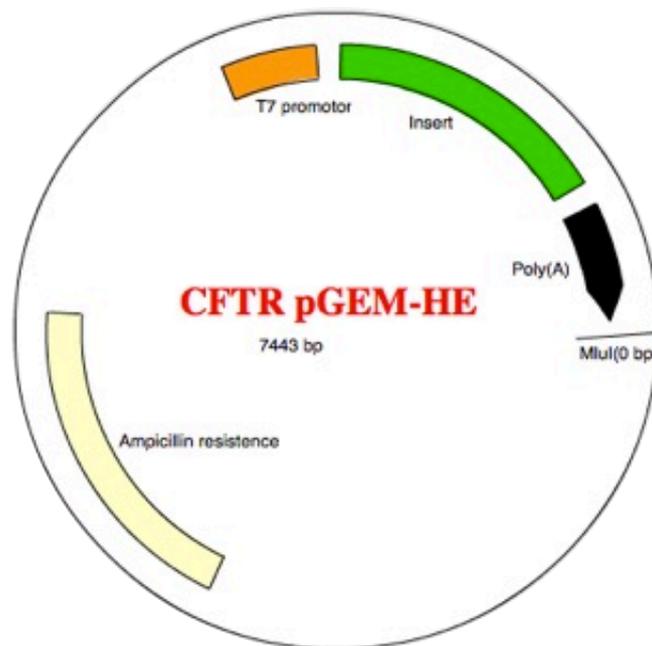


Abb. 5: Plasmidkarte des pGEM-HE Vektors.

Der Plasmidvektor beinhaltet die virale Promotorsequenz T7, das Insert, eine Poly(A)-Sequenz, die Restriktionsstelle des Enzyms MluI und eine Ampicillin-Resistenz. Die Vektorkarte wurde erstellt auf <http://www.infosake.com/plasmid/plasmidFrame.php>.

Transformation in kompetente Bakterienzellen (*E. coli*)

Die Vervielfältigung des hCFTR Plasmids erfolgte über eine Transformation in kompetente Bakterienzellen des *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamms DH5 α . Dazu wurde 1 μ l des hCFTR Plasmids in einem 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und auf Eis gekühlt. Die bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut und anschließend vorsichtig durch Konvertieren gemischt. Danach wurden 50 μ l der Bakteriensuspension mit dem vorgelegten DNA-Vektor vermischt und für 20 min auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt erfolgte eine Hitzeschock-Behandlung bei 42°C für 50 Sekunden. Durch diese kurzfristige Erhöhung der Temperatur bildeten sich Poren in der Zelloberfläche der Bakterien, die essentiell für die Aufnahme des Plasmids in das Bakterium sind. Der Reaktionsansatz wurde anschließend sofort für 2 min auf Eis gestellt, um die Poren der Zellmembran wieder zu schließen. Danach erfolgte, nach Zugabe von 950 μ l LB-Medium zu jedem Bakterienansatz, eine 90-minütige Inkubation bei 37°C und 150 Umdrehungen/Minute (rpm) auf einem Schüttler (Certomat HK, B. Braun, Melsungen, Deutschland). Für das LB-Medium wurden 2,5% LB-Boullion (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in *Aqua bidest* (ddH₂O) gelöst und autoklaviert. Die LB-Agarplatten (4 g LB-Boullion, 3 g Agar in 200 ml ddH₂O) wurden für die Kultivierung der transformierten Bakterien verwendet. Vor dem Gießen der Agarplatten wurde Ampicillin (Sigma) in einer finalen Konzentration von 70 μ g/ml hinzugefügt. Nach dem Trocknen der Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten (LB/amp-Agarplatten) wurden 100 μ l des Transformationsansatzes ausplattiert und anschließend bei 37°C für 12 bis 16 Stunden inkubiert.

Übernachtskultur und Plasmid-Präparation

Da der verwendete hCFTR-tragende pGEM-HE Vektor eine Ampicillin-Resistenz enthielt, wurde gewährleistet, dass auf den LB/amp-Agarplatten nur Bakterien wachsen und Kolonien bilden konnten, die zuvor den Vektor aufgenommen hatten. Diese Klone wurden vorsichtig mit einer sterilen Impföse gepickt und in 10 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium (70 μ g/ml Ampicillin) überführt. Die Flüssigkulturen wurden bei 37°C und 150 rpm auf einen Schüttler über Nacht inkubiert.

Mit einem Teil, der in der Übernachtskultur gewachsenen Bakterien (500 μ l), wurde ein Glycerol-Stock (500 μ l 30% Glycerin-LB-Medium) angesetzt, der für spätere Amplifizierungen des hCFTR Plasmids bei -80°C gelagert wurde.

Mit der verbleibenden Übernachtskultur schloss sich eine Plasmid-Präparation an, die nach

dem Protokoll des *PerfectPrep Mini Kit* (5PRIME, Hilden, Deutschland) durchgeführt wurde. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei Raumtemperatur statt und die benötigten Puffer waren Bestandteil des Kits. Zu Beginn wurde die Übernachtskultur in 15 ml Falcon-Tubes überführt, 10 min bei 6.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Bakterienpellet wurde anschließend in 1 ml LB-Medium resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min zentrifugiert (12.000 rpm). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 250 µl PR1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl PL2 Puffer und 350 µl PN3 Puffer wurde der Bakterienansatz vorsichtig invertiert und anschließend für 10 min zentrifugiert (12.000 rpm). Der Überstand wurde über die Säule CS mittels 2-minütiger Zentrifugation (12.000 rpm) aufgereinigt und anschließend wurde, die in der Probe enthaltene DNA, an die Säule CB3 gebunden. Nach drei Waschschritten mit 500 µl PD Puffer, 700 µl und 500 µl PW Puffer und jeweils 1-minütiger Zentrifugation (12.000 rpm), wurde die Säule zur Trocknung für 5 Minuten offen stehen gelassen. Letztlich wurde die gebundene Plasmid-DNA mit 50 µl RNase freiem Wasser von der Säule gewaschen und die Konzentration photometrisch bestimmt (*Pharmacia Biotech GeneQuant RNA/DNA Calculator*, Freiburg im Breisgau, Deutschland).

Linearisierung des Plasmids

Damit bei der *in vitro* Transkription der komplette Protein-kodierende Leserahmen (Insert) und die Poly(A)-Sequenz vervielfältigt wurden, mussten die isolierten Plasmide durch einen Restriktionsverdau linearisiert werden. Speziell für diesen Zweck ist im pGEM-HE Vektor eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym MluI enthalten. Die Linearisierung erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

Tab. 1: Restriktionsansatz zur Linearisierung des pGEM-HE Plasmids mit MluI.

Substanz	Menge
RNase freies Wasser	... µl
Plasmid-DNA 2 µg	... µl
10-fach Puffer D	3 µl
BSA (bovines Serum Albumin)	0,3 µl
MluI Restriktionsenzym (10 units/µl)	1 µl
Gesamtvolumen	30 µl

Nach dem Zusammenpipettieren wurde der Linearisierungsansatz gut gemischt, abzentrifugiert und für mindestens 2 Stunden bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Im Anschluss wurde die linearisierte Plasmid-DNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion von Proteinen gereinigt. Dafür wurde der Linearisierungsansatz mit RNase freiem Wasser auf 200 µl aufgefüllt und in ein *Phase-Lock-Gel Tube* (*PLG Tube*, 5PRIME) überführt. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform (Sigma) wurde der Ansatz durch Schütteln gemischt und danach für 5 min bei 15.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde erneut 200 µl Phenol/Chloroform zur Probe hinzu pipettiert, gemischt und zentrifugiert (5 min, 15.000 g). In der so erhaltenen oberen, wässrigen Phase befand sich die DNA. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der Probe erfolgte nach Zugabe von 1/10 Volumenanteil eiskaltem Na⁺-Acetat (3 M) sowie ein 2,5-faches Probenvolumen eiskaltem 100% Ethanol über Nacht bei -20°C. Am Folgetag wurde die gefällte Probe für 15 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wurde vorsichtig 500 µl eiskalter 70% Ethanol dem DNA-Pellet hinzugefügt und anschließend erneut zentrifugiert (15 min, 15.000 g, 4°C). Der Überstand wurde tropfenfrei abgezogen, das DNA-Pellet im Exsikkator getrocknet und letztlich in 11 µl in RNase freiem Wasser für 30 min auf Eis gelöst.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Linearisierung des aufgereinigten Ansatzes diente eine Agarose-Gelelektrophorese (1% Agarose-Gel mit 1x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer). Zur Visualisierung der DNA-Bande diente der Farbstoff *Midori Green Direct* (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland). Das Gel wurde für ca. 1 Stunde mit einer Spannung von 100 V gefahren und die Banden wurden nachfolgend mit UV-Licht sichtbar gemacht (Abb. 6).

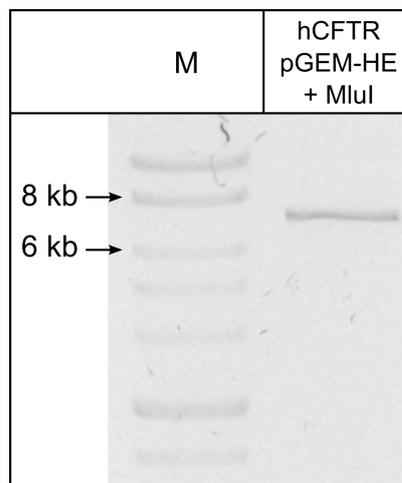


Abb. 6: Kontrolle der Linearisierung, des mit MluI geschnittenen hCFTR pGEM-HE Vektors, mittels 1%-igen Agarose-Gelelektrophorese.

Das linearisierte hCFTR pGEM-HE Konstrukt hatte eine Größe von ca. 7,5 Kilobasen (kb).

M: Marker, 1 kb DNA Ladder (Biomol, Hamburg, Deutschland).

***in vitro* Transkription**

Der in dieser Arbeit verwendete pGEM-HE Plasmidvektor beinhaltet die virale Promotorsequenz T7, die als Startpunkt für die DNA-abhängige RNA-Polymerase diente. Die *run-off* RNA *in vitro* Transkription erfolgte nach dem Protokoll des T7-RiboMAX™ *Large Scale RNA Production System* Kit (PROMEGA, Mannheim, Deutschland) und wurde wie folgt zusammen pipettiert:

Tab. 2: Ansatz für die *in vitro* Transkription.

Substanz	Menge
RNase freies Wasser	3,5 µl
T7 <i>Transcription Buffer</i> (5x)	4 µl
rNTP Mastermix	4 µl
linearisierte Plasmid-DNA (1 µg)	5 µl
CAP-Analog	1,5 µl
T7 Enzym Mix	2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Der Transkriptionsansatz wurde sorgfältig resuspendiert und für 3-4 Stunden bei 37°C in einem Thermoblock inkubiert.

Im Anschluss an die Transkription wurde durch Zugabe von 1 µl RQ1 *RNase free DNase* (1 unit/µg DNA, PROMEGA) die Plasmid-DNA mittels einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C abgedaut. Nachfolgend schloss sich eine Phenol/Chloroform-Extraktion an, um den RNA-Ansatz von Proteinen zu reinigen. Der Transkriptionsansatz wurde mit 80 µl RNase freiem Wasser versetzt (finales Volumen 100 µl) und in ein *PLG Tube* überführt. Nach der Zugabe von 100 µl Phenol/Chloroform wurde der Ansatz durch Schütteln gemischt und für 2 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der zuvor beschriebene Phenolisierungsschritt wiederholt. Die obere RNA-haltige Phase wurde über eine RNA-Reinigungssäule (Spin Columns, ROCHE, Basel, Schweiz) durch Zentrifugation (4 min, 1.100 g, 4°C) von nicht-eingebauten Nukleotiden befreit. Der Durchfluss wurde mit 1/10 Volumenanteil eiskaltem Na⁺-Acetat (3 M) und dem 3-fachem Volumen eiskaltem 100% Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die Fällung wurde anschließend für 30 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wurde das RNA-Pellet mit 500 µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min, 15.000 g, 4°C). Der Überstand wurde tropfenfrei abgezogen, das RNA-Pellet im Exsikkator getrocknet und anschließend in 20 µl RNase freiem Wasser auf Eis gelöst. Die Konzentration der RNA wur-

de anschließend photometrisch bestimmt (*Pharmacia Biotech GeneQuant RNA/DNA Calculator*). Zur Überprüfung der erfolgreichen *in vitro* Transkription wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Visualisierung der Banden wurde der RNA-Farbstoff *ROTI-Gelstain* (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) einem 1%-igen Agarose-Gel zugefügt. Um Sekundärfaltungen der RNA zu verhindern, wurden die RNA-Proben und der RNA-Marker (*RiboRuler High Range RNA Ladder*, ThermoScientific, Schwerte, Deutschland) für 10 min bei 70°C im Thermoblock denaturiert. Anschließend wurde das Agarose-Gel für ca. 1 Stunde bei 100 V gefahren (Abb. 7).

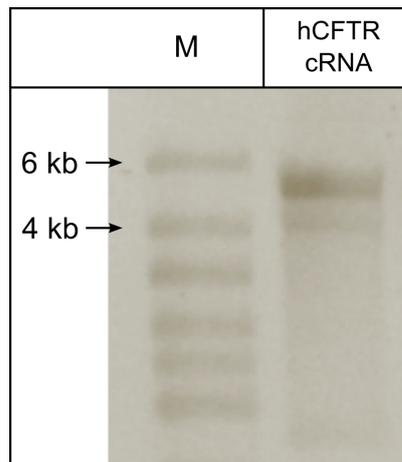


Abb. 7: Kontrolle der *in vitro* Transkription mittels 1% Agarose-Gelelektrophorese. Die hCFTR cRNA wies eine Größe von ca. 4,5 Kilobasen (kb) auf. M: Marker, *RiboRuler High Range RNA Ladder*.

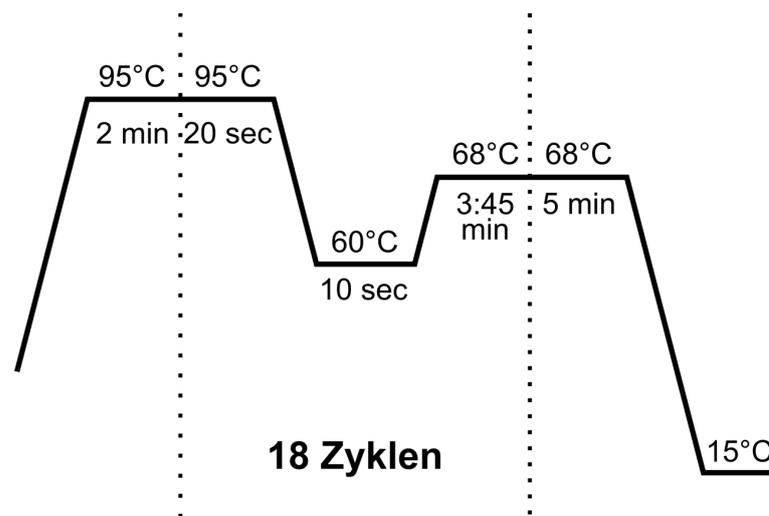
2.2.2 Generierung der hCFTR Mutanten

In dieser Arbeit wurden mittels zielgerichteter Mutagenese die $\Delta F508$ und die G551D Mutante des hCFTR generiert, um anschließend in TEVC-Experimenten die Mechanosensitivität dieser beiden Mutanten zu untersuchen. Für die Generierung der hCFTR Mutanten und die Veränderung der codierenden Sequenz des hCFTR, wurde mit Hilfe eines speziellen Online Tools (*Primer Design Tool*, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) die Mutagenese-Primerpaare erzeugt (Tab. 9). Die Mutagenese erfolgte mittels einer Methode, die auf der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*: PCR) beruht, um die mutierten Plasmide exponentiell zu amplifizieren. Für die Mutagenese-PCR wurde des *QuikChange Lightning Site-directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammen pipettiert:

Tab. 3: Ansatz für die Mutagenese-PCR.

Substanz	Menge
10x <i>reaction buffer</i>	5 μ l
100 ng Template-DNA	... μ l
125 ng <i>forward</i> Mutagenese-Primer	... μ l
125 ng <i>reverse</i> Mutagenese-Primer	... μ l
dNTP Mix	1 μ l
<i>QuikSolution</i>	5 μ l
RNase freies Wasser	... μ l
<i>QuikChange Lightning</i> Enzym	1 μ l
Gesamtvolumen	50 μ l

Anschließend wurden die Ansätze in einen Thermocycler (*TProfessional Basic*, Analytik Jena, Jena, Deutschland) überführt und die PCR nach folgendem Schema durchgeführt (Abb. 8).

**Abb. 8: Temperatur-Zeit-Diagramm der PCR für die Generierung der hCFTR Mutanten.**

Um im Anschluss an die Mutagenese-PCR die noch vorhandene Wildtyp-DNA zu entfernen, wurde der Reaktionsansatz mit 2 μ l des Enzym DpnI versetzt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Dieses Restriktionsenzym erkennt methylierte und hemimethylierte DNA und spaltet diese. Die PCR-Produkte, die nicht methyliert sind, wurden auf diese Weise selektiert. Die mutierten Plasmide (2 μ l) wurden nachfolgend in kompetente Bakterien (DH5 α) transformiert (siehe Material und Methoden 2.2.1) und bei -80°C gelagert. Nach der Isolierung der cDNA aus den Bakterien, wurden die erzeugten hCFTR Mutanten durch den Sequenzier-Service der Firma *Eurofins MWG Operon* sequenziert. Die erhaltenen Sequenziererergebnisse (siehe An-

hang 7.1) wurden mit dem *UniProt Align* Online-Tool (<http://www.uniprot.org>) auf die erfolgreiche Veränderung der Basenpaarsequenz überprüft. Im Anschluss daran wurde mittels *in vitro* Transkription die cRNA der hCFTR Mutanten erzeugt, die dann für die Mikroinjektion in *Xenopus* Oozyten zur Verfügung stand (siehe Material und Methoden 2.2.3).

2.2.3 Mikroinjektion der cRNA

Die heterologe Expression des Wildtyp (WT) hCFTR und der hCFTR Mutanten ($\Delta F508$ und G551D) erfolgte in *Xenopus* Oozyten, die zuvor aus den Ovarienlappen vereinzelt wurden (siehe Material und Methoden 2.1.1). Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, wurden zunächst alle Arbeitsflächen und Geräte mit 70% Ethanol gereinigt und sämtliche Arbeitsschritte mit Handschuhen durchgeführt. Die Injektion erfolgte mit Hilfe eines Nano-Injektors (Drummond Scientific, Broomall, USA), der ebenfalls sorgfältig mit Ethanol gereinigt wurde. Die für die Mikroinjektion verwendeten Borosilikat-Glaskapillaren (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) wurden mit einem Horizontal-Puller (DMZ Universal-Puller, Zeitz Instruments, Martinsried, Deutschland) ausgezogen, luftblasenfrei mit Mineralöl (Sigma) befüllt, auf die Nadel des Injektors geschoben und arretiert. Unter dem Binokular wurde die zugeschmolzene Kapillarenspitze mittels einer zuvor ebenfalls mit Ethanol gereinigten Pinzette vorsichtig abgebrochen. Zur Equilibrierung des Drucks in der Kapillare wurde diese für mindestens 5 min in Mineralöl eingetaucht. Währenddessen wurden die Oozyten auf einen Injektionsschlitten (Eigenbau des Instituts für Tierphysiologie) aufgereiht, der sich in einer mit KulORi befüllten Petrischale befand. Die aufgetaute cRNA wurde auf eine mit Parafilm bespannte Petrischale pipettiert und mit dem Injektor aufgesogen. Anschließend wurde mit der Kapillare vorsichtig in die aufgereihten Oozyten eingestochen und ein Volumen von 50,6 nl injiziert. Die cRNA-Konzentration betrug sowohl für den WT hCFTR als auch für die beiden hCFTR Mutanten 12,6 ng pro Oozyte. Zur Kontrolle wurden parallel Oozyten mit dem gleichen Volumen (50,6 nl) des cRNA-Lösungsmittels (DEPC-Wasser) injiziert. Nach der Mikroinjektion wurden die Oozyten in 24- bzw. 48-*well*-Platten bei 17°C im Brutschrank gelagert. Die TEVC-Experimente fanden 2-4 Tage nach der cRNA-Injektion statt.

2.3 Elektrophysiologische Methoden

Um den Einfluss von mechanischen Kräften (SK und Dehnung) auf den CFTR funktionell zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit elektrophysiologische Ganzzell-Messungen mittels der *two-electrode voltage-clamp* Methode sowie Ussing-Kammer-Messungen mit *Xenopus* Lungenpräparaten durchgeführt.

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

Die *two-electrode voltage-clamp* (TEVC) Technik ermöglicht die Messung von Ionenströmen über die Zellmembran größerer Zellen, wie beispielsweise *Xenopus* Oozyten. Das Messprinzip der TEVC Technik erlaubt es, das Membranpotential (V_M) einer Zelle auf einen konstanten Wert zu klemmen (V_C). Über eine in die Zelle eingestochene Potentialelektrode wird das V_M der Zelle gemessen. Über die ebenfalls in die Zelle eingestochene Stromelektrode kann bei eventuellen Differenzen zwischen V_M und V_C ein dem Membranpotential entgegengesetzter Kompensationsstrom auf die Zelle appliziert werden. Der Strom, der für den Ausgleich der Potentiale notwendig ist, entspricht dem Ionenstrom über die Zellmembran und wird als Transmembranstrom (I_M) bezeichnet.

Eine Darstellung des Versuchsaufbaus, der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen, ist in Abb. 9 zu sehen. Die *Xenopus* Oozyten wurden in einer Plexiglas-Messkammer platziert und durch ein gravitationsbetriebenes Perfusionssystem permanent mit frischer Oozyten Ringerlösung (ORi; siehe Material und Methoden 2.8) umspült. Um mögliche Verwirbelungen der Perfusionslösung und damit einhergehend mechanischen Stress zu vermeiden, wurde die Oozyte von einem Schutzschild vor dem Zulauf abgeschirmt. Die Perfusionslösung wurde über einen Ablauf am gegenüberliegenden Kammerende durch eine Saugpumpe abgesaugt. Das beschriebene Perfusionssystem erlaubte ein Ein- und Auswaschen von in ORi gelösten Pharmaka in die Messkammer. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

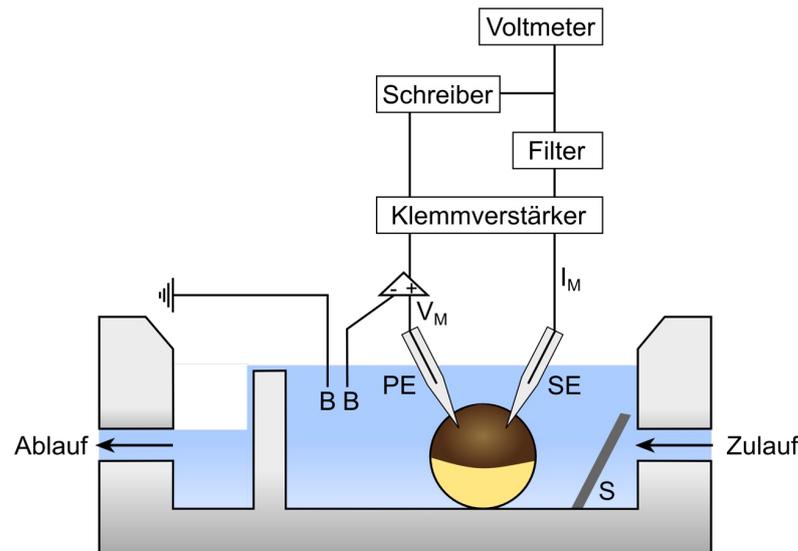


Abb. 9: Versuchsanordnung der *two-electrode voltage-clamp* (TEVC) Messungen.

B: Badelektrode; I_M : Transmembranstrom; PE: Potentialelektrode; S: Schutzschild; SE: Stromelektrode; V_M : Membranpotential.

Sowohl die Potential- als auch die Stromelektrode bestanden aus ausgezogenen Borosilikat-Filamentkapillaren (Hilgenberg). Die Glaskapillaren wurden mit 1 M KCl befüllt, auf einen chlorierten Silberdraht (Chlorierung: Eintauchen des Drahtes für 10 sec bei 1 V Spannung in eine in 0,1 M HCl-Lösung) geschoben und anschließend an der Plexiglashalterung arretiert. Die so hergestellten Messelektroden wurden auf die Mikromanipulatoren aufgesetzt. Vor Beginn der Messung wurden die Elektroden in die Perfusionslösung eingetaucht und über einen *voltage-clamp* Messverstärker (*Oocyte Clamp OC-275B*, Warner Instruments, Hamden, USA) wurde das Eigenpotential der Mikroelektroden zunächst auf 0 mV abgeglichen und nachfolgend der Elektrodenwiderstand bestimmt. In den Versuchen wurden lediglich Elektroden mit einem Widerstand zwischen 1 und 10 M Ω verwendet. Anschließend konnten die Elektroden vorsichtig in die Oozyte eingestochen werden. Das Membranpotential wurde nach Punktion der Oozyte am Messverstärker abgelesen und nach einer Einpendlungszeit von ca. 5 min auf einen Wert von -60 mV geklemmt. Der Transmembranstrom wurde gefiltert (1 kHz; Frequency Device 902, Ottawa, USA), mit einem Schreiber (Kipp & Zonen, Delft, Niederlande) kontinuierlich aufgezeichnet und auf einem Voltmeter abgelesen. Alle Apparaturen befanden sich in einem Faraday'schen Käfig, um unerwünschte elektromagnetische Störungen zu vermindern.

Vorzeichenkonvention

In den Ganzzell-Messungen mit der TEVC-Technik wurde ein transmembraner Summenstrom (I_M) gemessen. Ein Transport von positiver Ladung in die Zelle (z.B. Na^+ Ionen) oder negativer Ladung (z.B. Cl^- Ionen) aus der Zelle heraus wird als Stromstimulation bezeichnet und erhält ein negatives Vorzeichen. In den Abbildungen wurde dieser I_M als Auslenkung nach unten dargestellt.

Mechanische Stimulation der *Xenopus* Oozyten

In der vorliegenden Arbeit sollte eine mögliche Wirkung von mechanischen Kräften (SK und Dehnung) auf die Aktivität des heterolog exprimierten hCFTR untersucht werden. Daher wurden während der TEVC-Messungen die *Xenopus* Oozyten durch SK bzw. Dehnungskräfte mechanisch stimuliert.

Der Dehnungsreiz wurde über eine Erhöhung des Oozytenvolumens auf zwei unterschiedliche Weisen hervorgerufen. Zum einen wurde die Zellvolumenerhöhung durch die Injektion eines bestimmten Volumens einer intrazellulär analogen Lösung (siehe Material und Methoden 2.8) verursacht. Dafür wurde vor Beginn der TEVC-Messung eine mit der intrazellulär analogen Lösung befüllte Glaskapillare in die Oozyte eingestochen, über die mittels eines Nano-Injektors (Drummond Scientific) unterschiedliche Volumina in die Oozyte injiziert werden konnten. Zum anderen wurde durch eine 20-minütige Perfusion mit hypo-osmotischer Ringerlösung (siehe Material und Methoden 2.8) das Volumen der gemessenen Oozyte osmotisch erhöht. Zudem wurden die Oozyten 20 min in hyper-osmotischer Ringerlösung inkubiert (siehe Material und Methoden 2.8), um auf diese Weise Kompressionskräfte zu erzeugen, die durch das Schrumpfen der Zelle verursacht werden.

Die Applikation von SK erfolgte über eine modifizierte Messkammer (Knöpp 2014). Diese war im Vergleich zu der oben beschriebenen Kammer (siehe Abb. 9) sehr schmal gebaut und zudem fehlte der Schutzschild. Die Oozyte wurde direkt vor dem Zulauf der Perfusionslösung platziert, sodass der Lösungsstrom direkt auf die Zelle traf und SK an der Oozytenoberfläche verursachte. Mit Hilfe eines Luftdruck-betriebenen Perfusionssystems (*Valve control system*, ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA) konnte die Perfusionsgeschwindigkeit und damit einhergehend die Applikation der SK gezielt reguliert werden.

Für die Berechnung der SK wurde zunächst die mittlere Strömungsgeschwindigkeit (ω) bestimmt.

$$\omega = \frac{V}{A}$$

ω : mittlere Strömungsgeschwindigkeit (m/s)
 V : Volumenstrom (m³/s)
 A : Querschnittsfläche des Perfusionsschlauchs

Bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 6 ml/min und einem Durchmesser des Perfusionsschlauchs von 2 mm ergibt sich eine mittlere Strömungsgeschwindigkeit von $\sim 0,032$ m/s.

Anschließend erfolgte die Berechnung der Reynolds-Zahl (R_e), die eine Aussage über die Art der Strömung, turbulent oder laminar, zulässt.

$$R_e = \frac{\rho\omega D}{\eta}$$

ρ : Dichte (kg/m³) für Wasser bei 20°C = 998 kg/m³
 ω : mittlere Strömungsgeschwindigkeit (m/s)
 D : Durchmesser des Perfusionsschlauchs
 η : dynamische Viskosität (Ns/m²) für Wasser bei 20°C = 0,001 Ns/m²

Die errechnete R_e liegt bei ~ 64 und entspricht einer laminaren Strömung (Hoger *et al.* 2002).

Nachfolgend wurde die auftretende Zugkraft (F_{Zug}) errechnet.

$$F_{Zug} = 0,5 \rho A \omega^2 C_{Zug}$$

ρ : Dichte (kg/m³) für Wasser bei 20°C = 998 kg/m³
 A : Querschnittsfläche des umströmten Bereichs (m²)
 ω : mittlere Strömungsgeschwindigkeit (m/s)
 C_{Zug} : Zugkraftkoeffizient (dimensionslos), ~ 1

Für die TEVC-Messungen ergibt sich eine Zugkraft von $3,9 * 10^{-7}$ N.

Die errechneten Zugkräfte werden letztlich mit der umströmten Oberfläche der Oozyte ins Verhältnis gesetzt.

$$F_{Scher} = \frac{F_{Zug}}{A}$$

F_{Zug} : Zugkraft (N)
 A : Oozytenoberfläche (m²) = $3,1 * 10^{-6}$ m²

Die errechnete SK für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente betrug $1,3$ dyn/cm².

2.3.2 Die modifizierte Ussing-Kammer

Die Ussing-Kammer wurde Mitte des 20. Jahrhunderts von dem dänischen Physiologen Hans Ussing entwickelt. Mit dieser Messmethode ist es möglich Ladungsverschiebungen über ein Epithel bestimmen. Die Grundlage dessen bildet der vektorielle Transport von Ionen und damit einhergehend die Ladungsverschiebung, die eine transepitheliale Spannung (V_T) generiert. Mit Hilfe der V_T kann eine qualitative Aussage über die Netto-Transportrichtung gemacht werden, jedoch lässt sich keine quantitative Aussage über die transportierten Ionen treffen. Aus diesem Grund wird das Prinzip der Spannungsklemme (*voltage-clamp*) benötigt. Dabei wird dem V_T ein Kompensationsstrom entgegengesetzt, um die Spannung über dem Epithel auf 0 mV zu halten. Dieser entgegengesetzte Strom wird als Kurzschlussstrom (I_{SC}) bezeichnet.

Die in dieser Arbeit verwendete Ussing-Kammer bestand aus zwei Kompartimenten (Abb. 10), die durch das zuvor präparierte Lungenepithel (siehe Material und Methoden 2.1.1) voneinander getrennt wurden. Das apikale und basolaterale Kompartiment konnten unabhängig voneinander, über ein gravitationsbetriebenes Perfusionssystem, mit Ringerlösung (NRS; siehe Material und Methoden 2.8) bzw. Pharmaka perfundiert werden. Die modifizierte Ussing-Kammer besaß einen Schornstein auf dem apikalen Kompartiment, über den die Ablaufhöhe der Perfusionslösung verändert werden konnte. Zu diesem Zweck hatte der Schornstein drei seitliche Abflussmöglichkeiten mit einem Abstand von je 5 cm. Durch Verschließen des unteren Abflusses mit einem Gummistopfen, konnte eine Flüssigkeitssäule von 5 cm aufgebaut werden und damit einhergehend hydrostatischer Druck (HD) auf das eingespannte Epithel appliziert werden. Darüberhinaus konnte die Flüssigkeitssäule durch Verschließen der beiden untersten Abflüsse auch auf 10 cm erhöht werden, wodurch sich ebenfalls der HD auf das Epithel erhöht. Auf der basolateralen Seite der Ussing-Kammer war die Abflusshöhe nicht variabel und auf eine Höhe von 0 cm Flüssigkeitssäule festgelegt.

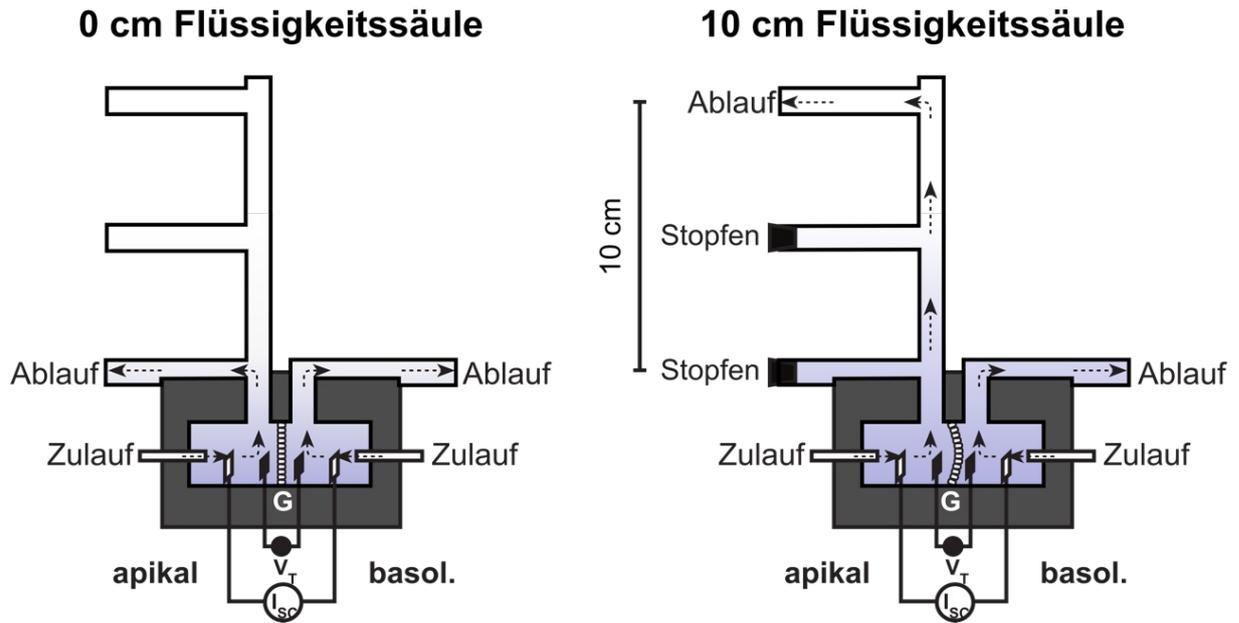


Abb. 10: Schematische Darstellung der modifizierten Ussing-Kammer.

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. Mit Hilfe des Schornsteins auf der apikalen Seite konnte der 0 cm Ablauf durch einen Stopfen verschlossen werden und somit eine 5 cm bzw. 10 cm Flüssigkeitssäule auf das eingespannte Gewebe appliziert werden. Zur elektrischen Ableitung war die Ussing-Kammer mit gewebnahen Potentialelektroden und gewebsernen Stromelektroden ausgestattet. Die Abbildung wurde verändert nach Bogdan *et al.* 2008.

Um die Ionentransportprozesse über das Epithel bestimmen zu können, wurde die Ussing-Kammer mit vier Elektroden ausgestattet, zwei Potential- und zwei Stromelektroden. Hierzu wurden modifizierte 200 μ l Pipettenspitzen verwendet, die mit einer 1 M KCl Agarbrücke (2,5% Agar) gefüllt waren. Die Agarbrücke wurde mit 1 M KCl Lösung überschichtet. In diese KCl-Lösung wurden Silberdrähte eingetaucht, die zuvor 10 sec bei 5 V in 0,1 M HCl chloriert wurden. Für die Ussing-Kammer-Messungen wurden ausschließlich Elektroden verwendet deren Eigenpotential kleiner als 1 mV, gemessen in NRS, war.

Die fertig zusammengebaute Ussing-Kammer wurde über die Elektroden in den Kammerhälften elektrisch mit der Messtechnik verbunden und innerhalb eines Faraday'schen Käfigs platziert. Zu Beginn jeder Messung wurde das Epithel zunächst mit NRS perfundiert und das V_T im *open-circuit* Modus gemessen. Anschließend wurde mit dem *voltage-clamp* Messverstärker ein Potential von 0 mV angelegt und der dadurch generierte Kurzschlussstrom (I_{sc}) wurde kontinuierlich über einen Schreiber (Kipp & Zonen) aufgezeichnet. Der I_{sc} wurde zudem durch ein Interface (MacLab Interface, ADInstruments, Spechbach, Deutschland) digitalisiert und auf einem Computer (Macintosh LC II, Apple, Cupertino, USA) mittels des Programmes Chart Software (ADInstruments) aufgenommen und gespeichert. Zur Ermittlung des

transepithelialen Widerstandes (R_T) im *voltage-clamp* Modus wurde ein kurzer Spannungspuls (1,5 sec) von 5 mV auf das Epithel appliziert. Aus der entstandenen Stromdifferenz (ΔI_{Puls}) konnte mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes der Widerstand bestimmt werden.

$$R_T (\Omega) = \frac{U(V)}{\Delta I_{\text{Puls}} (\mu A)}$$

Der R_T wurde zu Beginn jeder Messung und vor, während sowie nach der Applikation eines Pharmakon bzw. HD bestimmt.

Das *Xenopus* Lungenepithel benötigte eine ungefähre Equilibrierungszeit von 3 Stunden, bevor der I_{SC} einen stabilen Wert erreichte. Anschließend wurde mit dem eigentlichen Experiment begonnen. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Vorzeichenkonvention

Der bei den Ussing-Kammer-Experimenten gemessene I_{SC} stellt ein Netto-Ionenstrom dar und setzt sich aus verschiedenen Ladungsverschiebungen zusammen. Der transepitheliale Transport positiver Ladung von apikal nach basolateral (Kationen-Resorption) bzw. negativer Ladung von basolateral nach apikal (Anionen-Sekretion) wird als positiver Strom angegeben und wurde in den Abbildungen als Ausschlag nach oben dargestellt. Ein Abfall des I_{SC} entspricht daher der entgegengesetzten Ionenverschiebung.

2.4 Messung des Volumens von *Xenopus* Oozyten

Um eine Aussage über eine mögliche Änderung des Zellvolumens von *Xenopus* Oozyten in Folge der Injektion einer intrazellulär analogen Lösung sowie der Behandlung mit hypo- und hyper-osmotischer Lösung zu treffen, wurden foto-optische Analysen durchgeführt. Dafür wurden die Oozyten mit Hilfe eines Binokulars (4-fach Vergrößerung) vor und nach der jeweiligen Behandlung fotografiert. Mittels einer Mikrometer-Skala, die in der identischen Vergrößerung wie die Oozyten mitfotografiert wurde, konnte die animale-vegetale (anterior-posterior) und die äquatoriale Achse der Oozyten ausgemessen werden. Anschließend wurden die zwei Werte gemittelt und mit diesem Durchmesser wurde das Volumen der Oozyte berechnet (Formel Kugelvolumen: $4/3\pi r^3$). Für die Auswertung wurden das Ausgangsvolumen der Oozyte gleich 100% gesetzt und die Veränderungen des Volumens wurden als prozentuale Werte angegeben.

2.5 Modifizierung der Zytoskelettelemente von *Xenopus* Oozyten

Das Zytoskelett von *Xenopus* Oozyten ist, wie bei allen eukaryotischen Zellen, aus drei Filamentsystemen aufgebaut: 1) Mikrotubuli, 2) Aktinfilamente und 3) Intermediärfilamente (Gard 1999). Diese Strukturen sind an einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen während der Oogenese und an der mechanischen Stabilisierung der Oozyten beteiligt.

Es ist bekannt, dass die Verankerung von Ionenkanälen in der Zellmembran durch die Interaktion mit dem Zytoskelett beeinflusst werden kann. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Interaktion zwischen dem CFTR und dem Zytoskelett wichtig für die Wahrnehmung von mechanischen Kräften sein könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in einige Messungen die Stabilität der Mikrotubuli und Aktinfilamente der Oozyten pharmakologisch verändert (stabilisiert oder destabilisiert). Nachfolgend wurden die möglichen Auswirkungen der pharmakologischen Behandlung auf die Mechanosensitivität des hCFTR in TEVC-Experimenten untersucht. Darüberhinaus wurde eine hCFTR Mutante mittels zielgerichteter Mutagenese erzeugt, bei der eine mögliche Bindestellen zwischen dem hCFTR und den Aktinfilamenten deletiert wurde.

2.5.1 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind röhrenförmige Proteine, die aus α - und β -Tubulin bestehen und sie sind verbunden mit einer Vielzahl von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (*membrane associated proteins*, MAPs).

Die Destabilisierung der Mikrotubuli der *Xenopus* Oozyten erfolgte mit Colchicin. Dieses toxische Alkaloid aus der Herbst-Zeitlosen bindet freie Tubulin-Proteine, sodass die Ausbildung des Spindelfaserapparates während der Mitose verhindert wird (Heidemann und Kirschner 1975; Machu 1998). Für die Stabilisierung der Mikrotubuli wurde Paclitaxel verwendet, welches den Abbau von Mikrotubuli inhibiert, indem es an β -Tubulin bindet (Jesus *et al.* 1988; Verde *et al.* 1991). Colchicin (50 μ M) und Paclitaxel (10 μ M) wurden in ORi gelöst. Die *Xenopus* Oozyten wurden für 60-120 min mit den Pharmaka inkubiert und anschließend TEVC-Messungen durchgeführt. In weiteren Experimenten wurden Colchicin (40 μ M) bzw. Paclitaxel (10 μ M) in das Zytoplasma der Oocyte injiziert, um eine eventuell schlechte Membranpermeabilität beider Substanzen entgegenzuwirken. Beide Prozeduren sind bekannt und etabliert für die Veränderung der Mikrotubuli in *Xenopus* Oozyten (Jesus *et al.* 1988; Moran *et al.* 2000).

2.5.2 Aktinfilamente

Aktinfilamente bestehen aus filamentärem Aktin (F-Aktin), das sich wiederum aus globulären Aktinmolekülen (G-Aktin) zusammensetzt.

Um die Aktinfilamente der *Xenopus* Oozyten zu destabilisieren wurde in der vorliegenden Arbeit Cytochalasin D verwendet, welches die Polymerisierung des Aktins inhibiert (Cooper 1987). Um die Depolarisierung des F-Aktins und der verbundenen Stabilisierung der Aktinfilamente zu verursachen, wurde Phalloidin eingesetzt (Cooper 1987). Da Phalloidin nicht membrangängig ist, wurde es vor den TEVC-Messungen in die Oozyten injiziert (40 μM). Die Destabilisierung der Aktinfilamente erfolgte durch eine 60-120 minütige Inkubation der Oozyten in Cytochalasin D (10 μM) und durch die Injektion von Cytochalasin D (20 μM).

Mutation der Verknüpfungsstellen zwischen CFTR und Aktinfilamenten

Neben der pharmakologischen Modifizierung der Aktinfilamente wurde in dieser Arbeit zudem eine zielgerichtete Mutagenese (siehe Material und Methoden 2.2.2) durchgeführt, um eine mögliche Verknüpfungsstelle zwischen dem hCFTR und den Aktinfilamenten zu zerstören. Das Konstrukt wurde anschließend in *Xenopus* Oozyten exprimiert und nachfolgend in TEVC-Experimenten auf eine etwaige Veränderung in der Wahrnehmung von mechanischen Kräften überprüft und mit dem Wildtyp hCFTR verglichen. Es gibt Hinweise darauf, dass der CFTR Cl^- Kanal über dessen C-Terminus mit Aktinfilamenten assoziiert ist (Short *et al.* 1998; Edelman 2014). Besonders wichtig für diese Verbindung sind die drei C-terminalen Aminosäuren des hCFTR, Threonin (T), Arginin (R) und Leucin (L; Haggie *et al.* 2004). Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden in dieser Arbeit die letzten drei Aminosäuren in der Proteinstruktur des hCFTR deletiert (ΔTRL hCFTR). Die Mutagenese-Primer und die Sequenzierung der ΔTRL hCFTR Mutante sind in Tab. 9 und im Anhang zu finden (siehe Anhang 7.1).

2.6 Modifizierung der Membranfluidität von *Xenopus* Oozyten

Die Plasmamembran von *Xenopus* Oozyten besteht, wie die Biomembran anderer eukaryotischer Zellen oder Zellorganellen, aus Lipiden und Proteinen (Hill *et al.* 2005). Das Grundgerüst bildet die Lipiddoppelschicht, die für die physikochemischen Eigenschaften der Membran (selektive Permeabilität) verantwortlich ist. Die drei Hauptgruppen bilden Phospho- und Sphingolipide sowie Cholesterol. Cholesterol gilt als essentieller Bestandteil tierische Plas-

mamembranen, da es sowohl die Membranintegrität als auch die –fluidität aufrechterhält. Daher ist es möglich über Veränderungen des Cholesterol-Gehalts in der Plasmamembran deren Fluidität zu ändern. Für *Xenopus* Oozyten, deren Cholesterol-Gehalt 20% beträgt (Hill *et al.* 2005), sind bereits Strategien zur Änderung der Membranfluidität etabliert.

In dieser Arbeit sollte die Hypothese geprüft werden, ob eine Modifizierung der Membranfluidität die Wahrnehmung des hCFTR auf den Dehnungsreiz verändert. Für die Erhöhung der Membranfluidität wurde Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) verwendet (Santiago *et al.* 2001; Sadler und Jacobs 2004; Carattino *et al.* 2007). M β CD bildet einen adhäsiven Kontakt zu Membran-gebundenen Cholesterol und entfernt es (Ilangumaran und Hoessli 1998). Somit funktioniert M β CD wie eine Art „Cholesterol-Schwamm“. Die Verringerung der Membranfluidität erfolgte dagegen durch die Zugabe von wasserlöslichem Cholesterol, das sich in die Lipiddoppelschicht einlagert und dadurch den Cholesterol-Gehalt erhöht (Carattino *et al.* 2007). Die hCFTR-exprimierenden Oozyten wurden 60-120 min vor den TEVC-Messungen entweder in M β CD (5 mM) oder in wasserlöslichem Cholesterol (400 μ M) inkubiert. Anschließend wurde die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivierung in TEVC-Experimenten untersucht.

2.7 Datenverarbeitung und Statistik

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Werte als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*: SEM) angegeben. Sowohl in den TEVC-Experimenten als auch in den Ussing-Kammer-Messreihen wurden mindestens zwei verschiedene *Xenopus* Individuen verwendet (N). Die entsprechende Anzahl der Oozyten bzw. Lungenpräparate ist mit „n“ gekennzeichnet. Die Daten wurden auf Normalverteilung geprüft und für die Bestimmung der Signifikanz wurde der t-Test nach Student durchgeführt. Die Messdaten innerhalb einer Oozyten- bzw. Lungenpräparat-Messung wurden mittels des gepaarten t-Tests verglichen. Für den statistischen Vergleich von Messdaten aus zwei unterschiedlichen Messreihen wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Das Signifikanzniveau lag bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5% ($p \leq 0.05$) und wurde in den Abbildungen mit “*” gekennzeichnet. P-Werte mit $p \leq 0.01$ wurden mit “**” markiert.

Die Verarbeitung der Daten erfolgte mit den Programmen *Microsoft Word 2007* und *Excel 2007*. Mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism* wurde auf Normalverteilung geprüft und die Varianzanalyse (*ANOVA*) durchgeführt. Die graphische Bearbeitung der Stromspuren und der Balkendiagramme erfolgte mit dem Programm *Inkscape* (Version 0.48).

2.8 Verwendete Lösungen und Chemikalien

Tab. 4: Zusammensetzung der Lösungen für die Isolation und Kultivierung der *Xenopus* Oozyten sowie für die Durchführung der TEVC-Messungen (in mM).

Substanz	ORi	KulORi	Ca ²⁺ -frei ORi	Na ⁺ -Gluconat ORi
NaCl	90	90	90	45
KCl	1	1	1	1
CaCl ₂	2	2	-	2
HEPES	5	5	5	5
Na ⁺ -Pyruvat	-	2,5	-	-
Penicillin G	-	0,06	-	-
Streptomycin-Sulfat	-	0,02	-	-
EGTA	-	-	1	-
Na ⁺ -Gluconat	-	-	-	45
pH	7,4	7,4	7,4	7,4

ORi: Oozyten-Ringerlösung; KulORi: Kultur-Oozyten-Ringerlösung; HEPES: N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure); EGTA: Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N' tetraacetic acid; Alle Lösungen wurden mittels NaOH bzw. HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Tab. 5: Zusammensetzung der Lösungen für die Erhöhung bzw. Verringerung des intrazellulären Volumens der *Xenopus* Oozyten in (mM).

Substanz	intrazellulär analoge Lösung	hypo-osmotischer ORi	hyper-osmotischer ORi
NaCl	20	45	90
KCl	130	1	1
CaCl ₂	-	2	2
HEPES	5	5	5
MgCl ₂	2	-	-
D-Mannitol	-	-	100 / 250
pH	7,3	7,4	7,4

Der pH-Wert der Lösungen wurde mittels NaOH bzw. HCl eingestellt.

Tab. 6: Zusammensetzung der Lösung für die Ussing-Kammer-Experimente mit den *Xenopus* Lungenpräparaten (in mM).

Substanz	NRS
NaCl	100
KCl	3
CaCl ₂	1
MgCl ₂	1
HEPES	5
Glucose	10
pH	7,4

NRS: Normal Ringerlösung; Die Lösung wurde mittels NaOH bzw. HCl auf einen pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Tab. 7: In den elektrophysiologischen Messungen verwendete Pharmaka, deren Lösungsmittel sowie die Konzentration der Stammlösung bzw. die in den Versuchen verwendete Konzentration.

Substanz	Lösungsmittel	Stammlösung (in mM)	Versuchskonzentration (in μ M)
CFTR _{inh} -172	DMSO	40	5
Colchicin	ddH ₂ O	50	40 und 50
Cytochalasin D	DMSO	1	10 und 20
Forskolin	DMSO	10	5
GlyH-101	DMSO	40	40
IBMX	DMSO	100	100 und 500
Methyl- β -Cyclodextrin	ddH ₂ O	50	5000
Paclitaxel	DMSO	1	10
Phalloidin	ddH ₂ O	1	40
wasserlösliches Cholesterol	ddH ₂ O	20	400

ddH₂O: doppelt destilliertes Wasser; DMSO: Dimethylsulfoxid.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von mechanischen Kräften (Scherkraft und Dehnung) auf die Aktivität des humanen CFTR (hCFTR) im *in vitro* Expressionsmodell der *Xenopus* Oozyten mittels der TEVC-Technik untersucht. Ein weiterer Fokus lag auf der mechanosensitiven CFTR-Regulierung in dem nativen pulmonalen Epithel von *Xenopus*, wofür die Ussing-Kammer-Methode eingesetzt wurde. Darüber hinaus wurde eine Beteiligung von Zytoskelettelementen und der Membranfluidität an der Wahrnehmung des Dehnungsreizes durch den CFTR geprüft.

3.1 Der Einfluss von Scherkraft auf den humanen CFTR

Um den Einfluss von Scherkraft (SK) auf die Aktivität des hCFTR zu charakterisieren, wurde der hCFTR heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert und die hCFTR-vermittelten Ströme wurden mittels TEVC-Technik untersucht. Die SK-Applikation erfolgte dabei über eine Erhöhung der Perfusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min (SK: 0,04 dyn/cm²) auf 6 ml/min (SK: 1,3 dyn/cm²).

Die ca. 1-minütige Applikation von SK (1,3 dyn/cm²) hatte keine Änderung des I_M hCFTR-exprimierender Oozyten zur Folge (von 127 ± 14 nA auf 136 ± 13 nA; n = 12; N = 3; Abb. 11A). Auch eine zweite SK-Applikation hatte keinen Einfluss auf den I_M (von 142 ± 12 nA auf 142 ± 12 nA). Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede in Folge der beiden SK-Applikationen (p ≥ 0,05; Abb. 11B). Dies zeigte, dass SK in Höhe von 1,3 dyn/cm² keine Auswirkung auf die Aktivität des hCFTR hatte. Als Nachweis für die Expression des hCFTR in *Xenopus* Oozyten wurde in dieser Arbeit ein Cocktail aus Forskolin und IBMX verwendet. Beide Substanzen erhöhen den intrazellulären cAMP-Spiegel und deren Verwendung ist ein etablierter Nachweis der CFTR-Expression in Oozyten (Drumm *et al.* 1991; Jiang *et al.* 2000). Durch die Applikation von Forskolin (F; 5 µM) und IBMX (I; 100 µM) bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min, stieg der I_M von 143 ± 12 nA auf -731 ± 104 nA an (p ≤ 0,01).

In DEPC-Oozyten führte weder die wiederholte Applikation von SK (1,3 dyn/cm²) noch die Perfusion mit F/I zu einer Veränderung des I_M (p ≥ 0,05; n = 11; N = 3; Abb. 11C).

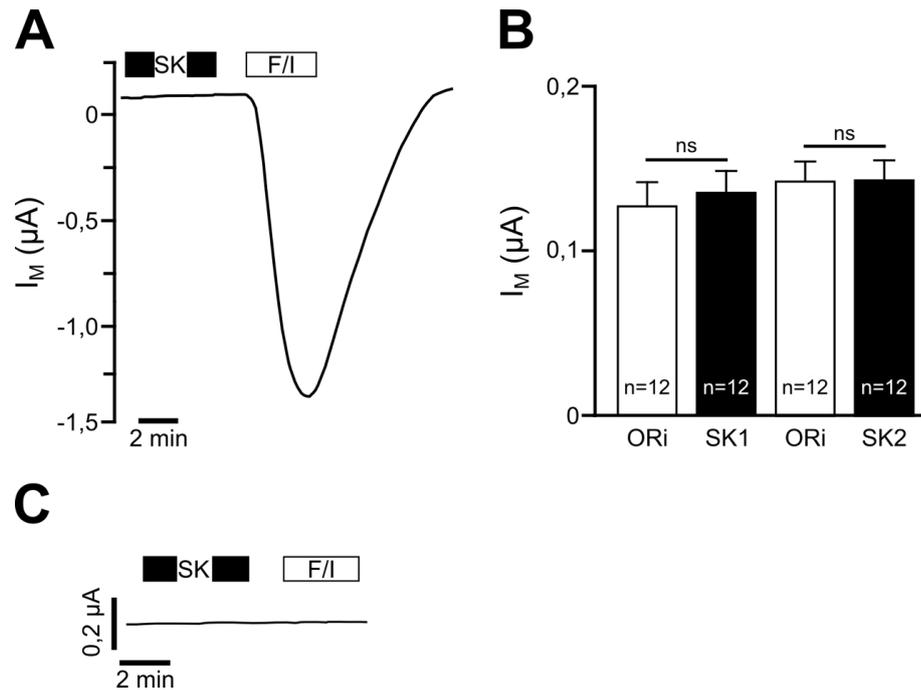


Abb. 11: Der Einfluss von Scherkraft auf den heterolog in Oozyten exprimierenden hCFTR.

A Die zweimalige Applikation von Scherkraft (schwarzer Balken: SK, $1,3 \text{ dyn/cm}^2$) hatte keine Änderung des Transmembranstroms (I_M) zur Folge. Mittels Forskolin und IBMX (F/I; $5/100 \text{ } \mu\text{M}$) wurde am Ende des Experiments die Expression des hCFTR überprüft und resultierte in einer Stimulation des I_M . **B** Statistische Auswertung der in **A** dargestellten Experimente. Beide SK-Applikationen (SK1, SK2) beeinflussten den I_M von hCFTR-exprimierenden Oozyten im Vergleich zu der Perfusion mit ORI nicht signifikant (ns: $p \geq 0,05$; $n = 12$; $N = 3$). **C** Bei DEPC-Oozyten (mit Wasser injiziert) veränderte sich der I_M weder durch die Applikation von SK noch durch F/I ($n = 11$; $N = 3$).

3.1.1 Simultane Applikation von SK und Forskolin/IBMX

Da SK keinen Einfluss auf den I_M von hCFTR-exprimierenden Oozyten hatte (siehe Abb. 11), wurde in den folgenden Experimenten SK und F/I simultan appliziert. Damit sollte überprüft werden, ob SK die durch F/I verursachte Stromstimulation und somit die Aktivität des hCFTR erhöhen kann. Als Kontrolle dienten hCFTR-exprimierende Oozyten, die lediglich mit F/I bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min ($0,04 \text{ dyn/cm}^2$) stimuliert wurden. Durch die F/I-Applikation bei langsamer Perfusionsgeschwindigkeit stieg der I_M signifikant von $-4 \pm 42 \text{ nA}$ auf $-890 \pm 101 \text{ nA}$ ($n = 11$; $N = 3$; Abb. 12A). Die F/I-Applikation mit schneller Perfusionsgeschwindigkeit (6 ml/min) und der damit verbundenen SK-Entstehung ($1,3 \text{ dyn/cm}^2$) erhöhte den I_M von $12 \pm 27 \text{ nA}$ auf $-886 \pm 92 \text{ nA}$ ($n = 11$; $N = 3$; Abb. 12B). Für die statistische Auswertung wurden die F/I-induzierten Stromstimulationen ($\Delta I_{F/I}$) der Kontroll-Messungen mit F/I ($\Delta I_{F/I} = 887 \pm 98 \text{ nA}$) und der Messung mit simultaner Applikation von F/I und SK ($\Delta I_{F/I} = 899 \pm 93 \text{ nA}$) herangezogen. Dies erbrachte keinen signifikanten

Unterschied ($p \geq 0,05$; Abb. 12C), wodurch geschlussfolgert werden kann, dass SK die Aktivität des hCFTR nicht beeinflusst.

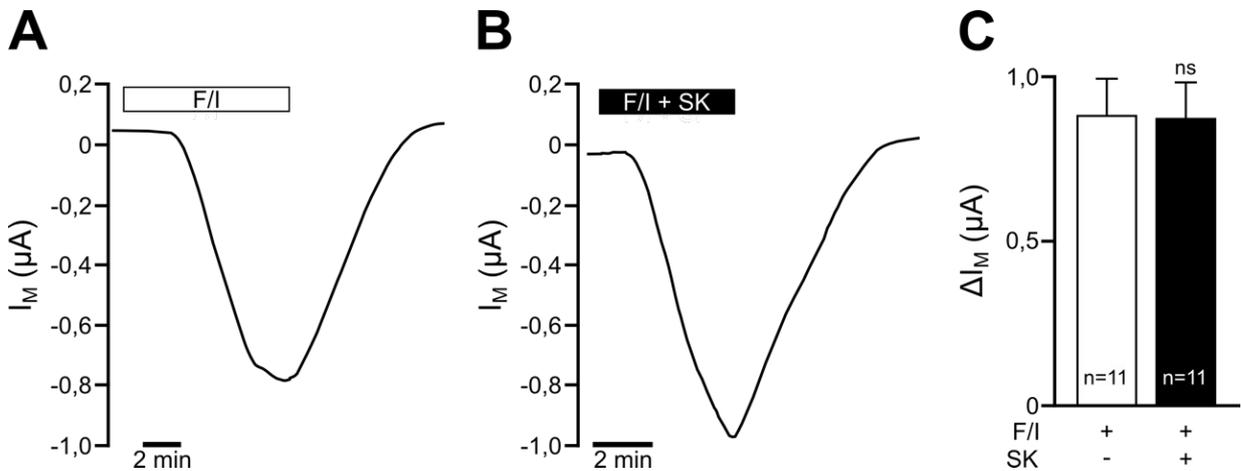


Abb. 12: Die simultane Applikation von Scherkraft und Forskolin/IBMX unterschied sich nicht zu der hCFTR Aktivierung durch Forskolin/IBMX allein.

Sowohl die Applikation von Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μM) allein (A) als auch die gleichzeitige Applikation von F/I zusammen mit Scherkraft (F/I + SK; 1,3 dyn/cm^2 ; B) führte zu einer Erhöhung des I_M . C Die induzierten Stromstimulationen (ΔI_M) der in A und B dargestellten Experimente unterschieden sich nicht signifikant voneinander (ns: $p \geq 0,05$).

Die Ergebnisse der SK-Versuche zeigten, dass SK nicht in der Lage war den hCFTR zu aktivieren, weder allein noch in Gegenwart von F/I.

3.2 Der Einfluss der Zellschrumpfung auf den humanen CFTR

Nachdem die Applikation von SK keinen Einfluss auf die Aktivität des hCFTR hatte, sollte nachfolgend eine etwaige Modulation der hCFTR Aktivität durch Änderungen des Zellvolumens untersucht werden.

In Kontroll-Experimenten wurde zunächst die erfolgreiche Expression des hCFTR mittels F/I-Applikation überprüft, wodurch der I_M um 1018 ± 111 nA anstieg (1. F/I; $n = 10$; $N = 3$; Abb. 13A). Nach dem Auswaschen des F/I-Effekts wurde ein weiteres Mal mit F/I perfundiert, was wiederum zu einer Stimulation des I_M führte (2. F/I = 547 ± 60 nA). Der Vergleich der F/I-induzierten Stromstimulationen ergab einen signifikant kleineren 2. F/I im Vergleich zum 1. F/I ($p \leq 0,01$). Dies deutet bei wiederholter Aktivierung des hCFTR auf eine Desensitivierung des F/I-Effektes hin.

Die Verringerung des Zellvolumens erfolgte durch eine Inkubation der hCFTR-exprimierenden Oozyten in hyper-osmotischen ORi (siehe Material und Methoden 2.8, Tab. 5). Die Osmolarität der ORi-Lösung wurde durch Mannitol erhöht, um ein Schrumpfen der

Oozyte zu induzieren. Der mechanische Stimulus, der durch die Zellschrumpfung induziert wird, ist die Kompression bzw. ein "Zusammendrücken" der Zelle (Andres und Gopfert 2014; Prager-Khoutorsky *et al.* 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene hyperosmotische Lösungen (hyper ORi 1 und hyper ORi 2) verwendet, die sich durch die Konzentration an D-Mannitol (hyper ORi 1: 100 mM oder hyper ORi 2: 250 mM) und demzufolge auch durch ihre Osmolarität (hyper ORi 1: 283 mosmol/kg oder hyper ORi 2: 447 mosmol/kg) unterschieden.

Um einen möglichen Einfluss der Zellschrumpfung auf die hCFTR Aktivität zu untersuchen, wurde zunächst der F/I-induzierte Effekt (1. F/I) bestimmt. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Perfusion mit hyper ORi, um die Zelle zu schrumpfen. Unter diesen Bedingungen wurde ein zweites Mal der F/I-induzierte Effekt (2. F/I) bestimmt. In den Experimenten mit hyper ORi 1 betrug der 1. F/I 1063 ± 201 nA ($n = 12$; $N = 4$; Abb. 13B). Anschließend erfolgte die Perfusion mit der hyper ORi 1, wodurch der I_M leicht sank (von -88 ± 8 nA auf -81 ± 8 nA). Der 2. F/I erfolgte unter hyper-osmotischen Bedingungen und induzierte eine I_M -Stimulation von 674 ± 96 nA ($p \leq 0,01$; Abb. 13B). Ähnliche Ergebnisse waren bei den Experimenten mit hyper ORi 2 zu beobachten, wo der 2. F/I (594 ± 58 nA) kleiner war als der 1. F/I (919 ± 86 nA; $n = 11$; $N = 3$; Abb. 13C). Für die statistische Auswertung wurden der 1. F/I und der 2. F/I in Relation zueinander gesetzt ($2. \text{ F/I} / 1. \text{ F/I}$) und normalisiert. In Kontroll-Experimenten (ohne Zellschrumpfung) betrug $2. \text{ F/I} / 1. \text{ F/I}$ $0,55 \pm 0,05$ ($n = 10$; $N = 3$; Abb. 13D). Der statistische Vergleich der Kontroll-Oozyten mit den normalisierten F/I-Werten der osmotisch geschrumpften Oozyten (hyper ORi 1: $0,70 \pm 0,06$; hyper ORi 2: $0,70 \pm 0,08$; Abb. 13D) ergab keine signifikanten Unterschiede ($p \geq 0,05$). Bei DEPC-Oozyten waren keine Veränderungen des I_M durch die Applikation des hyper ORi 2 und F/I zu beobachten ($n = 9$; $N = 3$; Abb. 13E).

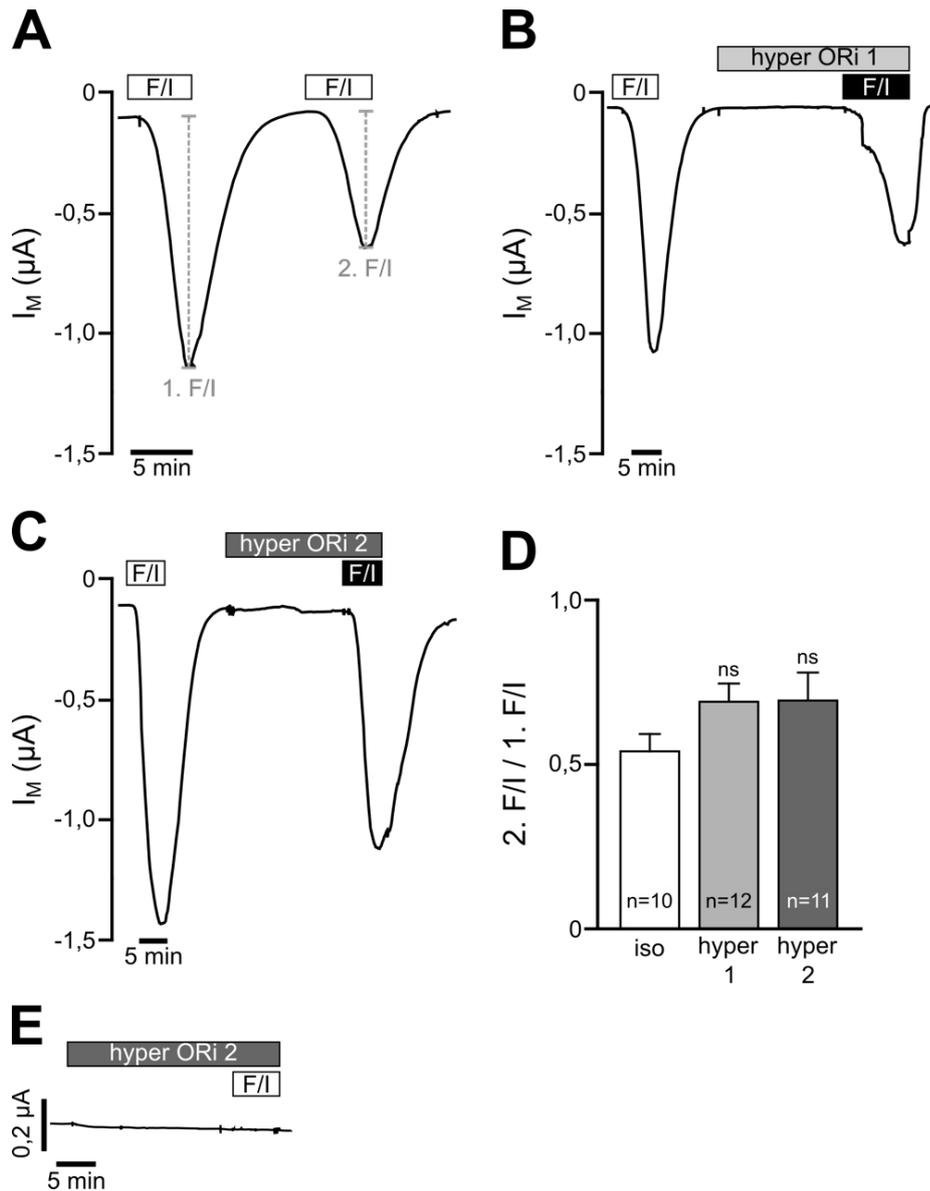


Abb. 13: Die osmotische Zellschrumpfung hatte keinen Einfluss auf die Aktivität des hCFTR.

A Die wiederholte Applikation von Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μM) unter normaler ORi Perfusion (iso-osmotische Bedingungen) zeigte einen kleineren 2. F/I-induzierten Stromanstieg (2. F/I) der hCFTR-exprimierenden Oozyten im Vergleich zu dem ersten F/I-Effekt (1. F/I). **B** Nach Bestimmung des 1. F/I wurden die Oozyten 20 Minuten mit hyper-osmotischem ORi (hyper ORi 1, Osmolarität 283 mosmol/kg) perfundiert, wodurch sich der I_M nicht veränderte. Nachfolgend wurde der hCFTR erneut mit F/I stimuliert. Dieser Effekt war ebenfalls kleiner als der 1. F/I. **C** Auch nach der Perfusion mit hyper-osmotischem ORi 2 (hyper ORi 2, Osmolarität 447 mosmol/kg) war der 2. F/I kleiner als der 1. F/I. **D** Der statistische Vergleich der normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Experimenten unter iso-osmotischen (iso) und hyper-osmotischen Bedingungen (hyper 1 und hyper 2; ns: p \geq 0,05). **E** In Wasser-injizierten Oozyten (DEPC-Oozyten) führte die Perfusion mit hyper-osmotischem ORi und F/I zu keiner Änderung des I_M .

Nachdem in TEVC-Experimenten die Zellschrumpfung keinen Unterschied in der Aktivität des hCFTR aufzeigte, sollte anschließend optisch überprüft werden, ob die Behandlung mit hyper ORi auch tatsächlich ein Zellschrumpfen induzierte. Dazu wurden die Oozyten, wie bereits im Material und Methodenteil beschrieben, vor und nach der 20-minütigen Inkubation in hyper ORi 2 fotografiert (siehe Material und Methoden 2.4). Das Schrumpfen der Oozyten durch die Inkubation in hyper ORi 2 war deutlich am Zusammenfallen der Oozytenmembran erkennbar (Abb. 14). Die Volumenänderungen der Oozyte wurden prozentual errechnet. Das Volumen der Oozyten verringerte sich durch den hyper ORi 1 um $9,1 \pm 1,1\%$ ($n = 12$; $N = 5$) und nochmals stärker durch die Inkubation in dem hyper ORi 2 ($13,6 \pm 1,5\%$, $n = 12$; $N = 5$), was auf die höhere Osmolarität dieser Lösung zurückzuführen war.

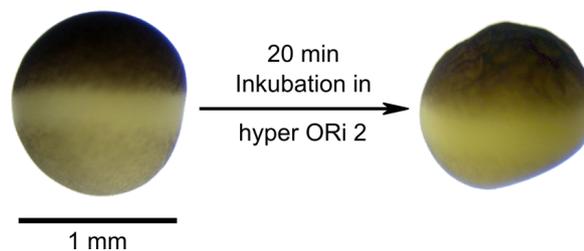


Abb. 14: Repräsentative Abbildung der Volumenänderung einer *Xenopus* Oozyte durch die 20-minütige Inkubation in einer hyper-osmotischen Lösung.

Das Volumen der Oozyten veränderte sich durch die 20-minütige Inkubation in hyper-osmotischer Lösung (hyper ORi 2) von $1,07 \pm 0,07 \text{ mm}^3$ auf $0,92 \pm 0,06 \text{ mm}^3$ ($p \leq 0,01$; $n = 12$; $N = 5$).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Inkubation in hyper-osmotischer Lösung zu einer Verringerung des Oozytenvolumens führte. Allerdings konnte in den TEVC-Experimenten kein Einfluss der osmotischen Zellschrumpfung auf die hCFTR Aktivität nachgewiesen werden. Demzufolge kann die Kompression der Zelle die Aktivität des hCFTR nicht regulieren.

3.3 Der Einfluss von Membrandehnung auf den humanen CFTR

Nachfolgend sollte der Einfluss der Membrandehnung auf die Aktivität des hCFTR in TEVC-Experimenten untersucht werden. Die Membrandehnung wurde dabei zum einen durch eine osmotische Erhöhung des Zellvolumens (siehe Ergebnisse 3.3.1) und zum anderen durch die Injektion einer intrazellulär analogen Lösung (siehe Ergebnisse 3.3.2) induziert.

3.3.1 Erhöhung des Zellvolumens durch Inkubation in einer hypo-osmotischen Lösung

Das Zellvolumen der Oozyten wurde durch Inkubation in hypo-osmotischer Lösung erhöht. In diesen Experimenten erfolgte der mechanische Stimulus durch die Membrandehnung, die über den osmotischen Druckgradienten zwischen Badlösung und Zytoplasma induziert wurde (Martinac 2004). Bei der hier verwendeten hypo-osmotischen Badlösung wurde die Konzentration an NaCl verringert (siehe Material und Methoden 2.8, Tab. 5). Um Veränderungen der extrazellulären Cl^- Konzentration durch die hypo-osmotische Lösung zu vermeiden, wurde in diesen Experimenten Na^+ -Gluconat ORi (siehe Material und Methoden 2.8, Tab. 4) anstelle von ORi eingesetzt. Der Na^+ -Gluconat ORi beinhaltet ebenso wie der hypo-osmotische ORi 45 mM NaCl, aber zusätzlich noch 45 mM Na^+ -Gluconat. Die Osmolarität des Na^+ -Gluconat ORi betrug ebenso wie der normale ORi 188 mosmol/kg, wohingegen die hypo-osmotische Lösung eine Osmolarität von 105 mosmol/kg aufwies.

Gluconat ist als Komplexbildner bekannt, da es als Anion freie Kationen, wie z.B. Ca^{2+} Ionen, aus einer wässrigen Lösung binden kann und somit die Konzentration an freiem Ca^{2+} verringert (Woehler *et al.* 2014). Daher wurde in den Experimenten geprüft, ob Na^+ -Gluconat einen Einfluss auf den I_M hCFTR-exprimierender Oozyten hat. Nach Erreichen eines Stromplateaus unter ORi wurde die Perfusion auf Na^+ -Gluconat ORi umgestellt, wobei sich der I_M nicht signifikant änderte (von -88 ± 9 nA auf -83 ± 12 nA; $p \geq 0,05$; $n = 7$; $N = 3$; Abb. 15A+B). Nachfolgend wurde die Perfusion wieder auf ORi umgestellt und die Expression des hCFTR durch F/I überprüft, wodurch eine signifikante Stromstimulation hervorgerufen wurde ($\Delta I_{F/I} = 1308 \pm 218$ nA; $p \leq 0,01$). Diese Ergebnisse zeigten, dass Na^+ -Gluconat ORi keinen Einfluss auf den hCFTR hatte, was einen Einsatz in den Zellschwellungsexperimenten legitimierte.

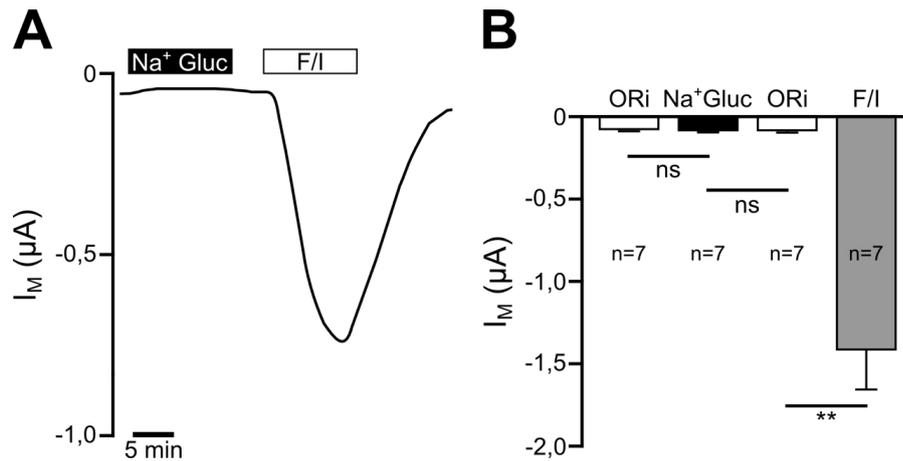


Abb. 15: Na⁺-Gluconat ORi hatte keinen Einfluss auf den Transmembranstrom von hCFTR-exprimierenden Oozyten.

A+B Die Perfusion mit Na⁺-Gluconat ORi (Na⁺ Gluc) hatte keine Änderung des Transmembranstroms (I_M) zur Folge (ns: $p \geq 0,05$). Die Applikation von Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μ M) am Ende der Messung führte zu einer signifikanten Stromstimulation als Folge der hCFTR Aktivierung (**: $p \leq 0,01$; $n = 7$; $N = 3$).

Um zu untersuchen, ob die osmotische Zellschwellung einen Einfluss auf die Aktivität des hCFTR hat, wurde zunächst der F/I-induzierte Effekt (1. F/I) bestimmt. Anschließend erfolgte die 20-minütige Perfusion mit hypo-osmotischer Lösung, um die Zelle zu schwellen. Unter diesen Bedingungen wurde ein zweites Mal der F/I-induzierte Effekt (2. F/I) bestimmt. Der 1. F/I unter iso-osmotischen Bedingungen betrug 1039 ± 200 nA ($n = 11$; $N = 3$; Abb. 16B). Nach der 20-minütigen Perfusion mit hypo-osmotischer Lösung wurde der 2. F/I mit 790 ± 120 nA detektiert. Es ist erwähnenswert, dass die Inkubation in hypo-osmotischer Lösung zu einem leichten Abfall des I_M führte (vorher: -121 ± 17 nA und nachher: -87 ± 10 nA). Dies ist aber zu vernachlässigen, da eine Aktivierung des hCFTR mit einer Erhöhung des I_M verbunden ist.

Als Kontrolle wurden hCFTR-exprimierende Oozyten zweimal mit F/I stimuliert, wobei der 2. F/I (214 ± 60 nA; $n = 13$; $N = 4$) kleiner war als der 1. F/I (703 ± 116 nA; Abb. 16A). Ein Vergleich der normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) von osmotisch geschwollenen Oozyten ($0,88 \pm 0,09$; $n = 11$; $N = 3$) mit denen von Kontroll-Oozyten (ohne Schwellung; $0,26 \pm 0,05$; $n = 13$; $N = 4$) ergab eine signifikant erhöhte hCFTR Aktivität bei den osmotisch geschwollenen Oozyten ($p \leq 0,01$; Abb. 16C). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass durch die Dehnung der Membran die Aktivität des hCFTR erhöht wurde.

In DEPC-Oozyten führte die Perfusion mit hypo-osmotischer Lösung und die Applikation von F/I zu keiner Änderung des I_M ($n = 10$; $N = 4$; Abb. 16D).

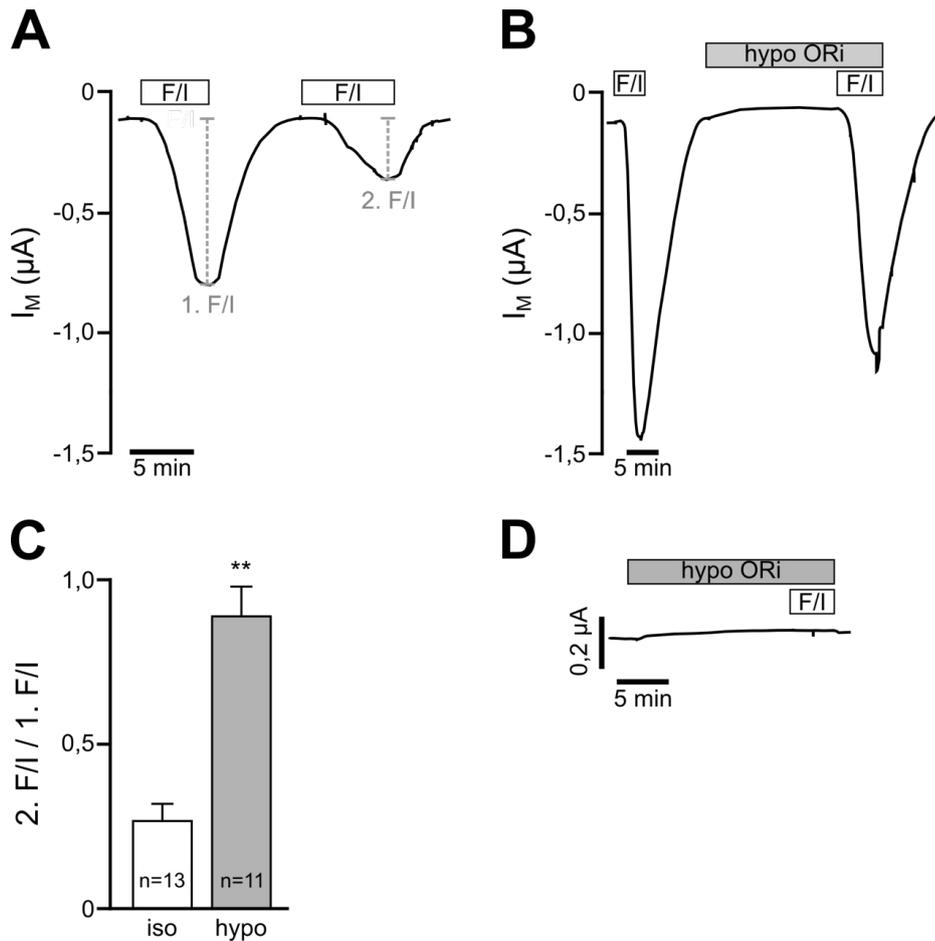


Abb. 16: Die osmotische Zellschwellung durch Inkubation in hypo-osmotischer Lösung führte zu einer Erhöhung der Aktivierung des hCFTR.

A Unter iso-osmotischen Bedingungen war der zweite Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μM)-induzierte Effekt (2. F/I) kleiner als der erste Effekt (1. F/I). **B** Der 2. F/I nach 20-minütiger Perfusion mit hypo-osmotischer Lösung (hypo ORi) war etwas kleiner als der 1. F/I unter iso-osmotischen Bedingungen. **C** Der normalisierte F/I-Effekt (2. F/I / 1. F/I) von Kontroll-Oozyten (iso) war signifikant verringert im Vergleich zu dem Wert von osmotisch geschwollenen Oozyten (hypo; **: $p \leq 0,01$). **D** Bei DEPC-Oozyten war ein leichter Abfall im I_M durch die hypo ORi zu beobachten.

In den vorangegangenen TEVC-Messungen wurde eine erhöhte hCFTR Aktivität nach Inkubation in hypo-osmotischer Lösung beobachtet. Mit Hilfe der Fotos von *Xenopus* Oozyten, vor und nach der 20-minütigen Behandlung in hypo ORi, wurde die Veränderung des Oozytenvolumens bestimmt. Die Analyse der Volumenänderung der Oozyten durch die 20-minütige Inkubation in hypo-osmotischer Lösung ergab eine signifikante Erhöhung des Oozytenvolumens um $7,5 \pm 1,8\%$ ($p \leq 0,01$; $n = 12$; $N = 5$; Abb. 17). Dies bestätigt, dass die Inkubation in hypo-osmotischer Lösung eine Zellschwellung verursacht und damit einhergehend eine Dehnung der Oozytenmembran induziert.

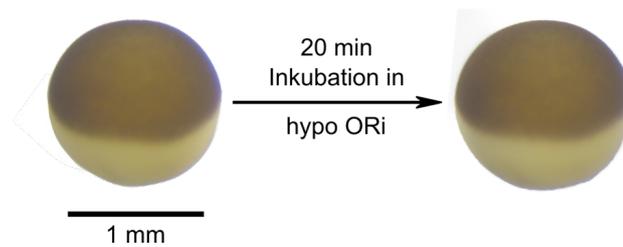


Abb. 17: Volumenänderung einer *Xenopus* Oozyte durch die 20-minütige Inkubation in hypo-osmotischer Lösung.

Das Volumen der Oozyte erhöhte sich durch die Inkubation in hypo-osmotischer Lösung (hypo ORi) von $1,02 \pm 0,05 \text{ mm}^3$ auf $1,09 \pm 0,04 \text{ mm}^3$ ($p \leq 0,01$; $n = 12$; $N = 5$).

Osmotische Zellschwellung bei devitellinisierten *Xenopus* Oozyten

Die *Xenopus* Oozyten sind von einer Vitellinhülle umgeben, welche einen Teil ihrer extrazellulären Matrix bildet (Hedrick und Nishihara 1991) und für die Formgebung der Zelle essentiell ist. Nachfolgend sollte die Hypothese überprüft werden, ob sich die Schwellungsfähigkeit von Oozyten ohne Vitellinhülle von intakten Oozyten (mit Vitellinhülle) unterscheidet. Die Vitellinhülle der Oozyten wurde vorsichtig mit zwei feinen Pinzetten entfernt. Anhand der Fotos der devitellinisierten Oozyten vor und nach der 20-minütigen Inkubation in hypo-osmotischer Lösung und der anschließenden Volumenberechnung vergrößerten die Oozyten ihr Volumen um $14,9 \pm 2,7\%$ ($n = 8$; $N = 3$; Abb. 18). Diese Volumenerhöhung unterschied sich signifikant zu der Volumenzunahme von intakten Oozyten mit Vitellinhülle ($7,5 \pm 1,8\%$; $p \leq 0,01$). Es lässt sich daher schlussfolgern, dass die Vitellinhülle die Schwellungsfähigkeit von Oozyten limitierte.

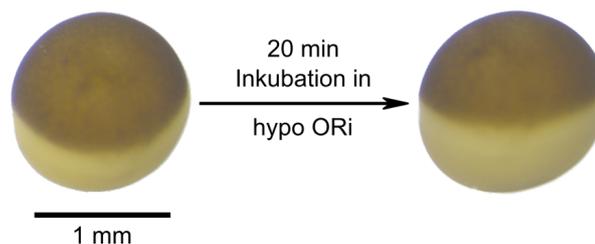


Abb. 18: Volumenänderung der devitellinisierten Oozyte durch die Inkubation in hypo-osmotischer Lösung.

Das Volumen der Oozyten ohne Vitellinhülle erhöhte sich durch die 20-minütige Inkubation in hypo-osmotischer Lösung (hypo ORi) von $1,33 \pm 0,12 \text{ mm}^3$ auf $1,52 \pm 0,12 \text{ mm}^3$ ($p \leq 0,01$; $n = 8$; $N = 3$).

In TEVC-Experimenten wurde überprüft, ob die erhöhte Schwellungsfähigkeit der devitellinisierten Oozyten ebenso in einer erhöhten hCFTR Aktivität resultiert. Für diese Untersuchungen wurde zu Beginn der Messung der F/I-induzierte Stromanstieg unter iso-osmotischen Bedingungen (1. F/I: 716 ± 83 nA) bestimmt sowie nach einer 20-minütigen Inkubation in hypo-osmotischer Lösung (2. F/I: 879 ± 131 nA; $n = 12$; $N = 5$; Abb. 19A). Parallel zu diesen Messungen erfolgte bei devitellinisierten Kontroll-Oozyten die zweimalige F/I-Stimulation unter iso-osmotischen Bedingungen. Dabei war 2. F/I (528 ± 84 nA) kleiner als 1. F/I (948 ± 140 nA; $n = 11$; $N = 5$). Der statistische Vergleich der normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) ergab einen signifikant höhere Wert von geschwollenen devitellinisierten Oozyten (hypo: $1,21 \pm 0,13$) im Vergleich zu den Kontrollen (iso: $0,59 \pm 0,07$; $p \leq 0,01$; Abb. 19B).

Darüber hinaus wurde auch der normalisierte F/I-Effekt von intakten (mit Vitellinhülle) osmotisch geschwollenen Oozyten (siehe Ergebnisse 3.3.1) mit denen von devitellinisierten Oozyten verglichen. Dabei ergab sich ein signifikant höherer normalisierter F/I-Effekt von osmotisch geschwollenen Oozyten ohne Vitellinhülle ($p \leq 0,05$). Diese Ergebnisse zeigten, dass es einen Zusammenhang zwischen der Schwellungsfähigkeit von Oozyten und der Aktivität des hCFTR gibt: Je größer die Volumenänderung, desto höher ist die F/I-vermittelte hCFTR Aktivierung.

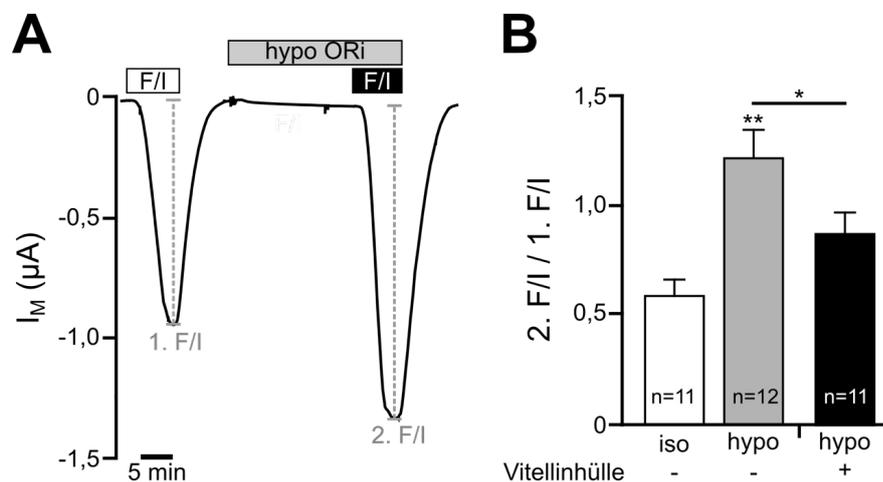


Abb. 19: Bei devitellinisierten Oozyten erhöhte die osmotische Zellschwellung die Aktivität des hCFTR.

A Bei devitellinisierten Oozyten war die zweite Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μM)-Applikation (2. F/I) nach einer 20-minütigen Perfusion mit hypo-osmotischer Lösung (hypo ORI) größer als der erste F/I-Effekt (1. F/I) unter iso-osmotischen Bedingungen. **B** Der normalisierte F/I-Effekt (2. F/I / 1. F/I) von osmotisch geschwollenen Oozyten (hypo) war signifikant größer als der von Kontroll-Oozyten (iso; **: $p \leq 0,01$). Zudem zeigten devitellinisierte Oozyten (-Vitellinhülle) einen signifikant höheren normalisierten F/I-Effekt nach Zellschwellung als Oozyten mit einer Vitellinhülle (+Vitellinhülle; *: $p \leq 0,05$).

3.3.2 Erhöhung des Zellvolumens durch die Injektion einer intrazellulär analogen Lösung

Um das Zellvolumen von *Xenopus* Oozyten präziser und vor allem schneller zu erhöhen, wurde eine intrazellulär analoge Lösung (siehe Material und Methoden 2.8, Tab. 5) verwendet. Die intrazellulär analoge Lösung wurde mittels einer Glaskapillare des Nano-Injektors vor dem Klemmen in die Oozyte gefahren und so war es möglich, während der TEVC-Messungen das Zellvolumen durch eine Injektion zu erhöhen. Diese Injektion resultierte in einer Volumenzunahme der Oozyte und verursachte die Dehnung der Zellmembran. Die intrazellulär analoge Lösung entspricht der intrazellulären Ionenzusammensetzung von *Xenopus* Oozyten (Weber 1999a; Bryan-Sisneros *et al.* 2003). Daher bietet die Lösung den Vorteil, das Zellvolumen iso-osmotisch zu erhöhen, ohne die Osmolarität der Badlösung zu verändern.

In Kontrollmessungen führte die wiederholte F/I-Applikation zu einer kleineren zweiten F/I-induzierten Stromstimulation (2. F/I: 214 ± 60 nA; $n = 13$; $N = 4$; Abb. 20A) im Vergleich zum ersten F/I-Effekt (1. F/I: 703 ± 116 nA; $p \leq 0,01$). In den eigentlichen Experimenten wurde zwischen den beiden F/I-Applikationen eine Injektion der intrazellulär analogen Lösung durchgeführt (Abb. 20B). Der Dehnungsstimulus wurde dabei durch eine 55 nl Injektion der intrazellulär analogen Lösung induziert. Der 1. F/I (vor Injektion) betrug 751 ± 185 nA ($n = 10$; $N = 2$) und war somit vergleichbar mit den Werten des Kontroll-Experiments aus Abb. 20A. Die Injektion der intrazellulären Lösung führte zu einer kleinen, transienten Stromstimulation von 53 ± 22 nA ($p \leq 0,05$). Nach der Injektion war der 2. F/I mit 1495 ± 335 nA signifikant größer im Vergleich zu dem 1. F/I ($p \leq 0,01$). Zudem wurde das zuvor beschriebene Experiment mit einem Injektionsvolumen von 110 nl sowie 147 nl wiederholt (Abb. 20C). Für die statistische Auswertung wurde ein Verhältnis der beiden F/I-induzierten Effekte gebildet (2. F/I / 1. F/I). Der normalisierte F/I-Effekt des Experiments ohne Dehnungsstimulus betrug $0,26 \pm 0,05$ ($n = 13$; $N = 4$). Im Gegensatz dazu führte die Injektion der drei Injektionsvolumina (55 nl, 110 nl und 147 nl) zu einer signifikanten Volumen-abhängigen Erhöhung der F/I-Antworten (2. F/I / 1. F/I mit 55 nl Injektion: $2,19 \pm 0,20$; $n = 10$; $N = 2$; 110 nl Injektion: $2,70 \pm 0,20$; $n = 9$; $N = 3$ und 147 nl Injektion: $4,75 \pm 0,48$; $n=10$; $N = 2$; $p \leq 0,01$).

Bei DEPC-Oozyten führten alle drei Injektionsvolumina zu einer schnellen und transienten Stromstimulation. Dies wurde bereits in früheren Studien gezeigt und ist vermutlich auf eine kurzzeitige Aktivierung von endogenen Dehnungs-aktivierten Kationenkanälen (SACs, TRPC1) der *Xenopus* Oozyten zurückzuführen (Bryan-Sisneros *et al.* 2003; Hamill 2006).

Exemplarisch ist in Abb. 20D die Stromspur einer DEPC-Oozyte mit 147 nl Injektionsvolumen abgebildet.

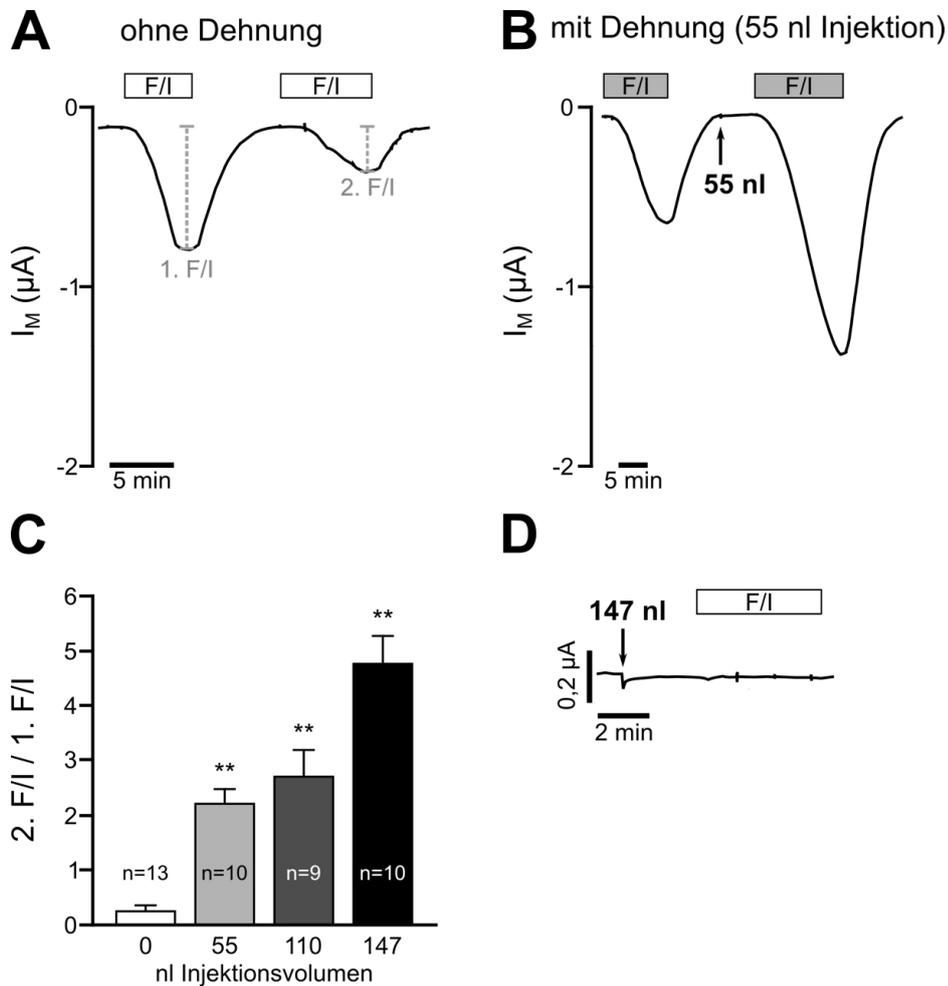


Abb. 20: Die durch Injektion einer intrazellulär analogen Lösung verursachte Membrandehnung erhöhte die Aktivität des hCFTR.

A In Kontroll-Experimenten (ohne Dehnung) war die zweite Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μ M)-induzierte Stromstimulation (2. F/I) kleiner als die Erste (1. F/I). **B** Demgegenüber war nach der 55 nl Injektion der intrazellulär analogen Lösung der 2. F/I größer als der 1. F/I. **C** Die statistische Analyse der normalisierten F/I-induzierten Effekte (2. F/I / 1. F/I). Durch die Injektion der intrazellulär analogen Lösung stiegen die normalisierten F/I-Effekte signifikant und Volumenabhängig an (**: $p \leq 0,01$). Die vier normalisierten F/I-Effekte wurden mit einer *ANOVA* auf ihre Signifikanz überprüft. **D** In DEPC-Oozyten führte die Injektion von 147 nl der intrazellulär analogen Lösung zu einer kleinen transienten Stromstimulation. Die nachfolgende F/I-Applikation hatte keinen Effekt auf den I_M .

Durch das Ausmessen der Oozyten und Berechnen des Volumens wurde im Folgenden gezeigt, dass die Injektion der intrazellulär analogen Lösung zu Veränderungen des Oozytenvolumens führte. Durch die Injektion von 55 nl vergrößerte sich das Oozytenvolumen um $6,3 \pm 1,7\%$ ($n = 10$). Eine Erhöhung des Injektionsvolumens resultierte in einer entsprechenden weiteren Zunahme des Zellvolumens (110 nl: $10,0 \pm 1,5\%$; $n = 10$; 147 nl: $11,9 \pm 3,1\%$;

n = 7). Um zu prüfen, ob die Zellvolumenzunahme mit der hCFTR Aktivität korreliert, wurden sowohl die Werte der Volumenerhöhung als auch die normalisierten F/I-Effekten (2. F/I / 1. F/I) aus den TEVC-Experimenten (siehe Abb. 20C) mit ihren SEMs in ein Punktediagramm eingetragen (Abb. 21). Anhand dieses Diagramms wurde deutlich, dass das Oozytenvolumen ein fast lineares Verhältnis zu den normalisierten F/I-Effekten bzw. der hCFTR Aktivität nach den Injektionsvolumina hatte (Korrelationskoeffizient: $R^2 = 0,89$).

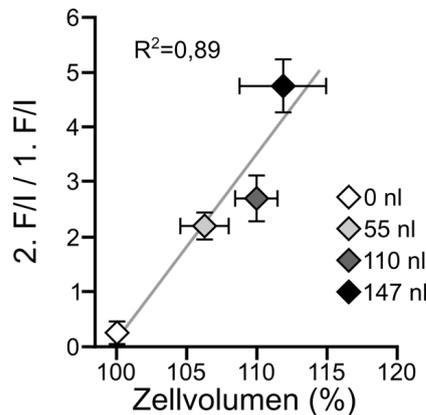


Abb. 21: Das Zellvolumens von *Xenopus* Oozyten korrelierte nahezu linear mit der hCFTR Aktivität in Folge der Injektionsvolumina.

Der Korrelationskoeffizient $R^2=0,89$ beschreibt ein fast lineares Verhältnis zwischen Zellvolumenzunahme und normalisierten F/I-Effekten (2. F/I / 1. F/I) nach der Injektion verschiedener Volumina aus dem TEVC-Experimenten.

Die hier gezeigten Ergebnisse stehen im Einklang mit den Experimenten der osmotischen Zellschwellung (siehe Ergebnisse 3.3.1). Mit beiden Methoden (Injektion der intrazellulären Lösung oder Inkubation in hypo-osmotischer Lösung) wurde die Aktivität des hCFTR durch die Membrandehnung erhöht.

3.3.3 Wiederholbarkeit der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität

Es wurde gezeigt, dass sich durch die Injektion der intrazellulär analogen Lösung das Volumen der *Xenopus* Oozyten erhöhte. Es stellte sich aber die Frage, ob diese Volumenzunahme über einen längeren Zeitraum stabil blieb oder ob die Erhöhung des Volumens durch endogene Regulationsmechanismen der Oozyte reversibel war. Um dies zu untersuchen wurden fünf Oozyten mit 110 nl Injektionsvolumen injiziert und anschließend wurden die Oozyten alle 5 min für einen Zeitraum von 30 min fotografiert. Nach dem Ausmessen der Oozyten und dem Berechnen der Zellvolumina wurden die Volumenänderungen in Relation zu den Anfangswerten (vor Injektion = 100%) gesetzt. Es war zu beobachten, dass unmittelbar nach dem Dehnungsstimulus (Injektion von 110 nl; t_0) das Oozytenvolumen signifikant um $6,6 \pm 1,7\%$ ($n=5$; $p \leq 0,01$; Abb. 22) anstieg. Anschließend erhöhte sich das Volumen weiter

bis es nach 5 min das Maximum erreichte ($t_5: 9,0 \pm 2,4\%$; $p \leq 0,05$) und abfiel. Auch 10 min nach der Injektion war das Oozytenvolumen immer noch signifikant größer als vor der Injektion ($t_{10}: 8,2 \pm 2,1\%$, $p \leq 0,05$). In den folgenden 20 min verringerte sich das Volumen der Oozyten immer mehr und nach 30 min (t_{30}) wurden mit einem Oozytenvolumen von $104,3 \pm 3,0\%$ lediglich eine kleine, aber nicht signifikante Erhöhung gegenüber der Ausgangsgröße verzeichnet ($p \geq 0,05$). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Erhöhung des Zellvolumens für einen Zeitraum von 10-15 min nach der Injektion anhält, allerdings deutete es auch darauf hin, dass die Oozyten der Zellschwellung entgegenwirken können.

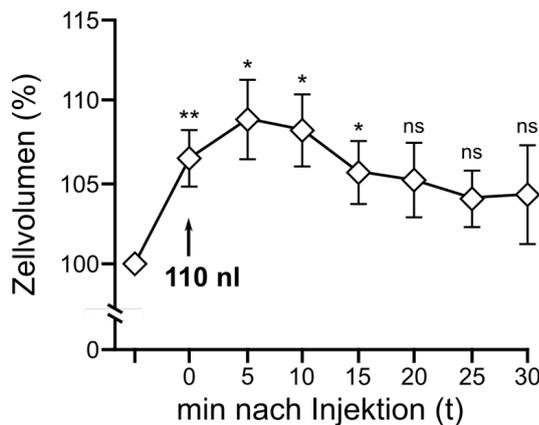


Abb. 22: Veränderung des Zellvolumens der Oozyten nach der Injektion von 110 nl der intrazellulär analogen Lösung über einen Zeitraum von 30 min.

Durch den Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) erhöhte sich das Volumen der Oozyte unmittelbar signifikant (**: $p \leq 0,01$) und erreichte 5 min nach Injektion den höchsten Wert. Die Erhöhung des Zellvolumens blieb bis 15 min nach der Injektion erhalten (*: $p \leq 0,05$) und anschließend unterschieden sich die Werte des Zellvolumen nicht mehr signifikant gegenüber den Oozytenvolumen vor Injektion (ns: $p \geq 0,05$).

Innerhalb dieser Arbeit konnte eine Korrelation zwischen der Volumenerhöhung der *Xenopus* Oozyten und einer gesteigerten hCFTR Aktivität festgestellt werden (siehe Abb. 21). Da die Volumenerhöhung und der damit verbundene Dehnungsstimulus nicht beständig war (siehe Abb. 22), sollte nachfolgend die Wiederholbarkeit der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität untersucht werden.

In Kontrollexperimenten (ohne Dehnungsstimulus) wurde der hCFTR dreimal mit F/I stimuliert (Abb. 23A). Bei jeder der F/I-Applikationen wurde der I_M erhöht (1. F/I = 1087 ± 146 nA; 2. F/I = 463 ± 109 nA; 3. F/I = 293 ± 70 nA; $n = 9$; $N = 2$), wobei eine Desensitivierung der F/I-Effekte zu beobachten war (Abb. 23B). In parallel durchgeführten Experimenten erfolgte ebenfalls eine dreimalige F/I-Applikation, allerdings wurde nach dem 1. F/I der Dehnungsstimulus durch eine 110 nl Injektion induziert (Abb. 23C). Der 2. F/I (3527 ± 629 nA; $n = 11$; $N = 2$) nach dem Dehnungsstimulus war signifikant größer als der 1. F/I (1249 ± 221 nA; $p \leq 0,01$; Abb. 23D). Der 3. F/I führte zu einer Stromstimulation von

1109 ± 230 nA, der signifikant kleiner war als der 2. F/I ($p \leq 0,01$; Abb. 23D). Allerdings unterschied sich der 3. F/I nicht signifikant von dem 1. F/I ($p \geq 0,05$).

In weiteren Messungen wurde die Membrandehnung zweimal durch die Injektion von 55 nl induziert (Abb. 23E). Die Reduzierung des Injektionsvolumens von 110 nl auf 55 nl war notwendig, da durch eine zweimalige Injektion von 110 nl die Volumenzunahme der Oozyten so groß war, dass die Oozyten platzten und Zytoplasma austrat. Zu Beginn erfolgte der Expressionsnachweis des hCFTR durch F/I (1. F/I), wodurch der I_M um 930 ± 200 nA anstieg ($n = 10$; $N = 2$). Im Anschluss an den ersten Dehnungsstimulus (55 nl) betrug der 2. F/I 1983 ± 351 nA und war signifikant größer als der 1. F/I ($p \leq 0,01$). Nach einer zweiten 55 nl Injektion erhöhte der 3. F/I den I_M um 2281 ± 345 nA ($p \leq 0,01$). Der statistische Vergleich von 2. F/I und 3 F/I ergab keinen signifikanten Unterschied ($p \geq 0,05$; Abb. 23E).

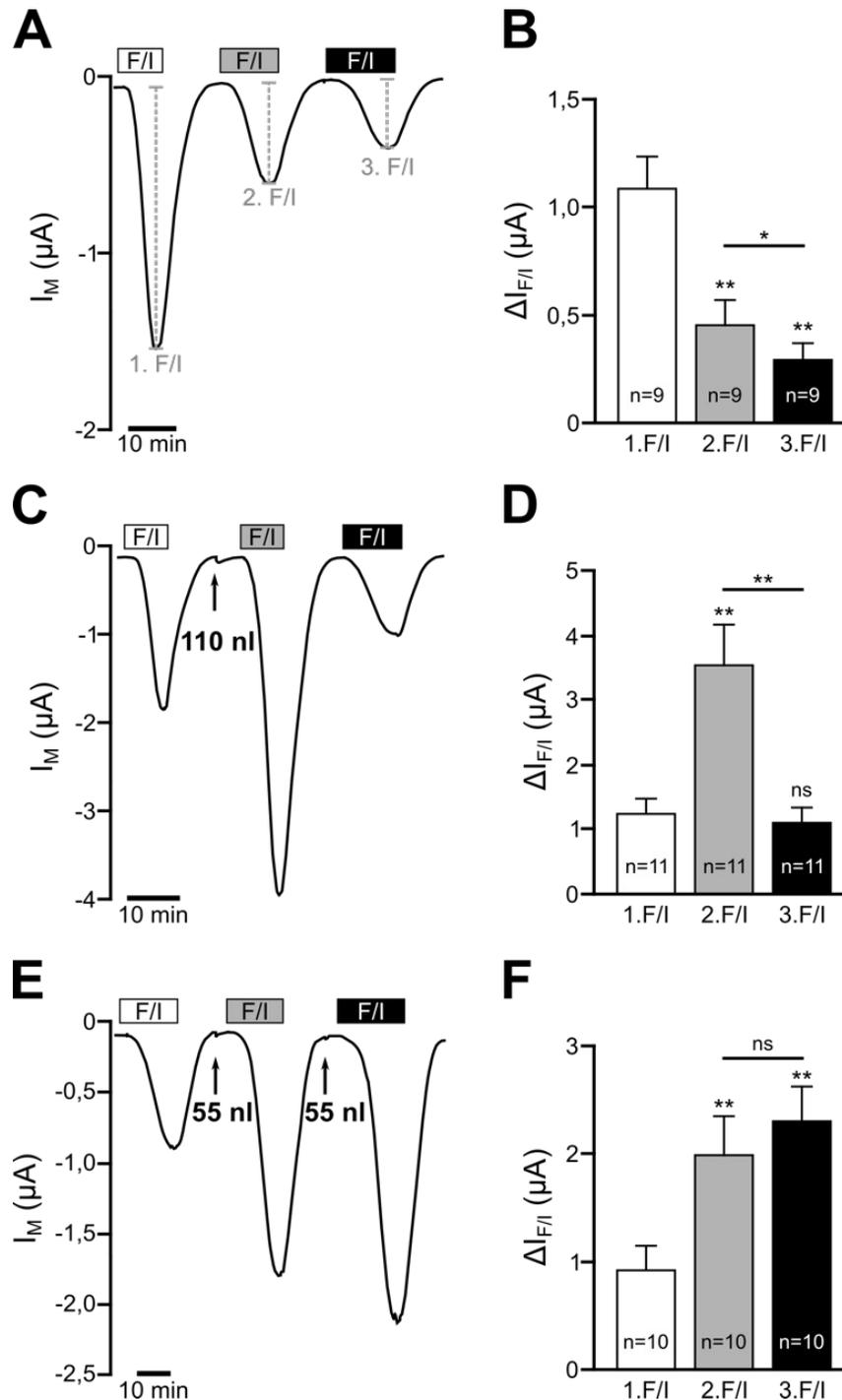


Abb. 23: Eine Erhöhung der hCFTR Aktivität war lediglich unmittelbar nach dem Induzieren der Membrandehnung zu beobachten.

A+B Die dreimalige Applikation von Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μM) führte zu immer kleiner werdenden F/I-induzierten Stromstimulation (**: $p \leq 0,01$; *: $p \leq 0,05$). **C+D** Der 2. F/I nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) war signifikant erhöht (**: $p \leq 0,01$). Der nachfolgende 3. F/I unterschied sich hingegen nicht signifikant von dem 1. F/I (ns: $p \geq 0,05$). **E+F** Die Injektion von jeweils 55 nl direkt vor der 2. und 3. F/I-Applikation erhöhte sowohl den 2. F/I als auch den 3. F/I signifikant im Vergleich zu dem 1. F/I (**: $p \leq 0,01$). Die drei Mittelwerte einer Messreihe wurden mit einer ANOVA auf ihre Signifikanzen überprüft.

Diese Ergebnisse zeigten, dass eine Steigerung der F/I-induzierten hCFTR-Stimulation lediglich unmittelbar nach dem Dehnungsstimulus beobachtet wurde. Dies bekräftigt die oben formulierte Hypothese, dass die Membrandehnung eine erhöhte Aktivität des hCFTR zur Folge hatte.

3.3.4 Effekt des Dehnungsstimulus auf den vorstimulierten hCFTR

In den vorherigen Experimenten wurde gezeigt, dass der Dehnungsstimulus keine unmittelbare Änderung des I_M induzierte (siehe Ergebnisse 3.3.2). Vielmehr war im Anschluss an die Injektion eine erhöhte Aktivität des hCFTR durch die F/I-Applikation zu beobachten. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der hCFTR aktiv sein muss, um den Dehnungsstimulus wahrzunehmen.

Nachfolgend wurden TEVC-Experimente durchgeführt, bei denen der hCFTR zunächst mittels F/I-Applikation aktiviert wurde (Abb. 24A). Dies resultierte in einer Stromstimulation von 379 ± 73 nA ($\Delta I_{F/I}$; $p \leq 0,01$; $n = 10$; $N = 3$). Nach dem Erreichen dieses Plateauwertes wurde in Anwesenheit von F/I zusätzlich der Dehnungsstimulus (55 nl Injektion der intrazellulär analogen Lösung) appliziert. Dies führte unmittelbar zu einem weiteren Stromanstieg ($\Delta I_{F/I+Injekt}$) auf 903 ± 189 nA ($p \leq 0,01$; Abb. 24A+B). Der identische Messablauf wurde zudem mit den Injektionsvolumina 110 nl und 147 nl durchgeführt (Abb. 24B). Anhand der statistischen Analyse wurde deutlich, dass sich die $\Delta I_{F/I}$ der drei Messreihen nicht signifikant voneinander unterschieden ($p \geq 0,05$), wohl aber die $\Delta I_{F/I+Injekt}$ der jeweiligen Injektionsvolumina (50 nl, 110 nl und 147 nl; $p \leq 0,05$; Abb. 24B). Die Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass der hCFTR eine Grundaktivität benötigt, um unmittelbar den Dehnungsreiz wahrzunehmen und mit einer Aktivitätssteigerung zu reagieren.

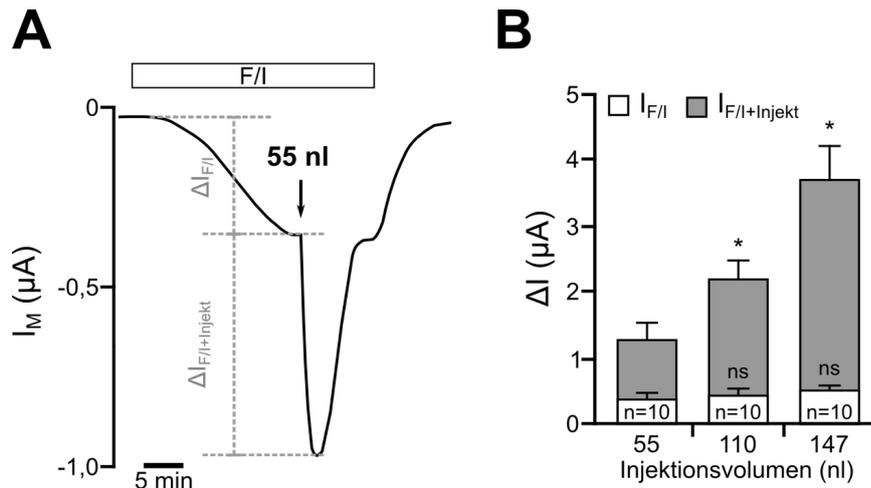


Abb. 24: Die Injektion der intrazellulär analogen Lösung hatte eine unmittelbare Steigerung der Aktivität des hCFTR nach F/I-Vorstimulation zur Folge.

A Nach der Vorstimulation des hCFTR mit Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μM ; $\Delta I_{F/I}$) führte der Dehnungsstimulus (55 nl Injektion) zu einer zusätzlichen Stromstimulation ($\Delta I_{F/I+Injekt}$). **B** Die statistische Auswertung der $\Delta I_{F/I}$ (weiße Balken) und $\Delta I_{F/I+Injekt}$ (graue Balken) zeigte eine signifikante Steigerung der $\Delta I_{F/I+Injekt}$ durch die höher werdenden Injektionsvolumina (*: $p \leq 0,05$). Hingegen wurde kein signifikanter Unterschied in den $\Delta I_{F/I}$ der drei Experimente festgestellt (ns: $p \geq 0,05$). Sowohl die $\Delta I_{F/I}$ als auch die $\Delta I_{F/I+Injekt}$ der drei Messreihen wurden mittels ANOVA auf ihre Signifikanz zu einander überprüft.

Inhibition der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivierung

Nachfolgend wurde untersucht, ob die Erhöhung der Aktivität des hCFTR durch dem Dehnungsstimulus tatsächlich auf eine zusätzliche Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivierung zurückzuführen war. Dafür wurde zu Beginn der Messung der hCFTR durch die Applikation von F/I aktiviert, wodurch der I_M von -101 ± 15 nA signifikant auf -799 ± 163 nA anstieg ($p \leq 0,01$; $n = 10$; $N = 2$; Abb. 25A). Dann erfolgte eine zusätzliche Applikation des CFTR Blocker CFTR_{inh}-172 (5 μM ; Ma *et al.* 2002; Taddei *et al.* 2004). Infolge dessen fiel der I_M signifikant auf -169 ± 29 nA ab ($p \leq 0,01$). Anschließend wurde in Anwesenheit beider Pharmaka der Dehnungsstimulus durch die Injektion von 110 nl der intrazellulär analogen Lösungen induziert. Dabei kam es zu einem transienten Anstieg des I_M auf -289 ± 60 nA (Abb. 25A).

In parallel durchgeführten Kontrollexperimenten erfolgte ebenfalls zu Beginn der Messungen die Aktivierung des hCFTR mit F/I (Abb. 25B). Dies resultierte in einer signifikanten Stromstimulation von -88 ± 4 auf -732 ± 94 nA ($n = 24$; $N = 7$; $p \leq 0,01$). Anschließend wurde unter der maximalen F/I-induzierten hCFTR Stimulation zusätzlich der Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) induziert, wodurch der I_M unmittelbar und transient auf -1451 ± 187 nA ($p \leq 0,01$) anstieg (Abb. 25B). Die statistische Auswertung der Injektions-induzierten Stromstimulatio-

nen (ΔI_{110nl} ; Abb. 25C) beider Messungen ergab einen signifikant reduzierten Dehnungs-induzierten Effekt in Anwesenheit des CFTR_{inh}-172 ($p \leq 0,01$).

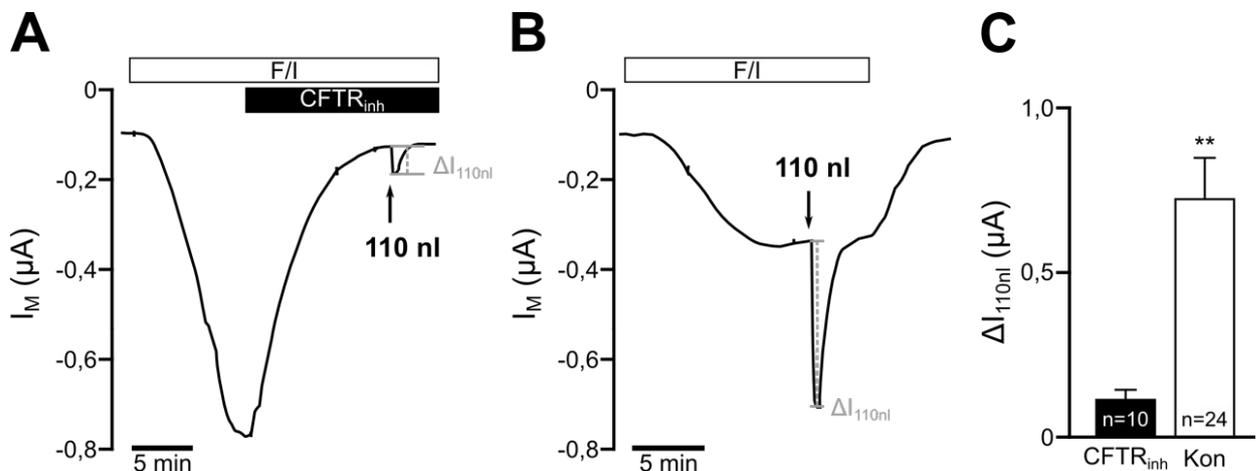


Abb. 25: Durch den CFTR Blocker CFTR_{inh}-172 wurde die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivierung inhibiert.

A Die Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μM)-induzierte hCFTR Stimulation wurde durch die Applikation des CFTR Blockers CFTR_{inh}-172 (CFTR_{inh}; 5 μM) inhibiert. In Anwesenheit beider Pharmaka führte der Dehnungsstimulus (110 nl) zu einer leichten transienten Veränderung des I_M (ΔI_{110nl}). **B** Der experimentelle Ablauf war identisch wie in A, jedoch ohne CFTR_{inh}-Perfusion. Unter diesen Bedingungen resultierte der Dehnungsstimulus (110 nl) in einem ausgeprägten Anstieg des I_M . **C** Die Dehnungs-induzierte Stromänderung (ΔI_{110nl}) war in Abwesenheit des CFTR Blockers CFTR_{inh} signifikant erhöht (**: $p \leq 0,01$).

3.4 Auswirkungen der $\Delta F508$ und G551D Mutationen auf die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität

Die am häufigsten vorkommende Mutation des hCFTR-Proteins ist auf eine Deletion der Aminosäure Phenylalanin (F) an Position 508 ($\Delta F508$) zurückzuführen, welche zu einer Fehlfaltung und einem ineffizienten Transport des Proteins zur Zellmembran führt (Döring und Ratjen 2006). Eine andere häufig auftretende Mutation ist eine Punktmutation (*missense mutation*), bei der an der Proteinposition 551 Glycin (G) durch Asparaginsäure (D) ersetzt wird (G551D). Bei dieser Mutation ist die Aktivität, der in der Membran befindlichen CFTR Proteine, beeinträchtigt (Lubamba *et al.* 2012). Im Folgenden wurde untersucht, ob die $\Delta F508$ oder die G551D Mutationen des CFTR Proteins die Reaktion auf den Dehnungsstimulus beeinflussen.

In *Xenopus* Oozyten, welche den $\Delta F508$ oder den G551D hCFTR exprimierten, musste eine höhere IBMX-Konzentration von 500 μM anstelle von 100 μM , zusammen mit 5 μM Forskolin, eingesetzt werden, um signifikante Stromstimulationen zu induzieren. Dies wurde bereits in früheren Studien beschrieben und war notwendig, um die geringere Membranabundanz des

$\Delta F508$ hCFTR-Proteins (Dalemans *et al.* 1991; Drumm *et al.* 1991) bzw. die verminderte Öffnungswahrscheinlichkeit des G551D hCFTR (Kongsuphol *et al.* 2011) zu kompensieren. In Anlehnung an diese Studien wurden beide hCFTR Mutanten auf die F/I-induzierte Stimulation untersucht und mit dem Wildtyp hCFTR verglichen.

3.4.1 $\Delta F508$ hCFTR

Bei Oozyten, welche die $\Delta F508$ hCFTR Mutation exprimierten, führte die Applikation von $5 \mu\text{M}$ Forskolin und $500 \mu\text{M}$ IBMX (F/I) zu einem Anstieg des I_M von $-52 \pm 5 \text{ nA}$ auf $-115 \pm 12 \text{ nA}$ ($p \leq 0,01$; $n = 14$; $N = 2$; Abb. 26A). Parallel wurde mit der identischen F/I-Konzentration der Wildtyp (WT) hCFTR stimuliert. Die F/I-induzierte Stromstimulation betrug $1720 \pm 335 \text{ nA}$ ($p \leq 0,01$; $n = 6$; $N = 2$; Abb. 26B). Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied der F/I-induzierten Ströme ($\Delta I_{F/I}$) zwischen $\Delta F508$ und WT hCFTR ($p \leq 0,01$; Abb. 26C), der auf die verminderte Membranabundanz des $\Delta F508$ zurückzuführen war. In DEPC-Oozyten führte die Applikation der höheren F/I-Konzentration zu keiner Änderung des I_M (vorher: $-36 \pm 7 \text{ nA}$; danach: $-28 \pm 6 \text{ nA}$; $n = 8$; $N = 2$; Abb. 26D).

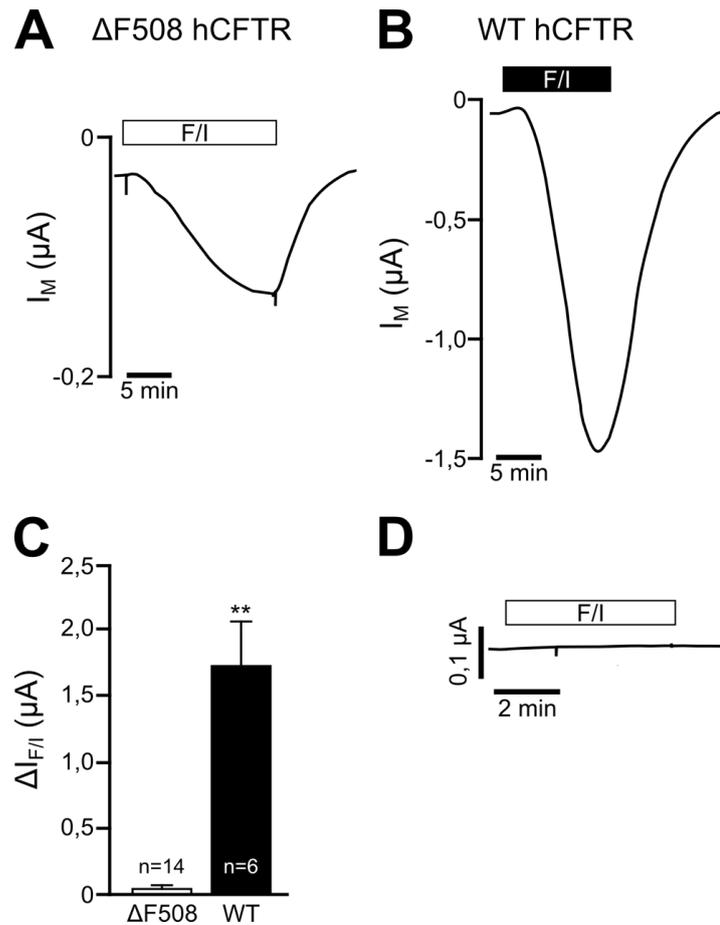


Abb. 26: Die $\Delta F508$ hCFTR Mutante zeigte eine geringere Stromstimulation durch Forskolin und IBMX im Vergleich zum Wildtyp hCFTR.

A+B Die Applikation von 5 μM Forskolin und 500 μM IBMX (F/I) führte sowohl bei dem $\Delta F508$ hCFTR als auch beim Wildtyp (WT) hCFTR zu einer Stimulation des Transmembranstroms (I_M). **C** Der Vergleich der F/I-induzierten Ströme ($\Delta I_{F/I}$) ergab einen signifikanten Unterschied (**: $p \leq 0,01$) zwischen $\Delta F508$ und WT hCFTR. **D** Die F/I-Applikation hatte bei DEPC-Oozyten keinen Einfluss auf den I_M ($n = 8$; $N = 2$).

In den vorangegangenen Ergebnissen wurde bei $\Delta F508$ -exprimierenden Oozyten eine F/I-induzierte signifikante Stimulation des I_M gezeigt. Um zu überprüfen, ob diese Stromänderung tatsächlich auf einer Aktivierung der $\Delta F508$ hCFTR Mutante beruhte, wurde in den nachfolgenden Experimenten der CFTR Blocker CFTR_{inh}-172 eingesetzt. Zu Beginn des Versuches wurden die $\Delta F508$ -exprimierenden Oozyten mit F/I perfundiert, wodurch der I_M signifikant von -42 ± 5 nA auf -164 ± 36 nA ($p \leq 0,01$; $n = 8$; $N = 2$; Abb. 27A) anstieg. Die Applikation von 5 μM CFTR_{inh}-172 führte zu einer rapiden, signifikanten Hemmung des F/I-induzierten Stroms auf -44 ± 5 nA ($p \leq 0,01$; Abb. 27B). Daher kann geschlossen werden, dass die F/I-induzierte Stromstimulation auf einer Aktivierung des $\Delta F508$ hCFTR beruhte.

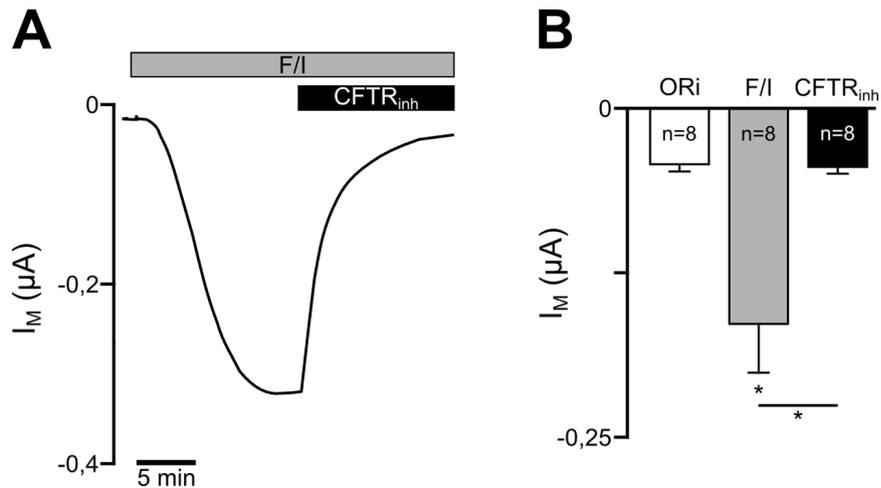


Abb. 27: Inhibition der F/I-induzierten Stromstimulation mit dem CFTR Blocker CFTR_{inh}-172 bei Δ F508 hCFTR-exprimierenden Oozyten.

A+B Die durch Forskolin/IBMX (F/I; 5/500 μ M)-induzierte Stimulation des Transmembranstroms (I_M) wurde durch den CFTR Blocker CFTR_{inh}-172 (CFTR_{inh}; 5 μ M) signifikant gehemmt (*: $p \leq 0,05$; $n = 8$; $N = 2$).

Einfluss des Dehnungsstimulus auf die Aktivität des Δ F508 hCFTR

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die Δ F508 hCFTR Mutante ebenso wie der WT hCFTR auf Membrandehnung reagiert. Die Dehnung der Oozytenmembran erfolgte durch die Injektion von 110 nl der intrazellulär analogen Lösung während den TEVC-Messungen.

In Kontrollmessungen (ohne Dehnungsstimulus) führte die erste Applikation von F/I (1. F/I) zu einer Erhöhung des I_M von -48 ± 8 nA auf -120 ± 20 nA ($p \leq 0,01$; $n = 7$; $N = 2$; Abb. 28A). Nach dem Auswaschen erfolgte eine zweite F/I-Applikation (2. F/I), die wiederum zu einer Stromstimulation führte (31 ± 6 nA; $p \leq 0,01$). Der Vergleich der beiden F/I-induzierten Stromänderungen zeigte einen signifikant reduzierten 2. F/I im Vergleich zum 1. F/I ($p \leq 0,01$).

In weiteren Messungen mit Δ F508 hCFTR-exprimierenden Oozyten wurden nach Bestimmung des 1. F/I der Dehnungsstimulus (110 nl) induziert (Abb. 28B). Hier zeigte sich ein signifikant erhöhter 2. F/I (138 ± 26 nA) verglichen mit dem 1. F/I (54 ± 12 nA; $p \leq 0,05$; $n = 7$; $N = 2$). Für den statistischen Vergleich wurden die F/I-induzierten Ströme normalisiert (2. F/I / 1. F/I; Abb. 28C). Der unter Kontrollmessungen (ohne Dehnungsstimulus) detektierte normalisierte F/I-Effekt ($0,46 \pm 0,04$) unterschied sich signifikant von der F/I-Antwort der Oozyten mit dem Dehnungsstimulus ($3,11 \pm 0,64$; $p \leq 0,01$). Dies bedeutet, dass die Δ F508 hCFTR Mutante eine höhere Aktivität nach dem Dehnungsstimulus aufwies.

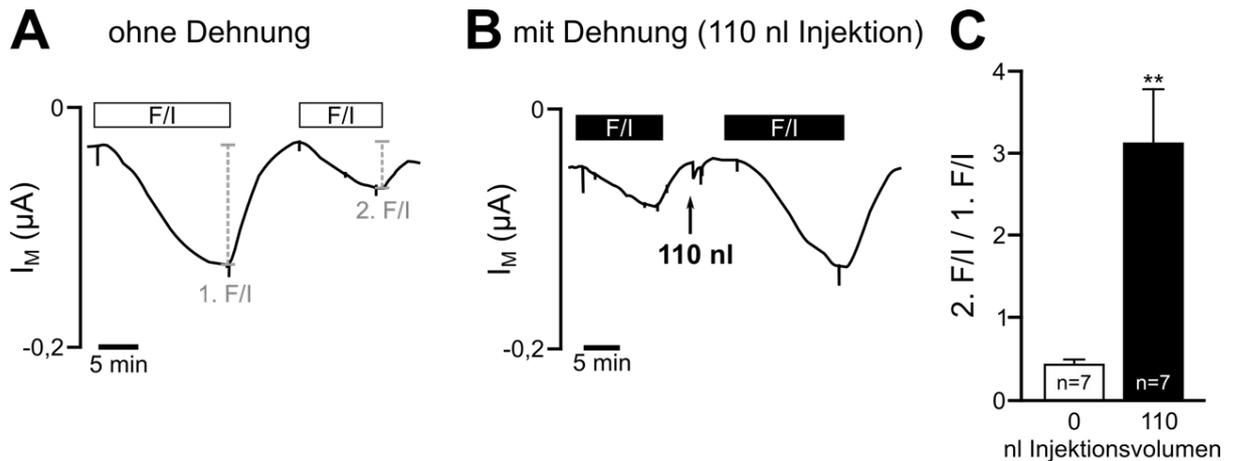


Abb. 28: Die Membrandehnung erhöhte die Aktivität der $\Delta F508$ hCFTR Mutante.

A Die Applikation von Forskolin/IBMX-Applikation (F/I; 5/500 μM) auf $\Delta F508$ hCFTR-exprimierende Oozyten führte zu einer reversiblen und wiederholbaren Stromstimulation. Dabei war die zweite F/I-induzierte Stromstimulation (2. F/I) kleiner im Vergleich zu der ersten (1. F/I). **B** Wurde hingegen die Membran durch die Injektion von 110 nl der intrazellulär analogen Lösung gedehnt, war der 2. F/I größer als der 1. F/I. **C** Der statistische Vergleich der normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) zeigte einen signifikant höheren Wert nach dem Dehnungsstimulus (110 nl; **: $p \leq 0,01$).

Effekt des Dehnungsstimulus auf den vorstimulierten $\Delta F508$ hCFTR

In der anschließenden Versuchsreihe wurde der Effekt der Dehnungsstimulus auf die Aktivität des bereits mit F/I-vorstimulierten $\Delta F508$ hCFTR untersucht. Diese Experimente wurde bereits mit den WT hCFTR durchgeführt (siehe Abb. 24).

Zu Beginn wurde die $\Delta F508$ hCFTR Mutante mit F/I aktiviert (Abb. 29A), was in einer Stromstimulation von 152 ± 28 nA ($\Delta I_{F/I}$; $p \leq 0,01$; $n = 9$; $N = 2$) resultierte. Der nachfolgende Dehnungsstimulus (110 nl) führte zu einer zusätzlichen signifikanten Stimulation des I_M auf 402 ± 67 nA ($\Delta I_{F/I+Injekt}$; $p \leq 0,01$; Abb. 29B). Zusammenfassend zeigten diese Experimente, dass sich die Aktivität des vorstimulierten $\Delta F508$ hCFTR nach dem Dehnungsstimulus erhöht. Dies war im Einklang mit den Ergebnissen des WT hCFTR.

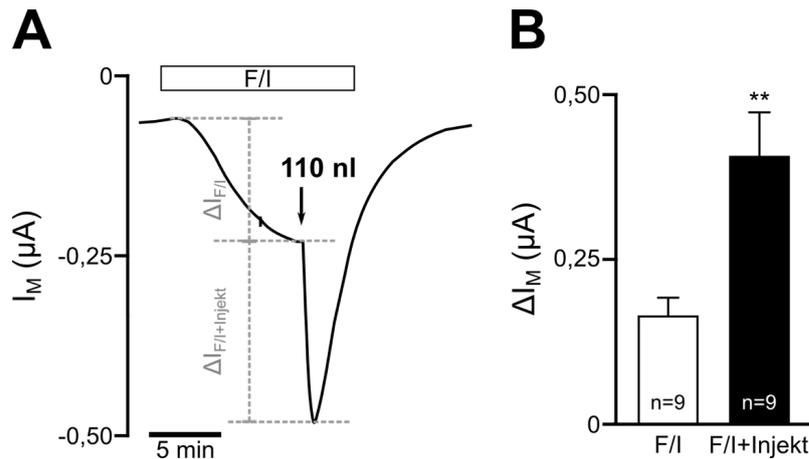


Abb. 29: Der Dehnungsstimulus führte zu einer zusätzlichen Stromstimulation des bereits vorstimulierten $\Delta F508$ hCFTR.

A+B Die durch Forskolin/IBMX (F/I; 5/500 μM)-induzierte Stromstimulation ($\Delta I_{F/I}$) der $\Delta F508$ hCFTR Mutante wurde durch den Dehnungsstimulus (110 nl) nochmals signifikant erhöht ($\Delta I_{F/I+\text{Injekt}}$; **: $p \leq 0,01$; $n = 9$; $N = 2$).

3.4.2 G551D hCFTR

Nach den Untersuchungen zur Dehnungs-induzierten Aktivität der $\Delta F508$ hCFTR Mutante, sollte nachfolgend die Fähigkeit der G551D hCFTR Mutante zur Detektion des Dehnungsstimulus überprüft werden. Zu Beginn wurde zunächst die F/I-induzierte Stromstimulation der G551D hCFTR Mutante im Vergleich zum WT hCFTR untersucht. Die Applikation von F/I (5/500 μM) führte bei G551D hCFTR-exprimierenden Oozyten zu einer signifikanten Stromstimulation von 136 ± 15 nA ($\Delta I_{F/I}$; $p \leq 0,01$; $n = 14$; $N = 2$; Abb. 30A). Bei WT hCFTR-exprimierenden Oozyten betrug $\Delta I_{F/I}$ 920 ± 165 nA ($p \leq 0,01$; $n = 6$, $N = 2$; Abb. 30B). Der Vergleich der $\Delta I_{F/I}$ -Werte zeigte eine signifikant höhere F/I-induzierte Stromstimulation des WT hCFTR ($p \leq 0,01$; Abb. 30C). Diese verringerte Reaktion des G551D hCFTR auf die F/I-Applikation lässt sich mit der Fehlregulierung der G551D Mutation erklären, die in einer geringeren Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals resultiert (Kongsuphol *et al.* 2011).

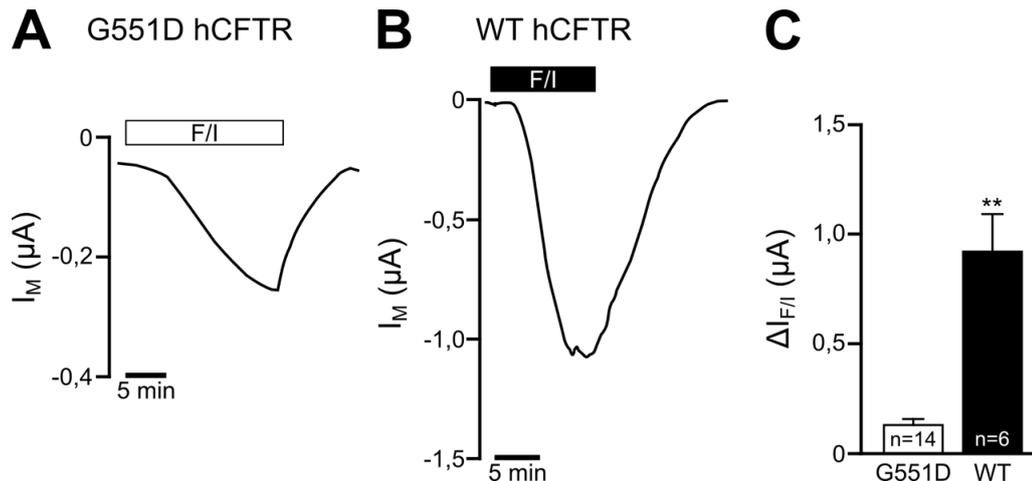


Abb. 30: Der G551D hCFTR zeigte eine geringere F/I-induzierte Stromstimulation im Vergleich zum Wildtyp hCFTR.

A-C In G551D hCFTR-exprimierenden Oozyten führte die Applikation von Forskolin/IBMX (F/I; 5/500 μM) zu einer signifikant geringeren Stromstimulation ($\Delta I_{F/I}$) als bei Oozyten, die den Wildtyp (WT) hCFTR exprimierten (**: $p \leq 0,01$).

Einfluss des Dehnungsstimulus auf die Aktivität des G551D hCFTR

Wie bereits für den WT hCFTR (siehe Abb. 24) und die $\Delta F508$ hCFTR Mutante (siehe Abb. 29) gezeigt, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die G551D hCFTR Mutante auf ihre Fähigkeit zur Wahrnehmung des Dehnungsstimulus überprüft.

In Kontrollmessungen (ohne Dehnungsstimulus; Abb. 31A) an G551D hCFTR-exprimierenden Oozyten induzierte die zweite F/I-Applikation (2. F/I: 67 ± 20 nA; $n = 7$; $N = 2$) einen signifikant kleineren Stromanstieg im Vergleich zu dem ersten F/I-Effekt (1. F/I: 149 ± 17 nA; $p \leq 0,01$).

In Experimenten mit dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion; Abb. 31B) war hingegen der 2. F/I (397 ± 94 nA; $n = 7$; $N = 2$) gegenüber dem 1. F/I (124 ± 27) signifikant erhöht ($p \leq 0,01$). Der statistische Vergleich der normalisierten F/I-induzierten G551D Antworten (2. F/I / 1. F/I) mit ($3,22 \pm 0,21$) und ohne Dehnungsstimulus ($0,43 \pm 0,10$) zeigte einen signifikant höheren normalisierten Wert mit dem Dehnungsstimulus ($p \leq 0,01$; Abb. 31C).

Anhand dieser Ergebnisse wurde der Nachweis erbracht, dass die G551D hCFTR Mutante eine Dehnungs-induzierte Erhöhung der Kanalaktivität aufweist und somit die Fähigkeit zur Wahrnehmung des Dehnungsstimulus besitzt.

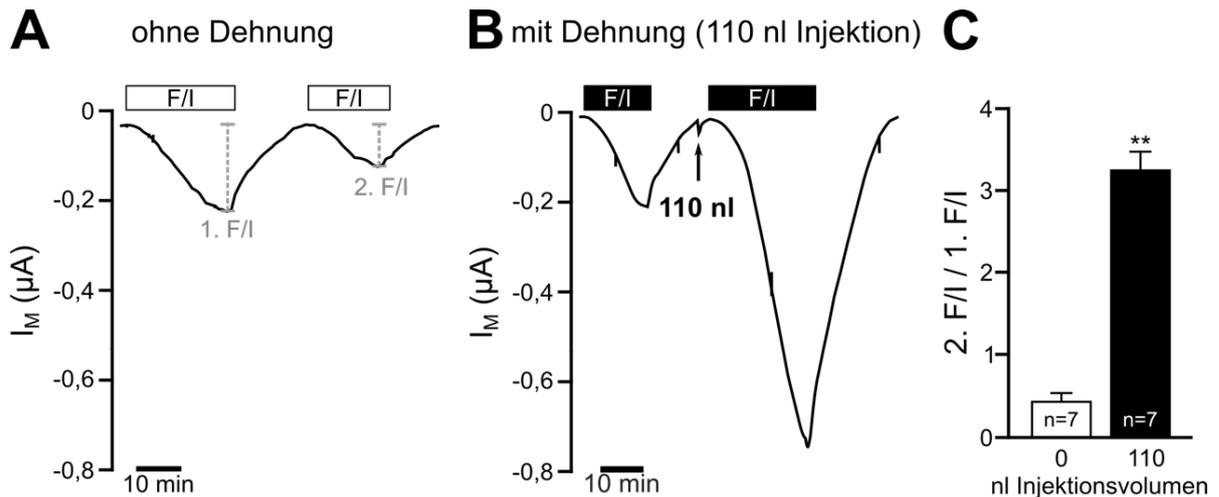


Abb. 31: Die Aktivität der G551D hCFTR Mutante wurde durch den Dehnungsstimulus erhöht.

A In Kontrollmessungen (ohne Dehnungsstimulus) an G551D hCFTR-exprimierenden Oozyten war die zweite Forskolin/IBMX (F/I; 5/500 μ M)-induzierte Stromstimulation (2. F/I) kleiner als der erste F/I-induzierte Effekt (1. F/I). **B** Im Gegensatz dazu zeigte sich nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) bzw. nach der Induktion von Membrandehnung ein erhöhter 2. F/I. **C** Der Vergleich der normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) beider Experimente ergab einen signifikant höheren Wert bei G551D Oozyten nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektionsvolumen; **: $p \leq 0,01$).

Effekt des Dehnungsstimulus auf den vorstimulierten G551D hCFTR

Nachfolgend wurde untersucht, welchen Einfluss der Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) auf die Aktivität des bereits vorstimulierten G551D hCFTR ausübt. Es wurde zu Beginn der Messung mit F/I (5/500 μ M) perfundiert. Dies resultierte in einer Stimulation des I_M ($\Delta I_{F/I}$) von 110 ± 17 nA ($n = 8$; $N = 2$; Abb. 32A). Die anschließende Applikation des Dehnungsstimulus (110 nl; $\Delta I_{F/I+Injekt}$) führte zu einem schnellen transienten Anstieg des I_M auf -385 ± 40 nA. Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen $\Delta I_{F/I}$ und $\Delta I_{F/I+Injekt}$ ($p \leq 0,01$; Abb. 32B) und war auf eine zusätzliche Erhöhung der Aktivität des G551D hCFTR durch den Dehnungsstimulus zurückzuführen.

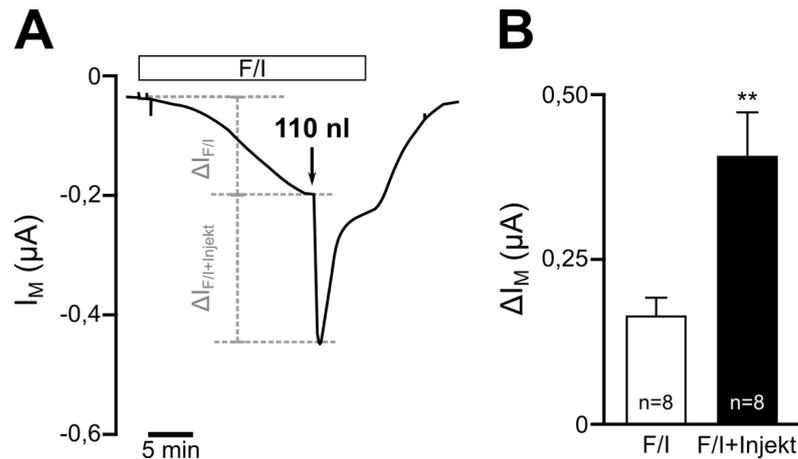


Abb. 32: Der Dehnungsstimulus führte zu einer zusätzlichen Aktivierung des bereits vorstimulierten G551D hCFTR.

A+B Durch die Applikation von Forskolin und IBMX (F/I; 5/500 μM) auf G551D hCFTR-exprimierende Oozyten war eine Stromstimulation ($\Delta I_{F/I}$) zu beobachten. Die anschließende Dehnung der Membran (110 nl Injektion) führte zu einer weiteren signifikanten Erhöhung des I_M ($\Delta I_{F/I+Injekt}$; **: $p \leq 0,01$; $n = 8$; $N = 2$).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Aktivität des hCFTR durch Induktion der Membrandehnung potenziert wurde. Dabei war es unabhängig davon, ob die Dehnung der Oozytenmembran osmotisch (siehe Ergebnisse 3.3.1) oder durch Injektion einer intrazellulär analogen Lösung (siehe Ergebnisse 3.3.2) erfolgte. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Aktivierung des hCFTR mit F/I essentiell für die Wahrnehmung des Dehnungsstimulus war (siehe Ergebnisse 3.3.4). Sowohl die $\Delta F508$ als auch die G551D Mutation des hCFTR-Proteins hatten keinen Einfluss auf die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität (siehe Ergebnisse 3.4).

In den nachfolgenden Experimenten sollte eine Dehnungs-induzierte Aktivierung des CFTR in einem nativen Epithel verifiziert werden.

3.5 Die Applikation von hydrostatischen Druck auf das native pulmonale Epithel von *Xenopus*

Innerhalb dieser Arbeit wurde eine Dehnungs-induzierte CFTR Aktivität im *in vitro* Expressionsmodell der *Xenopus* Oozyten gezeigt. Nachfolgend wurde die mechanosensitive CFTR-Regulierung in einem nativen Epithel, dem Lungenepithel von *Xenopus*, verifiziert. In früheren Studien am Institut für Tierphysiologie konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Applikation von hydrostatischen Druck (HD) eine Dehnung des pulmonalen Epithels von *Xenopus* induziert wurde und diese zur Aktivierung verschiedener Ionenleitfähigkeiten führte (Bogdan *et al.* 2008; Richter *et al.* 2014). Da unter anderem durch HD eine mechanisch induzierte Cl^- Sekretion aktiviert wurde (Bogdan *et al.* 2008), lag der Fokus der weiteren Experimente dieser Arbeit, auf der Untersuchungen an einer möglichen Beteiligung des CFTR an diesem Dehnungs-induzierten Effekt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der mechanische Stimulus durch HD appliziert. Dies wurde über eine Erhöhung der Flüssigkeitssäule um 5 cm oder 10 cm ermöglicht. Die beiden Flüssigkeitssäulen wurden gewählt, da der mechanische Stimulus durch 10 cm Flüssigkeitssäule größer war als durch 5 cm Flüssigkeitssäule, ähnlich wie bei den *in vitro* Experimenten mit den unterschiedlichen Injektionsvolumina (siehe Ergebnisse 3.3.3). Nachfolgend wurde die Wirkung von HD durch 5 cm und 10 cm Flüssigkeitssäule auf den transepithelialen Ionen-transport des pulmonalen Epithels von *Xenopus* in Ussing-Kammer-Experimenten untersucht und inwiefern der CFTR daran beteiligt ist.

Nachdem die Lungenpräparate in die modifizierte Ussing-Kammer eingebaut wurden (siehe Material und Methoden 2.1.1) und der gemessene Kurzschlussstrom (I_{SC}) sich auf einen konstanten Wert eingependelt hatte, wurde über das apikale Kompartiment die Flüssigkeitssäule um 5 cm erhöht und damit HD auf das Epithel appliziert. Dies resultierte über die Dauer von 5-10 min in einem signifikanten Absinken des I_{SC} von $21,44 \pm 2,18 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf ein neues Stromplateau bei $19,34 \pm 2,11 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($p \leq 0,01$; $n = 11$; Abb. 33A). Nach der Wegnahme des HD stieg der Strom wieder an und pendelte sich auf einen Wert von $23,75 \pm 2,59 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ein, der höher war als der Ausgangswert vor HD-Applikation ($p \leq 0,01$).

Darüber hinaus wurde in weiteren Experimenten der Effekt von 10 cm Flüssigkeitssäule auf den I_{SC} untersucht, was gleichermaßen zu einem signifikanten Abfall des I_{SC} von $42,87 \pm 3,40 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ auf $33,01 \pm 2,85 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ führte ($p \leq 0,01$; $n = 16$; Abb. 33B). Der statistische Vergleich der HD-induzierten Stromänderungen durch 5 cm ($\Delta I_{\text{HD}_5\text{cm}}$) und 10 cm

Flüssigkeitssäule (ΔI_{HD_10cm}) ergab einen signifikanten größeren Abfall des I_{SC} bei 10 cm Flüssigkeitssäule ($p \leq 0,01$; Abb. 33C). Demnach führte die Applikation von HD zu einer Inhibition des I_{SC} und je größer die Flüssigkeitssäule, desto ausgeprägter war diese Dehnungs-induzierte Strominhibition.

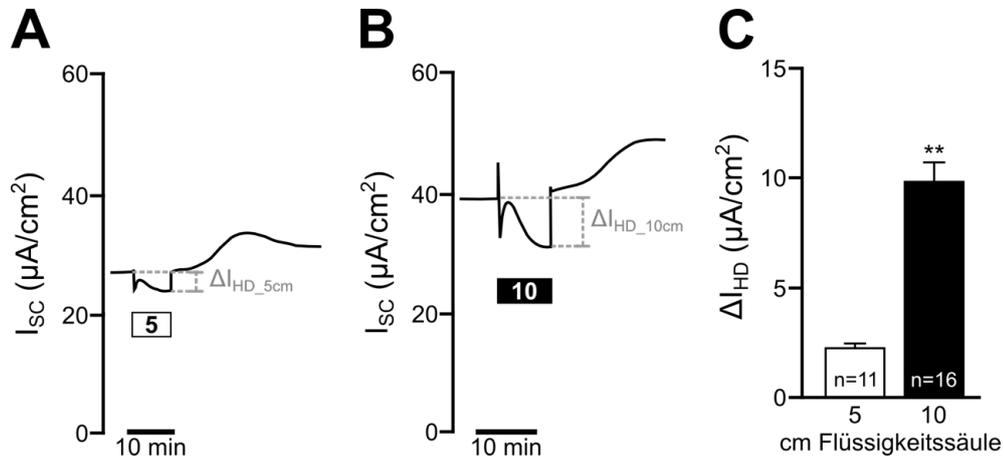


Abb. 33: Der hydrostatische Druck-induzierte Effekt bei 5 cm und 10 cm Flüssigkeitssäule.

A Die Applikation von hydrostatischen Druck (HD; 5 cm Flüssigkeitssäule; weißer Balken) auf die apikale Epithelseite der *Xenopus* Lunge führte zu einem Abfall des Kurzschlussstroms (I_{SC} ; ΔI_{HD_5cm}). Nach Wegnahme des HD stieg der I_{SC} wieder an und erreichte einen höheren Wert im Vergleich zu dem vor der HD-Applikation. **B** In Experimenten mit 10 cm Flüssigkeitssäule (schwarzer Balken) wurde ebenfalls ein HD-induzierter Stromabfall beobachtet (ΔI_{HD_10cm}). **C** Der statistische Vergleich der HD-induzierten Stromänderungen (ΔI_{HD}) der Experimente dargestellt in A und B ergab einen signifikant erhöhten HD-induzierten Stromabfall mit 10 cm Flüssigkeitssäule (**: $p \leq 0,01$).

Im Rahmen von Ussing-Kammer-Experimenten wurde außerdem der Gewebswiderstand des Lungenepithels (R_T) vor (0 cm), während (5 bzw. 10 cm) und nach (0 cm) der Applikation von HD bestimmt (Abb. 34). Bei einer Flüssigkeitssäule von 5 cm änderte sich der Widerstand nicht signifikant ($R_{T0cm} = 722,54 \pm 81,64 \Omega \cdot cm^2$; $R_{T5cm} = 720,91 \pm 63,27 \Omega \cdot cm^2$; $R_{T0cm} = 763,68 \pm 113,62 \Omega \cdot cm^2$; $p \geq 0,05$; $n=11$; Abb. 34A). Des Weiteren wurden auch bei einer 10 cm Flüssigkeitssäule keine signifikanten Änderungen des Gewebswiderstandes beobachtet ($R_{T0cm} = 427,41 \pm 34,23 \Omega \cdot cm^2$; $R_{T10cm} = 413,32 \pm 46,72 \Omega \cdot cm^2$; $R_{T0cm} = 384,60 \pm 25,85 \Omega \cdot cm^2$; $p \geq 0,05$; $n=16$; Abb. 34B). Die Ergebnisse der Messungen mit 5 cm bzw. 10 cm Flüssigkeitssäule zeigten, dass die Dehnung des *Xenopus* Lungenepithel keine Auswirkungen auf den Gewebswiderstand hatte. Demnach sind die HD-induzierten Effekte auf Änderungen des pulmonalen Ionentransports zurückzuführen und nicht auf etwaige Beschädigungen der epithelialen Barriere.

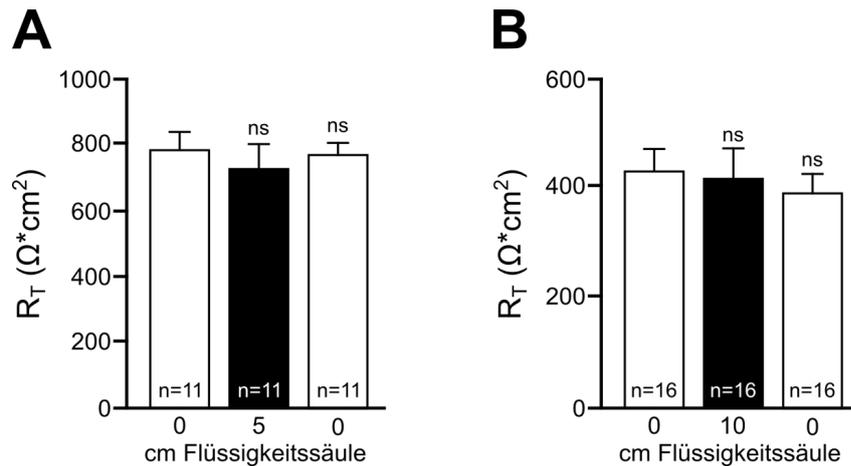


Abb. 34: Der Gewebswiderstand des *Xenopus* Lungenepithels änderte sich durch die mechanische Dehnung nicht.

Sowohl in Experimenten mit hydrostatischem Druck (HD) von 5 cm Flüssigkeitssäule (**A**) als auch mit 10 cm Flüssigkeitssäule (**B**) gab es keine signifikanten Unterschiede im transepithelialen Widerstand (R_T) vor (0 cm), während (5 cm bzw. 10 cm) und nach (0 cm) der HD-Applikation (ns: $p \geq 0,05$).

In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass eine zweimalige Applikation von HD mit 5 cm Flüssigkeitssäule zu einer Wiederholung der HD-induzierten Effekte führte, die sich nicht signifikant voneinander unterschieden (Bogdan 2007; Richter 2014). In dieser Arbeit wurde HD mit 10 cm Flüssigkeitssäule zweimalig appliziert und auch hier wurde kein signifikanter Unterschied der beiden HD-induzierten Effekte beobachtet (1. HD-Effekt: $6,65 \pm 1,05 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; 2. HD-Effekt: $7,47 \pm 1,26 \mu\text{A}/\text{cm}^2$; $p \geq 0,05$; $n = 6$; Abb. 35). Demnach konnte der erste HD-induzierte Effekt in den nachfolgenden Experimenten als Kontrolle (ohne Pharmakon) für den 2. HD-induzierten Effekt in Anwesenheit des Pharmakons herangezogen werden.

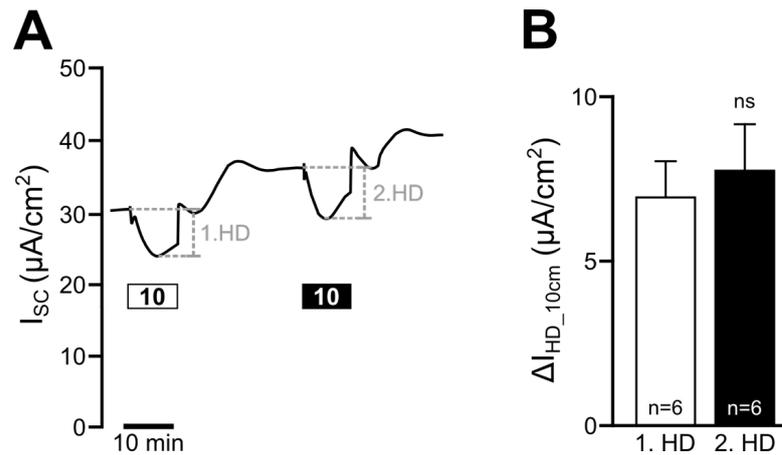


Abb. 35: Die wiederholte Applikation von HD (10 cm Flüssigkeitssäule) zeigte keine Änderung des HD-induzierten Stromabfalls.

A Die Applikation von hydrostatischem Druck (HD; weißer Balken; 10 cm Flüssigkeitssäule; apikal) resultierte in einem Abfall des Kurzschlussstroms (I_{sc} ; 1. HD). Dieser Effekt war reversibel und ein zweites Mal wiederholbar (2. HD; schwarzer Balken). **B** Die statistische Auswertung des HD-induzierten Stromabfalls ($\Delta I_{HD_{10cm}}$) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen dem 1. HD und dem 2. HD ($p \geq 0,05$; $n = 6$).

3.5.1 Untersuchungen zur Beteiligung des CFTR am HD-induzierten Effekt

Der HD-induzierte Stromabfall im pulmonalen Epithel von *Xenopus* ist auf eine Aktivierung verschiedener Ionenleitfähigkeiten zurückzuführen, die eine Na^+ Absorption, K^+ Sekretion und Cl^- Sekretion miteinschließt (Bogdan *et al.* 2008; Abb. 36A). Es stellte sich daher die Frage, ob die Cl^- sekretierende Komponente durch eine mechanosensitive Aktivierung des CFTR hervorgerufen wurde. Daher wurden im Folgenden Experimente mit dem CFTR Blocker GlyH-101 (GlyH; Muanprasat *et al.* 2004) durchgeführt, dessen inhibitorische Wirksamkeit auf die CFTR Aktivität bereits am *Xenopus* Lungenepithel gezeigt wurde (Mathes 2013). Eine Inhibition des CFTR und somit die Inhibition der HD-induzierten Cl^- Sekretion, sollte den verbleibenden Strom in Richtung der K^+ sekretierenden Komponente verschieben, welche für den Abfall des zu beobachteten Stromabfalls verantwortlich ist. Dies würde bedeuten, dass der HD-induzierte Stromabfall durch die Inhibition der Cl^- Sekretion ausgeprägter sein sollte (Abb. 36B).

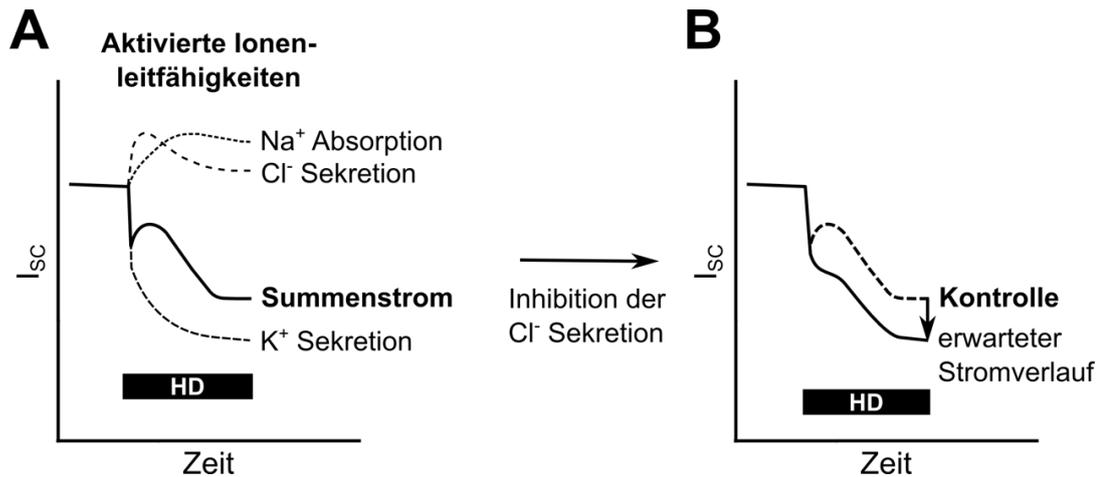


Abb. 36: Schematische Darstellung der Inhibition der HD-induzierten Cl^- Sekretion.

A Die apikale Applikation von hydrostatischem Druck (HD; 5 cm Flüssigkeitssäule; schwarzer Balken) resultierte in einem Abfall des Kurzschlussstroms (I_{sc}). Dieser Abfall repräsentiert einen Summenstrom, der sich aus verschiedenen Ionenleitfähigkeiten zusammensetzt (Na^+ Absorption, Cl^- Sekretion und K^+ Sekretion). **B** Die Inhibition der Cl^- Sekretion, durch den CFTR Inhibitor GlyH-101, würde den Strom in Richtung der K^+ sekretierenden Komponente verschieben und daher den HD-induzierten Stromabfall vergrößern.

Die erste Applikation von 5 cm Flüssigkeitssäule führte zu einem signifikanten Abfall des I_{sc} um $2,10 \pm 0,27 \mu A/cm^2$ (ΔI_{HD_5cm} ; $p \leq 0,01$; $n = 11$; Abb. 37A). Als sich im Anschluss an die HD-Applikation ein neues Stromplateau einstellte, wurde apikal mit GlyH (40 μM) perfundiert, um den CFTR zu blocken. Dies führte zu einer leichten Abnahme des I_{sc} und war ein Hinweis auf eine erfolgreiche CFTR Inhibition. Die zweite Applikation von HD (5 cm Flüssigkeitssäule) in Anwesenheit von GlyH verursachte einen ΔI_{HD_5cm} von $5,70 \pm 0,93 \mu A/cm^2$ ($p \leq 0,01$). Diese Strominhibition war signifikant größer als unter Kontrollbedingungen (ohne GlyH; $p \leq 0,01$; Abb. 37B).

In weiteren Experimenten wurde HD mit 10 cm Flüssigkeitssäule appliziert (Stromspuren nicht gezeigt). Ohne GlyH betrug der HD-induzierte Stromabfall (ΔI_{HD_10cm}) $9,76 \pm 1,10 \mu A/cm^2$ und in Gegenwart von GlyH war ΔI_{HD_10cm} signifikant erhöht auf $18,76 \pm 1,58 \mu A/cm^2$ ($p \leq 0,01$; $n = 10$; Abb. 37B).

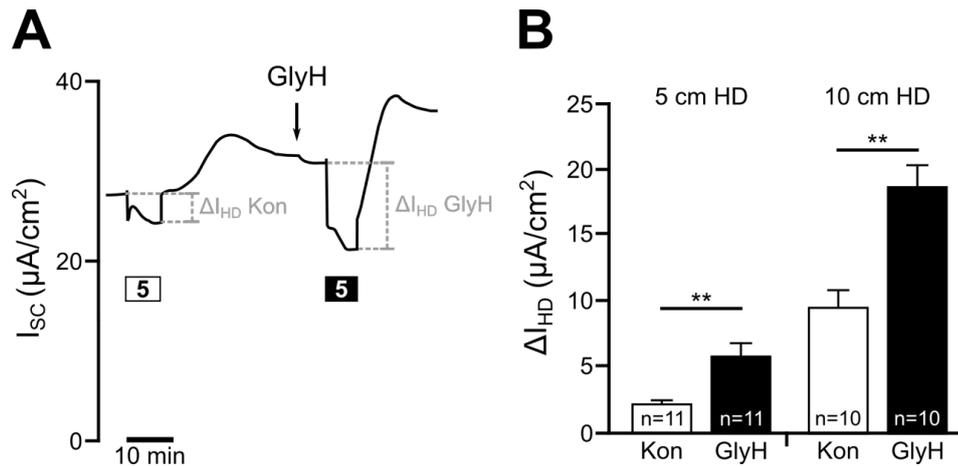


Abb. 37: Untersuchungen zur Beteiligung des CFTR an dem HD-induzierten Effekt.

A Die apikale Applikation von hydrostatischem Druck (HD; 5 cm Flüssigkeitssäule; weißer Balken) führte zu einem Abfall des Kurzschlussstroms (I_{SC} ; ΔI_{HD} Kon). Nachdem Erreichen eines neues Stromplateaus wurde der CFTR Inhibitor GlyH-101 (GlyH; 40 μ M; apikal) appliziert, wodurch ein kleiner Stromabfall zu verzeichnen war. Die erneute Applikation von HD in Anwesenheit von GlyH (5 cm Flüssigkeitssäule; schwarzer Balken) resultierte in einem stärkeren HD-induzierten Stromabfall (ΔI_{HD} GlyH). **B** Statistischer Vergleich der HD-induzierten Effekte (ΔI_{HD}) von 5 cm bzw. 10 cm Flüssigkeitssäule. In Gegenwart des CFTR Inhibitors GlyH (schwarze Balken) war der HD-induzierte Effekt signifikant größer als unter Kontrollbedingungen (Kon; weiße Balken; **: $p \leq 0,01$).

Da sowohl bei 5 cm als auch bei 10 cm Flüssigkeitssäule der HD-induzierte Effekt mit GlyH ausgeprägter war, konnte somit eine Beteiligung des CFTR an dem HD-induzierten Effekt im Lungenepithel von *Xenopus* aufgezeigt werden.

3.6 Beteiligung der Membranfluidität an der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivierung

Die Verankerung von Ionenkanälen in der Plasmamembran ist ein wichtiger Faktor, um eine effiziente Wahrnehmung und Übertragung von mechanischen Stimuli zu gewährleisten (Jaalouk und Lammerding 2009; Zanini und Gopfert 2013). Dieser Mechanismus der Wahrnehmung von mechanischen Stimuli kann mit Hilfe des *Bilayer*-Modells erklärt werden (siehe Einleitung 1.3; Hamill und Martinac 2001; Hamill 2006). Durch die Deformation der Plasmamembran wird der Reiz zu den Ionenkanälen weitergeleitet und durch eine Konformationsänderung öffnet sich der Kanal (Gullingsrud und Schulten 2004). Die Verankerung der Kanäle in der Membran kann unter anderem durch deren Zusammensetzung, die Membranfluidität ist ein Faktor, mit dem sich die Zusammensetzung der Membran bemessen lässt, beeinflusst werden (Tillman und Cascio 2003). In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Membranfluidität auf die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivierung untersucht und dafür wurde die Membranfluidität der *Xenopus* Oozyten sowohl erhöht als auch verringert.

3.6.1 Erhöhung der Membranfluidität mit Methyl- β -Cyclodextrin

Für die Erhöhung der Membranfluidität wurde in dieser Arbeit das Pharmakon Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) verwendet, welches Cholesterol aus der Zellmembran verdrängt (Ilangumaran und Hoessli 1998), wodurch die Membran fluider wird. Die hCFTR-exprimierenden Oozyten wurden zunächst für 60-120 min in 5 mM M β CD inkubiert. Anschließend wurde in TEVC-Experimenten die hCFTR Aktivität elektrophysiologisch gemessen.

Zu Beginn der Messung wurde die hCFTR Expression mit F/I überprüft, wodurch der I_M anstieg (1. F/I: 917 ± 164 nA; $n = 9$; $N = 3$; Abb. 38A). Im Anschluss daran wurde der Dehnungsstimulus (110 nl Injektion der intrazellulär analogen Lösung) appliziert. Der darauffolgende zweite F/I-induzierte Effekt (2. F/I: 1380 ± 231 nA) war signifikant größer gegenüber dem 1. F/I ($p \leq 0,01$).

Der identische Messablauf wurde mit unbehandelten (ohne M β CD) hCFTR-exprimierenden Oozyten wiederholt (Abb. 38B). Auch bei diesen Experimenten war der 2. F/I (1763 ± 266 nA; $n = 9$; $N = 3$) nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) größer als der 1. F/I (861 ± 132 nA). Der statistische Vergleich der beiden normalisierten F/I-induzierten Effekte (2. F/I / 1. F/I) ergab, dass sich M β CD-inkubierte Oozyten ($1,60 \pm 0,10$) und unbe-

handelte Oozyten ($2,11 \pm 0,14$) signifikant in ihrer F/I Antwort unterschieden ($p \leq 0,01$; Abb. 38C). Folglich verminderte sich die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität durch eine Erhöhung der Membranfluidität.

Da die Membranfluidität für die Verankerung von Ionenkanälen in der Plasmamembran mit verantwortlich ist (Tillman und Cascio 2003), wäre es möglich, dass eine Erhöhung der Membranfluidität die Expression des hCFTR beeinflussen könnte. Dies würde bedeuten, dass die reduzierte Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität bei M β CD-inkubierten Oozyten nicht auf einer verringerten Dehnungssensitivität, sondern auf einer verminderten Anzahl des CFTR Kanals zurückzuführen ist. Wenn es aber keine Beeinträchtigung der hCFTR Expression gibt, dann sollte es keine Unterschiede in der F/I-vermittelten Stromstimulation und Wiederholbarkeit der F/I-Effekte bei M β CD-inkubierten Oozyten und unbehandelten Oozyten ohne Dehnungsstimulus geben. Daher wurde in parallel durchgeführten Kontrollexperimenten mit unbehandelten und M β CD-inkubierten Oozyten der F/I-induzierte Effekt zweimal, ohne Dehnungsstimulus, bestimmt (Stromspuren nicht gezeigt, nur statistische Auswertung in Abb. 38C). Die statistische Analyse der 2. F/I / 1. F/I-Werte zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten ($0,39 \pm 0,06$; $n = 5$; $N = 2$) und M β CD-inkubierten Oozyten ($0,47 \pm 0,04$; $p \geq 0,05$; $n = 5$; $N = 2$; Abb. 38C). Demnach veränderte eine Erhöhung der Membranfluidität die Wiederholbarkeit der F/I-induzierten Aktivierung des hCFTR nicht. Dies bedeutet, dass durch die Änderung der Membranfluidität die Expression des hCFTR nicht beeinträchtigt wurde.

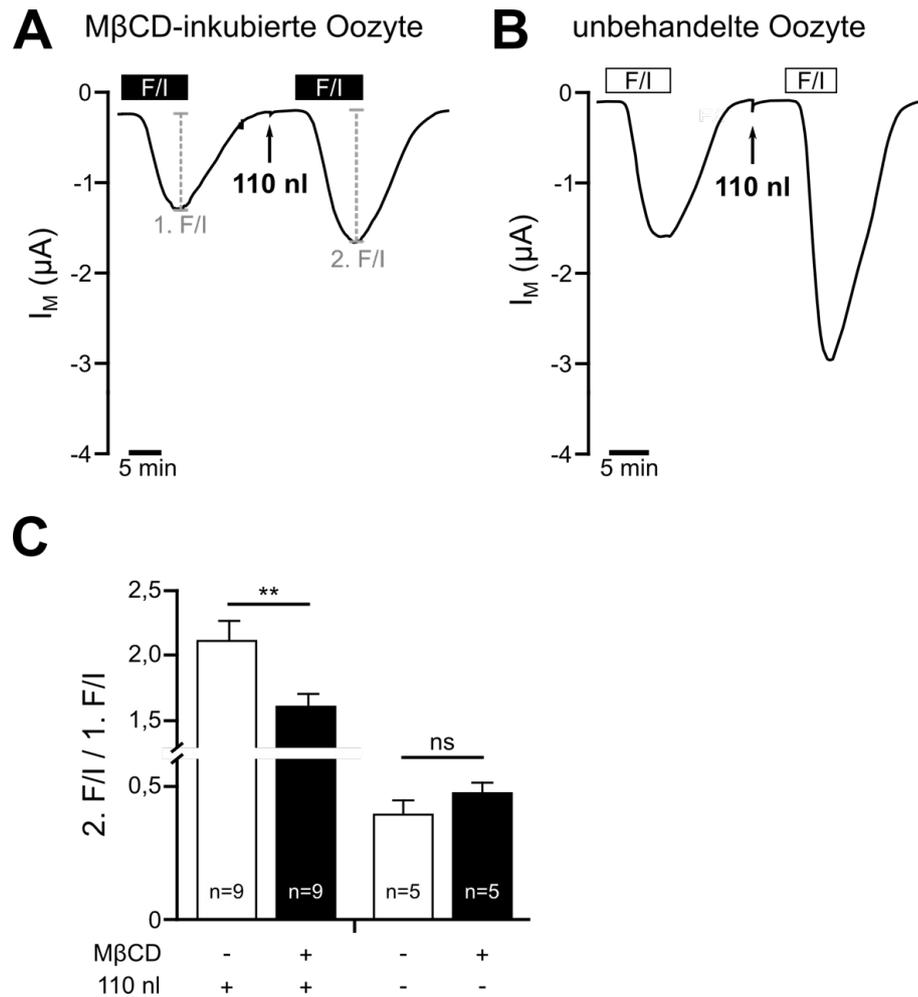


Abb. 38: Die Erhöhung der Membranfluidität von *Xenopus* Oozyten durch Methyl- β -Cyclodextrin reduzierte die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität.

Sowohl in Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD; 5 mM)-inkubierten Oozyten (A) als auch in unbehandelten Oozyten (B) führte die zweite Forskolin/IBMX-Applikation (F/I; 5/100 μ M; 2. F/I) nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) zu einer höheren Stromstimulation im Vergleich zu dem ersten F/I-Effekt (1. F/I). C Die statistische Auswertung der normalisierten F/I-induzierten Effekte (2. F/I / 1. F/I) aus A und B zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten (-M β CD; +110 nl) und M β CD Oozyten (+M β CD; +110 nl; **: $p \leq 0,01$). Im Gegensatz dazu waren die normalisierten F/I-Effekte von unbehandelten (-M β CD) und M β CD Oozyten (+M β CD) ohne Dehnungsstimulus (-110 nl; lediglich zweimal F/I-Applikation) nicht signifikant verschieden (Stromspuren nicht gezeigt; ns: $p \geq 0,05$).

3.6.2 Verringerung der Membranfluidität mit wasserlöslichem Cholesterol

Um die Membranfluidität von *Xenopus* Oozyten zu verringern, wurde der Cholesterol-Gehalt der Membran erhöht, indem die Oozyten in wasserlöslichen Cholesterol (400 μ M) für 60-120 min inkubiert wurden (Carattino *et al.* 2007). Im Anschluss daran wurde in TEVC-Experimenten der F/I-induzierte Effekt vor (1. F/I) und nach (2. F/I) dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) bestimmt (Abb. 39A). Dieser Messablauf wurde parallel mit unbehandelten (ohne Cholesterol) hCFTR-exprimierenden Oozyten durchgeführt (Abb. 39B). Der Vergleich

der normalisierten F/I-induzierten Effekte ($2. F/I / 1. F/I$) ergab einen signifikant kleineren Wert von Cholesterol-inkubierten Oozyten ($1,39 \pm 0,12$; $n = 9$; $N = 3$) im Vergleich zu unbehandelten Oozyten ($2,11 \pm 0,14$; $n = 9$; $N = 3$; Abb. 39C). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Verringerung der Membranfluidität bzw. eine Versteifung der Zellmembran, zu einer Abnahme der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität führte.

In Kontrollexperimenten wurde zweimal nacheinander die F/I-induzierte Stromstimulation ohne Dehnungsstimulus (keine Injektion) von unbehandelten und Cholesterol-inkubierten Oozyten bestimmt (Stromspuren nicht gezeigt, nur statistische Auswertung in Abb. 39C). Die statistische Analyse der normalisierten F/I-induzierten Effekte ($2. F/I / 1. F/I$) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten ($0,39 \pm 0,06$; $n = 5$; $N = 2$) und Cholesterol behandelten Oozyten ($0,44 \pm 0,013$; $n=5$; $N=2$; $p \geq 0,05$; Abb. 39C). Diese Ergebnisse zeigten, dass eine Verringerung der Membranfluidität keinen Einfluss auf die Wiederholbarkeit der F/I-induzierten hCFTR Aktivierung hatte. Dies bedeutete, dass die Verringerung der Membranfluidität keine Änderungen der Expression des hCFTR bedingte.

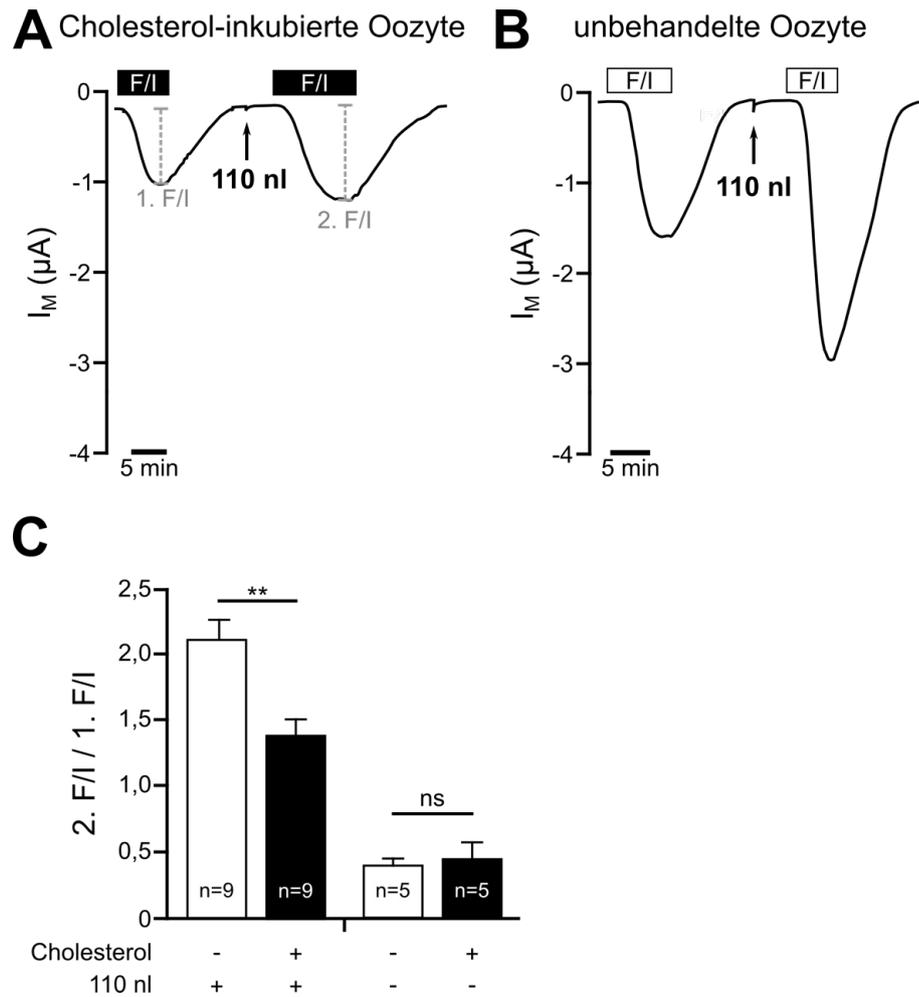


Abb. 39: Die Verringerung der Membranfluidität von *Xenopus* Oozyten durch wasserlösliches Cholesterin reduzierte die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität.

In Cholesterin-inkubierten Oozyten (400 μM ; **A**) und in unbehandelten Oozyten (**B**) war der zweite Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μM)-Effekt (2. F/I) nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) höher als der erste F/I-Effekt (1. F/I). **C** Der statistische Vergleich der normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) mit Dehnungsstimulus (+110 nl) aus **A** und **B** zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten (-Cholesterin) und Cholesterin-inkubierten Oozyten (+Cholesterin; **: $p \leq 0,01$). Im Gegensatz dazu waren die normalisierten F/I-Effekte von unbehandelten (-Cholesterin) und Cholesterin-Oozyten (+Cholesterin) ohne Dehnungsstimulus (-110 nl) nicht signifikant verschieden (ns: $p \geq 0,05$).

3.6.3 Korrelation zwischen Zellvolumen und hCFTR Aktivität bei Oozyten mit veränderter Membranfluidität

In den zuvor beschriebenen Ergebnissen (siehe Ergebnisse 3.6.1 und 3.6.2) wurde gezeigt, dass sowohl eine Erhöhung als auch eine Verringerung der Membranfluidität zu einer Verminderung der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität führte. Ursächlich hierfür könnte eine Veränderung der Zellschwellungsfähigkeit der Oozyten mit veränderter Membranfluidität in Folge des Dehnungsstimulus sein. Um dies zu überprüfen, wurden *Xenopus* Oozyten jeweils

vor und nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) fotografiert, um anschließend die Volumenzunahme bestimmen zu können. Die Oozyten wurden dafür zuvor entweder für 60-120 min in M β CD (5 mM) bzw. Cholesterol (400 μ M) inkubiert oder als Kontrolle in ORI gelagert. Nach der Volumenzunahme wiesen die M β CD-inkubierten Oozyten ($+8,4 \pm 0,9\%$; $n = 11$) und Cholesterol-inkubierten Oozyten ($+6,6 \pm 1,3\%$; $n = 10$) keine signifikanten Veränderungen im Zellvolumen zu den unbehandelten Kontroll-Oozyten ($+7,5 \pm 1,1\%$; $n = 11$; $p \geq 0,05$) auf. Dies wurde nochmals mit Hilfe eines Punktediagramms deutlich, indem die Zellvolumina der drei Behandlungsansätze gegen die entsprechenden normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) aus den oben beschriebenen TEVC-Messungen (siehe Ergebnisse 3.6.1 und 3.6.2) aufgetragen wurden (Abb. 40). Nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) war kein signifikanter Unterschied in der Volumenzunahme von Oozyten mit veränderter Membranfluidität erkennbar ($p \geq 0,05$), wohl aber bei der hCFTR Aktivität (2. F/I / 1. F/I; $p \leq 0,01$; Abb. 40). Eine Verringerung der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität bei M β CD- und Cholesterol-Oozyten (siehe Abb. 38 und Abb. 39) war daher nicht auf eine Veränderung des Zellschwellungspotentials dieser Oozyten zurückzuführen.

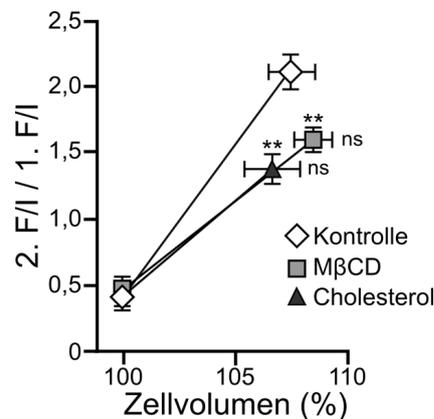


Abb. 40: Korrelation des Zellvolumens und der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität von Oozyten mit veränderter Membranfluidität.

Die Zellvolumenzunahme durch den Dehnungsstimulus (110 nl) unterschied sich zwischen Oozyten mit erhöhter (Methyl- β -Cyclodextrin: M β CD; graues Viereck) bzw. verringerter (Cholesterol; schwarzes Dreieck) Membranfluidität nicht signifikant von unbehandelten Kontroll-Oozyten (Kontrolle; weiße Raute; ns: $p \geq 0,05$). Im Gegensatz dazu war die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität (2. F/I / 1. F/I) sowohl bei M β CD- als auch bei Cholesterol-Oozyten signifikant verringert gegenüber den Kontroll-Oozyten (**: $p \leq 0,01$).

3.7 Beteiligung des Zytoskeletts an der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivierung

Neben der Membranfluidität ist die Interaktion mit dem Zytoskelett ein wichtiger Faktor für die Verankerung von Ionenkanälen in der Zellmembran (Mazzochi *et al.* 2006). In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass der CFTR mit Elementen des Zytoskeletts ein dynamisches Interaktom bildet und diese Verbindung für die Regulation, das *Trafficking* und den Abbau des CFTR Proteins (Edelman 2014) wichtig ist. Daher wurde im Folgenden überprüft, ob eine Interaktion zwischen dem hCFTR und dem Zytoskelett essentiell bei der Wahrnehmung der Membrandehnung und der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivierung ist. Um diese Beteiligung zu prüfen, wurde sowohl das Mikrotubuli- als auch Aktin-Zytoskelett pharmakologisch modifiziert, um eine Stabilisierung oder Destabilisierung dieser Strukturen zu erreichen.

3.7.1 Das Mikrotubuli-Zytoskelett

Destabilisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts

Eine Destabilisierung der Mikrotubuli von hCFTR-exprimierenden Oozyten wurde durch eine 60-120-minütige Inkubation in Colchicin (50 μM) herbeigeführt. Colchicin hemmt die Polymerisierung der Mikrotubuli, da es freie Tubulin-Untereinheiten bindet (Heidemann und Kirschner 1975; Machu 1998). In TEVC-Messungen erfolgte eine zweimalige Applikation von F/I (5/100 μM) mit einem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) bei Colchicin-inkubierten ($n = 11$; $N = 3$; Abb. 41A) und unbehandelten ($n = 11$; $N = 3$; Abb. 41B) Oozyten. Der Vergleich der normalisierten F/I-Effekte ($2. \text{ F/I} / 1. \text{ F/I}$) zwischen unbehandelten ($2,98 \pm 0,49$) und Colchicin-inkubierten Oozyten ($3,45 \pm 0,47$) ergab keinen signifikanten Unterschied ($p \geq 0,05$; Abb. 41C). Demnach wurde durch die Destabilisierung der Mikrotubuli die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität nicht verändert.

Da die Mikrotubuli an dem Transport von Ionenkanälen zur Plasmamembran beteiligt sind, sollte im Folgenden ausgeschlossen werden, ob die Behandlung mit Colchicin zu einer Verringerung des F/I-vermittelten Stroms führt oder sich auf die Wiederholbarkeit der F/I-Effekte auswirkt. In parallelen Kontrollexperimenten (ohne Dehnungsstimulus) wurden daher unbehandelte und Colchicin-inkubierte Oozyten zweimalig mit F/I stimuliert (Stromspuren nicht gezeigt). Die $2. \text{ F/I} / 1. \text{ F/I}$ -Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Colchicin: $0,35 \pm 0,08$; $n = 6$; $N = 2$; Kontrolle: $0,39 \pm 0,08$; $n = 5$; $N = 2$; $p \geq 0,05$; Abb. 41C). Da

sich diese Werte nicht unterschieden, beeinflusste die Behandlung mit Colchicin die hCFTR Expression nicht.

Darüber hinaus war in DEPC-Oozyten, die ebenfalls 60-120 min in Colchicin inkubiert wurden, keine Änderung des I_M durch die Injektion (110 nl) oder die Applikation von F/I zu beobachten (Abb. 41D).

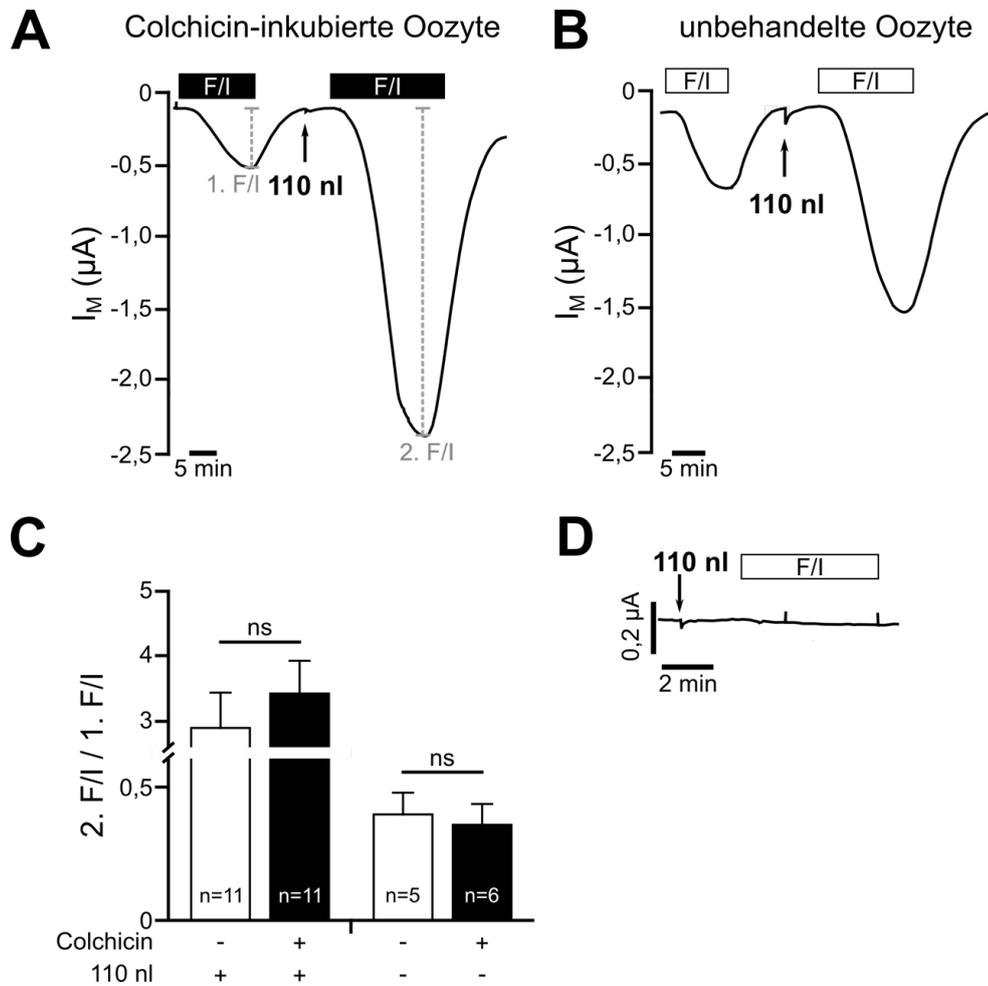


Abb. 41: Die Destabilisierung der Mikrotubuli hatte keine Auswirkungen auf die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität.

Sowohl bei Colchicin-inkubierten (50 μ M; **A**) als auch bei unbehandelten Oozyten (**B**) war die zweite Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μ M)-induzierte Stromstimulation (2. F/I) nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) größer als die Erste (1. F/I). **C** Die statistische Analyse der normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) der Messungen mit 110 nl Injektion (+110 nl) ergab keinen Unterschied zwischen Oozyten mit intaktem (-Colchicin) und destabilisierte Mikrotubuli (+Colchicin; ns: $p \geq 0,05$). Die normalisierten F/I-Effekte der Kontrollexperimente (ohne Dehnungsstimulus; -110 nl) unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant voneinander (ns: $p \geq 0,05$). **D** Die in Colchicin-inkubierten DEPC-Oozyten zeigten keine Änderungen des Transmembranstroms (I_M) durch die 110 nl Injektion oder die F/I-Applikation.

In den zuvor beschriebenen Experimenten wurde kein Einfluss von Colchicin auf die Dehnungs-induzierte Aktivität des hCFTR beobachtet. Dies könnte möglicherweise daran liegen, dass Colchicin nicht membrangängig ist und daher gar nicht in die Oozyte gelangte. Um dies als Fehlerquelle auszuschließen, wurde nachfolgend der Versuchsverlauf modifiziert und 32 nl einer 1 mM Colchicin-Lösung (finale Konzentration von 40 μ M Colchicin pro Oozyte) 60-120 min vor den TEVC-Messungen direkt in die Oozyten injiziert. Als Kontrolle dienten Oozyten, die mit der äquivalenten Menge des Lösungsmittels von Colchicin, ddH₂O, injiziert wurden. Der Versuchsablauf war identisch mit den vorherigen Colchicin-Inkubationsexperimenten und umfasste die Applikation von F/I vor (1. F/I) und nach (2. F/I) dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion). Die statistische Auswertung der normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Oozyten mit intakten ($2,94 \pm 0,32$; n = 7; N = 2) und destabilisierten Mikrotubuli ($2,91 \pm 0,43$; n = 7; N = 2; $p \geq 0,05$; Abb. 42). Diese Ergebnisse standen im Einklang mit den Ergebnissen der Colchicin-Inkubationsexperimenten und unterstützen die Aussage, dass eine Destabilisierung der Mikrotubuli die Dehnungswahrnehmung des hCFTR nicht verändert.

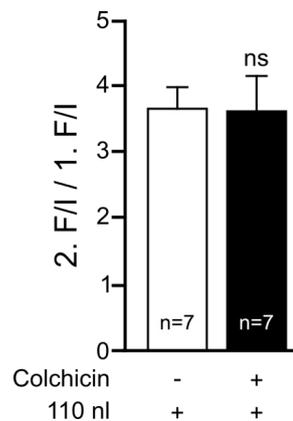


Abb. 42: Die Destabilisierung der Mikrotubuli, induziert durch die Injektion von Colchicin, veränderte die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität nicht.

Die normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) von gedehnten Oozyten (+110 nl) mit intakten (-Colchicin) und destabilisierten Mikrotubuli (40 μ M Colchicin; +Colchicin) zeigten keinen signifikanten Unterschied (ns: $p \geq 0,05$).

Stabilisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts

Nachfolgend wurde mit dem Pharmakon Paclitaxel der Abbau der Mikrotubuli inhibiert, wodurch eine Stabilisierung der Tubulinfilamente induziert wurde (Jesus *et al.* 1988; Verde *et al.* 1991). Die hCFTR-exprimierenden Oozyten wurden vor den TEVC-Messungen entweder für 60-120 min in 10 μ M Paclitaxel inkubiert (Abb. 43A) oder als Kontrolle der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität nicht mit Paclitaxel behandelt (Abb. 43B). Der statistische Vergleich der normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) von unbehandelten ($2,26 \pm 0,14$; $n = 11$; $N = 3$) und Paclitaxel-inkubierten Oozyten ($1,42 \pm 0,07$; $n = 11$; $N = 3$) ergab einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,01$; Abb. 43C). Dies bedeutet, dass die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität durch eine Stabilisierung der Mikrotubuli verringert wurde.

In Kontrollexperimenten (ohne Dehnungsstimulus) wurde durch die zweimalige F/I-Applikation ein möglicher Effekt von Paclitaxel auf die hCFTR Expression und Wiederholbarkeit der F/I-induzierten Stimulation untersucht (Stromspuren nicht gezeigt). Bei Oozyten mit intakten (ohne Paclitaxel: $0,39 \pm 0,08$; $n = 5$; $N = 2$) und mit stabilisierten Mikrotubuli (mit Paclitaxel: $0,39 \pm 0,08$; $n = 6$; $N = 2$) wurde kein signifikanter Unterschied der beiden normalisierten F/I-Effekte ermittelt ($p \geq 0,05$; Abb. 43C). Die Stabilisierung der Mikrotubuli hatte dem zufolge keine Auswirkungen auf die wiederholte Aktivierung des hCFTR durch F/I.

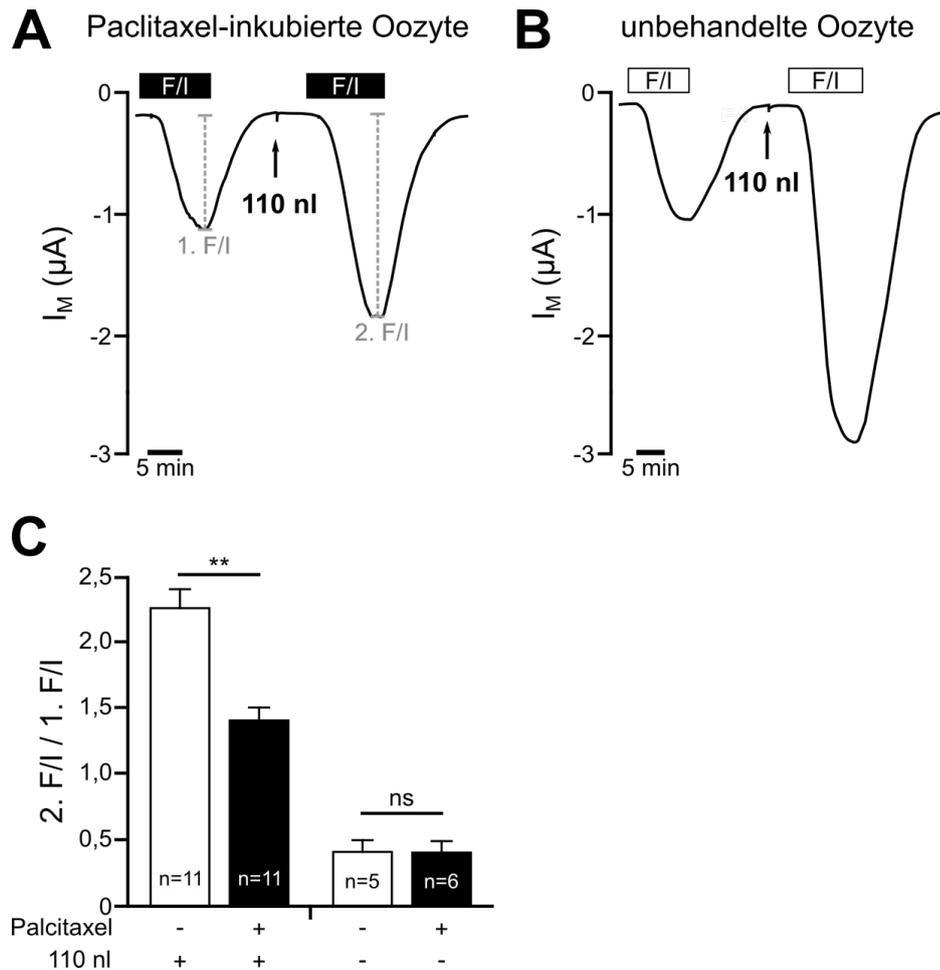


Abb. 43: Die Stabilisierung der Mikrotubuli durch Paclitaxel verringerte die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität.

A Bei Paclitaxel-inkubierten Oozyten (10 μM) und auch bei unbehandelten Oozyten (**B**) war die zweite F/I-induzierte Stromstimulation (2. F/I) nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) höher als die Erste (1. F/I). **C** Die statistische Analyse der normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) mit Dehnungsstimulus (+110 nl) ergab einen signifikant kleineren Wert bei Paclitaxel-inkubierten Oozyten (+Paclitaxel) im Vergleich zu unbehandelten Oozyten (-Paclitaxel; **: $p \leq 0,01$). Im Gegensatz dazu unterschieden sich die normalisierten F/I-Effekte von Oozyten mit intakten (-Paclitaxel) und stabilisierten Mikrotubuli (+Paclitaxel) ohne Dehnungsstimulus (-110 nl) nicht signifikant voneinander (ns: $p \geq 0,05$).

Die Verringerung der Dehnungs-induzierten Aktivität des hCFTR durch Stabilisierung der Mikrotubuli wurde in Experimenten bestätigt, bei denen Paclitaxel vor den TEVC-Messungen in die Oozyten injiziert wurde (finale Konzentration von 10 μM Paclitaxel pro Oozyte). Denn auch hier war der normalisierte F/I-Effekt (2. F/I / 1. F/I) von Paclitaxel-inkubierten Oozyten ($1,37 \pm 0,13$; $n = 7$; $N = 2$) signifikant verringert im Vergleich zu unbehandelten Kontrolloozyten ($3,71 \pm 0,53$; $n = 6$; $N = 2$; $p \leq 0,01$; Abb. 44).

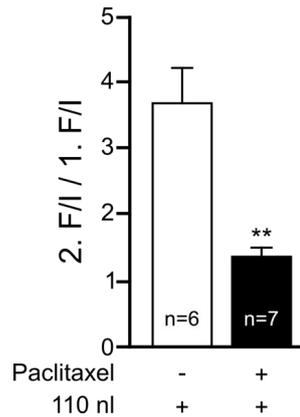


Abb. 44: Die durch Paclitaxel induzierte Mikrotubuli-Stabilisierung reduzierte den Dehnungs-induzierten Effekt des hCFTR.

Die durch die Injektion von Paclitaxel (10 μ M; +Paclitaxel; +110 nl) herbeigeführte Stabilisierung der Mikrotubuli reduzierte die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität (2. F/I / 1. F/I) signifikant gegenüber unbehandelten Oozyten (-Paclitaxel; +110 nl; **: $p \leq 0,01$).

Korrelation zwischen Zellvolumen und hCFTR Aktivität bei Oozyten mit veränderten Mikrotubuli

Es wurde zuvor gezeigt, dass eine Destabilisierung der Mikrotubuli die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität nicht veränderte, aber dass eine Stabilisierung der Mikrotubuli die Dehnungssensitivität des hCFTR verringerte (siehe Ergebnisse 3.7.1). Eine mögliche Ursache könnte in der Zellschwellungsfähigkeit der Oozyten mit stabilisierten Mikrotubuli liegen. In TEVC-Experimenten wurde beim Einstechen der Glaskapillaren in Paclitaxel-behandelte Oozyten bemerkt, dass die Oozyten fester und steifer waren im Vergleich zu unbehandelten Oozyten. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Stabilisierung der Mikrotubuli zu einer Versteifung der Oozyte führte, sodass der Dehnungsstimulus nicht mehr adäquat von der Oozyte wahrgenommen werden konnte. Um dies zu überprüfen wurden *Xenopus* Oozyten jeweils vor und nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) fotografiert und anschließend die Volumenzunahme bestimmt. Das Volumen von Oozyten mit intakten Mikrotubuli (Kontrolle) stieg nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) um $8,2 \pm 1,1\%$ ($n = 21$). Eine ähnliche Volumenzunahme war bei Oozyten mit destabilisierten Mikrotubuli errechnet worden (Colchicin: $9,2 \pm 1,8\%$; $n = 9$). Die ähnliche Zellschwellungsfähigkeit könnte daher eine Erklärung für die nicht signifikant verschiedenen normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) der Kontrolle ($2,98 \pm 0,49$; Abb. 45) und der Colchicin-behandelten Oozyten ($3,45 \pm 0,47$) aus den TEVC-Experimenten sein (siehe Abb. 42). Interessanterweise waren bei Oozyten mit stabilisierten Mikrotubuli (Paclitaxel) sowohl das Zellvolumen ($7,8 \pm 1,7\%$; $n = 9$; $p \leq 0,05$) als auch der 2. F/I / 1. F/I-Wert ($1,42 \pm 0,07$; $p \leq 0,01$) signifikant verringert gegenüber den entsprechenden Werten der Kontroll-Oozyten ($2,26 \pm 0,14$). Anhand des Vergleiches zwischen Zellvolu-

men und hCFTR Aktivität ließ sich eindeutig eine Korrelation beider Parameter erkennen: Eine Reduzierung des Zellschwellungspotentials der Oozyten mit stabilisierten Mikrotubuli, ging mit einer Verringerung der hCFTR Aktivität in Folge des Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) einher.

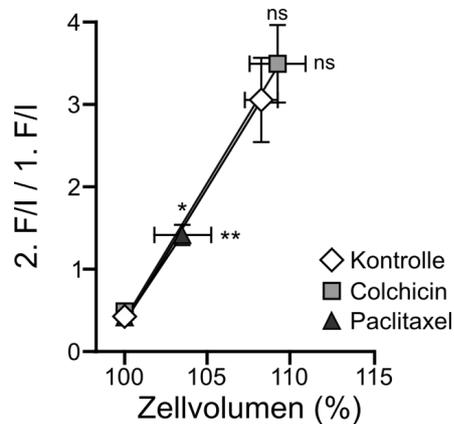


Abb. 45: Korrelation des Zellvolumens und der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität von Oozyten mit veränderten Mikrotubuli.

Bei Oozyten mit destabilisierten Mikrotubuli (graues Quadrat; Colchicin) gab es keinen Unterschied im Zellvolumen und in den normalisierten F/I-Effekten (2. F/I / 1. F/I) gegenüber unbehandelten Kontrollen (weiße Raute; ns: $p \geq 0,05$). Dagegen war bei Oozyten mit stabilisierten Mikrotubuli (schwarzes Dreieck; Paclitaxel) sowohl das Zellvolumen (**: $p \leq 0,01$) als auch der 2. F/I / 1. F/I-Wert (*: $p \leq 0,05$) signifikant verringert.

3.7.2 Das Aktin-Zytoskelett

Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts

Für die Destabilisierung der Aktinfilamente in *Xenopus* Oozyten wurde Cytochalasin D verwendet, welches die Polymerisierung von Aktin inhibiert (Cooper 1987). Dafür wurden hCFTR-exprimierende Oozyten für 60-120 min in 10 μ M Cytochalasin D inkubiert und anschließend in TEVC-Experimente auf ihre Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität überprüft (Abb. 46A). Auch unbehandelten Oozyten wurden vor (1. F/I) und nach (2. F/I) dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) mit F/I (5/100 μ M) stimuliert (Abb. 46B). Der statistische Vergleich der normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten ($2,98 \pm 0,49$; $n = 11$; $N = 3$) und Cytochalasin-inkubierten Oozyten ($2,62 \pm 0,36$; $n = 11$; $N = 3$; $p \geq 0,05$; Abb. 46C). Daher kann geschlossen werden, dass die Destabilisierung der Aktinfilamente die Dehnungswahrnehmung des hCFTR nicht beeinflusst.

Da auch Aktinfilamente an dem Einbau und der Verankerung von Ionenkanälen in der Plasmamembran beteiligt sind, wurden in Kontrollmessungen (ohne Dehnungsstimulus) die nor-

malisierten F/I-Effekte beider Experimente (Kontrolle und Cytochalasin D) untersucht (Stromspuren nicht gezeigt). Die normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) zwischen Oozyten mit intakten ($0,40 \pm 0,09$; $n = 5$; $N = 2$) und destabilisierten Aktinfilamenten ($10 \mu\text{M}$ Cytochalasin D: $0,38 \pm 0,12$; $n = 5$; $N = 2$) war nicht signifikant verschieden ($p \geq 0,05$; Abb. 46C). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Destabilisierung der Aktinfilamente keine Beeinträchtigung der hCFTR Expression und der Wiederholbarkeit der F/I-induzierten Stromstimulationen zur Folge hatte. Zusätzlich dazu war in DEPC-Oozyten, die ebenfalls 60-120 min in $10 \mu\text{M}$ Cytochalasin-inkubierten, keine Änderung des I_M durch die 110 nl Injektion sowie durch die F/I-Applikation zu beobachten ($n = 10$; $N = 3$; Abb. 46D).

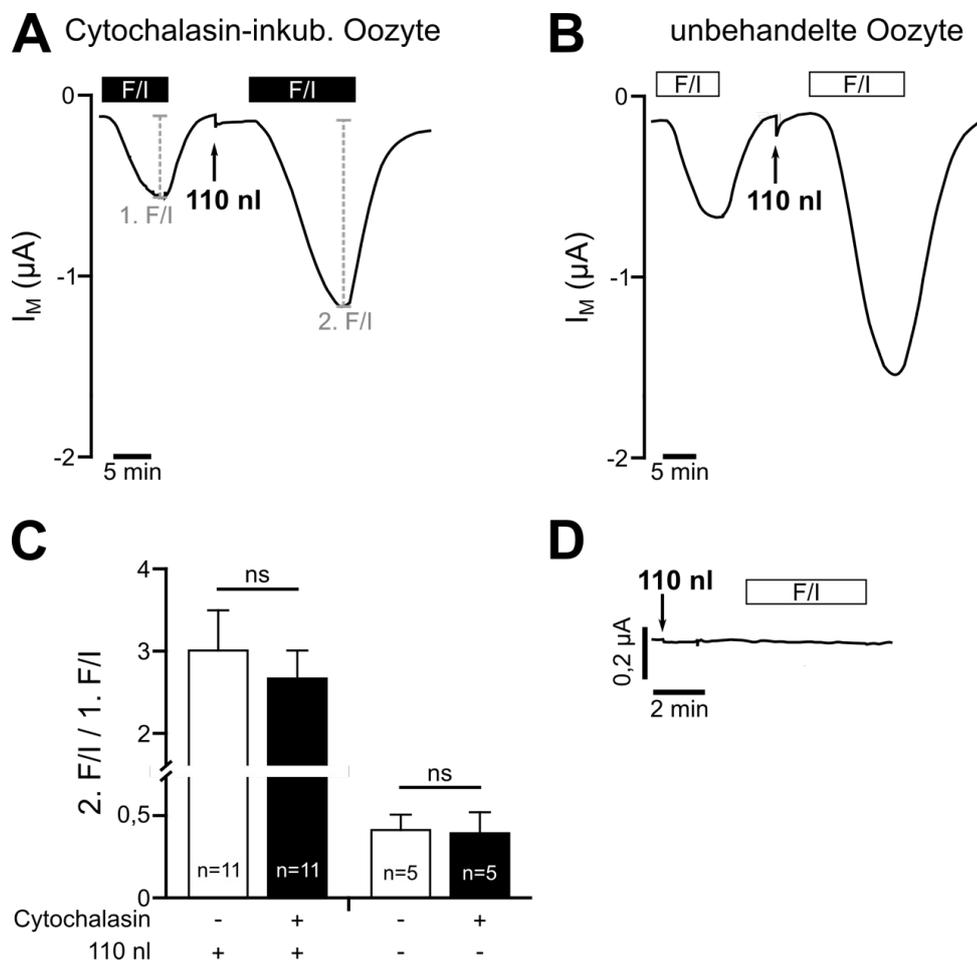


Abb. 46: Die Destabilisierung der Aktinfilamente veränderte die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität nicht.

A In Cytochalasin D ($10 \mu\text{M}$)-inkubierten und in unbehandelten Oozyten (**B**) führte die zweite Forskolin/IBMX (F/I; $5/100 \mu\text{M}$)-Applikation (2. F/I) nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) zu einer höheren I_M -Stimulation als die erste Applikation (1. F/I). **C** Die normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) der Messungen aus A und B zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten (-Cytochalasin; +110 nl) und Cytochalasin-inkubierten Oozyten (+Cytochalasin; ns: $p \geq 0,05$). Auch in Experimenten ohne Dehnungsstimulus (-110 nl) unterschieden sich die 2. F/I / 1. F/I-Werte von unbehandelten (-Cytochalasin) und Cytochalasin-inkubierten Oozyten (+Cytochalasin) nicht signifikant voneinander (ns: $p \geq 0,05$). **D** In DEPC-Oozyten mit destabilisierten Aktinfilamenten führte sowohl die 110 nl Injektion als auch die F/I-Applikation zu keiner Änderung des I_M .

Um zu gewährleisten, dass Cytochalasin in die Zelle gelangte und dort die Aktinfilamente destabilisieren konnte, wurde der Messverlauf mit einer F/I-Applikation vor (1. F/I) und nach (2. F/I) der 110 nl Injektion mit Oozyten, die entweder mit 32 nl Cytochalasin (20 μ M pro Oozyte) oder DMSO (Lösungsmittel von Cytochalasin) injiziert wurden, wiederholt. Die Ergebnisse unterschieden sich nicht zu den oben beschriebenen Messungen mit Cytochalasin-Inkubation (siehe Abb. 46). Die Analyse der normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten ($2,94 \pm 0,32$; $n = 7$; $N = 2$) und Cytochalasin-inkubierten ($2,60 \pm 0,28$; $n = 7$; $N = 2$; $p \geq 0,05$; Abb. 47) Oozyten. Diese Ergebnisse zeigten zum einen, dass es keinen Unterschied zwischen der Cytochalasin-Inkubation oder der Cytochalasin-Injektion gab. Zum Anderen wurde bestätigt, dass die Destabilisierung der Aktinfilamente keinen Einfluss auf die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität hatte.

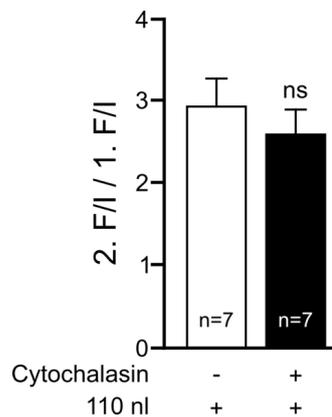


Abb. 47: Die Destabilisierung der Aktinfilamente der Oozyte hatte keine Veränderung der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität zur Folge.

Die Injektion von Cytochalasin D (20 μ M pro Oozyte) führte zu einer Destabilisierung der Aktinfilamenten. Der normalisierte F/I-Effekt (2. F/I / 1. F/I) von Cytochalasin-injizierten Oozyten (+Cytochalasin; +110 nl) unterschied sich nicht signifikant von unbehandelten Oozyten (-Cytochalasin; +110 nl; ns : $p \geq 0,05$).

Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts

Um zu überprüfen, ob die Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts an der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität beteiligt ist, wurden Experimente mit Phalloidin durchgeführt. Phalloidin bindet filamentöses Aktin (F-Aktin) und verhindert so den Umbau von F- zu G-Aktin (Cooper 1987). Des Weiteren ist bekannt, dass Phalloidin nicht gut membrangängig ist (Matthews *et al.* 1997). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit Phalloidin direkt in die Oozyten injiziert. Die Injektion von Phalloidin (40 μM pro Oozyte) erfolgte 60-120 min vor den TEVC-Messungen (Abb. 48A). Als Kontrolle dienten Oozyten, die mit dem identischen Volumen (32 nl) von ddH₂O (Lösungsmittel von Phalloidin) injiziert wurden (Abb. 48B). Die F/I-induzierte Stromstimulation wurde vor (1. F/I) und nach (2. F/I) dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) ermittelt. Der normalisierte F/I-Effekt (2. F/I / 1. F/I) von Phalloidin-behandelten Oozyten ($0,27 \pm 0,10$; n = 11; N = 3) war signifikant kleiner im Vergleich zu unbehandelten Oozyten ($2,54 \pm 0,41$; n = 11; N = 3; $p \leq 0,01$; Abb. 48C). Dies bedeutete, dass eine Stabilisierung der Aktinfilamente die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität reduzierte. In Experimenten ohne Dehnungsstimulus (Stromspuren nicht gezeigt) unterschieden sich die normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) von Phalloidin- ($0,47 \pm 0,08$; n = 5; N = 2) und ddH₂O-injizierten Oozyten ($0,40 \pm 0,09$; n = 5; N = 2) ohne Dehnungsstimulus nicht signifikant voneinander ($p \geq 0,05$; Abb. 48D), sodass Phalloidin keine Auswirkungen auf die Wiederholbarkeit der F/I-Effekte hatte. Des Weiteren zeigten DEPC-Oozyten, die mit Phalloidin injiziert wurden, keine Änderungen des I_M in Folge des Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) und der F/I-Applikation (Abb. 48D).

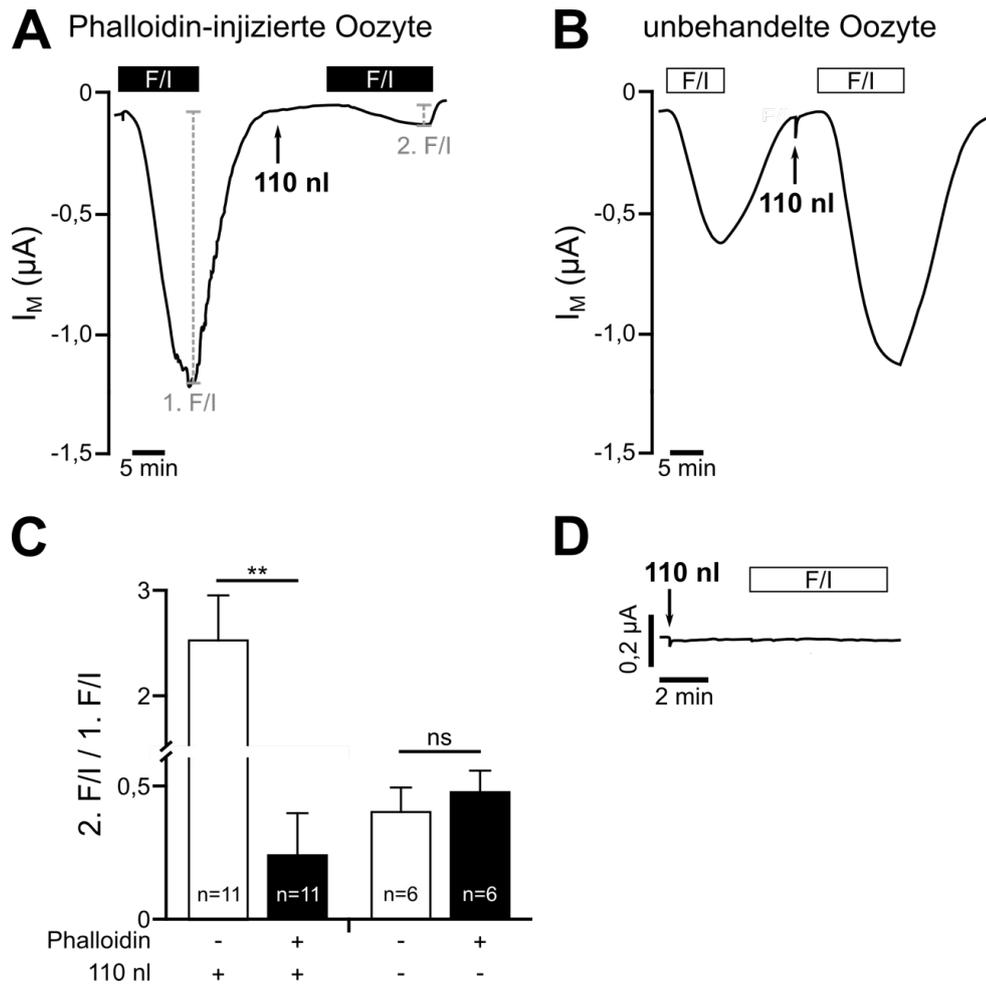


Abb. 48: Die Stabilisierung der Aktinfilamente durch Phalloidin verringerte die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität in *Xenopus* Oozyten.

A Bei Phalloidin-injizierten Oozyten (40 μM) war die zweite Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μM)-induzierte Stromstimulation (2. F/I) nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion; 2. F/I) kleiner als der erste F/I-Effekt (1. F/I). **B** Im Gegensatz dazu war der 2. F/I bei unbehandelten Oozyten höher als der 1. F/I. **C** Anhand der statistischen Analyse der Experimente aus **A** und **B** waren die normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) von Oozyten mit stabilisierten Aktinfilamenten (+Phalloidin; +110 nl) signifikant verringert gegenüber Oozyten mit intaktem Aktin-Zytoskelett (-Phalloidin; +110 nl; **: $p \leq 0,01$). Es gab keinen Unterschied in der F/I-Antwort bei den beiden Oozyten-Behandlungen (-Phalloidin und +Phalloidin) ohne den Dehnungsstimulus (-110 nl; ns: $p \geq 0,05$). **D** Bei DEPC-Oozyten mit stabilisierten Aktinfilamenten wurde keine Änderung des I_M durch Injektion oder F/I-Applikation sichtbar.

Korrelation zwischen Zellvolumen und hCFTR Aktivität bei Oozyten mit veränderten Aktinfilamenten

Nachfolgend wurde das Zellschwellungspotential von Oozyten mit intakten und veränderten Aktin-Zytoskelett bestimmt und in Relation zu den normalisierten F/I-Effekten (2. F/I / 1. F/I) aus den TEVC-Experimenten gesetzt (Abb. 49). Durch die Injektion von 110 nl intrazellulär analoger Lösung stieg das Zellvolumen von unbehandelten Oozyten um $9,9 \pm 1,5\%$ an ($n = 10$). Die Erhöhung des Zellvolumens bei Cytochalasin D-behandelten Oozyten ($6,0 \pm 1,5\%$; $n = 8$) war etwas, aber nicht signifikant verringert gegenüber Kontroll-Oozyten ($p \geq 0,05$). Da die Zellschwellungsfähigkeit beider Oozytenbehandlungen identisch war, könnte dies auch eine Erklärung für die nicht signifikant verschiedenen 2. F/I / 1. F/I-Werte der Kontrolle ($2,98 \pm 0,49$) und Cytochalasin D-behandelten Oozyten ($2,62 \pm 0,36$; $p \geq 0,05$) sein. In TEVC-Experimenten wurde beim Anstechen der Phalloidin-injizierten Oozyten bemerkt, dass diese fester und steifer gegenüber den unbehandelten Oozyten waren. Diese Tatsache könnte sowohl eine Erklärung für die signifikant geringere Volumenzunahme ($2,9 \pm 1,3\%$; $n = 8$; $p \leq 0,01$) als auch für die signifikant reduzierte Dehnungswahrnehmung (2. F/I / 1. F/I: $0,27 \pm 0,10$; $p \leq 0,01$) dieser Oozyten sein. Anhand dieser Ergebnisse ließ sich daher ein Zusammenhang zwischen Volumenzunahme und Dehnungs-induzierter Aktivität des hCFTR bei Oozyten mit veränderten Aktin-Zytoskelett feststellen.

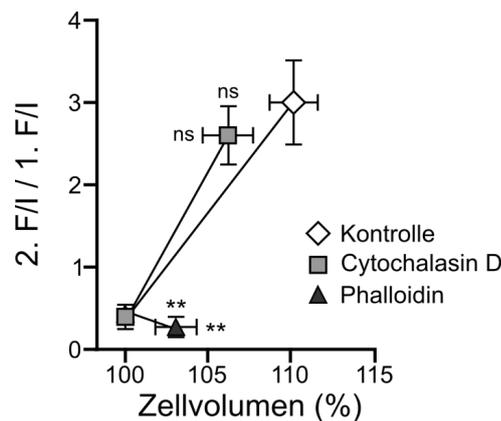


Abb. 49: Bei Oozyten mit veränderten Aktinfilamenten korrelierte die Volumenzunahme mit der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität.

Bei Oozyten mit destabilisierten Aktinfilamenten (graues Quadrat; Cytochalasin D) unterschied sich sowohl die Volumenzunahme als auch die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität (2. F/I / 1. F/I) nicht signifikant von Kontroll-Oozyten (weiße Raute; ns: $p \geq 0,05$). Im Gegensatz dazu war bei Oozyten mit stabilisierten Aktinfilamenten (schwarzes Dreieck; Phalloidin) das Zellvolumen und der 2. F/I / 1. F/I-Wert signifikant verringert gegenüber unbehandelten Kontroll-Oozyten (**: $p \leq 0,01$).

Die Δ TRL hCFTR Mutante

Der C-Terminus des hCFTR bildet eine Verknüpfungsstelle zwischen CFTR-Kanal und Aktinfilamenten (Short *et al.* 1998; Edelman 2014). Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden in dieser Arbeit die letzten drei C-terminalen Aminosäuren des hCFTR-Proteins deletiert (Δ TRL hCFTR; siehe Material und Methoden 2.5.2). Diese Δ TRL hCFTR Mutante wurde heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert und in TEVC-Experimenten auf ihre Dehnungswahrnehmung untersucht. In Kontrollexperimenten (ohne Dehnungsstimulus) wurden die Δ TRL hCFTR-exprimierenden Oozyten zweimal mit F/I (5/100 μ M) stimuliert (Abb. 50A). Hierbei war der zweite F/I-induzierte Effekt (2. F/I) kleiner als der erste Effekt (1. F/I), was sich einen normalisierten F/I-Effekt von $0,41 \pm 0,10$ ($n = 10$; $N = 4$) ergab. In parallel durchgeführten Experimenten mit dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion; Abb. 50B) war der 2. F/I größer als der 1. F/I (2. F/I / 1. F/I : $2,23 \pm 0,29$; $n = 10$; $N = 4$). Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die Δ TRL hCFTR Mutante Dehnungs-sensitiv war.

Identische Experimente wurden mit dem WT hCFTR durchgeführt (Stromspuren nicht gezeigt), um eine mögliche Veränderung der Dehnungswahrnehmung des Δ TRL hCFTR zu ermitteln. Für die statistische Analyse wurden die 2. F/I / 1. F/I-Werte der Δ TRL hCFTR Mutante und des WT hCFTR miteinander verglichen (Abb. 50C). Der 2. F/I / 1. F/I-Wert des Δ TRL hCFTR mit Dehnungsstimulus war signifikant kleiner im Vergleich zum WT hCFTR ($3,61 \pm 0,45$; $n = 11$; $N = 4$; $p \leq 0,01$). Darüber hinaus unterschied sich der 2. F/I / 1. F/I ohne Dehnungsstimulus der Δ TRL hCFTR Mutante nicht signifikant von dem des WT hCFTR ($0,59 \pm 0,03$; $n = 6$; $N = 1$; $p \geq 0,05$). Diese Ergebnisse zeigten, dass bei der Δ TRL hCFTR Mutante eine verringerte Dehnungswahrnehmung zu beobachten war. Dies weist darauf hin, dass die C-terminale Verbindung des hCFTR für die Perzeption der Dehnung wichtig ist.

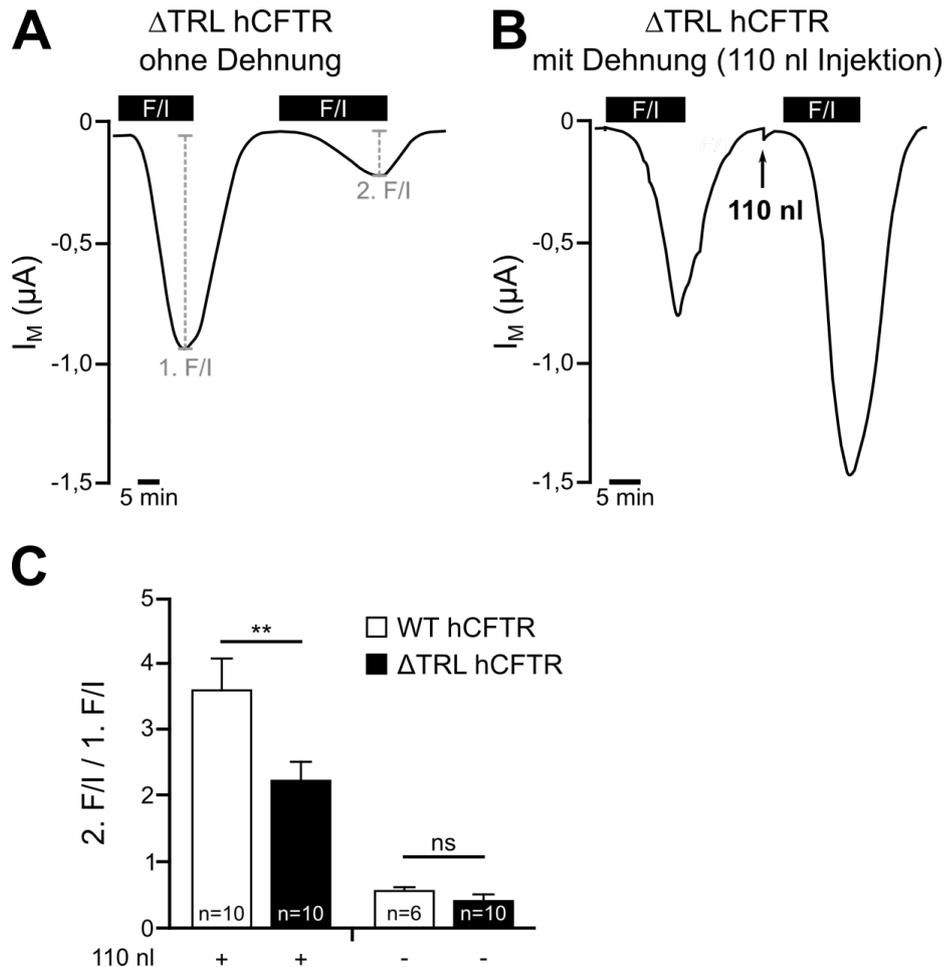


Abb. 50: Die Deletion der C-terminalen TRL-Sequenz des hCFTR führte zu einer Reduzierung der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität.

A Bei der Δ TRL hCFTR Mutante führte die wiederholte Applikation von Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μ M) zu einer kleineren zweiten Stromstimulation (2. F/I) gegenüber dem 1. F/I-Effekt (1. F/I). **B** Demgegenüber war der 2. F/I nach dem Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) größer als der 1. F/I. **C** In der statistischen Analyse wurden die normalisierten F/I-Effekte (2. F/I / 1. F/I) der Δ TRL hCFTR Mutante (schwarze Balken) mit (+110 nl) und ohne Dehnungsstimulus (-110 nl) mit den Werten von parallel durchgeführten WT hCFTR Experimenten (weiße Balken; Stromspuren nicht gezeigt) verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen WT und Δ TRL hCFTR mit Dehnungsstimulus (**: $p \leq 0,01$). Allerdings waren die 2. F/I / 1. F/I-Effekte zwischen WT und Δ TRL hCFTR ohne Dehnungsstimulus (-110 nl) nicht signifikant verschieden (ns: $p \geq 0,05$).

In weiteren Experimenten wurde der Effekt des Dehnungsstimulus auf den vorstimulierten Δ TRL hCFTR untersucht. Zu Beginn der Messung wurde F/I (5/100 μ M) appliziert, wodurch der I_M um 427 ± 56 nA anstieg ($\Delta I_{F/I}$; $n = 9$; $N = 3$; Abb. 51B). Die anschließende Applikation des Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) führte zu einer zusätzlichen transienten Stromstimulation ($\Delta I_{F/I+Injekt}$: 1588 ± 189 nA; $p \leq 0,01$). Der identische Versuchsablauf wurde an WT hCFTR-exprimierenden Oozyten wiederholt ($\Delta I_{F/I}$: 422 ± 104 nA; $\Delta I_{F/I+Injekt}$: 2556 ± 389 nA; $n = 9$; $N = 3$; Abb. 51A) und auch hier wurde ein zusätzlicher Effekt des Dehnungsstimulus auf den vorstimulierten hCFTR beobachtet. Der Vergleich der

$\Delta I_{F/I+Injekt}$)-Werte zeigte einen signifikant kleineren Wert bei der Δ TRL hCFTR Mutante ($p \leq 0,05$; Abb. 51C).

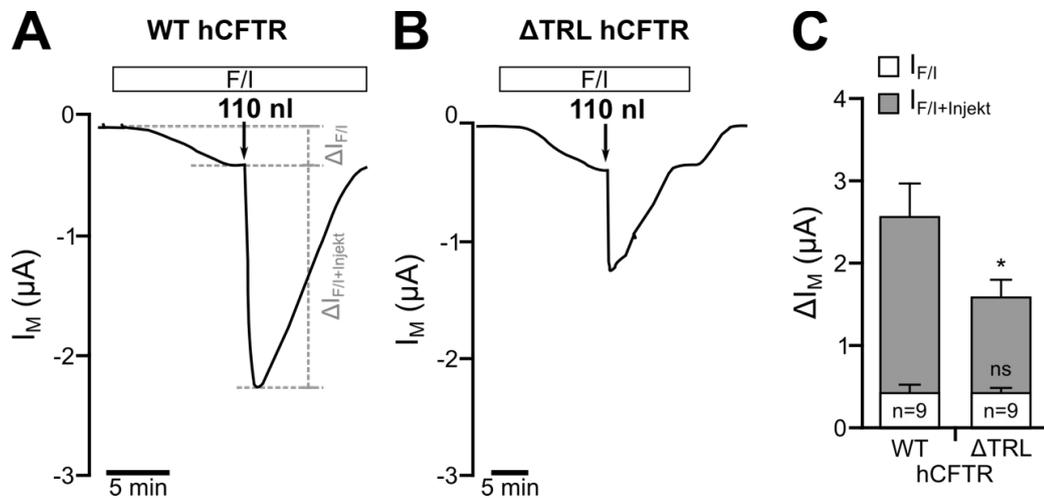


Abb. 51: Der Effekt des Dehnungsstimulus auf den vorstimulierten Δ TRL hCFTR war im Vergleich zum Wildtyp hCFTR verringert.

A Der Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) führte bei Wildtyp (WT) hCFTR-exprimierenden Oozyten nach Vorstimulation mit Forskolin/IBMX (F/I; 5/100 μ M; $\Delta I_{F/I}$) zu einer zusätzlichen Stromstimulation ($\Delta I_{F/I+Injekt}$). **B** Bei Δ TRL hCFTR Oozyten induzierte die 110 nl Injektion ebenso einen zusätzlichen Effekt auf den vorstimulierten hCFTR. **C** Der $\Delta I_{F/I+Injekt}$ -Effekt des WT hCFTR war im Vergleich zum Δ TRL hCFTR signifikant erhöht (*: $p \leq 0,05$), wobei sich die $\Delta I_{F/I}$ -Werte nicht signifikant voneinander unterschieden (ns: $p \geq 0,05$).

Zusammengenommen zeigten diese Experimente, dass die Δ TRL hCFTR Mutante Dehnungs-sensitiv war. Allerdings war die Dehnungswahrnehmung im Vergleich zum WT hCFTR signifikant verringert. Daher kann geschlussfolgert werden, dass die C-terminale TRL Aminosäuresequenz und deren Verbindung zu Zytoskelettelementen wichtig für die Dehnungs-induzierte Aktivität des hCFTR ist.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine Dehnungs-induzierte Aktivität des CFTR sowohl im *in vitro* Modell der *Xenopus* Oozyten als auch im nativen pulmonalen Epithel von *Xenopus* gezeigt werden. Zudem konnte eine Beteiligung der Membranfluidität und des Zytoskeletts als zugrunde liegende Mechanismen für eine Dehnungs-sensitive Aktivität des hCFTR in *Xenopus* Oozyten nachgewiesen werden. Besonders die C-terminale Verbindung zwischen dem hCFTR und den Aktin-Zytoskeletts scheint für die Mechanosensitivität des hCFTR essentiell zu sein.

4. Diskussion

Der CFTR mit seiner Funktion als Anionenkanal spielt eine wesentliche Rolle bei der Elektrolyt- und Flüssigkeitshomöostase in der Lunge (Li und Naren 2010). Im Zuge der Atembewegungen ist der CFTR in den pulmonalen Epithelzellen mechanischen Kräften, wie Dehnung und SK, ausgesetzt (Wirtz und Dobbs 2000). In einer Studie aus dem Jahr 2010 wurde die Dehnung der Membran als ein adäquater Stimulus für die Regulation der CFTR Aktivität beschrieben (Zhang *et al.* 2010). Basierend auf den Hinweisen einer mechanosensitiven Aktivierung des CFTR, wurde in der vorliegenden Arbeit die Dehnungs- und SK-vermittelte Aktivierung des humanen CFTR untersucht. Des Weiteren wurde die Dehnungs-induzierte CFTR-Aktivierung in einem nativen pulmonalen Epithel verifiziert. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der zugrunde liegenden Mechanismen der Dehnungs-induzierten CFTR Aktivierung. Um diese Fragestellungen zu bearbeiten wurden zwei unterschiedliche Untersuchungssysteme verwendet: 1) das Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten und 2) das native Lungenepithel von *Xenopus*. Zu Beginn dieser Diskussion wird die Eignung der Oozyten als Expressionsmodell bzw. der Lunge für alveolare Ionentransportprozesse erläutert. Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Arbeit in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext eingeordnet.

4.1 *Xenopus* als Modellorganismus?

Für die Lösung fundamentaler Fragen innerhalb der Medizin und Biologie besteht die Notwendigkeit von Modellorganismen, wie beispielsweise des Afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*.

4.1.1 Die *Xenopus* Oozyten als Expressionssystem

Die Grundlage für die Verwendung von *Xenopus* Oozyten als Expressionsmodell stellt die Pionierarbeit von Gurdon und Kollegen aus dem Jahr 1971 dar (Gurdon *et al.* 1971). Seither werden die Oozyten als heterologes Expressionssystem für bakterielle, pflanzliche und tierische Proteine eingesetzt (Gurdon und Wickens 1983; Sigel und Minier 2005). *Xenopus* Oozyten bieten den Vorteil, dass sie ganzjährig verfügbar sind. Allerdings sind saisonale Schwankungen der Oozyten-Qualität zu beobachten (Lafaire und Schwarz 1986), die mit einer hohen biologische Variabilität der bioelektrischen Parameter verbunden ist (Stuhmer 1992; Weber

1999b; Sobczak *et al.* 2010). Die Kultivierung der Oozyten ist relativ anspruchslos und bedarf keiner sterilen Zellkultur. Aufgrund des großen Durchmessers (1,0 - 1,3 mm; Dumont 1972) sind die Oozyten experimentell gut zugänglich. *Xenopus* Oozyten sind mit allen wichtigen Faktoren für Wachstum und Proteintranslation ausgestattet und somit unabhängig von ihrer Umgebung. Darüber hinaus ermöglicht die große Anzahl an Ribosomen eine hohe translationale Kapazität, was die Synthese von Proteinen aus fremder RNA ermöglicht (Sigel und Minier 2005). Des Weiteren bieten Oozyten den Vorteil der geringen Anzahl endogener Ionenkanäle und anderer Transportmechanismen (Weber 1999b), was für elektrophysiologische Untersuchungen von Ionenkanälen optimal ist (Wagner *et al.* 2000).

4.1.2 Die *Xenopus* Lunge als Modell für alveolare Ionentransportprozesse

Die *Xenopus* Lunge ist einfach und sackförmig aufgebaut (Meban 1973; Hyatt *et al.* 2007) und im Anschluss an die flächige Präparation (siehe Abb. 4) ist diese optimal geeignet für funktionelle Untersuchungen des pulmonalen Ionentransports in der Ussing-Kammer. Diese Art Untersuchung kann mit einer Säugerlunge nicht durchgeführt werden, da der komplexe Aufbau und die starke Verzweigung eine flächige Präparation verhindern (Fronius 2012). Daher beschränken sich die meisten Studien zu elektrophysiologischen Untersuchungen des pulmonalen Ionentransports bei Säugern auf die oberen Atemwege (Trachea bis zu den Bronchiolen; Tsang *et al.* 1993; Hollenhorst *et al.* 2012). Eine Alternative bietet die Kultivierung von isolierten Alveolarzellen. Dies hat allerdings den Nachteil, dass sich die Kultivierungsbedingungen auf die Expression von Transportproteinen auswirken können (Jain *et al.* 2001; Fronius 2012). Demgegenüber, verbleiben die Zellen innerhalb der *Xenopus* Lunge in ihrer natürlichen Umgebung und die ursprünglichen Zell-Zell-Verbindungen bleiben erhalten. Darüber hinaus besitzt die *Xenopus* Lunge sowohl morphologische als auch funktionelle Ähnlichkeiten mit dem Alveolarepithel von Säugetieren. Der Aufbau der Blut-Luft-Schranke mit ihrem Drei-Schichten-Design (*three-ply design*) bestehend aus Alveolarepithel, Basallamina und Endothel der Blutgefäße, stellt eine Gemeinsamkeit dar (Meban 1973). Im Gegensatz zu den Alveolarepithel der Säuger findet man in der *Xenopus* Lunge lediglich einen Zelltyp, die Pneumozyten (Meban 1973). Diese vereinen morphologische und funktionelle Eigenschaften der ATI und ATII Zellen (Meban 1973; Fischer *et al.* 1989). Des Weiteren zählt die *Xenopus* Lunge zu den Na⁺ resorbierenden Epithelien, mit dem apikal lokalisierten ENaC und der basolateralen Na⁺/K⁺ ATPase (Fischer *et al.* 1989; Kim 1990; Erb und Althaus 2014). Darüber hinaus wurden verschiedene K⁺ Kanäle sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen

ralen Membran der *Xenopus* Pneumozyten nachgewiesen (Illek *et al.* 1990; Richter *et al.* 2014; Richter 2014). Zusätzlich dazu verfügt die *Xenopus* Lunge auch über verschiedene Cl^- -leitende Transportmechanismen, einschließlich NKCC und $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Anionenaustauscher (Berger *et al.* 2010). Zudem wurde sowohl der immunhistochemische als auch der funktionelle Nachweis für die Expression des CFTR in der apikalen Membran erbracht (Sommer *et al.* 2007). Zusammengefasst stellt die *Xenopus* Lunge ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchungen pulmonaler Ionentransportprozesse in der modifizierten Ussing-Kammer dar.

4.2 Der Einfluss von SK auf die Aktivität des humanen CFTR

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss von SK auf die Aktivität des hCFTR untersucht. SK entsteht durch das Vorbeiströmen der Luft beim Ein- und Ausatmen und ist der hauptsächliche mechanische Stimulus in den luftleitenden Atemwegen (Fronius 2012). Die Erhöhung der Perfusionsgeschwindigkeit ist bereits eine etablierte Strategie, um experimentell SK zu erzeugen und somit heterolog exprimierte Ionenkanäle, z. B. den ENaC, mechanisch zu aktivieren (Carattino *et al.* 2004; Althaus *et al.* 2007; Fronius *et al.* 2010). Die SK in Höhe von $1,3 \text{ dyn/cm}^2$ ist physiologisch relevant, da diese während der Ruheatmung bei Menschen auftritt (Tarran *et al.* 2006). In den hier durchgeführten Experimenten wurde die hCFTR Aktivität nicht durch die Applikation von SK beeinflusst. Es war weder eine direkte Stromstimulation in Folge der SK-Applikation zu beobachten (siehe Abb. 11) noch unterschieden sich die F/I-induzierten Stromstimulationen mit und ohne SK-Applikation voneinander (siehe Abb. 12). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass SK nicht der adäquate mechanische Stimulus für die Regulation der hCFTR Aktivität ist. Es wird vermutet, dass große extrazelluläre Domänen der Ionenkanäle für die SK-Wahrnehmung benötigt werden. Diese Hypothese wurde bereits für den SK-sensitiven ENaC formuliert (Fronius und Clauss 2008; Shi *et al.* 2013) und die jüngsten Ergebnisse aus dem Institut für Tierphysiologie belegen diese Hypothese (Knöpp 2014). Mit Hilfe des Online-Tools UniProt wurde eine topologische Analyse des hCFTR Proteins durchgeführt (<http://www.uniprot.org/uniprot/P13569>). Hiermit wurde ersichtlich, dass die sechs extrazellulären Matrizen des hCFTR aus 59 Aminosäuren zusammengesetzt sind und somit lediglich 4% des Gesamtproteins (1480 Aminosäuren) einnehmen. Dies könnte daher eine Erklärung für das Fehlen der SK-Sensitivität des hCFTR sein.

4.3 Zellvolumenregulation und CFTR

Für alle Zellen ist es essentiell ihr Volumen zu regulieren, um unterschiedlichen osmotischen Herausforderungen (Zellschrumpfung oder -schwellung) während des Wachstums, der Teilung und der Migration, entgegenzuwirken (Voss *et al.* 2014). Die Zellvolumenregulation erfordert Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentration, denn dadurch wird ein osmotischer Gradient angetrieben, der für den Wassertransport unabdingbar ist (Pasantés-Morales *et al.* 2006; Hoffmann *et al.* 2009). Um den Einfluss der Zellschrumpfung auf die Aktivität des hCFTR zu untersuchen, wurden hCFTR-exprimierende Oozyten in hyper-osmotischer Lösung inkubiert. Dadurch verringerte sich das Oozytenvolumen innerhalb von 20 min um bis zu $13,6 \pm 1,5\%$ (siehe Abb. 14). Diese Zellschrumpfung hatte allerdings keinerlei Auswirkungen auf die hCFTR Aktivität (siehe Abb. 13). Hier kann daher geschlossen werden, dass die durch die Zellschrumpfung vermittelte Kompressionskraft (Andres und Gopfert 2014; Prager-Khoutorsky *et al.* 2014) nicht der adäquate mechanische Stimulus für die hCFTR Aktivierung ist. In Studien mit hyper-osmotischen geschrumpften *Xenopus* Oozyten wurde gezeigt, dass durch die hypertone Behandlung der Einstrom von Ionen aktiviert wird (Saitou *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2000), um mit dem damit verbundenen Wassereinstrom der Zellschrumpfung entgegenzuwirken. Diesen Prozess bezeichnet man als regulatorische Volumenerhöhung (*regulatory volume increase*: RVI) und wird vermittelt über Na^+/H^+ Austauscher, NKCC Co-Transporter und über Na^+ Kanäle (Hoffmann *et al.* 2009), die auch endogen in der *Xenopus* Oozyte vorkommen (Weber 1999a; Guizouarn *et al.* 2004). Eine Aktivierung des CFTR, die mit der Sekretion von Cl^- und folglich Wasser verbunden ist, wäre daher kontraproduktiv für die RVI. Somit fügen sich die ermittelten Daten dieser Arbeit, dass die hCFTR Aktivität nicht durch die hypertone Behandlung verändert wird, gut in diesen Kontext ein.

Bei dem entgegengesetzten Prozess, der regulatorischen Volumenverringern (*regulatory volume decrease*: RVD), werden intrazelluläre K^+ und Cl^- Ionen und folglich Wasser sekretiert (Hoffmann *et al.* 2009). Obwohl die Volumenregulation in den vergangenen Jahren intensiv erforscht wurde, konnten die beteiligten Cl^- -Kanäle noch nicht identifiziert werden (Furst *et al.* 2002; Sardini *et al.* 2003; Hoffmann *et al.* 2014). Erste Hinweise für eine Beteiligung des CFTR an der Zellvolumenregulation konnten allerdings bereits erbracht werden. Mehrere Studien zeigten, dass das Fehlen des CFTR in murinen Darmkrypten (Valverde *et al.* 1995) und Nephronen (Barriere *et al.* 2003) sowie in humanen Trachealzellen (Vazquez *et al.* 2001) die RVD infolge einer hypotonischen Behandlung negativ beeinträchtigen. Ein zusätzlicher Punkt ist, dass Hypotonizität immer auch eine mechanische Kraft generiert, die wieder-

rum in einer Dehnung der Zellmembran resultiert (Bryan-Sisneros *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2010). Bisher gibt es lediglich eine Studie, die erste Hinweise darauf liefert, dass der CFTR ein mechanosensitiver Ionenkanal sein könnte (Zhang *et al.* 2010). Um den Einfluss der Zellvolumenerhöhung auf die Aktivität des hCFTR zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit hCFTR-exprimierende Oozyten in hypo-osmotischer Lösung inkubiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die osmotische Zellschwellung eine Erhöhung des Oozytenvolumens bei Oozyten mit Vitellinhülle ($7,5 \pm 1,8\%$; siehe Abb. 17) und bei devitellinisierten Oozyten ($14,9 \pm 2,7\%$; siehe Abb. 18) auslöste. Die Schwellungsfähigkeit bei devitellinisierten Oozyten war somit höher als bei intakten Oozyten mit Vitellinhülle. Die Vitellinhülle gilt als Bestandteil der Extrazellulären Matrix der Oozyten, ist somit für die Formgebung der Zelle verantwortlich (Hedrick und Nishihara 1991) und limitierte die Schwellungsfähigkeit von *Xenopus* Oozyten in dieser Arbeit. Durch die osmotische Erhöhung des Oozytenvolumens wurde die F/I-induzierte hCFTR Aktivität, von Oozyten mit (siehe Abb. 16) und ohne Vitellinhülle (siehe Abb. 19), erhöht. Daher gilt die Membrandehnung, die durch die Zellschwellung vermittelt wird, als ein adäquater mechanischer Stimulus für die hCFTR Aktivierung. Somit deuten diese Ergebnisse auf eine Beteiligung des CFTR an der RVD hin. Des Weiteren fügen sich die Ergebnisse dieser Arbeit in den wissenschaftlichen Kontext ein, denn eine mechanische Regulation der CFTR Aktivität könnte durchaus denkbar sein. Für die Embryonalentwicklung der Säugerylunge ist eine Cl^- -vermittelte Flüssigkeitssekretion essentiell (Olver *et al.* 2004). Die Cl^- Sekretion *in utero* generiert einen osmotischen Druck, der die Lunge dehnt und somit die Lungenentwicklung stimuliert (Olver *et al.* 2004). Dies könnte auf einer Beteiligung des CFTR hindeuten und ferner darauf, dass mechanische Kräfte eine Rolle bei der Regulation der CFTR Aktivität und folglich bei der Cl^- Sekretion während der Lungenentwicklung. Diese Vermutung wird durch mehrere Studien unterstützt, die bei einer fehlenden oder abnormalen CFTR Aktivität eine Störung der Lungendifferenzierung und –entwicklung nachweisen konnten (Ornoy *et al.* 1987; Long *et al.* 2004; Larson und Cohen 2005). Da es Hinweise darauf gibt, dass die ordnungsgemäße Lungenentwicklung und –funktion sowohl auf mechanischen Stimuli als auch auf der Aktivität des CFTR beruhen (Ornoy *et al.* 1987; Long *et al.* 2004; Olver *et al.* 2004; Larson und Cohen 2005), kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der CFTR an der Vermittlung von mechanischen Kräften beteiligt ist und die mechanosensitive Regulation essentiell für eine normale Lungenfunktion ist. Innerhalb dieser Arbeit wurde der Einfluss von Membrandehnung auf die Aktivität des hCFTR im *in vitro* Modell der *Xenopus* Oozyten und im nativen Epithel der *Xenopus* Lunge untersucht. Die im

Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse zur Dehnungs-induzierten hCFTR Regulation sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.4 Membrandehnung reguliert die Aktivität des CFTR *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Dehnungs-induzierte Aktivierung des CFTR Cl⁻ Kanals im *Xenopus* Oozyten *in vitro* Model nachgewiesen. Für die Applikation von Dehnung bei hCFTR-exprimierenden Oozyten wurde, neben der osmotischen Zellschwellung, noch eine weitere Methode gewählt: die Injektion verschiedener Volumina einer intrazellulär analogen Lösung. Auch durch diese Vorgehensweisen wurde das Volumen der Oozyten erhöht und diese Volumenerhöhung korrelierte mit der hCFTR Aktivität (siehe Abb. 21). Dies steht daher im Einklang mit den osmotischen Schwellungsexperimenten dieser Arbeit. Beide Strategien zur Volumenerhöhung – osmotisch oder durch Injektion – erhöhten die hCFTR Aktivität. In diesen Oozyten-Experimenten gab es jedoch keine direkte hCFTR-vermittelte Stromstimulation in Folge der Volumenerhöhung bzw. des Dehnungsstimulus. Es war aber zu beobachten, dass die Injektion der intrazellulären Lösung eine schnelle, transiente Stromstimulation bei hCFTR-exprimierenden Oozyten und bei DEPC-Oozyten induzierte (siehe Abb. 20). Dieser Effekt wurde bereits in anderen Studien untersucht (Bryan-Sisneros *et al.* 2003; Hamill 2006) und lässt sich endogenen Dehnungs-aktivierten Kationenkanälen zuschreiben (*stretch-activated cation channels*: SACs; Weber 1999b). Die Injektions-vermittelte Volumenerhöhung der Oozyten war reversibel und blieb lediglich über einen Zeitraum von 15 min stabil (siehe Abb. 22) Dies ist auf den Prozess der RVD zurückzuführen, wodurch der Zellschwellung entgegengewirkt wird. Sowohl bei der osmotischen (siehe Abb. 16 und Abb. 19) als auch der Injektions-induzierten Membrandehnung (siehe Abb. 20 und Abb. 23) wurde eine erhöhte Stromantwort durch die Applikation von Forskolin und IBMX (F/I) beobachtet. Demgegenüber zeigten die Experimente, in denen der hCFTR durch F/I vorstimuliert wurde, eine unmittelbare Stromstimulation infolge der Membrandehnung (siehe Abb. 24). Dies deutet daraufhin, dass der hCFTR eine gewisse Grundaktivität benötigt, um auf den Dehnungsstimulus zu reagieren. Die Grundaktivität könnte auf einer Bindung/Hydrolyse von ATP (Gout 2012) oder auf einem bestimmten Phosphorylierungslevel (Dahan *et al.* 2001) beruhen, die durch die Applikation von F/I in Oozyten induziert wird. Eine Studie an humanen Atemwegsepithelzellen (Calu-3-Zellen) zeigte eine erhöhte CFTR Aktivität in Folge eines Dehnungsreizes (Zhang *et al.* 2010). In *patch-clamp* Experimenten im *inside-out* Modus wurde der CFTR durch Unterdruck aktiviert und beruhend auf diesen Beobachtungen formulierten die Autoren

die These, dass für eine mechanosensitive Aktivierung des CFTR keine zytosolischen Faktoren, wie ATP oder Proteinkinasen, benötigt werden (Zhang *et al.* 2010). Es gilt allerdings zu bedenken, dass weder in den Experimenten von Zhang und Kollegen noch in den hier durchgeführten Experimenten der Phosphorylierungszustand des CFTR bekannt war. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit war in den TEVC-Experimenten keine Grundaktivität des hCFTR vor dem Dehnungsreiz zu verzeichnen (siehe Abb. 16; Abb. 19; Abb. 20 und Abb. 23). Im Gegensatz dazu konnte in der Studie von Zhang *et al.* eine CFTR-Grundaktivität bereits vor der Dehnungs-Applikation beobachtet werden konnte (Zhang *et al.* 2010), was für einen phosphorylierten CFTR in dem *inside-out* Membranleck sprechen würde. In Übereinstimmung mit den Experimenten dieser Arbeit, beobachteten Zhang und Kollegen ebenfalls eine erhöhte Dehnungs-induzierte CFTR-Antwort in Anwesenheit von cAMP-stimulierenden Substanzen (Zhang *et al.* 2010). Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass der hCFTR nicht direkt durch Membrandehnung aktiviert werden kann, wenn dieser nicht vorstimuliert ist. Wurde aber eine gewisse Grundaktivität mit F/I erzeugt, wird aus dem hCFTR ein mechanosensitiver Ionenkanal.

4.5 Die Dehnung des pulmonalen Epithels von *Xenopus* durch hydrostatischen Druck aktiviert den CFTR

Die Dehnung-induzierte CFTR Aktivierung wird auch gestützt von den Ussing-Kammer-Experimenten mit dem nativen Lungenepithel von *Xenopus*. In diesen Experimenten wurde der Dehnungsstimulus durch die Applikation von HD induziert. Frühere Studien am Institut für Tierphysiologie zeigten, dass die apikale Applikation von HD in einem Abfall des transepithelialen Strom resultierte, die auf eine Aktivierung verschiedener Ionenleitfähigkeiten zurückzuführen war (Bogdan *et al.* 2008; Richter *et al.* 2014). In Gegenwart des CFTR Blockers GlyH-101 (Muanprasat *et al.* 2004) war der HD-induzierte Stromabfall vergrößert (siehe Abb. 37), was auf eine HD-induzierte CFTR-Aktivierung hindeutet. Zudem konnte eine Grundaktivität des CFTR in den *Xenopus* Lungenpräparaten gezeigt werden, da die Applikation von GlyH-101 zu einem leichten Stromabfall führte (siehe Abb. 37). Diese Ergebnisse unterstützen daher die Vermutung, dass eine CFTR-Grundaktivität benötigt wird, um die CFTR-Aktivität durch den Dehnungsstimulus zu erhöhen. Die apikale Applikation von HD mit einer Flüssigkeitssäule von 5 cm bzw. 10 cm repräsentieren physiologisch relevante Größenordnungen (Fredberg und Kamm 2006; Fronius 2012). In der Studie von Zhang *et al.* wurde eine erhöhte CFTR-Aktivität mit 5 mmHg in Calu-3-Zellen beobachtet (Zhang *et al.*

2010). Dieser Wert entspricht ca. 7 cm Flüssigkeitssäule und deckt sich daher mit den Werten dieser Studie. Um zu prüfen, ob die Dehnung des Lungenepithels von *Xenopus* etwaige Schädigungen des Gewebes induziert, wurde während der Ussing-Kammer-Experimente der transepitheliale Widerstand (R_T) bestimmt. Weder die Applikation von 5 cm noch 10 cm Flüssigkeitssäule hatte einen Einfluss auf den R_T (siehe Abb. 34). Daher kann man schlussfolgern, dass die hier verwendeten mechanischen Stimuli (5 cm und 10 cm Flüssigkeitssäule) die Integrität des nativen pulmonalen Epithels von *Xenopus* nicht veränderten. Diese Daten sind im Einklang mit einer früheren Studie, in der die Applikation von HD (5 cm) ebenfalls keine Änderungen des R_T zur Folge hatte (Richter 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine mechanosensitive Regulation der CFTR Aktivität. Neben der Vermutung, dass die mechanosensitive CFTR Aktivität an der Lungenentwicklung beteiligt ist, bietet sie eine Erklärung für die Ergebnisse einer kürzlich erschienenen Studie von Solymosi und Kollegen. Sie zeigten, dass der CFTR zur Bildung von kardiogenen Lungenödemen bei Ratten, Mäusen und Kaninchen beiträgt (Solymosi *et al.* 2013). Kardiogene Lungenödeme sind assoziiert mit einem erhöhten hydrostatischen Stress in der Lunge, der aus dem erhöhten Druck in der linken Herzarterie resultiert (Mutlu und Sznajder 2005). Des Weiteren zeigte diese Studie, dass eine Erhöhung des linken arteriellen Drucks um 15 cm Flüssigkeitssäule eine CFTR Aktivität induzierte (Solymosi *et al.* 2013). Die erhöhte CFTR Aktivität führte zu einer vermehrten Cl^- Sekretion und somit zu einer verstärkten Flüssigkeitsinfiltration in den alveolaren Raum (Solymosi *et al.* 2013). Dieses Beispiel untermauert die Relevanz einer Druck/Dehnungs-induzierten CFTR Regulation im pulmonalen Epithel und in Epithelien allgemein.

4.6 Mögliche Mechanismen der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivierung

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur mechanosensitiven Aktivierung des hCFTR decken sich mit den Ergebnissen aus einer früheren Studie (Zhang *et al.* 2010) und bestätigen eine Dehnungs-sensitive Regulierung der CFTR Aktivität. Allerdings wurde bisher der zugrundeliegende Mechanismus der Mechanosensitivität des CFTR noch nicht detailliert untersucht. Basierend auf dem Wissen anderer mechanosensitiver Ionenkanäle, ist die Verankerung in der Plasmamembran ein entscheidender Faktor dafür, wie effizient eine Kraft auf den Ionenkanal wirken kann (Jaalouk und Lammerding 2009; Zanini und Gopfert 2013). Die Verankerung von Ionenkanälen ist dabei von zwei Faktoren abhängig:

- 1) Von der Membranfluidität, die von der Zusammensetzung, speziell dem Anteil von Cholesterol in der Plasmamembran, bestimmt wird. Diese Annahme bildet die Grundlage des *Bilayer*-Modells, welches die Aktivierung der Ionenkanäle über die Deformation der Plasmamembran durch die Einwirkung von mechanischen Stimuli beschreibt (Markin und Martinac 1991; Martinac 2004; Ursell *et al.* 2008).
- 2) Von der Verknüpfung zwischen Ionenkanälen und Elementen des Zytoskeletts. Die Elemente des Zytoskeletts sind Teil des Mechanotransduktionsprozesses und gemäß dem *Tethered*-Modell, wichtig für die Detektion und Weiterleitung der mechanischen Stimuli (Markin und Martinac 1991; Hamill und Martinac 2001; Martinac 2004).

Die Beteiligung beider Modelle an der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivierung wurde in dieser Arbeit untersucht und die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

4.6.1 Beteiligung der Membranfluidität an der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität

Das *Bilayer*-Modell besagt, dass die Verankerung von Ionenkanälen in der Plasmamembran wichtig für die Übertragung mechanischer Stimuli ist (Jaalouk und Lammerding 2009; Zanini und Gopfert 2013). Wichtig für die Komposition der Plasmamembran ist vor allem Cholesterol, was hauptsächlich die biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran (Membranfluidität, Druck innerhalb der Membran) bestimmt (Tillman und Cascio 2003). Eine Änderung des Cholesterol-Anteils ist mit einer Veränderung des lateralen Drucks innerhalb der Plasmamembran verbunden, der durch die Lipid-Lipid- oder Lipid-Protein-Interaktion entsteht (Tillman und Cascio 2003). In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der laterale Druck die Aktivität von mechanosensitiven Ionenkanälen beeinflussen kann (Spencer *et al.* 1999; Hamill und Martinac 2001; Perozo *et al.* 2002; Levitan *et al.* 2010). Des Weiteren ist bekannt, dass der CFTR in sogenannten Membranflößen (*lipid rafts*) lokalisiert ist (Kowalski und Pier 2004; Dudez *et al.* 2008), die eine hohe Cholesterolkonzentration aufweisen (Pike 2004). Um in Anlehnung an das *Bilayer*-Modell zu überprüfen, ob die Wahrnehmung des Dehnungsreizes durch den hCFTR über eine mögliche Veränderung der Plasmamembran erfolgte, wurde in *Xenopus* Oozyten gezielt die Membranfluidität durch Änderungen des Cholesterol-Gehalts beeinflusst. Zum einen wurde durch das Entfernen von Cholesterol durch Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD; Ilangumaran und Hoessli 1998) die Membran der *Xenopus* Oozyten fluider gemacht. Zum anderen wurde durch den Einbau von Cholesterol die Plasmamembran der Oozyten versteift (Carattino *et al.* 2007). Sowohl die Erhöhung als auch die

Verringerung der Membranfluidität resultierte in einer signifikanten Verringerung der hCFTR Aktivität nach dem Dehnungsreiz (110 nl Injektion) gegenüber unbehandelten hCFTR Oozyten (siehe Abb. 38 und Abb. 39). Ursächlich hierfür könnte eine Veränderung der Schwellungsfähigkeit der Oozyten mit veränderter Membranfluidität gegenüber unbehandelten Oozyten sein. Da sich allerdings keine Unterschiede in der Injektions-induzierten Volumenzunahme zwischen unbehandelten Oozyten sowie mit erhöhter bzw. verringerter Membranfluidität zeigten (siehe Abb. 40), scheidet eine veränderte Schwellungsfähigkeit der Oozyten aus. Eine weitere mögliche Erklärung für die verminderte Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität könnte in der veränderten Verankerung der hCFTR Proteine in der Plasmamembran liegen, die aus einer Änderung des Cholesterolgehalts resultiert (Jaalouk und Lammerding 2009; Zanini und Gopfert 2013). Darüber hinaus könnte aber auch eine Veränderung des lateralen Drucks innerhalb der Plasmamembran eine Erklärung für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern. Denn es ist bekannt, dass die Erhöhung des Cholesterolgehalts innerhalb der Membran in einer Verringerung des lateralen Drucks resultiert (Ilangumaran und Hoessli 1998; Tillman und Cascio 2003). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Veränderung des Membrancholesterols keinen Effekt auf die Aktivierung des hCFTR mit F/I (ohne Dehnungsstimulus) hatte (siehe Abb. 38C und Abb. 39C), was in Einklang mit mehreren anderen Studien steht (Lam *et al.* 2004; Wang *et al.* 2008). Dies impliziert, dass erst die Kombination von Veränderung des Cholesterolgehalts und dem Dehnungsstimulus, eine Auswirkung der F/I-induzierten hCFTR Aktivität verursacht. Des Weiteren kann man annehmen, dass durch die Erhöhung der Membranfluidität, durch den Cholesterol-Abbau, die Zelle weicher wird und so verringert sich die Verankerung des hCFTR in der Membran. Dem gegenüber wird eine stärkere Verankerung durch den Einbau von Cholesterol in die Membran gewährleistet, die mit einer Verringerung der Membranfluidität verbunden ist. Dies ist wiederum mit einer Versteifung der Zelle assoziiert. In beiden Fällen, weiche und starre Zelle, wurde eine verminderte Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität nachgewiesen (siehe Abb. 38 und Abb. 39). Es kann daher geschlussfolgert werden, dass die Kraftübertragung von der Membran zu den eingebauten hCFTR sowohl bei einer geringeren als auch eine stärkeren Verankerung nicht so effizient erfolgt, wie bei unbehandelten Zellen. Diese Daten sprechen für eine Beteiligung der Membranfluidität an der Wahrnehmung und Übertragung des Dehnungsreizes auf den hCFTR, wodurch das *Bilayer*-Modell für die mechanosensitive Regulierung der hCFTR Aktivität erstmalig nachgewiesen wurde.

4.6.2 Die Zytoskelettelemente sind an der Mechanosensitivität des hCFTR beteiligt

Basierend auf dem *Tethered*-Modell ist bekannt, dass das Zytoskelett an dem Prozess der Mechanotransduktion beteiligt ist (Petrov und Usherwood 1994; Ingber 1998; Hamill und Martinac 2001; Jaalouk und Lammerding 2009; Peyronnet *et al.* 2014). Das Auftreten mechanischer Stimuli führt zur Neuordnung des Zytoskeletts. Diese Reorganisation des Zytoskeletts wird über Verknüpfungsstellen auf den Ionenkanal übertragen und resultiert letztlich in einer Aktivierung des Ionenkanals (Zanini und Gopfert 2013). Bis zu den 1990er Jahren galten die Zytoskelettelemente lediglich als Strukturproteine der Zellen und zu diesem Zeitpunkt gab es keinerlei Informationen über einen möglichen Einfluss auf den transepithelialen Ionentransport (Edelman 2014). In den darauffolgenden Jahren konnten erste Studien eine direkte Regulation von Ionenkanälen durch die beiden Hauptkomponenten des Zytoskeletts, Aktinfilamente und Mikrotubuli, zeigen (Edelman 2014). Im Hinblick auf den CFTR ist bekannt, dass das Zytoskelett ein dynamisches Interaktom mit dem CFTR bildet, wodurch eine direkte Verknüpfung des CFTR und dem Zytoskelett ermöglicht wird (Cantiello 1996; Chasan *et al.* 2002; Edelman 2014). Diese Verbindung ist essentiell für die cAMP-vermittelte Aktivierung des CFTR (Prat *et al.* 1995; Cantiello 1996; Prat *et al.* 1999), die Expression in der Plasmamembran (Ganeshan *et al.* 2007), die Internalisierung sowie für das intrazelluläre *Trafficking* des CFTR (Mazzochi *et al.* 2006; Ganeshan *et al.* 2007; Edelman 2014). Aufgrund der Bedeutung des Zytoskeletts für die CFTR Regulation wurde in dieser Arbeit die Beteiligung von Zytoskelettelementen an der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität untersucht. Für diese Untersuchungen wurden Aktinfilamente und Mikrotubuli pharmakologisch sowohl abgebaut (destabilisiert) als auch stabilisiert und etwaige Auswirkungen auf die mechanosensitive Aktivität des hCFTR in TEVC-Messungen untersucht. Die Destabilisierung der Aktinfilamente mittels Cytochalasin D (Cooper 1987) hatte weder eine Auswirkung auf das Schwellungspotentials der Oozyten noch auf die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität (siehe Abb. 46 und Abb. 49). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei dem Abbau der Mikrotubuli mit Colchicin (Heidemann und Kirschner 1975; Machu 1998; siehe Abb. 41 und Abb. 45). Demgegenüber vermindert sowohl die Stabilisierung der Aktinfilamente (siehe Abb. 48) als auch der Mikrotubuli (siehe Abb. 43) den Dehnungs-induzierten Effekt auf die hCFTR Aktivität. Ursächlich hierfür könnte die Verringerung der Schwellungsfähigkeit der behandelten Oozyten sein, denn diese zeigten eine signifikant reduzierte Volumenzunahme in Folge der 110 nl Injektion im Vergleich zu unbehandelten Zellen (siehe Abb. 45 und Abb. 49). Diese Ergebnisse machen

deutlich, dass für die Wahrnehmung und Weiterleitung des Dehnungsreizes auf den hCFTR ein intaktes Zytoskelett notwendig ist. Die Veränderungen der Aktinfilamente und Mikrotubuli (Destabilisierung und Stabilisierung) hCFTR-exprimierender Oozyten hatten keinen Einfluss auf die wiederholte hCFTR Aktivierung durch F/I ohne den Dehnungsreiz (siehe Abb. 41, Abb. 43, Abb. 46 und Abb. 48). Diese Ergebnisse stehen somit im Gegensatz zu mehreren Studien, die zeigten, dass eine Zerstörung der Zytoskelettelemente die cAMP-vermittelte Aktivierung des CFTR komplett verringerte (Prat *et al.* 1995; Cantiello 1996; Prat *et al.* 1999).

4.6.3 Verknüpfungsstellen zwischen dem hCFTR und dem Zytoskelett

In dieser Arbeit konnte das Zytoskelett als elementarer Bestandteil für die Wahrnehmung mechanischer Reize auf den hCFTR identifiziert werden. Ein vielbeschriebener Verknüpfungspunkt zwischen dem CFTR und dem Zytoskelett befindet sich im C-Terminus des Proteins (Monterisi *et al.* 2013; Edelman 2014). Die letzten drei Aminosäuren des hCFTR-Proteins, Threonin (T), Arginin (R) und Leucin (L), bilden eine Bindestelle, um den hCFTR an Zytoskelettproteinen zu verankern (Kunzelmann und Mehta 2013; Monterisi *et al.* 2013). Diese C-terminale Region wird für eine effiziente Regulierung des CFTR benötigt (Guggino und Stanton 2006). Des Weiteren zeigte Haggie *et al.*, dass die Deletion des CFTR C-Terminus in einer verminderten Stabilität in der Plasmamembran resultierte (Haggie *et al.* 2004), was die Bedeutung des C-terminalen Ende des CFTR für die Verankerung in der Plasmamembran untermauert. Die TRL-Sequenz enthält ein PDZ-bindendes Motiv, das als Bindestelle für andere Proteine gilt und über die Artgrenzen hinaus hochkonserviert ist (Wang *et al.* 1998). Die PDZ-Domäne verbindet den CFTR mit anderen PDZ-tragenden Proteinen, wie verschiedene Isoformen des Na⁺/H⁺ Austausch Regulationsfaktors (Na⁺/H⁺ *exchanger regularory factor*: NHERF; Wang *et al.* 1998; Hegedus *et al.* 2003; Guggino und Stanton 2006). Die NHERF Isoformen 1 und 2 besitzen in ihrem C-Terminus eine ERM-Bindedomäne, die mit Ezrin (E), Radixin (R) und Moesin (M) interagieren können (Guggino und Stanton 2006). Über diese Verknüpfung werden NHERF-bindende Proteine, wie der CFTR, an apikal lokalisierte F-Aktin-Stränge in polarisierten Epithelzellen gebunden (Short *et al.* 1998; Guggino und Stanton 2006; Abb. 52).

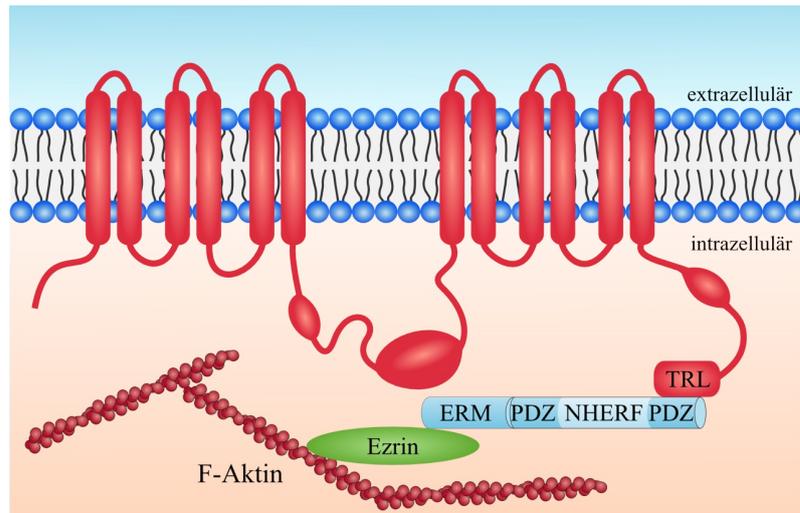


Abb. 52: Der C-Terminus des hCFTR ist mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft.

Die drei C-terminalen Aminosäuren des hCFTR Proteins (Threonin, Arginin, Leucin: TRL) sind über eine PDZ-Domäne mit anderen PDZ-tragenden Proteinen, wie Na⁺/H⁺ Austausch Regulationsfaktor (NHERF), verbunden. Über das Strukturprotein Ezrin wird eine Verbindung zu F-Aktin-Molekülen hergestellt. Diese Abbildung wurde verändert nach Guggino und Stanton 2006.

Da der C-Terminus des hCFTR ein Verknüpfungspunkt mit dem Aktin-Zytoskelett darstellt, wurden in dieser Arbeit mittels zielgerichteter Mutagenese die finalen drei Aminosäuren des hCFTR deletiert (Δ TRL). Diese Δ TRL hCFTR Mutante wurde anschließend in TEVC-Experimenten auf ihre Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität überprüft. Der Δ TRL hCFTR zeigte eine verringerte Stromstimulation durch F/I in Folge des Dehnungsstimulus (110 nl Injektion) gegenüber dem Wildtyp hCFTR (siehe Abb. 50). Zudem war auch der Effekt der Membrandehnung auf den vorstimulierten Δ TRL hCFTR reduziert (siehe Abb. 51). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die Bedeutung der C-terminalen TRL Aminosäuresequenz für die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität erkennen. Durch das Entfernen der Verbindung zwischen Aktinfilamenten und dem hCFTR kann der Dehnungsstimulus nicht mehr effizient genug auf den hCFTR weitergeleitet werden, wodurch die mechanosensitive Regulation der hCFTR Aktivität vermindert wird.

Zusätzlich zu der C-terminalen hCFTR Verknüpfung mit dem Aktin-Zytoskelett, wurden bereits andere Aktin-verwandte Proteine identifiziert, welche die Verankerung des CFTR in der Plasmamembran regulieren können. Über die Vernetzungsproteine Filamine werden Aktinfilamente direkt an die N-terminalen Reste des CFTR gebunden (Playford *et al.* 2010). Interessanterweise ist bei zwei Mukoviszidose-verursachenden Mutationen, L15P und W19C, die Interaktion zwischen Filamin A und dem CFTR gestört (Playford *et al.* 2010; Edel-

man 2014). Dennoch lässt sich über diese geschwächte Verbindung die Stabilität und Expression des CFTR modulieren (Thelin *et al.* 2007; Playford *et al.* 2010).

In einer Studie von Schnizler und Kollegen wurde eine konservative Aminosäuresequenz identifiziert, die ein Bindemotiv von Ionenkanälen mit Aktinfilamenten (α -Aktinin) repräsentiert (Schnizler *et al.* 2009). Diese konservierte α -Aktinin-Bindestelle wurde bereits bei dem NMDA-Rezeptor 1, dem purinergen P2X7 Rezeptor und beim ASIC 1a und 1b identifiziert. Zudem wurde bereits gezeigt, dass diese Ionenkanälen physikalisch mit α -Aktinin interagieren können (Krupp *et al.* 1999; Kim *et al.* 2001; Leonard *et al.* 2002).

Um zu überprüfen, ob diese α -Aktinin-Bindestelle auch im hCFTR zu finden ist, wurde ein Sequenzabgleich (*sequence alignment* mit Online-Tool <http://www.uniprot.org>) mit dem konservierten Bindemotiv und der Proteinsequenz des hCFTR durchgeführt. Dieser Proteinsequenzvergleich identifizierte eine mögliche α -Aktinin-Bindestelle im hCFTR-Protein, die sich zwischen der vierten und fünften Transmembranhelix der ersten membranspannenden Domäne des CFTR befindet (Abb. 53). Um eine Beteiligung dieser α -Aktinin-Bindestelle an der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität nachzuweisen, könnte mittels zielgerichteter Mutagenese die Aminosäureabfolge verändert werden und anschließend in TEVC-Experimenten die Dehnungssensitivität gegenüber dem Wildtyp hCFTR geprüft werden.

P13569	CFTR_HUMAN	61	LASKKNPKLINALRRRCFWF	FMFYGIPL	Helix 1	KAVQPLLGR	IIASYDPDNKEER	STIA	120
NMDA_R1		1	-----	-----		-----	-----	-----	0
P2X7		1	-----	-----		-----	-----	-----	0
ASIC1a+b		1	-----	-----		-----	-----	-----	0
P13569	CFTR_HUMAN	121	TYLGIG	Helix 2	VRTLLI	HPAIFGLHHIGM	QMRIAMFSLIYK	TKLKLSSRVLDKISIGQL	180
NMDA_R1		1	-----	-----		-----	-----	-----	0
P2X7		1	-----	-----		-----	-----	-----	0
ASIC1a+b		1	-----	-----		-----	-----	-----	0
P13569	CFTR_HUMAN	181	VSLLSNNLNKFDEGL	LALAHFV	Helix 3	ALLMGLI	WELLS	ASAFCGI	240
NMDA_R1		1	-----	-----		-----	-----	-----	0
P2X7		1	-----	-----		-----	-----	-----	0
ASIC1a+b		1	-----	-----		-----	-----	-----	0
P13569	CFTR_HUMAN	241	GRMMKYRDQRAGKISERL	VITSEM		ENIQSVK	AYCWEEME	KMIENLRQTELK	300
NMDA_R1		1	-----	-----		-----	-----	-----	7
P2X7		1	-----	-----		-----	-----	-----	7
ASIC1a+b		1	-----	-----		-----	-----	-----	7
						...	*		
P13569	CFTR_HUMAN	301	YVRYFNS	SAFFPSG	Helix 5	VLPYAL	KG	ILRKIP	360
NMDA_R1		8	-----	-----		-----	-----	-----	7
P2X7		8	-----	-----		-----	-----	-----	7
ASIC1a+b		8	-----	-----		-----	-----	-----	7

Abb. 53: Der hCFTR enthält eine mögliche α -Aktinin-Bindestelle.

Die Sequenzvergleich des humanen CFTR (hCFTR, P13569) mit den konservierten α -Aktinin-Bindemotiven des NMDA Rezeptors 1 (NMDA_R1), des purinergen P2X7 Rezeptors und der 1a und 1b Untereinheit des ASIC (ASIC1a+b) zeigte eine mögliche α -Aktinin-Bindestelle zwischen der vierten und fünften Helix der ersten Transmembrandomäne des hCFTR. Das rote Kästchen hebt diese konservierte Aminosäuresequenz hervor.

4.6.4 Die Extrazelluläre Matrix könnte an der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivierung beteiligt sein

Ein weiterer zellulärer Bestandteil, welcher neben der Membranfluidität und dem Zytoskelett, an der Detektion des Dehnungsstimulus beteiligt sein könnte, ist die Extrazelluläre Matrix (EZM). Sie dient nicht nur der Formgebung der Zelle (Hedrick und Nishihara 1991), sondern ist auch an der Wahrnehmung und Weiterleitung mechanischer Reize beteiligt (Schwartz 2010; Humphrey *et al.* 2014). Die Beteiligung der EZM an Mechanotransduktionsprozessen wird durch das *Tethered*-Modell beschrieben (Markin und Martinac 1991; Hamill und Martinac 2001; Martinac 2004). Durch die Einwirkung von mechanischen Stimuli wird die EZM verformt. Diese Verformung wird auf den Ionenkanal übertragen, der sich dadurch öffnet (Bounoutas und Chalfie 2007; Humphrey *et al.* 2014). Eine mögliche Beteiligung der EZM an der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivierung könnte durch den enzymatischen Verdau einzelner EZM-Komponenten, beispielsweise Kollagen, Hyaluronan, Elastan, untersucht werden. Darüber hinaus sind glykosylierte Asparagine mögliche Verknüpfungspunkte zwischen Ionenkanälen und Komponenten der EZM (Uematsu *et al.* 2014). Diese Asparagine müssen innerhalb einer bestimmten Konsensussequenz vorliegen, die ein Asparagin (N), eine beliebige Aminosäure, außer Prolin sowie Serin (S) oder Threonin (T) beinhaltet (Gavel und von Heijne 1990). Mit Hilfe der Aminosäuresequenz des hCFTR-Proteins konnten in der vorliegenden Arbeit mittels einer topologische Analyse (<http://www.uniprot.org>, P13569) zwei glykosylierte Asparagine in der vierten extrazellulären Schleife des hCFTR identifiziert werden (Abb. 54), die bereits auch in einer anderen Studie beschrieben wurden (Lubamba *et al.* 2012).

hCFTR 839 SIPAVTTWNTYLRYITVHKSLI **FVLIWCLV Helix 7 VAASLVVI** WLLGNTPLQDKG **N**STHS

hCFTR 899 **R**NSYAVIITSTS **SYVFPYIV Helix 8 TLLAMGFT** RGLPLVHTLITVSKILHHKMLHSVLQ

Abb. 54: Innerhalb des humanen CFTR-Proteins gibt es zwei glykosylierte Asparagine.

Die zwei glykosylierten Asparagine (N, rot hinterlegt) befinden sich in der vierten extrazellulären Schleife der Aminosäure-Sequenz des humanen CFTR-Proteins (hCFTR). Die gelb-markierten Bereiche repräsentieren die transmembranen Helix 7 und 8 des hCFTR.

Ob diese zwei Verknüpfungspunkte zwischen hCFTR und EZM wichtig für die Detektion mechanischer Stimuli des hCFTR sind, könnte man experimentell nachweisen, indem mittels zielgerichteter Mutagenese die glykosylierten Asparagine ausgetauscht wurden, beispielsweise gegen Alanin. Diese Aminosäure liegt aufgrund des fehlenden Stickstoffatoms deglykosyliert vor und kann daher keine Verbindung zu den Komponenten der EZM aufbauen. Diese

Asparagin-Mutanten des hCFTR könnten anschließend in TEVC-Experimenten auf ihre Dehnungssensitivität untersucht werden.

4.7 Schlussfolgerung und physiologische Relevanz der Mechano-sensitivität des CFTR

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Dehnung und nicht Scherkraft eine mechano-sensitive Regulierung der hCFTR Aktivität verursachte. Die Dehnungs-induzierte CFTR Aktivität wurde sowohl in einem *in vitro* System (*Xenopus* Oozyten) als auch in einem nativen pulmonalen Epithel nachgewiesen. Dies bestätigte, dass der CFTR ein mechanosensitiver Ionenkanal ist. Zudem konnte in Übereinstimmung mit dem *Bilayer*- und dem *Tethered*-Modell gezeigt werden, dass sowohl die Membranfluidität als auch ein intaktes Zytoskelett essentiell für die Dehnungsregulierung der hCFTR Aktivität sind.

Eine mechanosensitive Aktivierung des CFTR hätte weitreichende Auswirkungen auf verschiedene physiologische Funktionen, wie beispielsweise die Zellvolumenregulation oder der Regulation von anderen Ionenkanälen und Transportern. Denn all diese Prozesse setzten eine normale Regulation der CFTR Aktivität voraus. Eine mechanosensitive Regulation der CFTR Aktivität könnte eine wichtige Bedeutung für die normale fötale Lungendifferenzierung und -entwicklung haben, da hierbei sowohl mechanische Stimuli (Olver *et al.* 2004) als auch die CFTR Aktivität (Long *et al.* 2004; Larson und Cohen 2005) essentiell sind. Darüber hinaus könnte ein mechanosensitiver CFTR die positiven Auswirkungen der Physio- und Atemtherapie bei Mukoviszidose-Patienten erklären, die einen wichtigen Teil der Mukoviszidose-Behandlung ausmachen (McIlwaine 2007). Daher kann die Vermutung aufgestellt werden, dass durch die Atemphysiotherapie die mechanischen Kräfte im pulmonalen Epithel erhöht werden und dadurch die Restfunktion des CFTR gesteigert werden. Damit verbunden könnte eine Erhöhung der Cl⁻ Sekretion die Beseitigung bronchialer Sekrete aus den Atemwegen verbessern. Diese Hypothese wird bekräftigt durch die Experimente dieser Arbeit, dass zwei häufige CFTR Mutationen, $\Delta F508$ und G551D, ebenso eine mechanosensitive Regulation aufwiesen.

Trotz der Erkenntnis dieser Arbeit, dass der CFTR ein mechanosensitiver Ionenkanal ist, müssen in zukünftigen Studien alle Komponenten und Signalwege des CFTR-Mechanotransduktionsprozesses aufgeklärt werden, um möglicherweise neue Behandlungsstrategien für Mukoviszidose-Patienten daraus ableiten zu können.

5. Literaturverzeichnis

Ahmad, A., Ahmed, A., Patrizio, P. (2013). Cystic fibrosis and fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 25: 167-172.

Ahn, W., Kim, K.H., Lee, J.A., Kim, J.Y., Choi, J.Y., Moe, O.W., Milgram, S.L., Muallem, S., Lee, M.G. (2001). Regulatory interaction between the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and HCO_3^- salvage mechanisms in model systems and the mouse pancreatic duct. *J Biol Chem* 276: 17236-17243.

Al-Bazzaz, F.J., Hafez, N., Tyagi, S., Gailey, C.A., Toofanfard, M., Alrefai, W.A., Nazir, T.M., Ramaswamy, K., Dudeja, P.K. (2001). Detection of Cl^- - HCO_3^- and Na^+ - H^+ exchangers in human airways epithelium. *JOP* 2: 285-290.

Althaus, M., Bogdan, R., Clauss, W.G., Fronius, M. (2007). Mechano-sensitivity of epithelial sodium channels (ENaCs): laminar shear stress increases ion channel open probability. *FASEB J* 21: 2389-2399.

Andreeva, A.V., Kutuzov, M.A., Voyno-Yasenetskaya, T.A. (2007). Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L259-271.

Andres, M., Gopfert, M.C. (2014). Neuronal osmotransduction: push-activating TRPV1 with microtubules. *Dev Cell* 30: 363-364.

Bardou, O., Trinh, N.T., Brochiero, E. (2009). Molecular diversity and function of K^+ channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L145-155.

Barriere, H., Belfodil, R., Rubera, I., Tauc, M., Poujeol, C., Bidet, M., Poujeol, P. (2003). CFTR null mutation altered cAMP-sensitive and swelling-activated Cl^- currents in primary cultures of mouse nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F796-811.

Berger, J., Hardt, M., Clauss, W.G., Fronius, M. (2010). Basolateral Cl^- uptake mechanisms in *Xenopus laevis* lung epithelium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R92-100.

Bogdan, R. (2007). Charakterisierung Druck-induzierter Ionenströme am Pulmonalepithel von *Xenopus laevis*. Doktorarbeit, Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Bogdan, R., Veith, C., Clauss, W.G., Fronius, M. (2008). Impact of mechanical stress on ion transport in native lung epithelium (*Xenopus laevis*): short-term activation of Na^+ , Cl^- and K^+ channels. *Pflugers Arch* 456: 1109-1120.

Boucher, R.C. (2004). New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 23: 146-158.

Bounoutas, A., Chalfie, M. (2007). Touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Pflugers Arch* 454: 691-702.

Boyce, P.D., Waxman, A.B. (2003). Pulmonary hypertension: work in progress. *J Nucl Cardiol* 10: 413-423.

Brierley, S.M. (2010). Molecular basis of mechanosensitivity. *Auton Neurosci* 153: 58-68.

- Bryan-Sisneros, A.A., Fraser, S.P., Djamgoz, M.B.A.** (2003). Electrophysiological, mechanosensitive responses of *Xenopus laevis* oocytes to direct, isotonic increase in intracellular volume. *J Neurosci Methods* 125: 103-111.
- Bukoreshtliev, N.V., Haase, K., Pelling, A.E.** (2013). Mechanical cues in cellular signalling and communication. *Cell Tissue Res* 352: 77-94.
- Button, B., Picher, M., Boucher, R.C.** (2007). Differential effects of cyclic and constant stress on ATP release and mucociliary transport by human airway epithelia. *J Physiol* 580: 577-592.
- Cantiello, H.F.** (1996). Role of the actin cytoskeleton in the regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Exp Physiol* 81: 505-514.
- Carattino, M.D., Liu, W., Hill, W.G., Satlin, L.M., Kleyman, T.R.** (2007). Lack of a role of membrane-protein interactions in flow-dependent activation of ENaC. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F316-324.
- Carattino, M.D., Sheng, S., Kleyman, T.R.** (2004). Epithelial Na⁺ channels are activated by laminar shear stress. *J Biol Chem* 279: 4120-4126.
- Catalan, M.A., Nakamoto, T., Gonzalez-Begne, M., Camden, J.M., Wall, S.M., Clarke, L.L., Melvin, J.E.** (2010). CFTR and ENaC ion channels mediate NaCl absorption in the mouse submandibular gland. *J Physiol* 588: 713-724.
- Chasan, B., Geisse, N.A., Pedatella, K., Wooster, D.G., Teintze, M., Carattino, M.D., Goldmann, W.H., Cantiello, H.F.** (2002). Evidence for direct interaction between actin and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Eur Biophys J* 30: 617-624.
- Cooper, J.A.** (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105: 1473-1478.
- Dahan, D., Evagelidis, A., Hanrahan, J.W., Hinkson, D.A., Jia, Y., Luo, J., Zhu, T.** (2001). Regulation of the CFTR channel by phosphorylation. *Pflugers Arch* 443: S92-96.
- Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, R.G., Pavirani, A., Lecocq, J.P., Lazdunski, M.** (1991). Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* 354: 526-528.
- Daniels, C.B., Orgeig, S.** (2003). Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing. *News Physiol Sci* 18: 151-157.
- Döring, G., Ratjen, F.** (2005). Mucoviscidosis (Cystic Fibrosis), Molecular Cell Biology of. In: Meyers R.A., Editor. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, 2nd Edition, Volume 8. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; p. 623-640.
- Drumm, M.L., Wilkinson, D.J., Smit, L.S., Worrell, R.T., Strong, T.V., Frizzell, R.A., Dawson, D.C., Collins, F.S.** (1991). Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science* 254: 1797-1799.
- Dudez, T., Borot, F., Huang, S., Kwak, B.R., Bacchetta, M., Ollero, M., Stanton, B.A., Chanson, M.** (2008). CFTR in a lipid raft-TNFR1 complex modulates gap junctional intercellular communication and IL-8 secretion. *Biochim Biophys Acta* 1783: 779-788.
- Dumont, J.N.** (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136: 153-179.
- Edelman, A.** (2014). Cytoskeleton and CFTR. *Int J Biochem Cell Biol* 52: 68-72.

- Edwards, Y.S.** (2001). Stretch stimulation: its effects on alveolar type II cell function in the lung. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129: 245-260.
- Erb, A., Althaus, M.** (2014). Actions of hydrogen sulfide on sodium transport processes across native distal lung epithelia (*Xenopus laevis*). *PLoS One* 9: doi: 10.1371/journal.pone.0100971.
- Fang, X., Song, Y., Hirsch, J., Galletta, L.J.V., Pedemonte, N., Zemans, R.L., Dolganov, G., Verkman, A.S., Matthay, M.A.** (2006). Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L242-249.
- Fang, X., Fukuda, N., Barbry, P., Sartori, C., Verkman, A.S., Matthay, M.A.** (2002). Novel role for CFTR in fluid absorption from the distal airspaces of the lung. *J Gen Physiol* 119: 199-207.
- Fischer, H., Van Driessche, W., Clauss, W.G.** (1989). Evidence for apical sodium channels in frog lung epithelial cells. *Am J Physiol* 256: C764-771.
- Fouquet, A., Measey, J.G.** (2006). Plotting the course of an African clawed frog invasion in Western France. *Animal Biology* 56: 95-102.
- Frank, J.A., Matthay, M.A.** (2003). Science review: mechanisms of ventilator-induced injury. *Crit Care* 7: 233-241.
- Fredberg, J.J., Kamm, R.D.** (2006). Stress transmission in the lung: pathways from organ to molecule. *Annu Rev Physiol* 68: 507-541.
- Fronius, M.** (2012). Mechanical Forces Impair Alveolar Ion Transport Processes – A Putative Mechanism Contributing to the Formation of Pulmonary Edema. In: Iruken E.M., Editor. Lung Disease - Selected State of the Art Reviews. Rijeka, Croatia: InTech; p. 561-578.
- Fronius, M., Bogdan, R., Althaus, M., Morty, R.E., Clauss, W.G.** (2010). Epithelial Na⁺ channels derived from human lung are activated by shear force. *Respir Physiol Neurobiol* 170: 113-119.
- Fronius, M., Clauss, W.G.** (2008). Mechano-sensitivity of ENaC: may the (shear) force be with you. *Pflugers Arch* 455: 775-785.
- Furst, J., Gschwentner, M., Ritter, M., Botta, G., Jakab, M., Mayer, M., Garavaglia, L., Bazzini, C., Rodighiero, S., Meyer, G., Eichmuller, S., Woll, E., Paulmichl, M.** (2002). Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells. *Pflugers Arch* 444: 1-25.
- Gabriel, S.E., Clarke, L.L., Boucher, R.C., Stutts, M.J.** (1993). CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* 363: 263-268.
- Gadsby, D.C., Nairn, A.C.** (1999). Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev* 79: S77-107.
- Gadsby, D.C., Vergani, P., Csanady, L.** (2006). The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440: 477-483.
- Ganeshan, R., Nowotarski, K., Di, A., Nelson, D.J., Kirk, K.L.** (2007). CFTR surface expression and chloride currents are decreased by inhibitors of N-WASP and actin polymerization. *Biochim Biophys Acta* 1773: 192-200.

- Gard, D.L.** (1999). Confocal microscopy and 3-D reconstruction of the cytoskeleton of *Xenopus* oocytes. *Microsc Res Tech* 44: 388-414.
- Gavel, Y., Von Heijne, G.** (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* 3: 433-442.
- Gillespie, P.G., Walker, R.G.** (2001). Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature* 413: 194-202.
- Gout, T.** (2012). Role of ATP binding and hydrolysis in the gating of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Ann Thorac Med* 7: 115-121.
- Guggino, W.B., Stanton, B.A.** (2006). New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 426-436.
- Guizouarn, H., Gabillat, N., Borgese, F.** (2004). Evidence for up-regulation of the endogenous Na-K-2Cl Co-transporter by molecular interactions with the anion exchanger tAE1 expressed in *Xenopus* oocyte. *J Biol Chem* 279: 11513-11520.
- Gullingsrud, J., Schulten, K.** (2004). Lipid bilayer pressure profiles and mechanosensitive channel gating. *Biophys J* 86: 3496-3509.
- Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R., Marbaix, G.** (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233: 177-182.
- Gurdon, J.B., Wickens, M.P.** (1983). The use of *Xenopus* oocytes for the expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 101: 370-386.
- Haggie, P.M., Stanton, B.A., Verkman, A.S.** (2004). Increased diffusional mobility of CFTR at the plasma membrane after deletion of its C-terminal PDZ binding motif. *J Biol Chem* 279: 5494-5500.
- Hamill, O.P.** (2006). Twenty odd years of stretch-sensitive channels. *Pflugers Arch* 453: 333-351.
- Hamill, O.P., Martinac, B.** (2001). Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev* 81: 685-740.
- Hedrick, J.L., Nishihara, T.** (1991). Structure and function of the extracellular matrix of anuran eggs. *J Electron Microscop Tech* 17: 319-335.
- Hegedus, T., Sessler, T., Scott, R., Thelin, W., Bakos, E., Varadi, A., Szabo, K., Homolya, L., Milgram, S.L., Sarkadi, B.** (2003). C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 302: 454-461.
- Heidemann, S.R., Kirschner, M.W.** (1975). Aster formation in eggs of *Xenopus laevis*. Induction by isolated basal bodies. *J Cell Biol* 67: 105-117.
- Hilken, G., Iglauer, F. & Richter, H.P.** (1997). Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Labor-tier – Biologie, Haltung, Zucht und experimentelle Nutzung. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Hill, W.G., Southern, N.M., Maciver, B., Potter, E., Apodaca, G., Smith, C.P., Zeidel, M.L.** (2005). Isolation and characterization of the *Xenopus* oocyte plasma membrane: a new method for studying activity of water and solute transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F217-224.

- Hoffmann, E.K., Holm, N.B., Lambert, I.H.** (2014). Functions of volume-sensitive and calcium-activated chloride channels. *IUBMB Life* 66: 257-267.
- Hoffmann, E.K., Lambert, I.H., Pedersen, S.F.** (2009). Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 89: 193-277.
- Hoger, J.H., Ilyin, V.I., Forsyth, S., Hoger, A.** (2002). Shear stress regulates the endothelial Kir2.1 ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7780-7785.
- Hollenhorst, M.I., Lips, K.S., Weitz, A., Krasteva, G., Kummer, W., Fronius, M.** (2012). Evidence for functional atypical nicotinic receptors that activate K⁺-dependent Cl⁻ secretion in mouse tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46: 106-114.
- Hollenhorst, M.I., Richter, K., Fronius, M.** (2011). Ion transport by pulmonary epithelia. *J Biomed Biotechnol* 2011, doi: 10.1155/2011/174306.
- Humphrey, J.D., Dufresne, E.R., Schwartz, M.A.** (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 802-812.
- Hyatt, B.A., Resnik, E.R., Johnson, N.S., Lohr, J.L., Cornfield, D.N.** (2007). Lung specific developmental expression of the *Xenopus laevis* surfactant protein C and B genes. *Gene Expr Patterns* 7: 8-14.
- Ilangumaran, S., Hoessli, D.C.** (1998). Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J* 335: 433-440.
- Illek, B., Fischer, H., Clauss, W.G.** (1990). Aldosterone regulation of basolateral potassium channels in alveolar epithelium. *Am J Physiol* 259: L230-237.
- Ingber, D.E.** (1998). Cellular basis of mechanotransduction. *Biol Bull* 194: 323-325.
- Ingber, D.E.** (2006). Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J* 20: 811-827.
- Jaalouk, D.E., Lammerding, J.** (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 63-73.
- Jain, L., Chen, X.J., Ramosevac, S., Brown, L.A., Eaton, D.C.** (2001). Expression of highly selective sodium channels in alveolar type II cells is determined by culture conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L646-658.
- Jang, Y., Oh, U.** (2014). Anoctamin 1 in secretory epithelia. *Cell Calcium* 55: 355-361.
- Jessus, C., Thibier, C., Huchon, D., Ozon, R.** (1988). Taxol reveals cortical sites of microtubule assembly in *Xenopus* oocytes. Role of the nucleus. *Cell Differ Dev* 25: 57-63.
- Jiang, Q., Li, J., Dubroff, R., Ahn, Y.J., Foskett, J.K., Engelhardt, J., Kleyman, T.R.** (2000). Epithelial sodium channels regulate cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 275: 13266-13274.
- Kelly, T., Buxbaum, J.** (2015). Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Dig Dis Sci*. doi: 10.1007/s10620-015-3546-7.
- Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.C.** (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073-1080.
- Kim, K.J.** (1990). Active Na⁺ transport across *Xenopus* lung alveolar epithelium. *Respir Physiol* 81: 29-39.

- Kim, M., Jiang, L.H., Wilson, H.L., North, R.A., Surprenant, A.** (2001). Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J* 20: 6347-6358.
- Kitterman, J.A.** (1996). The effects of mechanical forces on fetal lung growth. *Clin Perinatol* 23: 727-740.
- Knöpp, F.** (2014). Die Beteiligung der Extrazellulären Matrix an der Mechanosensitivität des humanen Epithelialen Na⁺-Kanals (ENaC). Doktorarbeit, Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Knowles, M.R., Stutts, M.J., Spock, A., Fischer, N., Gatzky, J.T., Boucher, R.C.** (1983). Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* 221: 1067-1070.
- Kongsuphol, P., Schreiber, R., Kraidith, K., Kunzelmann, K.** (2011). CFTR induces extracellular acid sensing in *Xenopus* oocytes which activates endogenous Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance. *Pflugers Arch* 462: 479-487.
- Kowalski, M.P., Pier, G.B.** (2004). Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation. *J Immunol* 172: 418-425.
- Krupp, J.J., Vissel, B., Thomas, C.G., Heinemann, S.F., Westbrook, G.L.** (1999). Interactions of calmodulin and alpha-actinin with the NR1 subunit modulate Ca²⁺-dependent inactivation of NMDA receptors. *J Neurosci* 19: 1165-1178.
- Kunzelmann, K., Mehta, A.** (2013). CFTR: a hub for kinases and crosstalk of cAMP and Ca²⁺. *FEBS J* 280: 4417-4429.
- Kunzelmann, K., Schreiber, R.** (1999). CFTR, a regulator of channels. *J Membrane Biol* 168: 1-8.
- Lafaire, A.V., Schwarz, W.** (1986). Voltage dependence of the rheogenic Na⁺/K⁺ ATPase in the membrane of oocytes of *Xenopus laevis*. *J Membr Biol* 91: 43-51.
- Lam, R.S., Shaw, A.R., Duszyk, M.** (2004). Membrane cholesterol content modulates activation of BK channels in colonic epithelia. *Biochim Biophys Acta* 1667: 241-248.
- Larson, J.E., Cohen, J.C.** (2005). Developmental paradigm for early features of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 40: 371-377.
- Leonard, A.S., Bayer, K.U., Merrill, M.A., Lim, I.A., Shea, M.A., Schulman, H., Hell, J.W.** (2002). Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II docking to N-methyl-D-aspartate receptors by calcium/calmodulin and alpha-actinin. *J Biol Chem* 277: 48441-48448.
- Levitan, I., Fang, Y., Rosenhouse-Dantsker, A., Romanenko, V.** (2010). Cholesterol and ion channels. *Subcell Biochem* 51: 509-549.
- Li, C., Naren, A.P.** (2010). CFTR chloride channel in the apical compartments: spatiotemporal coupling to its interacting partners. *Integr Biol (Camb)* 2: 161-177.
- Linsdell, P., Hanrahan, J.W.** (1998). Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* 275: C323-326.
- Liu, M., Post, M.** (2000). Invited review: mechanochemical signal transduction in the fetal lung. *J Appl Physiol (1985)* 89: 2078-2084.
- Liu, M., Tanswell, A.K., Post, M.** (1999). Mechanical force-induced signal transduction in lung cells. *Am J Physiol* 277: L667-683.

- Long, F.R., Williams, R.S., Castile, R.G.** (2004). Structural airway abnormalities in infants and young children with cystic fibrosis. *J Pediatr* 144: 154-161.
- Lubamba, B., Dhooghe, B., Noel, S., Leal, T.** (2012). Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem* 45: 1132-1144.
- Ma, T., Thiagarajah, J.R., Yang, H., Sonawane, N.D., Folli, C., Galiotta, L.J.V., Verkman, A.S.** (2002). Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J Clin Invest* 110: 1651-1658.
- Machu, T.K.** (1998). Colchicine competitively antagonizes glycine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuropharmacology* 37: 391-396.
- Markin, V.S., Martinac, B.** (1991). Mechanosensitive ion channels as reporters of bilayer expansion. A theoretical model. *Biophys J* 60: 1120-1127.
- Martin, C.R., Zaman, M.M., Ketwaroo, G.A., Bhutta, A.Q., Coronel, E., Popov, Y., Schuppan, D., Freedman, S.D.** (2012). CFTR dysfunction predisposes to fibrotic liver disease in a murine model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303: G474-481.
- Martinac, B.** (2004). Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *J Cell Sci* 117: 2449-2460.
- Mathes, V.** (2013). Beteiligung des CFTR-Kanals am Druckeffekt im Lungenepithel von *Xenopus laevis*. Bachelorthesis, Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Matthay, M.A., Folkesson, H.G., Clerici, C.** (2002a). Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev* 82: 569-600.
- Matthay, M.A., Clerici, C., Saumon, G.** (2002b). Invited review: Active fluid clearance from the distal air spaces of the lung. *J Appl Physiol* 93: 1533-1541.
- Matthews, J.B., Smith, J.A., Hrnjez, B.J.** (1997). Effects of F-actin stabilization or disassembly on epithelial Cl⁻ secretion and Na-K-2Cl cotransport. *Am J Physiol* 272: C254-262.
- Mazzochi, C., Bubien, J.K., Smith, P.R., Benos, D.J.** (2006). The carboxyl terminus of the alpha-subunit of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel binds to F-actin. *J Biol Chem* 281: 6528-6538.
- McIlwaine, M.** (2007). Chest physical therapy, breathing techniques and exercise in children with CF. *Paediatr Respir Rev* 8: 8-16.
- Meban, C.** (1973). The pneumonocytes in the lung of *Xenopus laevis*. *J Anat* 114: 235-244.
- Monterisi, S., Casavola, V., Zaccolo, M.** (2013). Local modulation of cystic fibrosis conductance regulator: cytoskeleton and compartmentalized cAMP signalling. *Br J Pharmacol* 169: 1-9.
- Moran, O., Tammaro, P., Nizzari, M., Conti, F.** (2000). Functional properties of sodium channels do not depend on the cytoskeleton integrity. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 839-844.
- Muanprasat, C., Sonawane, N.D., Salinas, D., Taddei, A., Galiotta, L.J.V., Verkman, A.S.** (2004). Discovery of glycine hydrazide pore-occluding CFTR inhibitors: mechanism, structure-activity analysis, and *in vivo* efficacy. *J Gen Physiol* 124: 125-137.
- Mutlu, G.M., Sznajder, J.I.** (2005). Mechanisms of pulmonary edema clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L685-695.

- O'Grady, S.M., Lee, S.Y.** (2003). Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L689-700.
- O'Sullivan, B.P., Freedman, S.D.** (2009). Cystic fibrosis. *Lancet* 373: 1891-1904.
- Olver, R.E., Walters, D.V., M Wilson, S.** (2004). Developmental regulation of lung liquid transport. *Annu Rev Physiol* 66: 77-101.
- Ornoy, A., Arnon, J., Katznelson, D., Granat, M., Caspi, B., Chemke, J.** (1987). Pathological confirmation of cystic fibrosis in the fetus following prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 28: 935-947.
- Orr, A.W., Helmke, B.P., Blackman, B.R., Schwartz, M.A.** (2006). Mechanisms of mechanotransduction. *Dev Cell* 10: 11-20.
- Park, M., Ko, S.B.H., Choi, J.Y., Muallem, G., Thomas, P.J., Pushkin, A., Lee, M.-S., Kim, J.Y., Lee, M.G., Muallem, S., Kurtz, I.** (2002). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator interacts with and regulates the activity of the HCO₃⁻ salvage transporter human Na⁺-HCO₃⁻ cotransport isoform 3. *J Biol Chem* 277: 50503-50509.
- Pasantes-Morales, H., Lezama, R.A., Ramos-Mandujano, G., Tuz, K.L.** (2006). Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med* 119: S4-11.
- Perozo, E., Cortes, D.M., Sompornpisut, P., Kloda, A., Martinac, B.** (2002). Open channel structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels. *Nature* 418: 942-948.
- Petrov, A.G., Usherwood, P.N.** (1994). Mechanosensitivity of cell membranes. Ion channels, lipid matrix and cytoskeleton. *Eur Biophys J* 23: 1-19.
- Peyronnet, R., Tran, D., Girault, T., Frachisse, J.M.** (2014). Mechanosensitive channels: feeling tension in a world under pressure. *Front Plant Sci* 5: doi: 10.3389/fpls.2014.00558.
- Pike, L.J.** (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* 378: 281-292.
- Pilewski, J.M., Frizzell, R.A.** (1999). Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* 79: S215-255.
- Playford, M.P., Nurminen, E., Pentikainen, O.T., Milgram, S.L., Hartwig, J.H., Stossel, T.P., Nakamura, F.** (2010). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator interacts with multiple immunoglobulin domains of filamin A. *J Biol Chem* 285: 17156-17165.
- Prager-Khoutorsky, M., Khoutorsky, A., Bourque, C.W.** (2014). Unique interweaved microtubule scaffold mediates osmosensory transduction via physical interaction with TRPV1. *Neuron* 83: 866-878.
- Prat, A.G., Cunningham, C.C., Jackson, G.R., Borkan, S.C., Wang, Y., Ausiello, D.A., Cantiello, H.F.** (1999). Actin filament organization is required for proper cAMP-dependent activation of CFTR. *Am J Physiol* 277: C1160-1169.
- Prat, A.G., Xiao, Y.F., Ausiello, D.A., Cantiello, H.F.** (1995). cAMP-independent regulation of CFTR by the actin cytoskeleton. *Am J Physiol* 268: C1552-1561.
- Pratha, V.S., Hogan, D.L., Martensson, B.A., Bernard, J., Zhou, R., Isenberg, J.I.** (2000). Identification of transport abnormalities in duodenal mucosa and duodenal enterocytes from patients with cystic fibrosis. *Gastroenterology* 118: 1051-1060.
- Proesmans, M., Vermeulen, F., Boeck, K.D.** (2008). What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect. *Eur J Pediatr* 167: 839-849.

- Quinton, P.M.** (2007). Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology (Bethesda, Md.)* 22: 212-225.
- Quinton, P.M.** (2008). Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet* 372: 415-417.
- Ratjen, F., Döring, G.** (2003). Cystic fibrosis. *Lancet* 361: 681-689.
- Richter, K.** (2014). Transepitheliale Ionentransport-Prozesse im pulmonalen Epithel von *Xenopus laevis*: Modulation durch mechanischen Stress und *n*-Alkohole. Doktorarbeit, Institut für Tierphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Richter, K., Kiefer, K.P., Grzesik, B.A., Clauss, W.G., Fronius, M.** (2014). Hydrostatic pressure activates ATP-sensitive K⁺ channels in lung epithelium by ATP release through pannexin and connexin hemichannels. *FASEB J* 28: 45-55.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L.** (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073.
- Rubin, B.K.** (2002). Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care* 47: 761-768.
- Russo, M.A., Hogenauer, C., Coates, S.W.J., Santa Ana, C.A., Porter, J.L., Rosenblatt, R.L., Emmett, M., Fordtran, J.S.** (2003). Abnormal passive chloride absorption in cystic fibrosis jejunum functionally opposes the classic chloride secretory defect. *J Clin Invest* 112: 118-125.
- Sadler, S.E., Jacobs, N.D.** (2004). Stimulation of *Xenopus laevis* oocyte maturation by methyl-beta-cyclodextrin. *Biol Reprod* 70: 1685-1692.
- Saitou, T., Ishikawa, T., Obara, K., Nakayama, K.** (2000). Characterization of whole-cell currents elicited by mechanical stimulation of *Xenopus oocytes*. *Pflugers Arch* 440: 858-865.
- Santiago, J., Guzmàn, G.R., Rojas, L.V., Marti, R., Asmar-Rovira, G.A., Santana, L.F., Mcnamee, M., Lasalde-Dominicci, J.A.** (2001). Probing the effects of membrane cholesterol in the *Torpedo californica* acetylcholine receptor and the novel lipid-exposed mutation alpha C418W in *Xenopus oocytes*. *J Biol Chem* 276: 46523-46532.
- Sardini, A., Amey, J.S., Weylandt, K.H., Nobles, M., Valverde, M.A., Higgins, C.F.** (2003). Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels. *Biochim Biophys Acta* 1618: 153-162.
- Schnizler, M.K., Schnizler, K., Zha, X.-M., Hall, D.D., Wemmie, J.A., Hell, J.W., Welsh, M.J.** (2009). The cytoskeletal protein alpha-actinin regulates acid-sensing ion channel 1a through a C-terminal interaction. *J Biol Chem* 284: 2697-2705.
- Schwartz, M.A.** (2010). Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: doi: 10.1101/cshperspect.a005066.
- Schwiebert, E.M., Egan, M.E., Hwang, T.H., Fulmer, S.B., Allen, S.S., Cutting, G.R., Guggino, W.B.** (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81: 1063-1073.
- Sheppard, D.N., Welsh, M.J.** (1999). Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79: S23-45.
- Shi, S., Carattino, M.D., Hughey, R.P., Kleyman, T.R.** (2013). ENaC Regulation by Proteases and Shear Stress. *Curr Mol Pharmacol* 6: 28-34.

- Short, D.B., Trotter, K.W., Reczek, D., Kreda, S.M., Bretscher, A., Boucher, R.C., Stutts, M.J., Milgram, S.L.** (1998). An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 273: 19797-19801.
- Sigel, E., Minier, F.** (2005). The *Xenopus* oocyte: system for the study of functional expression and modulation of proteins. *Mol Nutr Food Res* 49: 228-234.
- Sobczak, K., Bangel-Ruland, N., Leier, G., Weber, W.M.** (2010). Endogenous transport systems in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Methods* 51: 183-189.
- Solymosi, E.A., Kaestle-Gembardt, S.M., Vadász, I., Wang, L., Neye, N., Chupin, C.J.A., Rozowsky, S., Ruehl, R., Tabuchi, A., Schulz, H., Kapus, A., Morty, R.E., Kuebler, W.M.** (2013). Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: doi: 10.1073/pnas.1216382110.
- Sommer, D., Bogdan, R., Berger, J., Peters, D.M., Morty, R.E., Clauss, W.G., Fronius, M.** (2007). CFTR-dependent Cl⁻ secretion in *Xenopus laevis* lung epithelium. *Respir Physiol Neurobiol* 158: 97-106.
- Spencer, R.H., Chang, G., Rees, D.C.** (1999). 'Feeling the pressure': structural insights into a gated mechanosensitive channel. *Curr Opin Struct Biol* 9: 448-454.
- Stuhmer, W.** (1992). Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol* 207: 319-339.
- Stutts, M.J., Canessa, C.M., Olsen, J.C., Hamrick, M., Cohn, J.A., Rossier, B.C., Boucher, R.C.** (1995). CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269: 847-850.
- Sznajder, J.I.** (2001). Alveolar edema must be cleared for the acute respiratory distress syndrome patient to survive. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1293-1294.
- Taddei, A., Folli, C., Zegarra-Moran, O., Fanen, P., Verkman, A.S., Galletta, L.J.V.** (2004). Altered channel gating mechanism for CFTR inhibition by a high-affinity thiazolidinone blocker. *FEBS Lett* 558: 52-56.
- Tarran, R., Button, B., Boucher, R.C.** (2006). Regulation of normal and cystic fibrosis airway surface liquid volume by phasic shear stress. *Annu Rev Physiol* 68: 543-561.
- Tarran, R., Button, B., Picher, M., Paradiso, A.M., Ribeiro, C.M., Lazarowski, E.R., Zhang, L., Collins, P.L., Pickles, R.J., Fredberg, J.J., Boucher, R.C.** (2005). Normal and cystic fibrosis airway surface liquid homeostasis. The effects of phasic shear stress and viral infections. *J Biol Chem* 280: 35751-35759.
- Tessier, G.J., Traynor, T.R., Kannan, M.S., O'Grady, S.M.** (1990). Mechanisms of sodium and chloride transport across equine tracheal epithelium. *Am J Physiol* 259: L459-467.
- Thelin, W.R., Chen, Y., Gentsch, M., Kreda, S.M., Sallee, J.L., Scarlett, C.O., Borchers, C.H., Jacobson, K., Stutts, M.J., Milgram, S.L.** (2007). Direct interaction with filamins modulates the stability and plasma membrane expression of CFTR. *J Clin Invest* 117: 364-374.
- Tillman, T.S., Cascio, M.** (2003). Effects of membrane lipids on ion channel structure and function. *Cell Biochem Biophys* 38: 161-190.
- Tsang, V.T., Alton, E.W., Hodson, M.E., Yacoub, M.** (1993). *In vitro* bioelectric properties of bronchial epithelium from transplanted lungs in recipients with cystic fibrosis. *Thorax* 48: 1006-1011.

- Uematsu, S., Goto, Y., Suzuki, T., Sasazawa, Y., Dohmae, N., Simizu, S.** (2014). N-Glycosylation of extracellular matrix protein 1 (ECM1) regulates its secretion, which is unrelated to lipid proteinosis. *FEBS Open Bio* 4: 879-885.
- Ursell, T., Kondev, J., Reeves, D., Wiggins, P.A., Phillips, R.** (2008). Role of Lipid Bilayer Mechanics in Mechanosensation. In: Kamkin, A. & Kiseleva, I., editors. *Mechanosensitive ion channels, Mechanosensitivity in Cells and Tissues*. 1st Edition. Dordrecht, Netherlands: Springer Netherlands; p. 37-70.
- Valverde, M.A., O'Brien, J.A., Sepulveda, F.V., Ratcliff, R.A., Evans, M.J., Colledge, W.H.** (1995). Impaired cell volume regulation in intestinal crypt epithelia of cystic fibrosis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9038-9041.
- Vazquez, E., Nobles, M., Valverde, M.A.** (2001). Defective regulatory volume decrease in human cystic fibrosis tracheal cells because of altered regulation of intermediate conductance Ca^{2+} -dependent potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5329-5334.
- Verde, F., Berrez, J.M., Antony, C., Karsenti, E.** (1991). Taxol-induced microtubule asters in mitotic extracts of *Xenopus* eggs: requirement for phosphorylated factors and cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* 112: 1177-1187.
- Voss, F.K., Ullrich, F., Munch, J., Lazarow, K., Lutter, D., Mah, N., Andrade-Navarro, M.A., Von Kries, J.P., Stauber, T., Jentsch, T.J.** (2014). Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science* 344: 634-638.
- Wagner, C.A., Friedrich, B., Setiawan, I., Lang, F., Bröer, S.** (2000). The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem* 10: 1-12.
- Wang, D., Wang, W., Duan, Y., Sun, Y., Wang, Y., Huang, P.** (2008). Functional coupling of Gs and CFTR is independent of their association with lipid rafts in epithelial cells. *Pflugers Arch* 456: 929-938.
- Wang, J., Haanes, K.A., Novak, I.** (2013). Purinergic regulation of CFTR and Ca^{2+} -activated Cl^{-} channels and K^{+} channels in human pancreatic duct epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 304: C673-684.
- Wang, S., Raab, R.W., Schatz, P.J., Guggino, W.B., Li, M.** (1998). Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett* 427: 103-108.
- Weber, W.** (1999a). Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* 1421: 213-233.
- Weber, W.M.** (1999b). Endogenous ion channels in oocytes of *Xenopus laevis*: recent developments. *J Membr Biol* 170: 1-12.
- Winters, S.L., Davis, C.W., Boucher, R.C.** (2007). Mechanosensitivity of mouse tracheal ciliary beat frequency: roles for Ca^{2+} , purinergic signaling, tonicity, and viscosity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L614-624.
- Wirtz, H.R., Dobbs, L.G.** (2000). The effects of mechanical forces on lung functions. *Respir Physiol* 119: 1-17.
- Woehler, A., Lin, K.H., Neher, E.** (2014). Calcium-buffering effects of gluconate and nucleotides, as determined by a novel fluorimetric titration method. *J Physiol* 592: 4863-4875.

Zanini, D., Gopfert, M.C. (2013). Mechanosensation: tethered ion channels. *Curr Biol* 23: R349-351.

Zhang, W.K., Wang, D., Duan, Y., Loy, M.M.T., Chan, H.C., Huang, P. (2010). Mechanosensitive gating of CFTR. *Nat Cell Biol* 12: 507-512.

Zhang, Y., Gao, F., Popov, V.L., Wen, J.W., Hamill, O.P. (2000). Mechanically gated channel activity in cytoskeleton-deficient plasma membrane blebs and vesicles from *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 523: 117-130.

6. Verzeichnisse

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematischer Aufbau des CFTR Proteins.....	10
Abb. 2:	Schematische Darstellung verschiedener zellulärer und extrazellulärer Komponenten, die als Mechanosensoren fungieren und an dem Mechanotransduktions-prozess beteiligt sein können.....	12
Abb. 3:	Der Einfluss von mechanischen Stimuli auf die Funktion und Physiologie der Lunge.	14
Abb. 4:	Die Lunge von <i>Xenopus laevis</i>	19
Abb. 5:	Plasmidkarte des pGEM-HE Vektors.	20
Abb. 6:	Kontrolle der Linearisierung, des mit MluI geschnittenen hCFTR pGEM-HE Vektors, mittels 1%-igen Agarose-Gelelektrophorese.....	23
Abb. 7:	Kontrolle der <i>in vitro</i> Transkription mittels 1% Agarose-Gelelektrophorese.....	25
Abb. 8:	Temperatur-Zeit-Diagramm der PCR für die Generierung der hCFTR Mutanten. .	26
Abb. 9:	Versuchsordnung der <i>two-electrode voltage-clamp</i> (TEVC) Messungen.	29
Abb. 10:	Schematische Darstellung der modifizierten Ussing-Kammer.	33
Abb. 11:	Der Einfluss von Scherkraft auf den heterolog in Oozyten exprimierenden hCFTR.....	41
Abb. 12:	Die simultane Applikation von Scherkraft und Forskolin/IBMX unterschied sich nicht zu der hCFTR Aktivierung durch Forskolin/IBMX allein.....	42
Abb. 13:	Die osmotische Zellschrumpfung hatte keinen Einfluss auf die Aktivität des hCFTR.	44
Abb. 14:	Repräsentative Abbildung der Volumenänderung einer <i>Xenopus</i> Oozyte durch die 20-minütige Inkubation in einer hyper-osmotischen Lösung.	45
Abb. 15:	Na ⁺ -Gluconat ORi hatte keinen Einfluss auf den Transmembranstrom von hCFTR-exprimierenden Oozyten.....	47
Abb. 16:	Die osmotische Zellschwellung durch Inkubation in hypo-osmotischer Lösung führte zu einer Erhöhung der Aktivierung des hCFTR.....	48
Abb. 17:	Volumenänderung einer <i>Xenopus</i> Oozyte durch die 20-minütige Inkubation in hypo-osmotischer Lösung.	49

Abb. 18: Volumenänderung der devitellinisierten Oozyte durch die Inkubation in hypo-osmotischer Lösung.....	49
Abb. 19: Bei devitellinisierten Oozyten erhöhte die osmotische Zellschwellung die Aktivität des hCFTR.....	50
Abb. 20: Die durch Injektion einer intrazellulär analogen Lösung verursachte Membrandehnung erhöhte die Aktivität des hCFTR.....	52
Abb. 21: Das Zellvolumens von <i>Xenopus</i> Oozyten korrelierte nahezu linear mit der hCFTR Aktivität in Folge der Injektionsvolumina.....	53
Abb. 22: Veränderung des Zellvolumens der Oozyten nach der Injektion von 110 nl der intrazellulär analogen Lösung über einen Zeitraum von 30 min.....	54
Abb. 23: Eine Erhöhung der hCFTR Aktivität war lediglich unmittelbar nach dem Induzieren der Membrandehnung zu beobachten.....	56
Abb. 24: Die Injektion der intrazellulär analogen Lösung hatte eine unmittelbare Steigerung der Aktivität des hCFTR nach F/I-Vorstimulation zur Folge.....	58
Abb. 25: Durch den CFTR Blocker CFTR _{inh} -172 wurde die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivierung inhibiert.....	59
Abb. 26: Die $\Delta F508$ hCFTR Mutante zeigte eine geringer Stromstimulation durch Forskolin und IBMX im Vergleich zum Wildtyp hCFTR.....	61
Abb. 27: Inhibition der F/I-induzierten Stromstimulation mit dem CFTR Blocker CFTR _{inh} -172 bei $\Delta F508$ hCFTR-exprimierenden Oozyten.....	62
Abb. 28: Die Membrandehnung erhöhte die Aktivität der $\Delta F508$ hCFTR Mutante.....	63
Abb. 29: Der Dehnungsstimulus führte zu einer zusätzlichen Stromstimulation des bereits vorstimulierten $\Delta F508$ hCFTR.....	64
Abb. 30: Der G551D hCFTR zeigte eine geringere F/I-induzierte Stromstimulation im Vergleich zum Wildtyp hCFTR.....	65
Abb. 31: Die Aktivität der G551D hCFTR Mutante wurde durch den Dehnungsstimulus erhöht.....	66
Abb. 32: Der Dehnungsstimulus führte zu einer zusätzlichen Aktivierung des bereits vorstimulierten G551D hCFTR.....	67
Abb. 33: Der hydrostatische Druck-induzierte Effekt bei 5 cm und 10 cm Flüssigkeitssäule.....	69
Abb. 34: Der Gewebswiderstand des <i>Xenopus</i> Lungenepithels änderte sich durch die mechanische Dehnung nicht.....	70

Abb. 35: Die wiederholte Applikation von HD (10 cm Flüssigkeitssäule) zeigte keine Änderung des HD-induzierten Stromabfalls.....	71
Abb. 36: Schematische Darstellung der Inhibition der HD-induzierten Cl ⁻ Sekretion.	72
Abb. 37: Untersuchungen zur Beteiligung des CFTR an dem HD-induzierten Effekt.....	73
Abb. 38: Die Erhöhung der Membranfluidität von <i>Xenopus</i> Oozyten durch Methyl- β -Cyclodextrin reduzierte die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität.	76
Abb. 39: Die Verringerung der Membranfluidität von <i>Xenopus</i> Oozyten durch wasserlösliches Cholesterol reduzierte die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität.	78
Abb. 40: Korrelation des Zellvolumens und der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität von Oozyten mit veränderter Membranfluidität.	79
Abb. 41: Die Destabilisierung der Mikrotubuli hatte keine Auswirkungen auf die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität.	81
Abb. 42: Die Destabilisierung der Mikrotubuli, induziert durch die Injektion von Colchicin, veränderte die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität nicht.....	82
Abb. 43: Die Stabilisierung der Mikrotubuli durch Paclitaxel verringerte die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität.	84
Abb. 44: Die durch Paclitaxel induzierte Mikrotubuli-Stabilisierung reduzierte den Dehnungs-induzierten Effekt des hCFTR.	85
Abb. 45: Korrelation des Zellvolumens und der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität von Oozyten mit veränderten Mikrotubuli.....	86
Abb. 46: Die Destabilisierung der Aktinfilamente veränderte die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität nicht.	87
Abb. 47: Die Destabilisierung der Aktinfilamente der Oozyte hatte keine Veränderung der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität zur Folge.....	88
Abb. 48: Die Stabilisierung der Aktinfilamente durch Phalloidin verringerte die Dehnungs-induzierte hCFTR Aktivität in <i>Xenopus</i> Oozyten.	90
Abb. 49: Bei Oozyten mit veränderten Aktinfilamenten korrelierte die Volumenzunahme mit der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität.	91
Abb. 50: Die Deletion der C-terminalen TRL-Sequenz des hCFTR führte zu einer Reduzierung der Dehnungs-induzierten hCFTR Aktivität.	93
Abb. 51: Der Effekt des Dehnungsstimulus auf den vorstimulierten Δ TRL hCFTR war im Vergleich zum Wildtyp hCFTR verringert.	94
Abb. 52: Der C-Terminus des hCFTR ist mit den Aktin-Zytoskelett verknüpft.	107

Abb. 53: Der hCFTR enthält eine mögliche α -Aktinin-Bindestelle.....	108
Abb. 54: Innerhalb des humanen CFTR-Proteins gibt es zwei glykosylierte Asparagine.	109

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Restriktionsansatz zur Linearisierung des pGEM-HE Plasmids mit MluI.	22
Tab. 2: Ansatz für die <i>in vitro</i> Transkription.....	24
Tab. 3: Ansatz für die Mutagenese-PCR.....	26
Tab. 4: Zusammensetzung der Lösungen für die Isolation und Kultivierung der <i>Xenopus</i> Oozyten sowie für die Durchführung der TEVC-Messungen (in mM).	38
Tab. 5: Zusammensetzung der Lösungen für die Erhöhung bzw. Verringerung des intrazellulären Volumens der <i>Xenopus</i> Oozyten in (mM).	38
Tab. 6: Zusammensetzung der Lösung für die Ussing-Kammer-Experimente mit den <i>Xenopus</i> Lungenpräparaten (in mM).	39
Tab. 7: In den elektrophysiologischen Messungen verwendete Pharmaka, deren Lösungsmittel sowie die Konzentration der Stammlösung bzw. die in den Versuchen verwendete Konzentration.	39
Tab. 8: Verwendete Abkürzungen und ihre Bedeutung	127
Tab. 9: Mutagenese-Primer für die Generierung der hCFTR Mutanten	131
Tab. 10: Verwendete Größenordnungen	133
Tab. 11: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien	134

7. Anhang

Tab. 8: Verwendete Abkürzungen und ihre Bedeutung

Abkürzung	Bedeutung
$\Delta F508$	CFTR Mutante, bei der Phenylalanin (F) an Position 508 des CFTR-Proteins deletiert wurde
ΔI_{110nl}	vermittelter Strom durch 110 nl Injektion der intrazellulär analogen Lösung
$\Delta I_{F/I}$	Forskolin/IBMX-vermittelter Strom
$\Delta I_{F/I+Injekt}$	Forskolin/IBMX und Injektions-vermittelter Strom
ΔTRL	CFTR Mutante, bei der die letzten 3 Aminosäuren Threonin (T), Arginin (R) und Leucin (L) deletiert sind
1. F/I	erster Forskolin/IBMX-Effekt
2. F/I	zweiter Forskolin/IBMX-Effekt
2. F/I / 1. F/I	normalisierter Forskolin/IBMX-Effekt
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-bindende Kasette
ALF	<i>alveolar lining fluid</i>
ALI	<i>acute lung injury</i>
<i>ANOVA</i>	<i>analysis of variance</i>
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
ASL	<i>airway surface liquid</i>
ATI und ATII	Alveolare Typ I und Typ II Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise

ca.	zirka
Ca ²⁺ -frei ORI	Ca ²⁺ -freier Oozyten-Ringer
CaCC	Ca ²⁺ -abhängige Cl ⁻ Kanäle
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> ; Cl ⁻ Kanal
CNG	<i>cyclic nucleotid-gated</i>
cRNA	<i>complementary</i> RNA
d.h.	das heißt
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEG	Degenerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC-Oozyten	Oozyten, die mit DEPC-Wasser injiziert wurden
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleotid-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ENaC	epithelialer Na ⁺ Kanal
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
EZM	Extrazelluläre Matrix
F-Aktin	filamentöses Aktin
F/I	Forskolin/IBMX
G-Aktin	globuläres Aktin

G551D	CFTR Mutante, bei der Glycin (G) an Position 551 des CFTR-Proteins durch Asparaginsäure (D) substituiert wurde
H ₂ O	Wasser
hCFTR	humaner CFTR Cl ⁻ Kanal
HD	Hydrostatischer Druck
Hyper ORi	Hyper-osmotischer Oozyten-Ringer
Hypo ORi	Hypo-osmotischer Oozyten-Ringer
I _M	transmembraner Strom
I _{sc}	<i>short-circuit current</i> (Kurzschlussstrom)
kb	Kilo-Basenpaare
KulORi	Kultur-Oozyten-Ringer
l	Liter
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> (Nährmedium für Bakterien)
m	Meter
M	Molar
min	Minuten
MSD	membranspannende Domäne
n	Anzahl der durchgeführten Experimente
N	Anzahl der verwendeten Donore
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Natrium-Kalium-Pumpe
NBD	Nukleotid-Bindedomäne
NKCC	Na ⁺ /K ⁺ / Cl ⁻ Co-Transporter
NRS	<i>normal Ringer's solution</i>
ns	nicht signifikant
ORi	Oozyten-Ringer

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCL	<i>periciliary liquid</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , Wert für die Konzentration von Protonen
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
rNTP	Ribonukleotid-triphosphat
rpm	<i>rounds per minute</i>
R _T	transepithelialer Widerstand
RVD	<i>regulatory volume decrease</i>
RVI	<i>regulatory volume increase</i>
SAC	<i>stretch-activated cation channels</i>
sec	Sekunde
SEM	<i>standard error of the means</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SK	Scherkraft
Tab.	Tabelle
TEVC	<i>two-electrode voltage-clamp</i>
TRP	<i>transient receptor potential</i>
u.a.	unter anderem
V _C	Kommando-Potential
VILI	<i>ventilator induced lung injury</i>
V _M	Membranpotential
V	Volt

V _T	transepitheliales Potential
WT hCFTR	Wildtyp des humanes CFTR Cl ⁻ -Kanals
z. B.	zum Beispiel

Tab. 9: Mutagenese-Primer für die Generierung der hCFTR Mutanten

CFTR Mutation	Primersequenz (5' → 3')		Anzahl der Nukleotide
ΔF508	<i>sense</i>	GCACCATTAAAGAAAATATCATCGGTG TTTCCTATGATGAATATAG	46
	<i>antisense</i>	CTATATTCATCATAGGAAACACCGATG ATATTTTCTTTAATGGTGC	
G551D	<i>sense</i>	GAATCACACTGAGTGGAGATCAACGA GCAAGAATTTC	37
	<i>antisense</i>	GAAATTCTTGCTCGTTGATCTCCACTC AGTGTGATTC	
ΔTRL	<i>sense</i>	GAGACAGAAGAAGAGGTGCAAGATTA GAGAGCAGCAT	37
	<i>antisense</i>	ATGCTGCTCTCTAATCTTGCACCTCTTC TTCTGTCTC	

Die Mutagenese-Primer wurden mit dem Online-Tool *Primer Design Tool* (Agilent Technologies) erzeugt und anschließend durch die Firma *Eurofins MWG Operon* generiert.

7.1 Sequenzierungs-Ergebnisse der hCFTR Mutanten

Die erfolgreiche Mutagenese der hCFTR Konstrukte wurde durch den Sequenzvergleich mit den Mutagenese-Primern (Tab. 9) durchgeführt.

7.1.1 ΔF508 hCFTR

AGACTGGAGCCTTCAGAGGGTAAATTAAGCACAGTGGAGAATTTTCATTCTGTTC
TCAGTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCGGTGTTTCCT
ATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACA
TCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACT
GAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGC
TGATTTGTATTTATTAGACTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACAGAAAAG

AAATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAAACCTAGGATTTTGGT
 CACTTCTAAAATGGAACATTTAAAGAAAGCTGACAAAATATTAATTTTGCATGAA
 GGTAGCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACAGCCAGACT
 TTAGCTCAAACTCATGGGATGTGATTCTTTTCGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAG
 AAATTCAATCCTAACTGAGACCTTACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCT
 GTCTCCTGGACAGAAACAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGG
 GAAAAAGGAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCTATACGAAAATTTTCCA
 TTGTGCAAAAGACTCCCTTACAAATGAATGGCATCGAAGAGGATTCTGATGAGCC
 TTTAGAGAGAACGCTGTCCTTAGTACCAGATTCTGAGCAGGAG

Sequenzvergleich gegen den Mutagenese-Primer (Δ F508_Primer)

hCFTR_ΔF508 TTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCGGTGTTTCTATGATGAAT 119
 ΔF508_Primer -----GCACCATTAAAGAAAATATCATCGGTGTTTCTATGATGAAT 42

hCFTR_ΔF508 ATAGATACAGAAGCGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAAGTTTGCAG 179
 ΔF508_Primer ATAG----- 46

7.1.2 G551D hCFTR

GAGCCTTCAGAGGGTAAAATTAAGCACAGTGGAAAGAATTTCAATTCTGTTCTCAGT
 TTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTGGTGTTCCTAT
 GATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATC
 TCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACTG
 AGTGGAGATCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGCT
 GATTTGTATTTATTAGACTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGA
 AATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAAACCTAGGATTTTGGTC
 ACTTCTAAAATGGAACATTTAAAGAAAGCTGACAAAATATTAATTTTGCATGAAG
 GTAGCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACAGCCAGACTTT
 AGCTCAAACTCATGGGATGTGATTCTTTTCGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAGAA
 ATTCAATCCTAACTGAGACCTTACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCTGTC
 TCCTGGACAGAAACAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGGGAA
 AAAAGGAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCTATACGAAAATTTTCCATTG
 TGCAAAAGACTCCCTTACAAATGAATGGCATCGAAGAGGATTCTGATGAGCCTTT
 AGAGAGAAGGCTGTCCTTAGTACCAGATTCTGAGCAGGGAGAGGGCGATACTGCC
 TCGCATCAGCGTGATCAGCACTGGCCCCACGCTTCAGGCACGAAGGAGGCAGTCT
 GTCCTGAACCTGATGACACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAACATTCACCGAAAGA
 CAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCA

Sequenzvergleich gegen den Mutagenese-Primer (G551D_Primer)

hCFTR_G551D AAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACTGAGTGGAGATCAACGAGCAAGA 240
 G551D_Primer -----GAATCACACTGAGTGGAGATCAACGAGCAAGA 32

hCFTR_G551D ATTTCTTTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAGACTCTCCTTTT 300
 G551D_Primer ATTTCTTT----- 37

7.1.3 Δ TRL hCFTR

ATTAGAAGACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAGTAATTCTCTGTGAACA
 CAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCCAACAAATTTTGGTCATAGAAGAGAACAA
 AGTGCGGCAGTACGATTCCATCCAGAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTCTTCCGG
 CAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAAGCTCTTCCCCACCGGA ACTCAAGCA
 AGTGCAAGTCTAAGCCCCAGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGG
 TGCAAGATTAGAGAGCAGCATAAATGTTGACATGGGACATTTGCTCATGGAATTG
 GAGCTCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACC GAATTCATCGATATCTCG
 AGAGATCTGGTTACCACTAAACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAG
 CTACATAATACCAACTTACACTTTACAAAATGTTGTCCCCCAAAATGTAGCCATTC
 GTATCTGCTCCTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAACC CCCCCCCCCCCCCCTTGCACGGACCGACGCGTGCCC
 GGGCTAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTGGGCGTAATCATGGTC
 ATA

Sequenzvergleich gegen den Mutagenese-Primer (Δ TRL_Primer)

```
hCFTR_ΔTRL  TTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGTGCAAGATTAGAGAGCAGCATAAATGT 300
ΔTRL_Primer  -----GAGACAGAAGAAGAGGTGCAAGATTAGAGAGCAGCAT----- 37
*****
```

Tab. 10: Verwendete Größenordnungen

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

Tab. 11: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien

Substanz	Firma	Firmensitz
CFTR _{inh} -172	Santa Cruz Biotechnologie	Heidelberg, Deutschland
Colchicin	Sigma	Taufkirchen, Deutschland
Cytochalasin D	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
DMSO	Sigma	Taufkirchen, Deutschland
Forskolin	MoBiTec	Göttingen, Deutschland
GlyH-101	Merck	Darmstadt, Deutschland
IBMX	Sigma	Taufkirchen, Deutschland
Methyl- β -Cyclodextrin	Sigma	Taufkirchen, Deutschland
Paclitaxel	Sigma	Taufkirchen, Deutschland
Phalloidin	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
wasserlösliches Cholesterol	Sigma	Taufkirchen, Deutschland

8. Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während meiner Doktorandenzeit sowie bei der Realisierung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Herr Prof. em. Dr. Wolfgang Clauss danke ich für die bereitwillige Übernahme meiner Betreuung und für die Unterstützung meiner Teilnahme am Graduiertenprogramm des GGL.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Martin Diener für die Co-Betreuung beim GGL, die damit verbundenen fachlichen Diskussionen und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dem Mukoviszidose Institut gGmbH gilt mein großer Dank hinsichtlich der Finanzierung meines Promotionsprojekts, der Einführung in die „Mukoviszidose-Familie“, die mit zahlreichen Teilnahmen an nationalen und internationalen Tagungen verbunden war.

Mein ganz besonderes Dankeschön geht an Dr. Martin Fronius nach Neuseeland, für seine fortwährende, kompetente und freundschaftliche Betreuung sowie für die zahlreichen konstruktiven Diskussionen und Ideen, die dieses Promotionsprojekt bereicherten. Außerdem möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung und Hilfe bei dem Stipendienantrag bedanken, ohne den die vorliegende Arbeit nicht realisiert worden wäre. Bedanken möchte ich mich zudem für das in mich gesetzte Vertrauen, die Möglichkeit eigene Ideen umsetzen zu dürfen, aber ebenso für das freundschaftliche Arbeitsklima und die privaten Gespräche.

Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan möchte ich für die zahlreiche Unterstützung danken.

Herzlichst bedanken möchte ich mich auch bei Kollegen, Frau Eichelmann, Anja, Mirjam, Fenja, Siggi, Herrn Seehagen-Rabenau und Verena, für die vielseitige Hilfsbereitschaft und Unterstützung und für das freundliche und entspannte Arbeitsklima.

Herrn Dr. Mike Althaus möchte ich darüber hinaus für seine fachlichen Ideen, Ratschläge, Diskussionen rund um mein Promotionsprojekt und für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Katrin Richter und Nikolaus Dittrich, für die wundervolle gemeinsame Doktorandenzeit, für jegliche Unterstützung, für die zahlreichen fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche und für eure Geduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit. Ohne euch wären die vergangenen Jahre nur halb so schön gewesen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und Sebastian Nedwed für das Vertrauen in meine Fähigkeiten, die riesige und uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen sowie den großen Rückhalt. Danke für alles!!!

9. 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 gute wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den

Datum

Unterschrift