Universität Ulm

Institut für Allgemeine Physiologie

Direktor: Prof. Dr. Paul Dietl

Flüssigkeits- und Elektrolyttransport von NCI-H441 Lungenepithelzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Jonas Philipp Korbmacher

Berlin

2019

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred Frick

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Barth

Tag der Promotion: 25.06.2020

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikation eingegangen:

Korbmacher, J.P., C. Michel, D. Neubauer, K. Thompson, B. Mizaikoff, M. Frick, P. Dietl, and O. H. Wittekindt, *Amiloride-Sensitive Fluid Resorption in Nci-H441 Lung Epithelia Depends on an Apical Cl(-) Conductance.* Physiol Rep, 2014. 2.

© 2014 The Authors. Physiological Reports published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Neubauer, D., J. Korbmacher, M. Frick, J. Kiss, M. Timmler, P. Dietl, O.H. Wittekindt, and B. Mizaikoff, *Deuterium oxide dilution: a novel method to study apical water layers and transepithelial water transport*. Anal Chem, 2013. 85, p. 4247-50.

Korbmacher, J.P., C. Michel, D. Neubauer, K. Thompson, M. Frick, B. Mizaikoff, P. Dietl, and O.H. Wittekindt, *Characterization of transepithelial fluid and electrolyte transport by cultured distal airway epithelial cells NCI-H441*. Acta Physiol, 2013. 207, p. 208 Posterpräsentation auf der *92. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis - VI -

1 Einleitung - 1 -

1.1 Lunge und Atemwegsepithel - 1 -

1.2 Alveolen und Alveolarepithel - 2 -

1.3 Wassertransport und Rolle von CFTR - 4 -

1.4 Wasser- und Elektrolyttransportmessungen an NCI-H441 Lungenepithelzellen- 6 -

1.5 Ziele der Arbeit - 7 -

2 Material und Methoden - 8 -

2.1 Material - 8 -

2.1.1 Chemikalien - 8 -

2.1.2 Laborgeräte und Software - 9 -

2.1.3 Zellkultur - 9 -

2.1.4 Funktionelle Lösungen - 9 -

2.2 Methoden - 10 -

2.2.1 NCI-H441 Lungenepithelzellen und Zellkultur - 10 -

2.2.2 Wassertransportmessung mittels D_2O-Dilutionsmethode - 11 -

2.2.3 Kurzschlussstrommessung in der Ussing-Kammer - 13 -

2.3 Statistische Analyse - 14 -

3 Ergebnisse - 15 -

3.1 Wassertransportmessung von NCI-H441 Lungenepithelzellen - 15 -

3.1.1 Basale Wassertransportrate - 15 -

3.1.2 Einfluss von Amilorid auf die Wasserresorption - 17 -

3.1.3 Einfluss von Chloridkanalmodulatoren auf die Wasserresorption - 18 -

3.2 Elektrolyttransport von NCI-H441 Lungenepithelzellen - 22 -

3.2.1 Einfluss von Amilorid und NPPB auf den Kurzschlussstrom ..... - 22 -

3.2.2 Einfluss von Chloridkanalmodulatoren auf den Kurzschlussstrom ..... - 24 -

3.2.3 Einfluss von DIOA auf den Kurzschlussstrom ..... - 28 -

3.2.4 Kurzschlussstrom unter asymmetrischer Cl^- -Ionenverteilung ..... - 30 -

4 Diskussion ..... - 33 -

4.1 Methodische Ansätze zur Charakterisierung der Flüssigkeitsresorption ..... - 33 -

4.2 Alveolare Wasserresorption und die Rolle von ENaC ..... - 34 -

4.3 Flüssigkeits- und Elektrolyttransport und der Einfluss von CFTR und anderen Chloridkanälen ..... - 37 -

4.3.1 Zunahme der Wasserresorption durch Anstieg des intrazellulären cAMP- 37 -

4.3.2 Reduktion der Wasserresorption durch Ionenkanalinhibitoren ..... - 40 -

4.3.3 Mögliche Rolle des basolateralen K^+/Cl^-Kotransporters für die transepitheliale Chloridabsorption ..... - 43 -

4.4 Schlussfolgerung ..... - 44 -

5 Zusammenfassung ..... - 45 -

6 Literaturverzeichnis ..... - 47 -

7 Danksagung ..... - 54 -

8 Lebenslauf und Publikationsregister ..... - 55 -

Abkürzungsverzeichnis

8 Br-cAMP ..... *8-Bromoadenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat*
AFC ..... *alveolar fluid clearance = alveolare Flüssigkeitsbeseitigung*
ALF ..... *alveolar lining fluid = oberflächlicher Flüssigkeitsfilm der Alveolen*
ALI ..... *air-liquid-interface = Luft-Nährlösungs-Kulturbedingung*
ARDS ..... *Acute Respiratory Distress Syndrome = Akutes Atemnotsyndrom*
ASL ..... *airway surface liquid = oberflächlicher Flüssigkeitsfilm der Atemwege*
ATI ..... *Alveolarepithelzelle Typ 1*
ATII ..... *Alveolarepithelzelle Typ 2*
ATP ..... *Adenosintriphosphat*
cAMP ..... *Cyclisches Adenosinmonophosphat*
CF ..... *cystic fibrosis = zystische Fibrose*
CFTR ..... *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
C_{H2O} ..... *Wasserkonzentration*
csFBS ..... *charcoal stripped fetal bovine serum = Holzkohle gereinigtes fetales Kälberserum*
D_2O ..... *Deuteriumoxid*
DIOA ..... *(R-(+)-[(2-n-Butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy]aceticacid)*
ENaC ..... *epithelialer Natriumkanal*
F ..... *Transportrate*
$F_{control}$ ..... *Transportrate unter Kontrollbedingungen*
F_{rel} ..... *relative Transportraten*
F_{sample} ..... *Transportrate mit Kanalmodulator*
H441-Zellen ..... *NCI-H441 Lungenepithelzellen*
IC_{50} ..... *mittlere inhibitorische Hemmkonzentration*
I_N ..... *Fläche unterhalb der einzelnen Absorptionsbanden*
I_{sc} ..... *Kurzschlussstrom I_{sc}*
KCC ..... *K^+/Cl^- Kotransporter*
M ..... *Fläche der Transwell-Filter*
NCI ..... *National Cancer Institute = Nationales Krebsregister (USA)*
NPPB ..... *5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure*
PBS ..... *Phosphatgepufferte Salzlösung*
PCL ..... *periciliary liquid = periziliärer Flüssigkeitsfilm*
R_{te} ..... *transepithelialer Widerstand*
SGLT1 ..... *Natrium-Glukose-Kotransporter*
V_{api} ..... *apikales Volumen*
V_{cor} ..... *Volumen mit korrigiertem Verdunstungsverlust*
V_{D2O} ..... *0,9% NaCl gelöst in 25 µL D_2O*
V_{evap} ..... *apikales Volumen nach Inkubation und Verdunstungsverlust*
V_{te} ..... *transepitheliale Spannung*
$V_{t=0}$ ..... *apikales Volumen zum Versuchszeitpunkt null*

1 Einleitung

1.1 Lunge und Atemwegsepithel

Die Lunge kann nach funktionellen Gesichtspunkten in zwei Abschnitte unterteilt werden: Der proximal gelegene und rein luftzuführende oder konduktive Anteil, sowie der distale und am Gasaustausch beteiligte Anteil, der als respiratorischer Abschnitt beschrieben wird. Der luftzuführende Teil entspricht anatomisch der Trachea und den Bronchien, welche sich weiter peripher in eine Vielzahl von Bronchioli verzweigen. Distal der sogenannten Bronchioli terminales folgen die am Gasaustausch beteiligten Bronchioli respiratorii, Ductus alveolares und Sacculi alveolares. Die Wände der Sacculi werden durch eine Vielzahl von Lungenalveolen geformt und bilden den sogenannten Alveolarraum. In einer menschlichen Lunge beteiligen sich etwa 480 Millionen solcher Lungenalveolen am lebenswichtigen Gasaustausch [73].

Dieser funktionelle Unterschied spiegelt sich auch auf epithelialer Ebene wieder. Der konduktive Teil der Lunge ist mit einem mehrreihigen hochprismatischen Epithel ausgekleidet. Hier finden sich undifferenzierte Basalzellen, Flimmerzellen, Becherzellen und Keulenzellen („Club cells“). Die Oberfläche des Epithels wird von einem etwa 7 µm [91] dünnen Flüssigkeitsfilm, „airway surface liquid“ (ASL), bedeckt, welcher in Höhe und Zusammensetzung genauestens reguliert wird. Der ASL kann nochmals in einen periziliären Flüssigkeitsfilm „periciliary liquid“ (PCL) und eine obere Mukusschicht unterteilt werden. Die adäquate Justierung der Höhe des ASL, respektive des PCL, ist essentiell für einen optimalen Zilienschlag des Flimmerepithels und damit für den rachenwärts gerichteten mukoziliären Schleimtransport [59]. Dabei ist die feinregulierte Balance zwischen epithelialer Flüssigkeitssekretion und –resorption entscheidend für die Höhe des ASL. Haupttriebkraft der Flüssigkeitsresorption ist ein durch transzelluläre Ionenbewegung hergestellter osmotischer Gradient. Aktivierung des epithelialen Natriumkanals (ENaC) führt zur Na^+-Aufnahme in die Zelle und ist der limitierende Schritt für den transepithelialen Natriumtransport, und damit auch für die pulmonale Flüssigkeitsresorption [7, 23]. Im Gegensatz dazu beruht die Flüssigkeitssekretion und daraus resultierende Zunahme des ASL auf einer transepithelialen Cl^--Sekretion, die insbesondere durch den in der apikalen Zellmembran der Atemwegsepithelzellen

lokalisierten Chloridkanal CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) vermittelt wird [7, 47]. Mutationen, die zu einem Funktionsverlust von CFTR führen, verursachen eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die Mukoviszidose oder auch zystische Fibrose (cystic fibrosis, CF) genannt wird. Viele Symptome der zystischen Fibrose, wie beispielsweise die Ausbildung von zähem Schleim in den Atemwegen, beruhen auf einer epithelialen Sekretionsstörung in den betroffenen Geweben durch den Verlust der Funktion von CFTR, was dessen physiologische Bedeutung als sekretorischer Chloridkanal unterstreicht [7].

1.2 Alveolen und Alveolarepithel

Die bläschenförmigen Alveolen werden mit einem 0,1 - 0,2 µm dünnen Epithel ausgekleidet, welches die eingeatmete Luft von den darunterliegenden Blutkapillaren trennt [63]. Dieser schmale Diffusionsabstand ermöglicht einen effizienten Gasaustausch über die epitheliale Blut-Luft-Schranke. Das Alveolarepithel besteht aus zwei Zelltypen: Flache Pneumozyten vom Typ 1 (Alveolarepithelzelle Typ 1; ATI-Zelle) und kissenförmige oder kubische Pneumozyten vom Typ 2 (Alveolarepithelzelle Typ 2; ATII-Zelle). Durchschnittlich finden sich pro Alveolar, neben Makrophagen, endothelialen und interstitiellen Zellen, etwa doppelt so viele ATII Zellen (92 Zellen pro Alveolar) als ATI Zellen (47 Zellen pro Alveolar)[99]. Die stark abgeflachten ATI-Zellen kleiden etwa 95% der alveolären Oberfläche aus, obwohl die ATII Zellen etwa 16% der gesamten alveolaren Zellanzahl ausmachen [15, 99].

Korrespondierend zu dem ASL des Atemwegsepithels findet sich auch in den Alveolen ein Flüssigkeitsfilm. Dieser kleidet die gesamte nach luminal gerichtete Epitheloberfläche aus und wird als „alveolar lining fluid“ (ALF) bezeichnet [4, 72]. Die Menge und das Volumen des ALF beeinflusst direkt den Diffusionsabstand, den die Atemgase über die Blut-Luft-Schranke zurücklegen müssen. Somit ist eine der Hauptaufgaben des Alveolarepithels die Volumenregulation des ALF durch eine entsprechende Steuerung des transepithelialen Ionentransports [4, 83]. Aufgrund eines hydrostatischen Druckgradienten zwischen den Blutkapillaren und dem Alveolarraum, kommt es zu einer passiven hydrostatischen Flüssigkeitssekretion. Apiko-lateral lokalisierte Schlussleisten (Tight junctions) bilden eine Art Dichtung zwischen den Alveolarzellen und verhindern einen unkontrollierten parazellulären Ionen- und Flüssigkeitstransport [4, 98, 100]. Tight junctions, die einen

komplexen molekularen Aufbau haben und deren Permeabilität durch Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration sowie durch viele weitere Faktoren reguliert werden kann, steuern somit den parazellulären Transport von Molekülen aus dem Interstitium in den Alveolarraum und umgekehrt [34, 84]. Zusätzlich zur wahrscheinlich geringen hydrostatischen Filtration, wird im Alveolarraum auch über eine transepitheliale Cl^- -Sekretion als Triebkraft einer passiven Flüssigkeitssekretion diskutiert [28, 54].

Neben der Regulation der Flüssigkeitssekretion ist die aktive Resorption von überschüssigem ALF-Volumen eine der Hauptaufgaben des Alveolarepithels. Auch hier wird eine transzelluläre Wasserresorption in erster Linie durch die Verschiebung osmotisch aktiver Substanzen erreicht. Im Wesentlichen beruht dieser Mechanismus auf einer elektrogenen transepithelialen Na^+-Resorption, die eine aktive Transportleistung der Alveolarepithelzellen darstellt. Dabei vermittelt der in der apikalen Membran der Alveolarepithelzellen lokalisierte ENaC die Na^+-Aufnahme in die Zelle [58]. Die elektrochemische Triebkraft für die Na^+-Aufnahme wird durch die basolateral gelegene Na^+ - K^+ - ATPase generiert, die in Verbindung mit einer basolateralen K^+-Leitfähigkeit ein negatives Membranpotential bewirkt und die aufgenommen Na^+-Ionen basolateral aus der Zelle heraustransportiert. Die durch den Na^+-Einstrom depolarisierte apikale Membran führt zu einer auf der luminalen Seite negativen transepithelialen Potentialdifferenz. Der dadurch entstehende elektrochemische Gradient bewirkt einen para- oder transzellulären transepithelialen Transport von Cl^- Ionen. Auf die resultierende Nettoresorption von NaCl, kann aufgrund der hohen Wasserpermeabilität des Epithels, Wasser folgen. Es kommt so zu einem Wassertransport, unter nahezu isotonen Bedingungen, d.h. dass nur ein geringer osmotischer Gradient über das Epithel aufgebaut wird. Diese passive Flüssigkeitsresorption vom Alveolarraum in das Interstitium wird als „alveolar fluid clearance“ [AFC] bezeichnet. Dieser Prozess ist beispielsweise bei der Resorption eines pathologischen Alveolarödems überlebenswichtig. So sind gentechnisch veränderte Mäuse, denen die funktionell entscheidende α-Untereinheit von ENaC fehlt, wegen einer dadurch eingeschränkten AFC nicht überlebensfähig [37]. Umgekehrt wurde gezeigt, dass eine intakte AFC bei Patienten mit akutem Lungenversagen (im Sinne eines „acute respiratory distress syndrome [ARDS]“ oder „Acute Lung Injury“) zu einer geringeren Morbidität und Mortalität führt [60, 61].

1.3 Wassertransport und Rolle von CFTR

Wie in den vorangegangenen Absätzen beschrieben, ist die Haupttriebkraft für einen transepithelialen Wassertransport ein durch einen entsprechenden transepithelialen NaCl-Transport erzeugter osmotischer Gradient. Dabei gilt die durch den apikal lokalisierten ENaC vermittelte Na^+-Resorption als geschwindigkeitslimitierender Faktor für die transepitheliale Wasserresorption [23]. Dagegen spielt, wie oben bereits erwähnt, in vielen sekretorischen Epithelien die Aktivierung apikaler Chloridkanäle, insbesondere von CFTR, eine entscheidende Rolle für die transepitheliale Flüssigkeitssekretion. So wird postuliert, dass der für die Flüssigkeitssekretion des fetalen Lungenepithels erforderliche osmotische Gradient auf einer aktiven transzellulären Chloridsekretion beruht, die die elektrochemische Triebkraft für einen entsprechenden parazellulären Na^+-Transport generiert [70]. Ein ähnlicher Mechanismus wurde in der adulten Lunge beschrieben, bei dem eine Chloridsekretion zu einer Flüssigkeitssekretion in den Alveolarraum führt [54]. Diese Ergebnisse passen zum Konzept einer von der Aktivität apikaler Chloridkanäle abhängigen Chloridsekretion, die durch die Generierung eines entsprechenden osmotischen Gradienten die Voraussetzung für eine transepitheliale Flüssigkeitssekretion schafft.

Interessanterweise gilt dieses Konzept, bei der eine Aktivierung von apikalen CFTR Chloridkanälen zu einer Flüssigkeitssekretion und die Aktivierung von apikalem ENaC zu einer Flüssigkeitsresorption führt, nicht für die Ausführungsgänge von Schweiß- und Speicheldrüsen. In diesen Epithelien führt offenbar die parallele Aktivierung von CFTR und ENaC zu einer NaCl-Resorption, was bei fehlender Wasserpermeabilität des Epithels die Produktion eines hypotonen und salzarmen Schweißes beziehungsweise Speichels ermöglicht. Bei Menschen und Mäusen mit homozygoter CFTR Mutation (ΔF508) und resultierendem CFTR Funktionsverlust wird daher Schweiß und Speichel mit deutlich erhöhtem NaCl-Gehalt produziert, weil die Fähigkeit des Epithels zur NaCl-Resorption eingeschränkt ist [12]. In der Tat ist ein diagnostisches Kriterium für die klinische Diagnose einer zystischen Fibrose eine erhöhte Chloridionenkonzentration (>60 mmol/l) im Schweiß, die man in einem standardisierten Schweißtest bestimmt, bei dem die Schweißsekretion durch Pilocarpin stimuliert wird [16]. Diese Beobachtungen sprechen

dafür, dass die parallele Funktion von CFTR und ENaC in der apikalen Membran die transepitheliale Resorption von NaCl vermitteln kann.

Im Alveolarepithel wird die Rolle des CFTR-Kanals weiterhin kontrovers diskutiert, wobei es verschiedene Befunde gibt, die für eine resorptive Funktion sprechen. So wurde beschrieben, dass eine Aktivierung CFTR-artiger Chloridkanäle an der β-adrenergen Stimulation des transepithelialen Natriumtransport von Alveolarepithelzellen beteiligt ist [44]. Man vermutet, dass die adrenerge Stimulation der Zellen zu einem intrazellulären Anstieg von cAMP und einer Aktivierung von CFTR-artigen Kanälen in der apikalen Membran führt. Aktuellere Publikationen stärken diese Vermutung und zeigen nach β-adrenerger Stimulation von distalem Lungengewebe eine Zunahme der Flüssigkeitsresorption infolge einer cAMP-vermittelten Aktivierung von CFTR [21, 25, 65]. Auch eine kürzlich vorgestellte Studie an Schweinen zeigt erste vielversprechende Ergebnisse in der Therapie des Lungenödems durch medikamentöse Potenzierung von CFTR, was für eine funktionelle Bedeutung von CFTR für die Flüssigkeitsresorption von Alveolarepithelzellen spricht [52].

Zwei Mechanismen werden diskutiert, über die eine Aktivierung apikaler Chloridkanäle eine transepitheliale Flüssigkeitsresorption fördern könnte: (1) Die Aktivierung von apikalen Cl^--Kanälen könnte eine transzelluläre Chloridresorption ermöglichen und damit zur Triebkraft für die Flüssigkeitsresorption beitragen. (2) Die Aktivierung einer apikalen Chloridleitfähigkeit könnte zur Aufrechterhaltung eines negativen Membranpotentials als Triebkraft für den Natriumeinstrom über ENaC dienen [44, 71]. Eine solche funktionelle Kopplung von ENaC und CFTR könnte den transepithelialen NaCl-Transport erleichtern und dem Alveolarepithel eine effektive Möglichkeit einer osmotischen Flüssigkeitsresorption bieten.

1.4 Wasser- und Elektrolyttransportmessungen an NCI-H441 Lungenepithelzellen

Um ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Transportmechanismen zu erlangen, wurden in der vorliegenden Arbeit Wasser- und Elektrolyttransportmessungen an einem Zellkulturmodell des Alveolarepithels durchgeführt. In früheren Studien wurden unterschiedliche Zellkulturmodelle verwendet, jedoch zeigen nicht alle Modelle typische Charakteristika nativer Alveolarepithelzellen. Die humanen NCI-H441 Lungenepithelzellen (H441-Zellen), die aus einem Adenokarzinom stammen [81], exprimieren einige typische Zellmarker, die für native ATII-Zellen charakteristisch sind. Genau wie ATII-Zellen exprimieren H441-Zellen Surfactant-Proteine und zeigen intrazellulär typische Lamellenkörper [36]. Unter Air-Liquid-Kulturbedingungen (Details unter Material und Methoden), die die physiologischen Verhältnisse in den Alveolen nachahmen, bilden H441-Zellen ein funktionelles Epithel aus [81]. Durch tight junctions und adherens junctions zwischen benachbarten Zellen, bildet sich eine polarisierte und dichte Epitheldecke aus [36]. In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass H441-Zellen Cl^--Kanäle aufweisen [49], ENaC exprimieren und ein resorptives Epithel ausbilden [69]. Diese Eigenschaften machen H441-Zellen zu einem interessanten Zellkulturmodell, um transepitheliale Transportmechanismen zu untersuchen und um weitere Rückschlüsse auf Transportmechanismen im Alveolarepithel zu ermöglichen.

Um ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen zu erlangen, wurden mit einer neu etablierten D_2O Konzentrations-Verdünnungsmethode („D_2O dilution method“) [69] quantitative Messungen des epithelialen Flüssigkeitstransport durchgeführt. Parallel dazu wurden traditionelle Kurzschlussstrommessungen verwendet, um Rückschlüsse auf die dem Flüssigkeitstransport zugrunde liegenden Ionentransportmechanismen zu ermöglichen.

1.5 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, durch die Kombination von klassischen Kurzschlussstrommessungen in der Ussing-Kammer und der neu etablierten D_2O Dilutions-Methode, den transepithelialen Ionen- und Flüssigkeitstransport des Alveolarepithels näher zu charakterisieren. Die D_2O Dilutions-Methode erlaubt quantitative Wassertransportmessungen in bisher nicht bekannter Genauigkeit und ermöglicht dadurch einen neuen experimentellen Ansatz zur Untersuchung der Mechanismen des epithelialen Flüssigkeitstransports.

Als Zellkulturmodell wurden NCI-H441 Lungenepithelzellen verwendet, die charakteristische Eigenschaften nativer humaner Alveolarepithelzellen aufweisen, sodass sie als ein mögliches Zellkulturmodell für das Alveolarepithel gelten. Die Verwendung von unterschiedlichen Ionenkanalmodulatoren diente der Identifizierung der an dem Wasser- und Elektrolyttransport des Epithels beteiligten Transportmechanismen. Mit diesem methodischen Ansatz möchte die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis des alveolaren Elektrolyt- und Flüssigkeitstransport leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien (8 Br-cAMP: 8-Bromoadenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat; BSS: balanced saltsolution = balancierte Salzlösung , csFBS: charcoal stripped fetal bovine serum = Holzkohle gereinigtes fetales Kälberserum; DIOA: (R-(+)-[(2-n-Butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy]aceticacid); HEPES: Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure; ITS: Insulin/Transferrin/Selen; NPPB: 5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure; TrypLE: trypsin like enzyme = Trypsin ähnliches Enzym; PBS: phosphate buffered saline = Phosphat gepufferte Salzlösung)

8 Br-cAMP	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
Amilorid	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
Bumetanid	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
$CFTR_{inh}$-172	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
csFBS	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
Deuteriumoxid	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
DIOA	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
Forskolin	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
Glibenclamid	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
ITS	Thermo Fisher (Langenselbold)
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
NPPB	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim)
PBS ohne Mg^2 or Ca^{2+},	Dulbecco’s Biochrom (Berlin)
RPMI-1640 Medium	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
TrypLE™ Express	Thermo Fisher (Langenselbold)

2.1.2 Laborgeräte und Software

Tabelle 2: Laborgeräte und Software (ATR: total attentuated reflection = abgeschwächte Totalreflexion; FT-IR: Fouriertransformationsinfrarotspektroskopie, MCT: mercury-cadmium-telluride = Quecksilber-Cadmium-Tellurid)

Axiovert 40 CFL inverses Mikroskop	Carl Zeiss (Oberkochen)
BioATRCell-II-Einheit	Bruker optics (Ettlingen)
Easy-Mount Diffusionskammer	EM-CSYS-4 Physiologic Instruments (San Diego, USA)
GraphPad Prism Version 5.01	GraphPad Software (San Diego, USA)
MCT-Detektor	Bruker optics (Ettlingen)
MIR-ATR-Spektroskopie	Bruker optics (Ettlingen)
Ussing-Kammer Verstärker	Böhringer Ingelheim (Biberach)
Ussing-Kammer Verstärker-Software	LabVIEW National Instruments) (München)
Vertex 70 FT-IR Spektrometer	Bruker optics (Ettlingen)
Zentrifuge 5427 R	Gerätebau Eppendorf (Engelsdorf)
HERAcell 150 incubator	Kendro Laboratory Products (Hanau)

2.1.3 Zellkultur

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial, Lösungen und Medien der Zellkultur. (ALI-Medium: Air-Liquid-Interface-Medium; csFBS: charcoal stripped fetal bovine serum = Holzkohle gereinigtes fetales Kälberserum; ITS: Insulin/Transferrin/Selen; NCI-H441 = H441 Lungenepithelzellen)

ALI-Medium	RPMI 1640 mit 30 nmol/L Dexamethason, 1.72 µmol/L Insulin, 68.8 µmol/L Transferrin und 38.7 µmol/L Selenium (ITS)
NCI-H441	American Type Culture Collection, LGC Standards (Wesel)
Kulturmedium	RPMI 1640 Medium mit 10% csFBS und 1% Natrium-Pyruvate
Transwell Filter	Costar 3470 Corning, Fisher Scientific (Deutschland)

2.1.4 Funktionelle Lösungen

Tabelle 4: Funktionelle Lösungen (D_2O: Deuteriumoxid; HEPES: Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure)

D_2O-Lösung	D_2O mit 0,9 % NaCl
HEPES-Ringer Lösung	140 mM NaCl, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES, 5 mM KCl, 2,5 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 mM KH_2PO_4, 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; pH 7,4 (mit NaOH titriert)
HEPES-Gluconat-Ringer Lösung	140 mM Na-Gluconat, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES, 5 mM K-Gluconat, 2,5 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 mM KH_2PO_4, 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; pH 7,4 (mit NaOH titriert)

2.2 Methoden

2.2.1 NCI-H441 Lungenepithelzellen und Zellkultur

NCI-H441 Zellen wurden von American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Wesel) bezogen. Die Zellen wurden in 25 cm² Kulturflaschen mit 10 ml Kulturmedium (Tabelle 3) kultiviert. Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2. Zur Subkultivierung (Passagieren) der Zellen wurden die adhärenten Zellen in Suspension gebracht. Dazu wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit 10 ml PBS gespült und anschließend mit 1 ml einer Trypsinlösung überschichtet (Tabelle 1) und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trypsinierung wurde nach 4 Minuten durch Hinzufügen von 9 ml Kulturmedium (Tabelle 3) gestoppt, und die Zellsuspension mit 800 U/min für 2 Minuten zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde mit 5 ml Kulturmedium re-suspendiert. Nach Bestimmung der Zelldichte, mittels Lichtmikroskop und Hämozytometer, wurden die Zellen in einer Zelldichte von $3x10^5$ in Zellkulturflaschen ausgesät.

Für Kurzschlussstrom- und Wassertransportmessungen wurden H441-Zellen auf Filtermembranen gezüchtet. Dafür wurden Transwell Polyester Filter (Tabelle 3) mit einem Durchmesser von 0,33 cm² und einer Porengröße von 0,4 µm, dem apikalen Kompartiment 200 µl Kulturmedium mit etwa 10^3 Zellen zugegeben. Das basolaterale Kompartiment wurde mit 500 µl Kulturmedium gefüllt. Nach Kultivierung in 24-Well-Zellkulturplatten wurde am vierten Tag durch Abpipettieren des apikalen Zellkulturmedium ein air-liquid-interface (ALI) hergestellt. Im basolateralen Kompartiment wurde das Kulturmedium durch ein sogenanntes air-liquid-interface Medium (Tabelle 3) ersetzt. In den nächsten zwei bis drei Tagen wurde täglich im apikalen Kompartiment gegebenenfalls noch vorhandene Flüssigkeit abpipettiert. Am Tag sechs bis sieben wurde ein stabiles ALI erreicht. Das ALI-Medium auf der basolateralen Seite wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Kurzschlussstrom- und Wassertransportmessungen wurden am elften Tag durchgeführt.

2.2.2 Wassertransportmessung mittels D_2O-Dilutionsmethode

Wasser und Deuteriumoxid (D_2O) sind aufgrund des unterschiedlichen molekularen Aufbaus und somit unterschiedlichen Infrarotabsorptionsspektrums mittels Infrarotspektroskopie voneinander unterscheidbar. Durch die Konzentrationsverdünnungsmethode ist es somit möglich, ein zuvor unbekanntes Wasservolumen genauestens zu quantifizieren. Diese sogenannte D_2O-Verdünnungs-Methode wurde vor kurzem etabliert [69] und soll im Folgenden nochmal zusammenfassend erläutert werden.

Für die Wassertransportmessungen wurden Transwell Filter mit einer konfluenten NCI-H441 Epithelschicht und stabilem ALI verwendet. Die Filter wurden in 24-Well-Zellkulturplatten überführt und das basolaterale Kompartiment mit 450 µl ALI-Medium (Tabelle 3) befüllt, das zuvor bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 äquilibriert worden war. Bei Kontrollfiltern wurde das apikale Kompartiment jeweils mit 25 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung ($V_{t=0}$; apikales Volumen zum Zeitpunkt 0) befüllt. Kontrollfilter aus der gleichen Zellcharge dienten als Kontrolle für Filter, bei denen das apikale Kompartiment mit 25 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung und einem darin in angegebener Konzentration gelöstem Kanalmodulator befüllt wurde ($V_{t=0}$). Das basolaterale Kompartiment wurde auf gleiche Weise unter Kontrollbedingungen mit ALI-Medium oder unter Testbedingungen mit ALI-Medium und einem darin gelösten Kanalmodulator (in angegebener Konzentration) befüllt.

Um Messfehler durch Verdunstungseffekte zu vermeiden, wurden Zwischenräume der 24-Well-Zellkulturplatten mit 0,9 %iger NaCl-Lösung (9 ml) befüllt. Zusätzlich wurden Evaporationskontrollen, mit Silikon abgedichtete Filter, mit 25 µL 9 %iger NaCl-Lösung befüllt.

Nach 16 Stunden Inkubationszeit bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 wurde das apikale Kompartiment mit 25 µL D_2O (Sigma-Aldrich, Steinheim), in dem 0,9% NaCl gelöst waren (V_{D2O}), verdünnt. Das resultierende H_2O/D_2O-Mischvolumen wurde aus dem apikalen Kompartiment mittels einer Pipette aspiriert und in verschließbare Aliquot-Röhrchen eingegeben (V_{api}).

Die Wasserkonzentration (C_{H2O}) in V_{api} wurde mittels MIR-ATR-Spektroskopie („attenuated total reflection midinfrared spectroscopy“) analysiert. Es wurde ein FT-IR Spektrometer (Vertex 70) mit durch Flüssigstickstoff gekühltem MCT-Detektor („mercury-cadmium-telluride detector“) und einer BioATRCell-II-Einheit verwendet (alle Geräte von Bruker Optics, Ettlingen). Im Infrarotabsorptionsspektrum präsentieren H_2O und D_2O analoge, aber in der Frequenz verschobene Absorptionsbanden. DHO, welches sich in einem H_2O/D_2O-Gemisch bildet, präsentiert drei unterschiedliche Absorptionsbanden [56]: Die sogenannte H-O Streckschwingungsbande, D-O Streckschwingungsbande und die D-O-D Deformationsschwingungsbande. Es wurde gezeigt, dass die Banden ein fast lineares Verhältnis zwischen Absorption und H_2O Konzentration aufweisen (bei H_2O Konzentrationen im Bereich von 1% bis 65%) [69].

Vor jeder Messreihe wurde eine Kalibrierungsserie mit 15%, 25%, 40% und 65% H_2O in D_2O vorbereitet. Vor jeder Messung wurde eine Leermessung durchgeführt und anschließend 15 µl der Probe mit 100 Scans in einer Wellenzahl von 4000 bis 400 cm^{-1} und Spektralauflösung von 4 cm^{-1} gemessen. Die Fläche unterhalb der gemessenen Absorptionsbanden (H-O Streckschwingungsbande: 3810.6 cm^{-1} – 2805cm^{-1}, D-O Streckschwingungsbande: 2774 cm^{-1} – 2070cm^{-1} und die D-O-D Deformationsschwingungsbande: 1818 cm^{-1} – 1090cm^{-1}) wurde gegen die bekannte Wasserkonzentrationen einer Kalibrierungsreihe (15%, 25%, 40%, 50%, und 65%) aufgetragen. Es wurde die lineare Regression ($R^2 \geq 0{,}991$) für die einzelnen Absorptionsbanden berechnet. Die Wasserkonzentration wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$C_{H2O} = \frac{(I_N - \gamma_0)}{m}$$

C_{H2O} als Wasserkonzentration in %; I_N als Fläche unterhalb der einzelnen Absorptionsbanden, m als Steigung und y_0 als Y-Achsenabschnitt.

Mit der so bestimmten Wasserkonzentration kann mittels der folgenden Formel das apikale Volumen berechnet werden:

$$V_{api} = \frac{C_{H2O} * V_{D2O}}{(100 - C_{H2O})}$$

Um Verdunstungsverluste während der Inkubation zu berücksichtigen, wurden unbehandelte Evaporationskontrollfilter mit 25 µl 0,9 %ige NaCl-Lösung ($V_{t=0}$) befüllt. Nach 16 h Inkubationszeit wurde das verbliebende Volumen (V_{evap}) gemessen;

$$\Delta V_{evap} = V_{t=0} - V_{evap}$$

Rechnerisch erhält man ein Volumen mit korrigiertem Verdunstungsverlust (ΔV_{cor}):

$$\Delta V_{cor} = \Delta V_{api} - \Delta V_{evap}$$

Die Transportrate (*F*) repräsentiert das transportierte Volumen (ΔV_{cor}) über die Epithelschicht (*M*) in einer bestimmten Inkubationszeit (t_{inc});

$$F = \frac{\Delta V_{cor}}{(t_{inc} * M)}$$

wobei *M* = 0,33 cm² (Fläche der Transwell Filter) und t_{inc} = 16 h (gewählte Inkubationszeit).

Um Ergebnisse aus verschiedenen Zellpassagen mit unterschiedlichen absoluten Transportraten zusammenfassen zu können, wurden relative Transportraten berechnet (F_{rel}):

$$F_{rel} = \frac{F_{sample}}{F_{control}}$$

F_{sample} entspricht der Transportrate von Filtern mit Kanalmodulator; $F_{control}$ entspricht der durchschnittlichen Transportrate von Filtern unter Kontrollbedingungen und aus der gleichen Zellpassage.

2.2.3 Kurzschlussstrommessung in der Ussing-Kammer

Um den elektrogenen Ionentransport über die Epithelzellschicht zu quantifizieren, wurden Kurzschlussstrommessungen mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik durchgeführt. Epithelien wurden unter ALI-Bedingungen kultiviert und in eine Ussing-Kammer eingesetzt. Das apikale und basolaterale Kompartiment der Ussing-Kammer wurde mit 5 ml HEPES-Ringer Lösung (Tabelle 4) befüllt, die auf 37°C erwärmt war. Ein integrierter Heizkreislauf hielt die Lösung in der Ussing-Kammer auf einer Temperatur von 37°C. Beide Kompartimente wurden mit einem Luftstrom durchperlt und somit in ständiger

Umwälzung gehalten („bubble lift“). Kanalmodulatoren wurden, wenn nicht anders angegeben, in das apikale Kompartiment zugegeben. Bei Experimenten mit einem Elektrolytgradienten wurden Chloridionen durch Gluconationen ersetzt (HEPES-Gluconat-Ringer Lösung,Tabelle 4). Die transepitheliale Spannung V_{te} wurde durch Injektion eines Stromes auf 0 mV geklemmt. Dieser Strom wird als Kurzschlussstrom (I_{sc}) bezeichnet und wurde alle 5 s über die gesamte Versuchsdauer bestimmt. Aus der gemessenen transepithelialen Spannung U und dem ermittelten I_{sc} kann der transepitheliale Widerstand R_{te} berechnet werden. Nachdem Erreichen eines konstanten I_{sc} wurden Kanalmodulatoren in angegebener Konzentration in das apikale Kompartiment gegeben. Der ermittelte I_{sc} wird in µA/cm² ± Standardfehler angegeben. Ein positiver I_{sc} entspricht dabei einer elektrogenen Resorption von Kationen oder eine elektrogenen Sekretion von Anionen.

2.3 Statistische Analyse

Ergebnisse wurden als arithmetisches Mittel ± SEM (standard error of the mean = Standardfehler) dargestellt. Dabei gilt $SEM = \sigma / \sqrt{n}$ mit σ = Standardabweichung der Grundgesamtheit und n = Stichprobenumfang. Abweichende Darstellungen sind entsprechend angegeben. Die statistische Auswertung wurde mit der Software GraphPad Prism Version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, USA) für Microsoft Windows durchgeführt. Um das Signifikanzniveau zu überprüfen, wurde der t-Test für unabhängige Stichproben für den Vergleich von zwei Gruppen mit normalverteilten Messwerten und gleichen Varianzen durchgeführt. Für den Vergleich zweier Messzeitpunkte wurde entsprechend der t-Test für abhängige Stichproben gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Wassertransportmessung von NCI-H441 Lungenepithelzellen

3.1.1 Basale Wassertransportrate

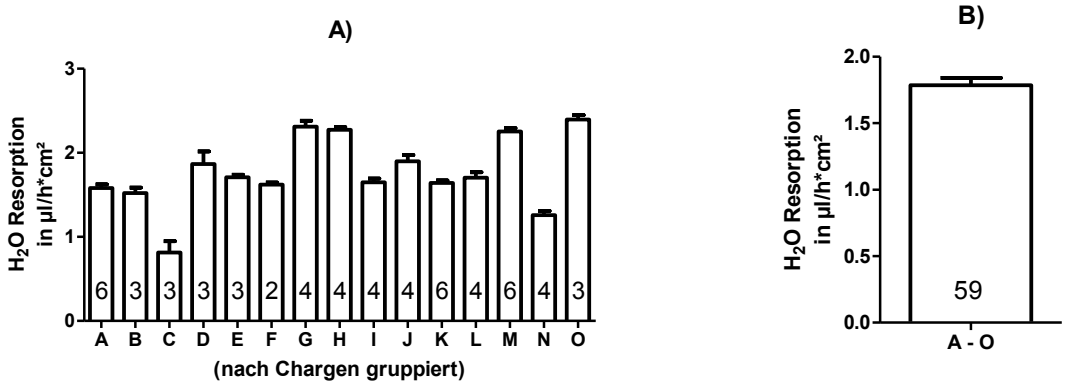

Abbildung 1: Mittlere Wassertransportraten von auf Filtern kultivierten NCI-H441 Lungenepithelzellen nach Zellchargen gruppiert (A) und Zusammenfassung der Messwerte aus allen Zellchargen A-O (B). Die in den Säulen angegeben Zahlen entsprechen der Anzahl der jeweils untersuchten Filter. Auf die apikale Oberfläche des Epithels wurden 25 µl 0,9 %ige NaCl-Lösung zugegeben und das apikale Volumen nach 16 Stunden mittels D2O-Dilutionsmethode gemessen und darüber die Wassertransportrate bestimmt. In allen untersuchten Filtern kam es zu einer Resorption der apikal zugegebenen Flüssigkeit. Die Resorptionsrate ist in µl/h * cm² angegeben. Die Höhe der Säulen entspricht dem jeweiligen Mittelwert, die vertikalen Markierungen kennzeichnen den Standardfehler (SEM).

Um die basale Wassertransportrate von auf Filtern gezüchteten NCI-H441 Lungenepithelzellen zu bestimmen, wurden 25 µl 0,9 %iger Kochsalzlösung auf die apikale Oberfläche der Zellen gegeben, ohne diese pharmakologisch zu stimulieren. Nach 16 h wurde das apikale Restvolumen mittels D_2O-Dilutionsmethode bestimmt und daraus die Wassertransportrate berechnet. In allen untersuchten Zellchargen konnte eine Resorption von apikaler Flüssigkeit beobachtet werden, wobei die mittleren Transportraten von Zellcharge zu Zellcharge variierten (Abbildung 1A). Die Resorptionsraten hatten in 15 unterschiedlichen Zellchargen (A-O) folgende Mittelwerte (in µL/h*cm² ± SEM): A: 1,58 ± 0,10; B: 1,52 ± 0,11; C: 0,82 ± 0,23; D: 1,87 ± 0,26; E: 1,71 ± 0,05; F: 1,62 ± 0,04; G: 2,31 ± 0,14; H: 2,27 ± 0,06; I: 1,65 ± 0,09; J: 1,90 ± 0,15; K: 1,64 ± 0,08; L: 1,70 ± 0,13; M: 2,26 ± 0,09; N: 1,26 ± 0,10; O: 2,40 ± 0,09. Das arithmetische Mittel aus allen gemessenen Resorptionsraten (n=59) betrug 1,79 ± 0,05 µl/h*cm (Abbildung 1B). Die Ergebnisse zeigen, dass die individuellen Transportraten von Filtern

aus einer Zellcharge weniger stark variierten als die mittleren Transportraten von Filtern unterschiedlicher Zellchargen. Unter ALI-Kulturbedingungen präsentierten nicht-stimulierte H441 Zellen in allen untersuchten Chargen eine deutliche Flüssigkeitsresorption. Wegen der unterschiedlichen Absolutwerte der mittleren Transportraten in unterschiedlichen Zellchargen wurden im Folgenden die Ergebnisse der Transportmessungen normalisiert und als Relativwerte dargestellt (siehe Material u. Methoden).

3.1.2 Einfluss von Amilorid auf die Wasserresorption

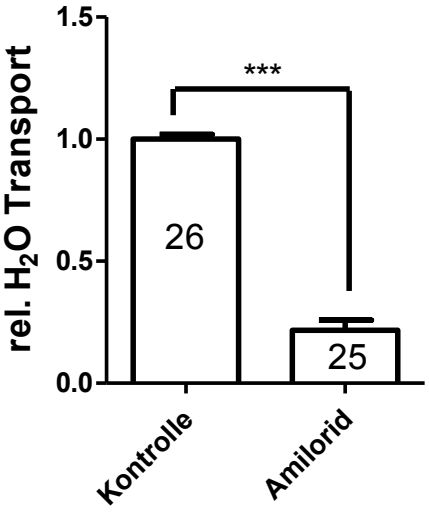

Abbildung 2: Einfluss von Amilorid auf den Wassertransport von NCI-H441 Lungenepithelzellen. Auf die apikale Oberfläche des Epithels wurden 25 µl 0,9 %ige NaCl-Lösung zugegeben und das apikale Volumen nach 16 Stunden mittels D_2O-Dilutionsmethode gemessen und darüber die Wassertransportrate bestimmt. Zur Inhibition von ENaC (epithelialer Natriumkanal) wurde dem apikalen und basolateralen Kompartiment Amilorid (30 µM) zugegeben. Parallel zu den Experimenten mit Amiloridzugabe (Amilorid) wurden Kontollexperimente (Kontrolle) durchgeführt ohne Amilorid. Die individuellen Messwerte wurden auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollmessungen normalisiert. Die Anzahl der untersuchten Filter ist in der jeweiligen Säule angegeben. Die Höhe der Säulen entspricht dem jeweiligen Mittelwert, die vertikalen Markierungen kennzeichnen den Standardfehler (SEM). Zweiseitiger P-Wert: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Teilergebnisse der Abbildung wurden vorab veröffentlicht in Korbmacher JP et al. [48] DOI: 10.1002/phy2.201, Abbildung wurde modifiziert (Deutsch, Filteranzahl, Darstellung), CC-BY 3.0, https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode

Um den Einfluss des durch ENaC vermittelten transepithelialen Na^+-Transports auf die Flüssigkeitsresorption zu bestimmen, wurde zusätzlich zum bekannten Versuchsaufbau (25 µl 0,9 %iger Kochsalzlösung auf die apikale Oberfläche des Epithels) Amilorid in einer Konzentration von 30 µM in das apikale und basolaterale Kompartiment hinzugegeben. In dieser Konzentration ist Amilorid ein zuverlässiger Inhibitor von ENaC. Nach 16 h wurde das apikale Restvolumen mittels D_2O-Dilutionsmethode bestimmt (Abbildung 2). Es zeigte sich eine signifikant reduzierte, relative Resorptionsrate in den mit Amilorid behandelten Filtern. So wurde die Resorptionsrate um fast 80% auf 0,22 ± 0,04 (n=25) reduziert. Dieser Befund spricht dafür, dass die ENaC vermittelte Na^+-Resoprtion eine wesentliche Triebkraft für die Flüssigkeitsresorption der NCI-H441 Lungenepithelzellen darstellt.

3.1.3 Einfluss von Chloridkanalmodulatoren auf die Wasserresorption

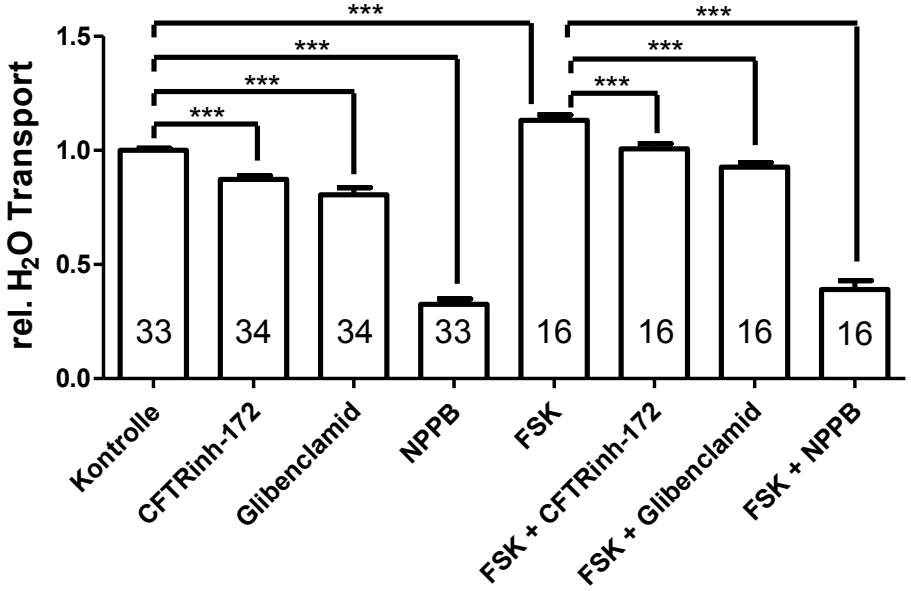

Abbildung 3: Einfluss von Chloridkanalmodulatoren und Forskolin auf den Wassertransport von NCI-H441 Lungenepithelzellen. Auf die apikale Oberfläche des Epithels wurden 25 µl 0,9 %ige NaCl-Lösung zugegeben und das apikale Volumen nach 16 Stunden mittels D2O-Dilutionsmethode gemessen und darüber die Wassertransportrate bestimmt. Zur Beeinflussung der Chloridkanalfunktion wurden in das apikale und basolaterale Kompartiment folgende Modulatoren eingegeben: CFTRinh-172 (50 µM), Glibenclamid (100 µM), NPPB = 5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure (200 µM), FSK = Forskolin (50 µM), FSK (50 µM) + CFTRinh-172 (50 µM), FSK (50 µM) + Glibenclamid (100 µM), FSK (50 µM) + NBBP (200 µM). Die individuellen Messwerte wurden auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollmessungen normalisiert. Die Anzahl der untersuchten Filter ist in der jeweiligen Säule angegeben. Die Höhe der Säulen entspricht dem jeweiligen Mittelwert, die vertikalen Markierungen kennzeichnen den Standardfehler (SEM). Zweiseitiger P-Wert: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Teilergebnisse der Abbildung wurden vorab veröffentlicht in Korbmacher JP et al. [48], DOI: 10.1002/phy2.201, modifiziert (Deutsch, Filteranzahl, Darstellung), CC-BY 3.0, https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode

Um den Einfluss von Chloridkanälen auf die Flüssigkeitsresorption von NCI-H441 Lungenepithelzellen zu bestimmen, wurden unterschiedliche Kanalmodulatoren in der jeweils angegebenen Konzentration in das apikale und basolaterale Kompartiment hinzugegeben. Parallel dazu wurden Kontrollmessungen in unbehandelten Zellen durchgeführt. Nach 16 h wurde das apikale Restvolumen mittels D_2O-Dilutionsmethode bestimmt und darüber die Wassertransportrate bestimmt (Abbildung 3). Die individuellen Messwerte wurden auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollmessungen normalisiert und sind als relative Werte ± Standardfehler angegeben. Unter Kontrollbedingungen (25 µl 0,9 %iger Kochsalzlösung) betrug die relative Resorptionsrate 1,0 ± 0,05 (n=33). Im Vergleich zu Kontrollbedingungen wurde die Resorptionsrate durch Zugabe des spezifischen CFTR-Kanalinhibitor $CFTR_{inh}$-172 (50 µM) oder Glibenclamid (100 µM) um

13% auf 0,87 ± 0,02 (n=34) beziehungsweise um 19% auf 0,81 ± 0,02 (n=34) reduziert. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe des relativ unspezifischen Chloridkanalinhibitors NPPB (200 µM) (5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure), der eine Vielzahl von Chloridkanälen hemmt, zu einer erheblichen Reduktion des relativen Transports auf 0,33 ± 0,02 (n=33). Forskolin (50 µM), ein bekannter Stimulator der Adenylylcyclase, der dadurch einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration hervorruft und darüber CFTR-Chloridkanäle aktiviert, führte zu einer erhöhten Resorptionsrate von 1,13 ± 0,02. Dieser Resorptionsanstieg wurde bei gleichzeitiger Gabe von Stimulator und spezifischem CFTR-Kanalinhibitor fast vollständig aufgehoben (Forskolin 50 µM + $CFTR_{inh}$-172 50 µM, 1,01 ± 0,02, n=16). Hingegen zeigte sich bei gleichzeitiger Stimulation mit Forskolin (50 µM) und Kanalblockade durch Glibenclamid (100 µM) bzw. NPPB (200 µM) weiterhin eine reduzierte Transportrate (FSK + Glibenclamid 0,92 ± 0,02, n=16; FSK + NPPB 0,39 ± 0,04, n=16).

In weiteren Versuchen wurde der Effekt von 8 Br-cAMP (8-Bromoadenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat) alleine und in Kombination mit verschiedenen Chloridkanalinhibitoren auf die Wasserresorptionsrate untersucht (Abbildung **4**). 8 Br-cAMP ist ein membrangängiges cAMP-Analogon, das daher in die Zellen gelangen und dort ebenfalls CFTR-Chloridkanäle aktivieren kann. Ähnlich wie bei Gabe von Forskolin zeigte sich auch unter 8 Br-cAMP (100 µM) eine leicht erhöhte Resorptionsrate von 1,09 ± 0,03 (n=10). Wurde 8 Br-cAMP zusammen mit dem CFTR-Inhibitor $CFTR_{inh}$-172 (50 µM) appliziert, betrug die Transportrate 1,07 ± 0,04 (n=10) und unterschied sich damit nicht signifikant von der Transportrate in den allein mit 8 Br-cAMP behandelten Zellen. Dagegen waren die Transportraten von Zellen, die mit 8Br-cAMP (100 µM) in Kombination mit Glibenclamid (100 µM) oder mit 8Br-cAMP (100 µM) in Kombination mit NPPB (200 µM) behandelt wurden, leicht beziehungsweise erheblich reduziert im Vergleich zu den Transportraten der Zellen mit alleiniger Applikation von 8 Br-cAMP (0,99 ± 0,02 bzw. 0,39 ± 0,02, n=10).

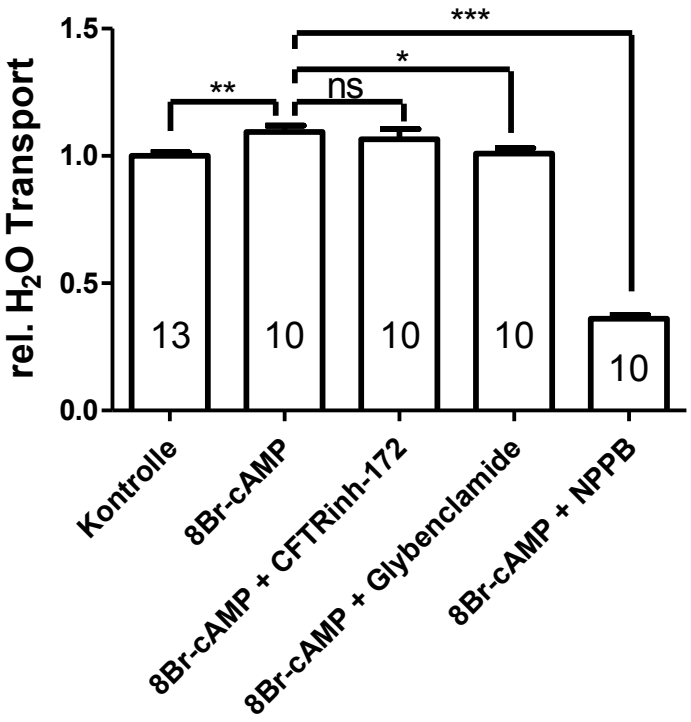

Abbildung 4: Einfluss von Chloridkanalmodulatoren und 8Br-cAMP auf den relativen Wassertransport von NCI-H441 Lungenepithelzellen. Auf die apikale Oberfläche des Epithels wurden 25 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung zugegeben und das apikale Volumen nach 16 Stunden mittels D_2O-Dilutionsmethode gemessen und darüber die Wassertransportrate bestimmt. Zur Beeinflussung der Chloridkanalfunktion wurden in das apikale und basolaterale Kompartiment folgende Modulatoren eingegeben: 8Br-cAMP = 8-Bromoadenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat (100 µM), 8Br-cAMP (100 µM) + $CFTR_{inh}$-172 (50 µM), 8Br-cAMP (100 µM) + Glibenclamid (100 µM), 8Br-cAMP (100 µM) + NBBP = 5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure (200 µM). Die individuellen Messwerte wurden auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollmessungen normalisiert. Die Anzahl der untersuchten Filter ist in der jeweiligen Säule angegeben. Die Höhe der Säulen entspricht dem jeweiligen Mittelwert, die vertikalen Markierungen kennzeichnen den Standardfehler (SEM). Zweiseitiger P-Wert: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

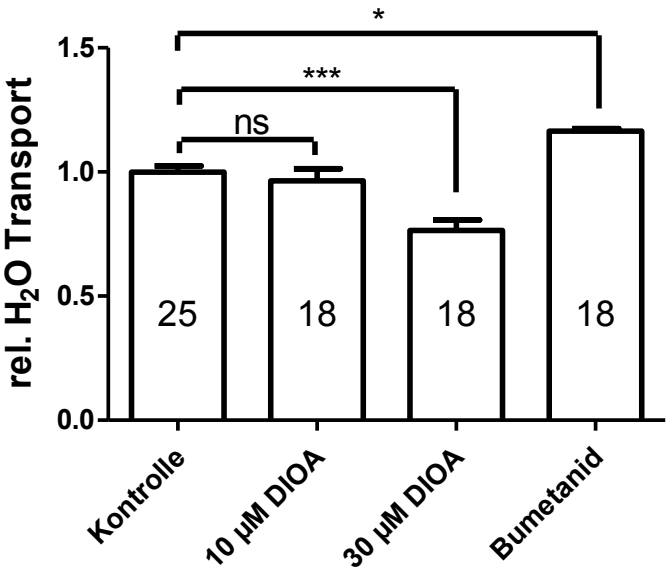

Abbildung 5: Einfluss von DIOA und Bumetanid auf den relativen Wassertransport von NCI-H441 Lungenepithelzellen. Auf die apikale Oberfläche des Epithels wurden 25 µl 0,9 %ige NaCl-Lösung zugegeben und das apikale Volumen nach 16 Stunden mittels D_2O-Dilutionsmethode gemessen und darüber die Wassertransportrate bestimmt. In das apikale und basolaterale Kompartiment wurden folgende Modulatoren von Chloridtransportern eingegeben: DIOA = R-(+)-[(2-n-Butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy]acetic acid (10 µM oder 30 µM) oder Bumetanid (100 µM). Die Resorptionsrate der apikal zugebenen Flüssigkeit ist in relativen Werten ± Standardfehler angegeben. Anzahl der untersuchten Filterepithelien (n=) ist im jeweiligen Balken angegeben. Die individuellen Messwerte wurden auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollmessungen normalisiert. Die Anzahl der untersuchten Filter ist in der jeweiligen Säule angegeben. Die Höhe der Säulen entspricht dem jeweiligen Mittelwert, die vertikalen Markierungen kennzeichnen den Standardfehler (SEM). Zweiseitiger P-Wert: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Teilergebnisse der Abbildung wurden vorab veröffentlicht in Korbmacher JP et al. [48], DOI: 10.1002/phy2.201, modifiziert (Deutsch, Darstellung, Bumetanid), CC-BY 3.0, https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode

Die Aktivität des basolateral gelegenen K^+/Cl^- Kotransporters ist von einem K^+-Gradienten, erzeugt durch die basolaterale Natrium-Kalium-Pumpe (Na^+/K^+-ATPase), abhängig. Es ist bekannt, dass DIOA (R-(+)-[(2-n-Butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy]acetic acid) in niedrigen Konzentrationen den K^+/Cl^- Kotransporter und in hohen Konzentrationen die Na^+/K^+-ATPase blockiert. Um eine unspezifische Blockade der Na^+/K^+-ATPase zu verhindern, wurden Wassertransportmessungen mit DIOA in einer Konzentration von 10 µM und 30 µM durchgeführt (Abbildung 5). Bei der geringen Konzentration von 10 µM wurde nur eine geringfügige Transportreduktion (0,96 ± 0,05, n=18) und bei dreifacher Konzentration (30 µM) eine deutliche Transportreduktion (0,77 ± 0,03, n=18) gemessen. Bumetanid (100 µM), ein weit verbreitetes Diuretikum und wirksam durch Blockade des basolateralen Na^+-$2Cl^-$-K^+- Kotransporters, führte zu einer Zunahme der relativen Transportrate auf 1,16 ± 0,01 (n=18).

3.2 Elektrolyttransport von NCI-H441 Lungenepithelzellen

Kurzschlussstrommessungen (I_{SC}) ermöglichen es, den elektrogenen Ionentransport über ein Epithel zu quantifizieren. Kanalmodulatoren können zu unterschiedlichen Zeitpunkten in das apikale oder basolaterale Kompartiment der Ussing-Kammer zugegeben werden und dienen der Charakterisierung der dem I_{SC} zugrunde liegenden Ionentransportprozesse.

3.2.1 Einfluss von Amilorid und NPPB auf den Kurzschlussstrom

In den unter 3.1 beschriebenen Wassertransportmessungen wurde die größte Reduktion des Flüssigkeitstransports unter dem Einfluss von Amilorid und NPPB festgestellt. Daher sollte mit Hilfe von Kurzschlussstrommessungen zunächst untersucht werden, ob diese Substanzen auch den transepithelialen Ionentransport von NCI-H441 Lungenepithelzellen beeinflussen. Nach dem Transfer der H441 Zellen in die Ussing-Kammer konnte in der Regel ein spontaner initialer Anstieg des I_{SC} beobachtet werden, wie das in den repräsentativen I_{SC}-Registrierungen in Abbildung 6A und Abbildung 6C zu erkennen ist. Nach etwa 20 Minuten wurde ein relativ stabiler basaler I_{SC}-Wert erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurden zum apikalen Kompartiment entweder 30 µM Amilorid (Abbildung 6A) oder 200 µM NPPB (Abbildung 6C) zugegeben. Die Applikation von Amilorid führte zu einer raschen Reduktion des I_{sc} um etwa 85 % (Abbildung 6A+B). Ergebnisse aus ähnlichen Experimenten sind in Abbildung 6B zusammengefasst. Der mittlere I_{SC} betrug in diesen Versuchen vor Amiloridzugabe 16,56 ± 0,87 µA/cm^2 (n=6) und danach nur noch 2,53 ± 0,38 µA/cm^2 (n=6). Dieser Befund spricht dafür, dass unter Kontrollbedingungen ein Großteil des I_{SC} auf einer durch ENaC-vermittelten transepithelialen elektrogenen Na^+-Resorption beruht. In Gegenwart von Amilorid verursachte die zusätzliche Gabe von NPPB nur eine geringfügige weitere Reduktion des I_{SC} (Abbildung 6A) auf im Mittel 1,83 ± 0,54 µA/cm^2 (n=6) (Abbildung 6 B). Im Gegensatz dazu reduzierte NPPB den basalen I_{SC} um etwa 65 %, wenn NPPB unter Kontrollbedingungen ohne vorherige Gabe von Amilorid appliziert wurde (Abbildung 6C und D). Im Mittel reduzierte NPPB den I_{sc} von 29,28 ± 2,96 µA/cm^2 auf 10,24 ± 1,15 µA/cm^2 (n=7). Die anschließende zusätzliche Gabe von Amilorid verringerte den I_{sc} rasch und signifikant weiter auf 7,00 ± 1,19 µA/cm^2 (n=7) (Abbildung 6 C und D).

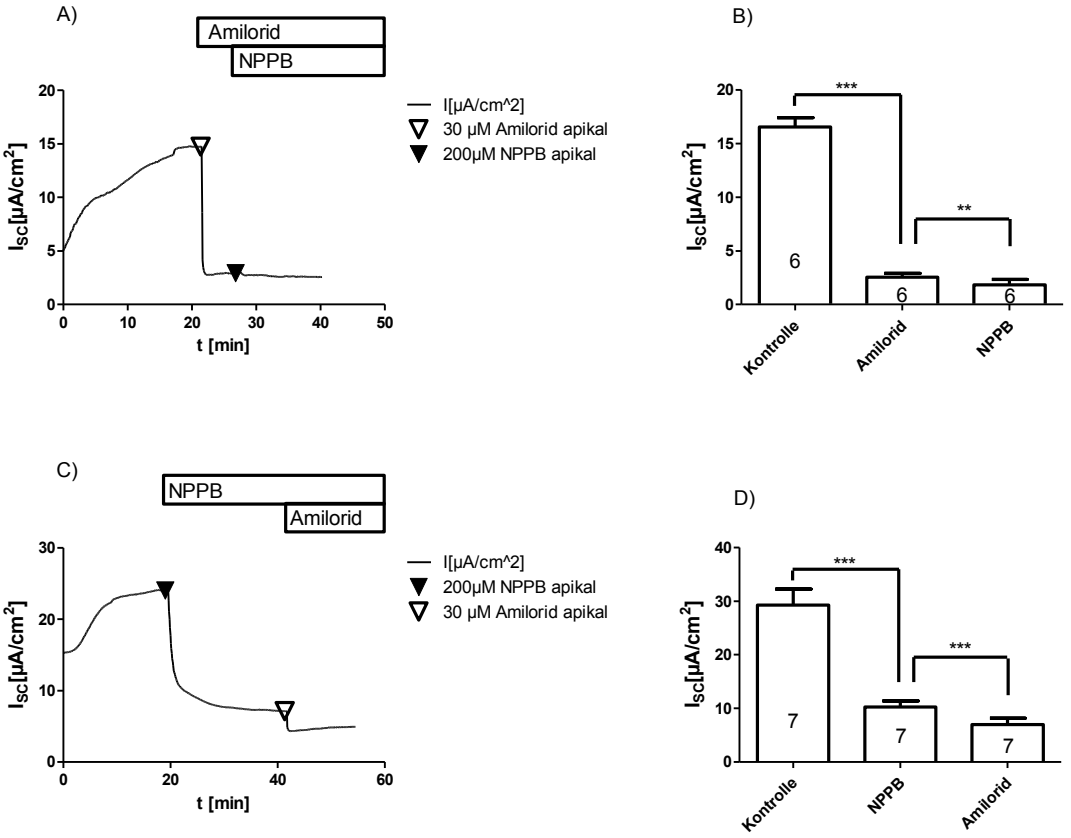

Abbildung 6: Einfluss von Amilorid und NPPB (5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure) auf den Kurzschlussstrom (I_{SC}) von NCI-H441 Lungenepithelzellen. Es werden repräsentative I_{SC}-Registrierungen gezeigt (A, C) und die Ergebnisse ähnlicher Versuche in entsprechenden Säulendiagrammen zusammengefasst (B, D). Die Symbole in den I_{SC}-Registrierungen kennzeichnen die Zeitpunkte, zu denen 30 µM Amilorid oder 200 µM NPPB apikal zugegeben wurden. Die kumulativ applizierten Substanzen verblieben nach Zugabe im apikalen Kompartiment, was durch die horizontalen Balken mit der Beschriftung NPPB beziehungsweise Amilorid verdeutlicht wird. In den korrespondierenden Säulendiagrammen sind die mittleren I_{SC}-Werte aus entsprechenden Versuchen zusammengefasst. Der I_{SC}-Wert der jeweils ersten Säule (Kontrolle) entspricht dem basalen I_{SC}-Wert, der nach einer initialen Stabilisierungsphase kurz vor Zugabe einer ersten Substanz erreicht wurde. Die weiteren Säulen zeigen die korrespondierenden I_{SC}-Werte, die in Gegenwart der Einzelsubstanzen (Amilorid oder NPPB) beziehungsweise der kumulativ applizierten Substanzen (Amilorid + NPPB oder NPPB + Amilorid) erreicht wurden. Die vertikalen Markierungen in den Säulendiagrammen kennzeichnen den Standardfehler (SEM). Zweiseitiger P-Wert: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Die Anzahl (n) der untersuchten Filter ist im jeweiligen Säulendiagramm angegeben. Die Abbildung wurde vorab veröffentlicht in Korbmacher JP et al. [48], DOI: 10.1002/phy2.201, modifiziert (Deutsch, Darstellung), CC-BY 3.0, https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode

3.2.2 Einfluss von Chloridkanalmodulatoren auf den Kurzschlussstrom

In den Wassertransportmessungen konnte eine Zunahme der Flüssigkeitsresorption nach Stimulation der NCI-H441 Lungenepithelzellen mit Forskolin gemessen werden. Daher wurde mit Hilfe von Kurzschlussstrommessungen untersucht, ob Forskolin auch einen Effekt auf den transepithelialen Ionentransport der H441-Zellen hat und welche Ionentransportmechanismen gegebenenfalls durch Forskolin beeinflusst werden.

Die drei repräsentativen I_{SC}-Registrierungen in Abbildung 7 (A, C E) zeigen, dass die Zugabe von Forskolin in allen Versuchsreihen zu einer deutlichen Zunahme des Kurzschlussstroms führte. In ähnlichen Versuchen, wie dem in Abbildung 7A gezeigten, betrug der mittlere I_{SC} unter Kontrollbedingungen vor Zugabe von Forskolin 14,12 ± 1,44 µA/cm^2 und erreichte unter Forskolin-Stimulation innerhalb von etwa 20 min einen Wert von 29,77 ± 2,10 µA/cm^2 (n=8) (Abbildung 7B). In Gegenwart von Forskolin bewirkte die Gabe des CFTR-Chloridkanalinhibitors $CFTR_{inh}$-172, dass der I_{SC} wieder fast auf das Ausgangsniveau zurückkehrte (18,17 ± 2,64 µA/cm^2, n=8). Nach zusätzlicher Gabe des unspezifischen Chloridkanalinhibitors NPPB nahm der I_{SC} weiter ab auf 1,90 ± 2,56 µA/cm^2 (n=8), was zu den Daten unter nicht stimulierten Bedingungen passt (Abbildung 6C und D). Die anschließende Zugabe von Amilorid bewirkt eine weitere geringfügige Reduktion des I_{sc} auf 0,60 ± 2,60 µA/cm^2 (n=8) (Abbildung 7B).

In Versuchen, wie dem in Abbildung 7 C gezeigten, wurde nach Stimulation mit Forskolin und Gabe von $CFTR_{inh}$-172 auf die Gabe von NPPB verzichtet und stattdessen gleich Amilorid appliziert. Die Ergebnisse solcher Versuche sind in Abbildung 7D zusammengefasst. Im Mittel betrug der I_{SC} unter Kontrollbedingungen 19,81 ± 7,06 µA/cm^2, stieg nach Forskolin-Stimulation auf 27,05 ± 2,10 µA/cm^2 an, ging nach Gabe von $CFTR_{inh}$-172 fast auf das Ausgangsniveau von 18,36 ± 0,65 µA/cm^2 zurück und wurde durch Amilorid sehr rasch auf 1,58 ± 0,69 µA/cm^2 reduziert (n=8). Der starke und instantane inhibitorische Effekt von Amilorid auf den I_{SC} ist im Einklang mit den Befunden an nicht stimulierten Zellen (Abbildung 6A und B).

In dem in Abbildung 7E dargestellten Versuch wurde nach der Stimulation von I_{SC} mit Forskolin zunächst Amilorid und dann erst $CFTR_{inh}$-172 appliziert. In dieser Versuchsserie betrug der mittlere I_{sc} unter Kontrollbedingungen 22,98 ± 3,21 µA/cm^2 und nach Forskolin-Stimulation 28,64 ± 0,42 µA/cm^2 (n=8). Der unter Forskolin erreichte I_{SC} wurde

durch Gabe von Amilorid wenigen Sekunden auf 2,03 ± 0,39 µA/cm^2 (n=8) reduziert und somit weitgehend gehemmt. Die anschließende Gabe von CFTR$_{inh}$-172 hatte praktisch keinen weiteren inhibitorischen Effekt auf den I_{SC}, der dann im Mittel 2,0 ± 0,42 µA/cm^2 (n=8) betrug (Abbildung 7 F). Diese Befunde zeigen, dass eine Inhibition von ENaC ausreicht, um nicht nur den überwiegenden Teil des basalen I_{SC} sondern auch den durch Forskolin stimulierten I_{SC} zu hemmen.

Um die Wirkung von Forskolin auf den Kurzschlussstrom zu charakterisieren, wurden zwei weitere Versuchsprotokolle benutzt (Abbildung 8). In Versuchen, wie dem in Abbildung 8A gezeigten, wurde zunächst Amilorid appliziert und damit der I_{SC} weitgehend gehemmt. In Gegenwart von Amilorid konnte keine Stimulation des I_{sc} durch Forskolin nachgewiesen werden. Abbildung 8B fasst Ergebnisse ähnlicher Versuche zusammen. Durch die Applikation von Amilorid wurde der I_{SC} von 18,83 ± 7,94 µA/cm^2 auf 1,42 ± 1,15 µA/cm^2 reduziert (n=8). Im weiteren Versuchsverlauf unterschieden sich die I_{SC}-Werte nach Zugabe von Forskolin (1,74 ± 1,46 µA/cm^2, n=8), CFTR$_{inh}$-172 (1,98 ± 1,81 µA/cm^2, n=8) und NPPB (0,85 ± 2,37 µA/cm^2, n=8) nicht signifikant vom jeweils vorherigen I_{SC}-Wert. Die Experimente zeigen, dass eine Hemmung des ENaC vermittelten transepithelialen Ionentransports mit Amilorid einen stimulatorischen Effekt von Forskolin auf den I_{SC} verhindert.

In der in Abbildung 8C gezeigten repräsentativen I_{SC}-Registrierung führte die Gabe von CFTR$_{inh}$-172 lediglich zu einer geringfügigen Abnahme des basalen I_{SC}. Im Mittel unterschieden sich die I_{SC}-Werte unter Kontrollbedingungen (22,93 ± 3,70 µA/cm^2, n=8)) und in Gegenwart von CFTR$_{inh}$-172 (20,79 ± 2,44 µA/cm^2, n=8) nicht signifikant voneinander. Dagegen hatte auch in dieser Versuchsserie Amilorid den üblichen starken und rasch einsetzenden inhibitorischen Effekt auf den I_{SC}, der in Gegenwart von Amilorid auf 2,03 ± 0,46 µA/cm^2 (n=8) reduziert wurde. Die anschließende Gabe von Forskolin blieb ohne Effekt mit einem mittleren I_{SC} von 1,89 ± 0,47 µA/cm^2 (n=8). Dies bestätigt die Beobachtung (Abbildung 8A und B), dass Forskolin in Gegenwart von Amilorid keinen stimulatorischen Effekt auf den I_{SC} hatte.

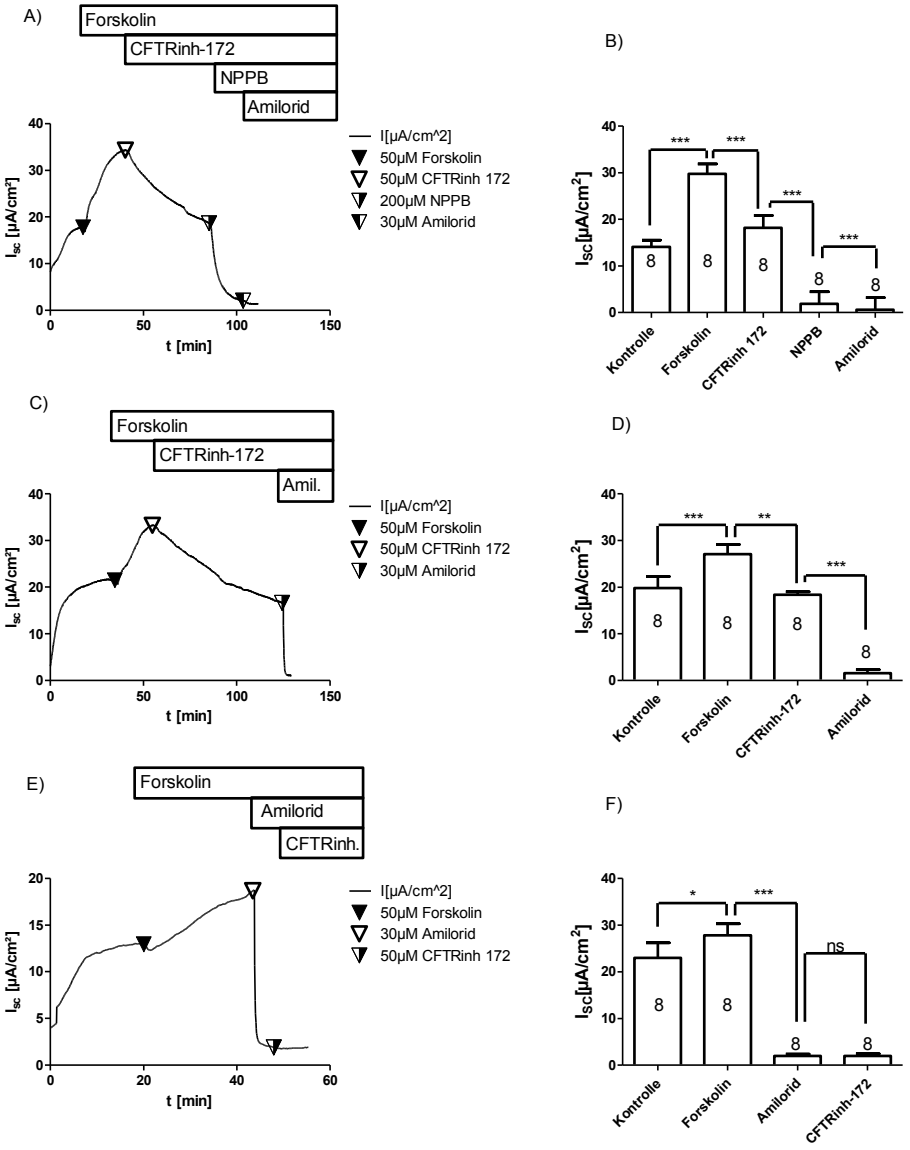

Abbildung 7: Einfluss von Forskolin und unterschiedlichen Kanalmodulatoren ($CFTR_{inh}$-172, Amilorid und NPPB (5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure)) auf den Kurzschlussstrom (I_{SC}) von NCI-H441 Lungenepithelzellen. Es werden repräsentative I_{SC}-Registrierungen gezeigt (A, C, E) und die Ergebnisse ähnlicher Versuche in entsprechenden Säulendiagrammen zusammengefasst (B, D, F). Die Symbole in den I_{SC}-Registrierungen kennzeichnen die Zeitpunkte, zu denen 50 µM Forskolin, 50 µM $CFTR_{inh}$-172, 200 µM NPPB =(5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure), 30 µM Amilorid apikal zugegeben wurden. Die kumulativ applizierten Substanzen verblieben nach Zugabe im apikalen Kompartiment, was durch die horizontalen Balken mit der Beschriftung Forskolin beziehungsweise CFTRinh-172 / NNPB / Amilorid verdeutlicht wird. In den korrespondierenden Säulendiagrammen sind die mittleren I_{SC}-Werte aus entsprechenden Versuchen zusammengefasst. Der I_{SC}-Wert der jeweils ersten Säule (Kontrolle) entspricht dem basalen I_{SC}-Wert, der nach einer initialen Stabilisierungsphase kurz vor Zugabe einer ersten Substanz erreicht wurde. Die weiteren Säulen zeigen die korrespondierenden I_{SC}-Werte, die in Gegenwart der Einzelsubstanzen (Forskolin) beziehungsweise der kumulativ applizierten Substanzen (B: Forskolin + $CFTR_{inh}$-172 + NPPB + Amilorid; D: Forskolin + $CFTR_{inh}$-172 +Amilorid; F: Forskolin + Amilorid + $CFTR_{inh}$-172) erreicht wurden. Die vertikalen Markierungen in den Säulendiagrammen kennzeichnen den Standardfehler (SEM). Zweiseitiger P-Wert: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Die Anzahl (n) der untersuchten Filter ist im jeweiligen Säulendiagramm angegeben. Die Abbildung A) und B) wurde vorab veröffentlicht in Korbmacher JP et al. [48], DOI: 10.1002/phy2.201, modifiziert (Deutsch, Darstellung), CC-BY 3.0, https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode

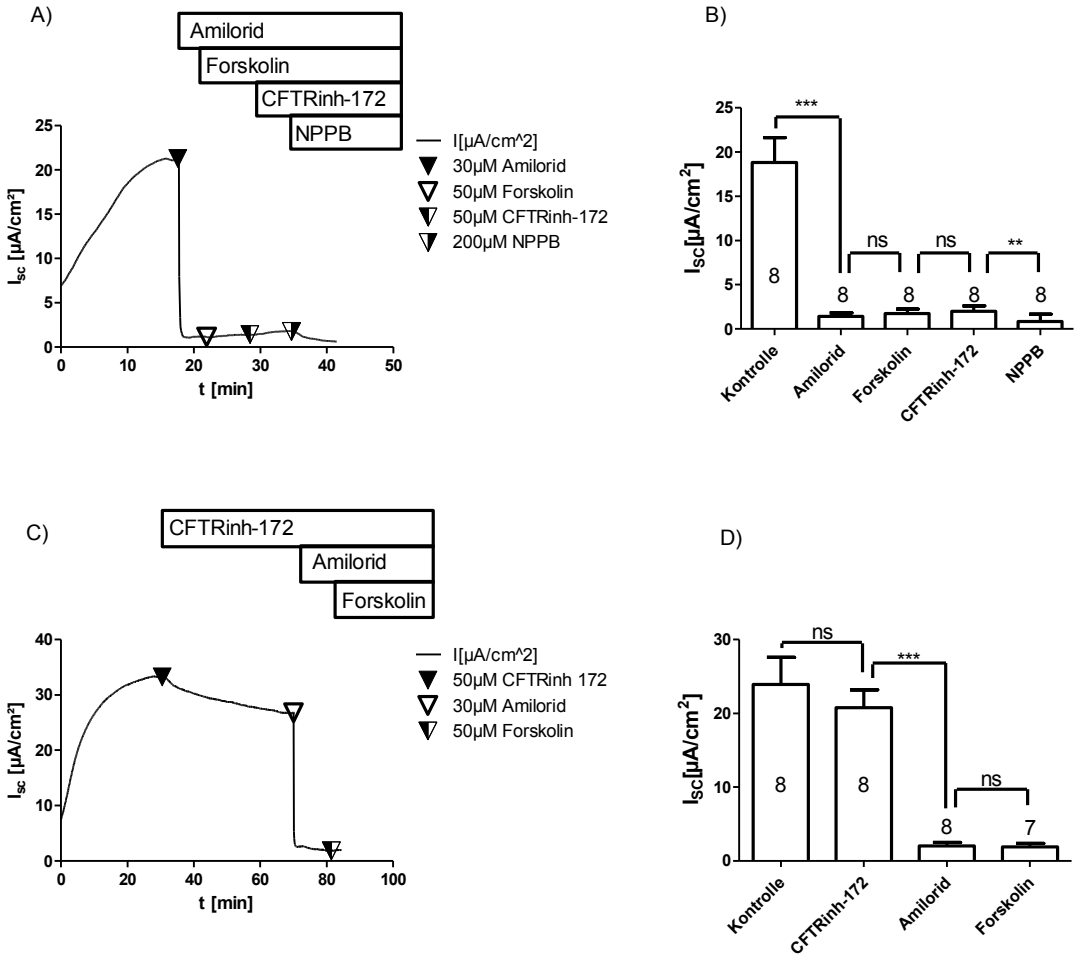

Abbildung 8: Einfluss von Forskolin und unterschiedlichen Kanalmodulatoren ($CFTR_{inh}$-172, Amilorid und NPPB (5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure)) auf den Kurzschlussstrom (I_{SC}) von NCI-H441 Lungenepithelzellen. Es werden repräsentative I_{SC}-Registrierungen gezeigt (A, C) und die Ergebnisse ähnlicher Versuche in entsprechenden Säulendiagrammen zusammengefasst (B, D). Die Symbole in den I_{SC}-Registrierungen kennzeichnen die Zeitpunkte, zu denen 30 µM Amilorid, 50 µM Forskolin, 50 µM $CFTR_{inh}$-172, 200 µM NPPB =(5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure), apikal zugegeben wurden. Die kumulativ applizierten Substanzen verblieben nach Zugabe im apikalen Kompartiment, was durch die horizontalen Balken mit der Beschriftung Amilorid beziehungsweise Forskolin / CFTRinh-172 / NNPB verdeutlicht wird. In den korrespondierenden Säulendiagrammen sind die mittleren I_{SC}-Werte aus entsprechenden Versuchen zusammengefasst. Der I_{SC}-Wert der jeweils ersten Säule (Kontrolle) entspricht dem basalen I_{SC}-Wert, der nach einer initialen Stabilisierungsphase kurz vor Zugabe einer ersten Substanz erreicht wurde. Die weiteren Säulen zeigen die korrespondierenden I_{SC}-Werte, die in Gegenwart der Einzelsubstanzen (B Amilorid; D $CFTR_{inh}$-172) beziehungsweise der kumulativ applizierten Substanzen (B: Amilorid + Forskolin + $CFTR_{inh}$-172 + NPPB; D: $CFTR_{inh}$-172 + Amilorid + Forskolin) erreicht wurden. Die vertikalen Markierungen in den Säulendiagrammen kennzeichnen den Standardfehler (SEM). Zweiseitiger P-Wert: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Die Anzahl (n) der untersuchten Filter ist im jeweiligen Säulendiagramm angegeben.

3.2.3 Einfluss von DIOA auf den Kurzschlussstrom

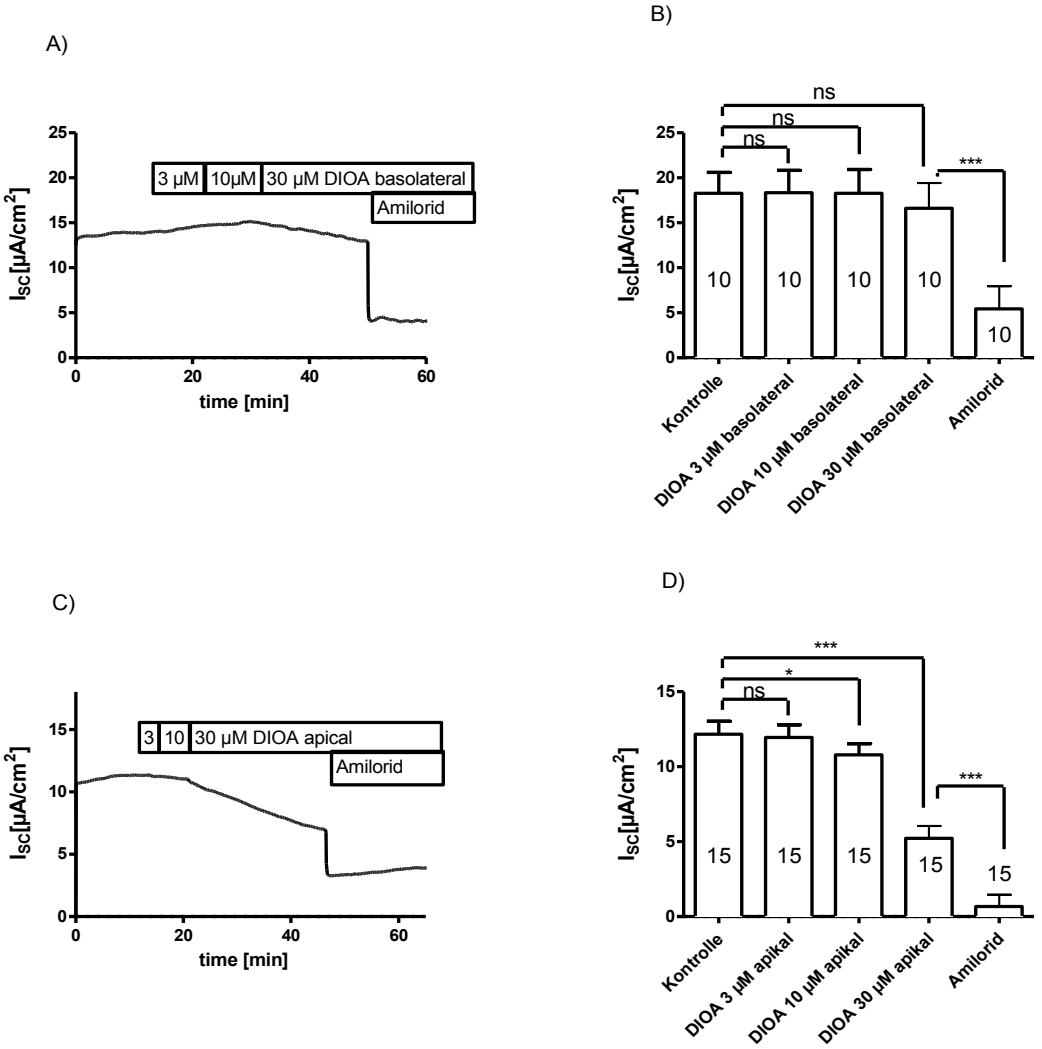

Abbildung 9: Einfluss von DIOA ((R-(+)-[(2-n-Butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy]acetic acid) in ansteigender Konzentration auf den Kurzschlussstrom (I_{SC}) von NCI-H441 Lungenepithelzellen. Es werden repräsentative I_{SC}-Registrierungen gezeigt (A, C) und die Ergebnisse ähnlicher Versuche in entsprechenden Säulendiagrammen zusammengefasst (B, D). Die Balken in den I_{SC}-Registrierungen kennzeichnen die Zeitpunkte, zu denen 3 µM DIOA, 10 µM DIOA, 30 µM DIOA basolateral (A) beziehungsweise apikal (C) zugegeben wurden. 30 µM Amilorid wurde in beiden Versuchsprotokollen apikal zugegeben. Die kumulativ applizierten Substanzen verblieben nach Zugabe im basolateralen (A) bzw. apikalen (C) Kompartiment, was durch die horizontalen Balken mit der Beschriftung DIOA (mit entsprechender Konzentration und Kompartiment) bzw. Amilorid verdeutlicht wird. In den korrespondierenden Säulendiagrammen sind die mittleren I_{SC}-Werte aus entsprechenden Versuchen zusammengefasst. Der I_{SC}-Wert der jeweils ersten Säule (Kontrolle) entspricht dem basalen I_{SC}-Wert, der nach einer initialen Stabilisierungsphase kurz vor Zugabe einer ersten Substanz erreicht wurde. Die weiteren Säulen zeigen die korrespondierenden I_{SC}-Werte, die in Gegenwart der Einzelsubstanzen (B: 3µM DIOA basolateral; D: 3 µM DIOA apikal) beziehungsweise der kumulativ applizierten Substanzen (B: basolateral: 3 µM DIOA, 10 µM DIOA, 30 µM DIOA und apikal 30µM Amilord; D: apikal 10 µM DIOA, 30 µM DIOA und 30µM Amilord) erreicht wurden. Die vertikalen Markierungen in den Säulendiagrammen kennzeichnen den Standardfehler (SEM). Zweiseitiger P-Wert: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Die Anzahl (n) der untersuchten Filter ist im jeweiligen Säulendiagramm angegeben. Die Abbildung wurde vorab veröffentlicht in Korbmacher JP et al. [48], DOI: 10.1002/phy2.201, modifiziert (Deutsch, Darstellung), CC-BY 3.0, https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode

Da DIOA in den Wassertransportmessungen bei einer Konzentration von 30 µM zu einer Reduktion der Flüssigkeitsresorption führte, wurde der Effekt von DIOA auch in Kurzschlussstrommessungen an H441-Zellen getestet. DIOA ist bekannt als ein Inhibitor des basolateral gelegenen K^+/Cl^- Kotransporters. Daher wurde DIOA in ansteigender Konzentration zunächst von basolateral appliziert. Eine repräsentative I_{SC}-Registrierung eines solchen Experiments ist in Abbildung 9A gezeigt, die Ergebnisse ähnlicher Experimente sind in Abbildung 9B zusammengefasst. Nach initialer Stabilisierung des Kurzschlussstroms unter Kontrollbedingungen führte die basolaterale Applikation von DIOA zu keiner signifikanten Veränderung des I_{sc} (Kontrolle 18,28 ± 2,33 µA/cm^2; DIOA 3 µM 18,33 ± 2,49 µA/cm^2; DIOA 10 µM 18,29 ± 2,61 µA/cm^2; DIOA 30 µM 16,59 ± 2,81 µA/cm^2, n=10). Die anschließende Zugabe von Amilorid zum apikalen Kompartiment führte dagegen zur üblichen raschen und deutlichen Reduktion des I_{SC} auf 5,44 ± 2,51 µA/cm^2 (n=10). Interessanterweise führte die apikale Applikation von DIOA in einer Konzentration von 10 µM zu einer geringen und bei 30 µM zu einer deutliche Abnahme des I_{sc} (Abbildung 9C). Im Mittel wurden in Versuchen mit apikaler DIOA-Applikation (n=15) folgende I_{SC}-Werte gemessen: Kontrolle 12,16 ± 0,87 µA/cm^2; DIOA 3 µM 11,94 ± 0,85 µA/cm^2; DIOA 10 µM 10,79 ± 0,74 µA/cm^2; DIOA 30 µM 5,24 ± 0,82 µA/cm^2. Auch in diesen Versuchen führte die anschließende apikale Gabe von Amilorid zu einer weiteren Reduktion des I_{SC} auf 0,68 ± 0,80 µA/cm^2. Die Versuche mit DIOA geben aber keinen Hinweis dafür, dass am transepithelialen elektrogenen Ionentransport der H441-Zellen ein basolateral lokalisierter DIOA sensitiver K^+/Cl^- Kotransporter beteiligt ist.

3.2.4 Kurzschlussstrom unter asymmetrischer Cl^- -Ionenverteilung

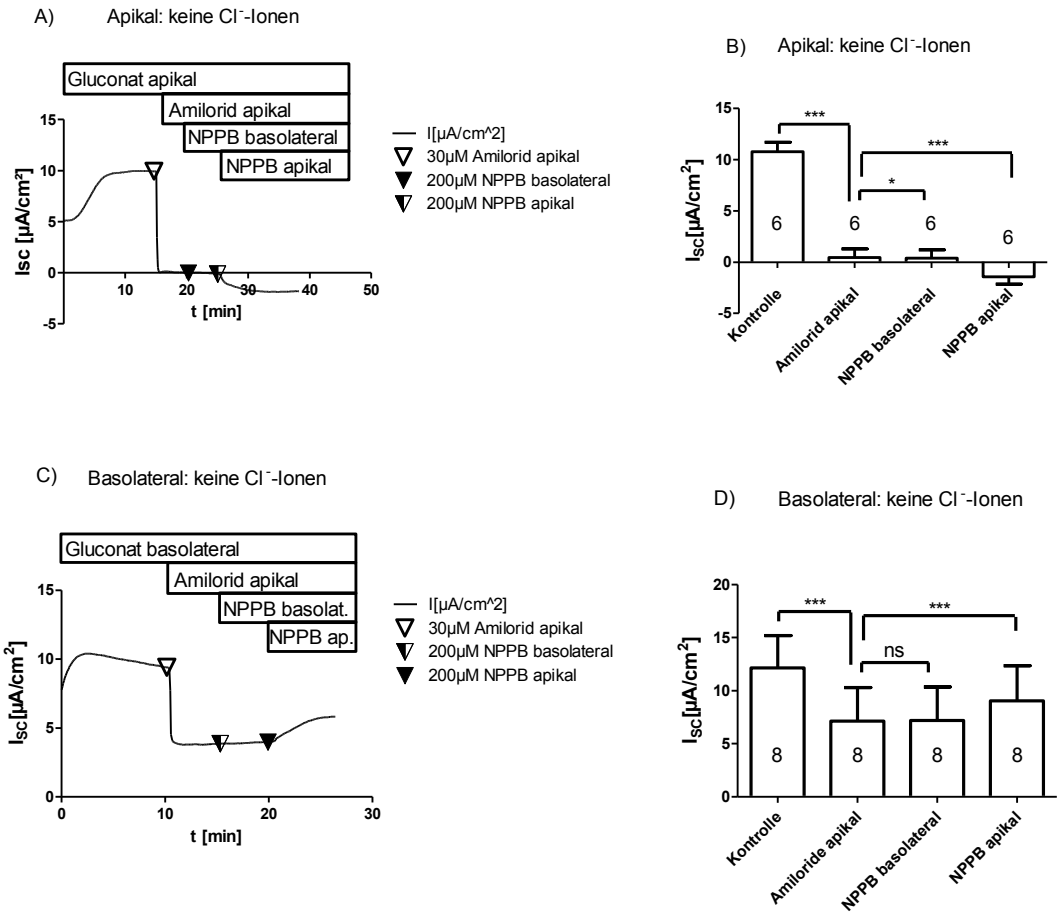

Abbildung 10: Einfluss von Amilorid und NPPB (5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure) auf den Kurzschlussstrom (I_{SC}) von NCI-H441 Lungenepithelzellen unter asymmetrischer Chloridionenverteilung. Die asymmetrische Ionenverteilung wurde durch Verwendung von Cl^- freier HEPES-Gluconat-Ringer Lösung (s. Material und Methoden) im apikalen oder basolateralen Kompartiment erreicht. Es werden repräsentative I_{SC}-Registrierungen gezeigt (A, C) und die Ergebnisse ähnlicher Versuche in entsprechenden Säulendiagrammen zusammengefasst (B, D). Die Symbole in den I_{SC}-Registrierungen kennzeichnen die Zeitpunkte, zu denen 30 µM Amilorid oder 200 µM NPPB apikal bzw. basolateral zugegeben wurden. Die kumulativ applizierten Substanzen verblieben nach Zugabe im apikalen oder basolateralen Kompartiment, was durch die horizontalen Balken mit der Beschriftung Amilorid beziehungsweise NPPB (basolateral o. apikal) verdeutlicht wird. In den korrespondierenden Säulendiagrammen sind die mittleren I_{SC}-Werte aus entsprechenden Versuchen zusammengefasst. Der I_{SC}-Wert der jeweils ersten Säule (Kontrolle) entspricht dem basalen I_{SC}-Wert, der nach einer initialen Stabilisierungsphase kurz vor Zugabe einer ersten Substanz erreicht wurde. Die weiteren Säulen zeigen die korrespondierenden I_{SC}-Werte, die in Gegenwart der Einzelsubstanzen (Amilorid) beziehungsweise der kumulativ applizierten Substanzen (Amilorid + NPPB basolateral + NPPB apikal) erreicht wurden. Die vertikalen Markierungen in den Säulendiagrammen kennzeichnen den Standardfehler (SEM). Zweiseitiger P-Wert: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Die Anzahl (n) der untersuchten Filter ist im jeweiligen Säulendiagramm angegeben. Die Abbildung wurde vorab veröffentlicht in Korbmacher JP et al. [48], DOI: 10.1002/phy2.201, modifiziert (Deutsch, Darstellung), CC-BY 3.0, https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode

Normalerweise werden Ussing-Kammer-Experimente ohne Ionengradienten zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment durchgeführt. Eine Asymmetrische Ionenverteilung bietet jedoch die Möglichkeit, gezielt für ein bestimmtes Ion einen Konzentrationsgradienten über das Epithel zu generieren und so Ionenströme zu identifizieren, die unter symmetrischen Bedingungen nur einen geringen Anteil am gesamt I_{sc} besitzen. Im Methoden-Teil wurde bereits beschrieben, dass in einigen Experimenten ein transepithelialer Ionengradient für Chloridionen generiert wurde, indem das apikale oder das basolaterale Kompartiment mit einer Chloridionen freien HEPES-Gluconat-Ringer-Lösung befüllt wurde (Tabelle 4). Es wurde somit ein Chloridionengradient von apikal nach basolateral bzw. in umgekehrter Richtung erzeugt und unter diesen Bedingungen Kurzschlussstrommessungen durchgeführt (Abbildung 10).

Das in Abbildung 10A gezeigte Experiment wurde mit HEPES-Gluconat-Ringer-Lösung im apikalen Kompartiment durchgeführt, wodurch ein transepithelialer Gradient für Chloridionen von basolateral nach apikal etabliert wurde. Unter diesen Bedingungen stellte sich nach einer Stabilisierungsphase ein basaler I_{sc} ein, der im Mittel 10,78 ± 0,94 µA/cm^2 (n=6) betrug (Abbildung 10B). Apikale Gabe von Amilorid reduzierte den I_{sc} auf 0,46 ± 0,85 µA/cm^2. Dieser Befund zeigt, dass auch unter diesen experimentellen Bedingungen der zu beobachtende I_{SC} wesentlich auf einem ENaC-vermittelten transepithelialen Na^+-Transport beruht. Eine anschließende basolaterale Applikation von NPPB führte zu einer minimalen weiteren Reduktion des I_{SC} auf 0,39 ± 0,83 µA/cm^2. Im Gegensatz dazu wurde nach apikaler Applikation von NPPB ein deutlich negativer I_{SC} von -1,4 ± 0,74 µA/cm^2 gemessen. Da das apikal applizierte NPPB vermutlich apikal lokalisierte Chloridkanäle inhibiert, spricht dieser Befund dafür, dass NPPB eine I_{SC}-Komponente hemmt, die auf einer Cl^--Sekretion beruht, die durch den transepithelialen Chloridionengradienten hervorgerufen wird und apikale Chloridkanäle involviert. Die Inhibition dieser chloridsekretorischen I_{SC}-Komponente könnte den beobachteten negativen I_{SC}-Wert erklären.

Bei dem in Abbildung 10C gezeigten Experiment befand sich eine HEPES-Gluconat-Ringer-Lösung im basolateralen Kompartiment, wodurch ein transepithelialer Chloridionengradient von apikal nach basolateral erzeugt wurde. Auch unter diesen experimentellen Bedingungen wurde durch apikale Gabe von Amilorid der basale I_{SC} von

12,15 ± 3,06 µA/cm^2 auf 7,14 ± 3,16 µA/cm^2 deutlich reduziert (n=8). Der durch Amilorid inhibierte Anteil des I_{SC} entspricht der durch den ENaC-vermittelten Transport verursachten I_{SC}-Komponente. Die anschließende basolaterale Applikation von NPPB hatte keinen signifikanten Effekt auf den I_{SC} (7,20 ± 3,15 µA/cm^2). Dagegen bewirkte die apikale Gabe von NPPB einen signifikanten Anstieg des I_{sc} auf 9,04 ± 3,33 µA/cm^2. Dieser Anstieg des I_{SC} könnte auf der Inhibition einer transepithelialen Chloridresorption beruhen, die durch den von apikal nach basolateral gerichteten Chloridionengradienten verursacht wird und apikale Chloridkanäle involviert, die durch apikale Gabe von NPPB gehemmt werden können. Der Wegfall der entsprechenden negativen I_{SC}-Komponente könnte den durch die apikale NPPB Gabe verursachten I_{SC} Anstieg erklären.

Zusammenfassend zeigt sich die Wirkung von Amilorid bei asymmetrischer Chloridionenverteilung weitgehend unverändert, was vermuten lässt, dass der ENaC vermittelte Ionentransport von transepithelialen Chloridgradienten wenig beeinflusst wird. Andererseits sprechen die apikalen Effekte von NPPB dafür, dass NPPB auf apikal lokalisierte Ionenkanäle wirkt. Die durch NPPB induzierten Änderungen im I_{sc} bei nicht symetrischen Cl^--Konzentration zeigen eine dem Grandienten entsprechende Stromrichtung. Das bedeutet, dass NPPB auf Cl^--Kanäle wirkt.

4 Diskussion

4.1 Methodische Ansätze zur Charakterisierung der Flüssigkeitsresorption

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente kombinieren eine neu etablierte Methode zur Wassertransportmessung mit Kurzschlussstrommessungen, um an NCI-H441 Lungenepithelzellen die der transepithelialen Flüssigkeitsresorption zugrunde liegenden Ionentransportmechanismen näher zu charakterisieren. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, ob neben dem durch ENaC vermittelten transepithelialen Ionentransport auch Cl^--Kanäle für den transepithelialen Wassertransport eine Rolle spielen. Idealerweise würde man solche Untersuchungen an nativem Alveolarepithel oder besser noch *in vivo* durchführen wollen. Dies ist aber aus technischen Gründen mit den oben erwähnten Methoden bisher nicht möglich. Daher wurde für die Untersuchungen ein etabliertes Zellkulturmodell des humanen distalen Lungenepithels verwendet. Mit Hilfe von Zellkulturmodellen konnten bereits wichtige Hinweise bezüglich Richtung, Geschwindigkeit und Regulation des transepithelialen Ionen- und Flüssigkeitstransportes des Alveolarepithels gewonnen werden. Allerdings gibt es bisher erst wenige Studien an nativen humanen Primärzellkulturen [8, 22], die vermutlich die *in vivo* vorhandenen Bedingungen am besten nachbilden können. Erst kürzlich wurden native ATII Zellen über zwei Passagen erfolgreich und ohne den bisher typischen Verlust von Transporteigenschaften kultiviert [9]. Die Verfügbarkeit humaner Primärzellkulturen ist allerdings weiterhin sehr limitiert, sodass alternativ zahlreiche Studien mit Primärzellen aus unterschiedlichen Tiermodellen durchgeführt wurden. Diese unterliegen immer speziesspezifischen Besonderheiten und schränken dadurch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ein. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die humane NCI-H441 Zelllinie als Modellsystem gewählt. Diese von ATCC (American Type Culture Collection) erhältliche Zelllinie wurde ursprünglich aus einem kleinzelligen humanen Lungenzellkarzinom gewonnen und ist vergleichsweise einfach in der experimentellen Handhabung. Dabei präsentieren unter entsprechenden Kulturbedingungen die H441-Zellen viele charakteristische Eigenschaften humaner ATII Zellen [36, 49, 69, 77, 81]. In den letzten Jahren haben sich daher NCI-H441 Lungenepithelzellen als ein zuverlässiges und gängiges Zellkulturmodell etabliert.

Zur Messung des transepithelialen Wassertransports wurde eine neu etablierte D_2O-Dilutionsmethode verwendet [69]. In früheren Studien zur Untersuchung der transepithelialen Flüssigkeitsresorption wurde die ASL-Höhe mittels mikroskopischer Techniken [1, 14] oder durch die Verwendung von Markersubstanzen im ASL [86] ermittelt. Nachteilig an der mikroskopischen Herangehensweise ist, dass die ASL-Höhe nur unzureichend mit dem ASL-Volumen korreliert [35] und aufgrund der nicht glatten Epitheloberfläche das Volumen an unterschiedlichen Messpunkten deutlich variieren kann. Bei hochmolekularen Markersubstanzen wurde zudem eine inhomogene Verteilung im ASL beschrieben [87]. Die Fluoreszenz der Marker kann außerdem durch pH Änderungen [33] oder durch Interaktion mit sezernierten Molekülen negativ beeinflusst werden [92].

Die neu etablierte D_2O-Dilutionsmethode [69] vermeidet diese experimentellen Fehlerquellen und erlaubt eine zuverlässige Quantifizierung des epithelialen ASL-Volumens. Dies ermöglicht die Bestimmung der transepithelialen Flüssigkeitsresorptionsrate mit einer bisher nicht erreichten Genauigkeit. Um Rückschlüsse auf die dem Flüssigkeitstransport zugrunde liegenden Ionentransportmechanismen zu ermöglichen, wurden parallel zu den Versuchen mit der D_2O-Dilutionsmethode traditionelle Kurzschlussstrommessungen durchgeführt.

4.2 Alveolare Wasserresorption und die Rolle von ENaC

Die aktive transepitheliale Flüssigkeitsresorption von ALF-Volumen ist eine der Hauptaufgaben des Alveolarepithels. Die transzelluläre Wasserresorption wird in erster Linie durch eine Nettoresorption von NaCl und der hohen Wasserpermeabilität des Epithels erreicht. Die elektrogene transepitheliale Na^+-Resorption, stellt eine aktive Transportleistung der Alveolarepithelzellen dar. Dabei vermittelt der in der apikalen Membran der Alveolarepithelzellen lokalisierte ENaC die Na^+-Aufnahme in die Zelle und ist der limitierende Schritt für die transepitheliale Na^+-Resorption [19]. Vermutlich tragen sowohl Typ1 als auch Typ2 Alveolarepithelzellen zur ENaC-vermittelten Na^+-Resorption und damit zur alveolaren Flüssigkeitsresorption bei [27, 46].

Die Grundlage für die Identifizierung des molekularen Transportmechanismus der apikalen Natriumaufnahme wurde 1994 gelegt, als drei Untereinheiten (α, β, γ) des ENaC-Kanals erfolgreich kloniert wurden [11]. Beim Menschen wurde zusätzlich eine δ-

Untereinheit identifiziert [93], die bei Maus und Ratte nicht nachweisbar ist. In-situ-Hybridisierung von δ-ENaC in menschlichen Lungenschnitten zeigte eine spezifische Expression in ATI und ATII Pneumozyten [104]. In H441 Zellen konnte die Expression von allen vier ENaC-Untereinheiten nachgewiesen werden [40, 43, 69]. Im Einklang mit bisherigen Studien [69], konnte in der vorliegenden Arbeit mittels der D_2O-Dilutionsmethode an H441 Epithelzellen nachgewiesen werden, dass die Zellen bereits unter nicht stimulierten Bedingungen ein resorptives Verhalten zeigen (Abbildung 1). Nach dem oben beschriebenen Modell der transepithelialen Flüssigkeitsresorption ist die Na^+-Aufnahme über ENaC der limitierende Faktor dieser Resorption. In der Tat wurde die Wasserresorption der H441-Epithelzellen durch den ENaC-Inhibitor Amilorid weitgehend gehemmt. Das spricht dafür, dass die ENaC-vermittelte Na^+-Resorption eine wesentliche Triebkraft für die Flüssigkeitsresorption der NCI-H441 Lungenepithelzellen darstellt (Abbildung 2). In parallelen Untersuchungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der unter Kontrollbedingungen gemessene transepitheliale Kurzschlussstrom ebenfalls Amilorid-sensitiv ist (Abbildung 6). Zusammen belegen diese Befunde, dass ein Großteil des I_{SC} und des transepithelialen Flüssigkeitstransports der H441-Zellen auf einer durch ENaC-vermittelten transepithelialen elektrogenen Na^+-Resorption beruhen.

Experimentelle Befunde an nativem Lungengewebe und *in vivo* Beobachtungen sprechen ebenfalls dafür, dass aktiver Na^+-Transport für die Resorption der Alveolarflüssigkeit von großer physiologischer und pathophysiologischer Bedeutung ist. Menschliches Lungengewebe von Tumorresektaten zeigte nach Exposition mit Amilorid oder mit g-Strophanthin (Ouabain), ein Na^+/K^+–ATPase-Inhibitor, eine Reduktion der AFC um fast 50% [80]. Ähnliche Experimente an isolierten Rattenlungen bestätigen diese Beobachtung [5, 6]. Darüber hinaus zeigen Knock-Out-Mäuse, bei denen die funktionell entscheidende α-Untereinheit von ENaC fehlt, eine insuffiziente pulmonale Flüssigkeitsresorption und sind aufgrund einer nach der Geburt persistierenden Flüssigkeitsfüllung der Lunge nicht überlebensfähig [37]. Beim Menschen kann eine reduzierte ENaC-Funktion im Rahmen eines autosomal rezessiv vererbten Pseudohypoaldosteronismus Typ I vorkommen. Hier verursachen ENaC-Mutationen einen Funktionsverlust (loss-of-function) des Kanals und führen zu einem lebensbedrohlichen renalen Salzverlustsyndrom mit Hyperkaliämie [3, 38]. Hierfür wurden Mutationen in allen drei ENaC-Untereinheiten (α, β, γ) identifiziert [88, 89]. Im Gegensatz zur αENaC-Knock-Out-Maus leiden Kinder mit

Pseudohypoaldosteronismus Typ 1 nach der Geburt nicht an einem persistierenden Lungenödem. Eine Fallstudie beschreibt ein Kind mit einer homozygoten loss-of-function Mutation der ENaC α-Untereinheit (SCNN1A Gen), welches die ersten neun Tage nach der Geburt keinerlei Atemunterstützung benötigte [38]. Somit scheint beim Menschen die Resorption alveolarer Flüssigkeit nicht kritisch von der αENaC-Funktion abhängig zu sein. Im Gegensatz zur Maus könnte beim Menschen eine fehlende Funktion der α-Untereinheit von ENaC möglicherweise durch die δ-Untereinheit des Kanals kompensiert werden. Außerdem könnten ENaC-unabhängige alternative Natrium-resorptionsmechanismen zu einer Kompensation einer reduzierten pulmonalen ENaC-Funktion beitragen, was das Überwiegen eines renalen Phänotyps bei Patienten mit Pseudohypoaldosteronismus Typ 1 erklären könnte. Als alternative Natriumresorptionsmechanismen werden in der Literatur nicht-selektiven-Kationen-Kanäle, andere selektive Natriumkanäle und der Natrium-Glukose-Kotransporter (SGLT1) als Kandidaten diskutiert [62, 64]. So wurde an der isolierten Rattenlunge neben einem Amilorid-hemmbaren Wassertransport auch ein Amilorid-insensitiver Wassertransport beschrieben, der durch Phlorizin, ein Inhibitor des Natrium-Glukose-Kotransporters, gehemmt werden kann [6]. In der Mauslunge konnte ein mRNA Nachweis des SGLT1 erbracht werden, jedoch zeigte eine luminale Glukose-Exposition keinen Einfluss auf die basale Flüssigkeitsresorption [39]. Diese Ergebnisse zeichnen somit kein klares Bild zur Bedeutung des Natrium-Glukose-Kotransporters für die alveolare Flüssigkeitsresorption. Interessanterweise gibt es Hinweise dafür, dass SGLT1 nicht nur Natrium und Glukose transportiert, sondern auch ein effektiver Wasser-Kotransporter ist [18, 24]. Die funktionelle Bedeutung von SGLT1 für den alveolaren Flüssigkeitstransport bleibt daher eine interessante Frage für zukünftige Forschung. Daneben scheint der SGLT1 auch pathophysiologisch bedeutend, in dem er durch den Natrium-Glukose-Kotransport die Glukosekonzentration des ALF verringert und somit zu einem sterilen und antibakteriellen Milieu beiträgt [31]. Zusammenfassend scheint für das Alveolarepithel das Modell einer rein ENaC-abhängigen Flüssigkeitsresorption eine zu vereinfachende Darstellung zu sein. Dafür spricht auch der in der vorliegenden Arbeit erhobene Befund, dass der transepitheliale Wassertransport der H441-Zellen zwar weitgehend aber nicht komplett (80 %; Abbildung 2) durch Amilorid gehemmt wurde.

4.3 Flüssigkeits- und Elektrolyttransport und der Einfluss von CFTR und anderen Chloridkanälen

4.3.1 Zunahme der Wasserresorption durch Anstieg des intrazellulären cAMP

Bezüglich der zentralen Rolle von ENaC und der Na^+/K^+ – ATPase für die Schaffung eines osmotischen Gradienten als Triebkraft für die alveoläre Flüssigkeitsresorption besteht weitgehend Konsens. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass auch die Funktion von apikalen CFTR-Chloridkanälen für die Flüssigkeitsresorption des Alveolarepithels eine Rolle spielen könnte. So lassen einige Studien einen Zusammenhang zwischen einer Zunahme der Flüssigkeitsresorption und einer cAMP vermittelten Aktivierung von CFTR vermuten [21, 25, 65].

Mittels Forskolin, einem bekannten Stimulator der Adenylylcyclase, der dadurch einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration hervorruft, können CFTR-Chloridkanäle stimuliert werden. Um einen möglichen Einfluss von CFTR auf die Flüssigkeitsresorption zu untersuchen, wurden H441-Lungenepithelzellen mit Forskolin stimuliert. Hier zeigte sich eine signifikante Forskolin-abhängige Zunahme der Wasserresorption um etwa 13 % (Abbildung 3). Auch in den korrespondierenden Kurzschlussstrommessungen konnte durch die Zugabe von Forskolin eine Zunahme des I_{sc} gemessen werden, die sogar deutlicher war als die Zunahme des Flüssigkeitstransports (Abbildung 7).

In weiteren Experimenten wurde der Effekt von 8 Br-cAMP, welches ein membrangängiges cAMP-Analogon darstellt und intrazellulär ebenfalls CFTR-Chloridkanäle aktivieren kann [103], auf den Wassertransport von H441-Zellen untersucht (Abbildung **4**). Ähnlich wie bei Gabe von Forskolin zeigte sich auch unter 8 Br-cAMP eine leicht erhöhte Wasserresorptionsrate. Im Gegensatz zum Forskolineffekt, der durch $CFTR_{inh}$-172 gehemmt wurde, reduzierte der $CFTR_{inh}$-172 die stimulatorische Wirkung von 8 Br-cAMP auf den Wassertransport nicht signifikant (Abbildung **4**). Dies lässt sich möglicherweise durch einen verzögerten Wirkungseintritt und eine längere Wirkdauer von 8 Br-cAMP erklären, welches zunächst die Membran passieren muss und anschließend intrazellulär nicht von der cyclischen AMP-Phosphodiesterase abgebaut werden kann [85]. So könnte bei einer nur partiellen Inhibition von CFTR ein

inhibitorischer Effekt von $CFTR_{inh}$-172 von einer weiter zunehmenden CFTR-Stimulation durch 8 Br-cAMP überlagert werden. Unabhängig davon sprechen die grundsätzlich ähnlichen Effekte von Forskolin und 8 Br-cAMP aber dafür, dass beide Substanzen an den H441-Zellen CFTR aktivieren und den Wassertransport stimulieren.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass vermutlich auch die ENaC-Aktivität durch Forskolin beziehungsweise durch einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration stimuliert wird. So steigert Forskolin beispielsweise in Epithelzellen des Sammelrohrs den Einbau von ENaC in die apikale Membran und erhöht somit den Amilorid-sensitiven I_{sc} [20, 78]. An Alveolarepithelzellen bewirkt das Sympathomimetikum Terbutalin, welches über eine Stimulation von β_2-Adrenozeptoren zu einem intrazellulären Anstieg von cAMP führt, eine Erhöhung der Offenheitswahrscheinlichkeit von ENaC und steigert vermutlich so die AFC in der Rattenlunge *in vivo* [17]. Auch in H441 Zellen wurde gezeigt, dass Forskolin den Einbau von ENaC-Untereinheiten in die apikale Membran fördert und somit den ENaC-abhängigen I_{sc} steigert [101]. Man muss also davon ausgehen, dass es in H441-Zellen bei einem intrazellulären Anstieg von cAMP sowohl zu einer Aktivierung von ENaC als auch zu einer Aktivierung von CFTR kommen kann.

Für eine cAMP-vermittelte Aktivierung von CFTR spricht der Befund, dass die Forskolin-abhängige Zunahme der Wasserresorption durch die gleichzeitige Applikation der Substanz $CFTR_{inh}$-172, die als spezifischer CFTR-Inhibitor gilt [55, 102], auf das Ausgangsniveau von nicht-stimulierten Kontrollepithelzellen gebracht werden (Abbildung 3). In den korrespondierenden Kurzschlussstrommessungen zeigte sich außerdem ein ähnlicher inhibitorischer Effekt von $CFTR_{inh}$-172 auf den zuvor durch Forskolin stimulierten I_{sc}.

Untersuchungen an einem Mausmodell für zystische Fibrose (ΔF508 Mäuse) ergaben überzeugende Hinweise für eine funktionelle Beteiligung von CFTR an der pulmonalen Flüssigkeitsresorption. So zeigten homozygote ΔF508-Mäuse, die keine funktionellen CFTR-Kanäle exprimieren, in Experimenten, bei denen durch hydrostatische Druckerhöhung ein Lungenödem erzeugt wurde, eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verlangsamte Flüssigkeitsresorption [25]. Darüber hinaus fehlte bei homozygoten ΔF508-Mäusen der stimulatorische Effekt des β-Agonisten Isoproterenol auf die Flüssigkeitsclearance der Lunge, der dagegen bei Wildtyp-Mäusen beobachtet werden

konnte [25]. Weiterhin wurde gezeigt, dass der CFTR-Inhibitor Glibenclamid an muriner und humaner Lunge die durch Isoproterenol verursachte Stimulation der Flüssigkeitsclearcance verhinderte [25]. Zusammen sprechen diese Befunde dafür, dass CFTR für die resorptive Eigenschaft des Alveolarepithels von funktionell wichtiger Bedeutung ist.

Im Gegensatz dazu hat CFTR in den konduktiven Atemwegen eine überwiegend sekretorische Funktion. Dort führt bei Patienten mit CF eine fehlende oder stark eingeschränkte CFTR-Funktion zu einer verminderten Sekretionsfähigkeit und einer gesteigerten Natriumresorption [90]. Letztere beruht vermutlich auf dem relativen Überwiegen des ENaC-vermittelten transepithelialen Transports. Dazu trägt möglicherweise auch der Wegfall eines in der Literatur kontrovers diskutierten inhibitorischen Effekts von CFTR auf ENaC bei [50, 67, 75]. Statt einer inhibitorischen Interaktion haben CFTR und ENaC in der distalen Lunge eher eine parallele und synergistische Funktion, die für die transepitheliale NaCl-Resorption förderlich zu sein scheint. Eine solche Parallelfunktion von ENaC und CFTR wird auch in den Ausführungsgängen menschlicher Schweißdrüsen für eine normale NaCl-Resorptionsleistung benötigt. So wurde berichtet, dass die Aktivierung von ENaC in den Ausführungsgängen menschlicher Schweißdrüsen eine entsprechende CFTR-Funktion und -Aktivierung voraussetzt. Dafür spricht auch der Befund, dass bei Patienten mit Mukoviszidose und defektem CFTR die Natriumresorption in den Ausführungsgängen der Schweißdrüsen durch cAMP nicht aktiviert werden konnte [76].

Analog zu dem postulierten Transportmodell für die Ausführungsgänge der Schweißdrüse könnte CFTR auch in der distalen Lunge für die ENaC-vermittelte Natriumresorption und damit für die transepitheliale NaCl- und Flüssigkeitsresorption unter bestimmten Bedingungen funktionell von Bedeutung sein.

Eine cAMP vermittelte Zunahme der Resorption durch eine Kostimulation von ENaC und CFTR könnte beispielweise eine Möglichkeit darstellen, die alveoläre Flüssigkeitsresorption kurzfristig zu erhöhen, um diese einer veränderten (patho-)physiologischen Situation akut anzupassen. Beim Menschen konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhalationstherapie mit einem β_2-Agonisten (Salmeterol), welcher einen intrazellulären Anstieg von cAMP verursacht, die Ausbildung eines Höhenlungenödems

verhindern kann [82] und bei Patienten mit postoperativem hydrostatischem Lungenödem die Sauerstoffsättigung ansteigen lässt [53]. In einer Multizenterstudie (BALTI-2) [29, 68], zeigte sich allerdings bei ARDS-Patienten keine geringere Mortalität, wenn diese inhalativ oder intravenös mit β_2-Agonisten behandelt wurden [32]. Für den fehlenden Effekt könnte das multifaktorielle Krankheitsbild des ARDS verantwortlich sein. So kommt es beim ARDS aufgrund von Apoptose und Nekrose neben der Ausbildung eines Lungenödems häufig auch zu einem Verlust der alveolaren Epithelbarriere [2, 64, 97]. Auch die kardialen Nebenwirkungen von β-Agonisten könnten ein Grund dafür sein, dass in der BALTI-2-Studie kein positiver Effekt der β_2-Agonisten beobachtet wurde [32].

Dennoch wird die Rolle des CFTR-Kanals und seine Aktivierung zur schnelleren Resorption des Lungenödems aktuell weiterhin intensiv erforscht. Kürzlich zeigte eine pharmakologische Potenzierung von CFTR mittels Ivacaftor (VX-770), einem zugelassenem Arzneimittel für Patienten mit einer spezifischen (G551D) CFTR-Genmutation, eine 2-fache Zunahme der AFC bei Schweinen [52]. Dieser Ansatz ist im Einklang mit einer CFTR-vermittelten Regulation der AFC und liefert einen ersten Hinweis, dass die CFTR-Potenzierung eine sinnvolle therapeutische Strategie in der Therapie des Lungenödems sein könnte.

4.3.2 Reduktion der Wasserresorption durch Ionenkanalinhibitoren

Bisher wurde angenommen [26], dass die beiden Inhibitoren $CFTR_{inh}$-172 und Glibenclamid keinen Effekt auf die basale Resorptionsrate des distalen Lungenepithels haben, obwohl an intakten Schweinebronchiolen CFTR Chloridkanäle für eine basale Cl^--Leitfähigkeit verantwortlich zu sein scheinen [95]. Mittels der D_2O-Dilutionsmethode konnte jedoch in den hier durchgeführten Wassertransportmessungen an H441-Zellen in Anwesenheit von $CFTR_{inh}$-172 eine um etwa 13% verringerte Wasserresorption nachgewiesen werden (Abbildung 3). $CFTR_{inh}$-172 gilt als spezifischer CFTR-Inhibitor mit einer IC_{50} von 300 nM [55, 102]. In Ussing-Kammer-Versuchen führte die Applikation von $CFTR_{inh}$-172, zumindest in einigen Versuchen, ebenfalls zu einer kleinen Reduktion des basalen Kurzschlussstroms. So lässt sich beispielsweise in dem in Abbildung 8C gezeigten Experiment eine Abnahme des I_{SC} nach Applikation von $CFTR_{inh}$-172 erkennen. Dieser in einigen Experimenten zu beobachtende inhibitorische Effekt war allerdings statistisch nicht signifikant (Abbildung 8D). Ursächlich dafür könnte der nur geringe Effekt von

$CFTR_{inh}$-172 auf die basale Resorptionsrate und die geringe Zahl an Experimenten (n=8) sein. Glibenclamid, ein Sulfonylharnstoff bekannt als Therapeutikum bei Diabetes Mellitus, reduzierte die basale Wasserresorption um etwa 19% und damit etwas mehr als $CFTR_{inh}$-172. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Glibenclamid nicht nur CFTR hemmt [102], sondern auch weitere Chloridkanäle [55, 74] und insbesondere ATP sensitive Kaliumkanäle [57]. Letztere Wirkung ist für den therapeutischen Effekt von Glibenclamid bei Diabetes Mellitus verantwortlich. Die vergleichsweise geringe Reduktion der basalen Flüssigkeitsresorptionsrate durch $CFTR_{inh}$-172 und Glibenclamid spricht dafür, dass CFTR unter basalen Bedingungen keinen großen Beitrag zur alveolären Wasserresorption leistet. Dies ist im Einklang mit der weiter oben diskutieren Hypothese einer akuten Anpassung der Resorptionsleistung durch eine cAMP vermittelte Koaktivierung von CFTR und ENaC.

Im Gegensatz zu dem vergleichsweise geringen Effekte von $CFTR_{inh}$-172 und Glibenclamid bewirkte der unspezifische Chloridkanalinhibitor NPPB eine erhebliche Reduktion des basalen Wassertransports der H441-Zellen (Abbildung 3). Hervorzuheben ist, dass NPPB einen ähnlich starken inhibitorischen Effekt auf die Wasserresorption hatte wie Amilorid (Abbildung 3). Korrespondierend dazu wurde auch der I_{sc} durch NPPB erheblich vermindert, und eine konsekutive Applikation von Amilorid führte in Anwesenheit von NPPB nur zu einer minimalen weiteren Reduktion des I_{sc} (Abbildung 6D). Auch umgekehrt führte die konsekutive Applikation von NPPB in Anwesenheit von Amilorid nur zu einer minimalen Reduktion des I_{sc}. In diesen Kurzschlussstrommessungen wurde NPPB nur apikal zugegeben, während bei den Wassertransportmessungen NPPB apikal und basolateral appliziert wurde. Daher kann für die Wassertarnsportmessungen nicht ausgeschlossen werden, dass auch eine Inhibition basolateraler Chloridkanäle zur Inhibition des Wassertransports durch NPPB beiträgt. Allerdings zeigten sich bei den I_{sc}-Messungen mit asymmetrischer Chloridionenverteilung (Abbildung 10) NPPB-abhängige Effekte nur nach apikaler Applikation des Inhibitors. Nach basolateraler Applikation zeigten sich dagegen keine nennenswerten Veränderungen des I_{sc}. Das spricht dafür, dass die Inhibition des Wassertransports durch NPPB auf einer Inhibition apikaler Chloridkanäle beruht.

NPPB wurde erstmal 1986 als Chloridkanalinhibitor in Kurzschlussstrommessungen (IC_{50} von 80 nM) beschrieben [96]. In späteren Publikationen wurde deutlich, dass der inhibitorische Effekt von NPPB auf CFTR (IC_{50} von 166 µM) [94] schwächer ist als der auf andere Chloridkanäle. NPPB gilt daher als unspezifischer Chloridkanalinhibitor mit geringer CFTR-Affinität (low-affinity inhibitor) [102]. Der beobachtete NPPB-Effekt kann daher nicht eindeutig der Inhibition eines bestimmten Chloridionenkanals zugeordnet werden [42]. Darüber hinaus kann NPPB beispielsweise bei bronchialen Epithelzellen Apoptose induzieren [13]. In den durchgeführten Kurzschlussstrommessungen zeigte sich die Reduktion des I_{sc} jedoch innerhalb von wenigen Sekunden, was einen durch Apoptose vermittelten NPPB-Effekt unwahrscheinlich macht. Ob die kontinuierliche NPPB-Exposition in den Wassertransportmessungen eine Apoptose induziert haben könnte, wurde nicht untersucht. Es bleibt zu hoffen, dass in Zukunft deutlich spezifischere Chloridkanalinhibitoren verfügbar sein werden, um eine genauere Charakterisierung der zugrunde liegenden Transportmechanismen zu ermöglichen.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde passen sehr gut zu Ergebnissen von Untersuchungen an Mäusen, bei denen mit NPPB eine ähnliche starke Reduktion der pulmonalen Flüssigkeitsresorption erreicht werden konnte wie mit Amilorid [25]. In der Zusammenschau mit den hier präsentierten Befunden sprechen diese Beobachtungen dafür, dass ein funktionelles Zusammenspiel von ENaC und apikalen NPPB-sensitiven Chloridkanälen für die basale transepitheliale Flüssigkeitsresorption in der distalen Lunge von Bedeutung ist. Die CFTR-Chloridkanäle spielen dagegen vermutlich eine Rolle, wenn die Flüssigkeitsresorption akut gesteigert werden muss, was durch eine cAMP-vermittelte Aktivitätssteigerung von CFTR bei vermutlich gleichzeitiger Aktivierung von ENaC erreicht werden kann. Der Fokus bisheriger Untersuchungen war vor allem die Rolle von CFTR für die alveoläre Flüssigkeitsresorption. In weiteren Arbeiten sollte die Möglichkeit einer ratenlimitierenden Rolle von nicht-CFTR Chloridkanälen für den alveolären Wassertransport näher untersucht und die zugrunde liegenden Chloridkanäle identifiziert werden.

4.3.3 Mögliche Rolle des basolateralen K^+/Cl^-Kotransporters für die transepitheliale Chloridabsorption

Es gibt Hinweise dafür, dass an der transepithelialen Chloridabsorption des Terbutalin-stimulierten Rattenalveolarepithels neben apikalen Chloridkanälen auch ein basolateraler K^+/Cl^-Kotransporter (KCC Transporter) beteiligt ist [51]. DIOA, ein Inhibitor des KCC-Kotransporters (IC_{50} von 10 - 40 µM) [30, 79], führte in der vorliegenden Arbeit in einer Konzentration von 30 µM zu einer gewissen Reduktion der Wasserresorption (Abbildung 5), was zu der Hypothese passt, dass der KCC-Kotransporter einen Beitrag zur alveolären Wasserresorption leistet. In den Kurzschlussstrommessungen (Abbildung 9) konnte allerdings ein inhibitorischer Effekt nur bei apikaler Applikation von DIOA gemessen werden. Die Ursache hierfür ist unklar und ist am ehesten, wie bereits durch andere Arbeitsgruppen postuliert, auf eine unspezifische Inhibition apikaler Chloridkanäle durch DIOA zurückzuführen [10, 41]. Da in den Wassertransportmessungen DIOA apikal und basolateral appliziert wurde, ist nicht auszuschließen, dass die durch DIOA verursachte Inhibition der Wasserresorption auf einer unspezifischen Inhibition apikaler Choridkanäle durch DIOA und nicht auf einer selektiven Inhibition eines basolateralen KCC-Kotransporters beruht. Die Versuche der vorliegenden Arbeit konnten daher nicht eindeutig klären, ob am transepithelialen elektrogenen Ionentransport der H441-Zellen ein basolateral lokalisierter DIOA sensitiver K^+/Cl^- Kotransporter beteiligt ist. Auch diese Befunde verdeutlichen, dass die Weiterentwicklung und Verfügbarkeit von spezifischen Chloridkanal- und Chloridtransportinhibitoren wünschenswert ist, um die der alverolären Flüssigkeitsresorption zugrundeliegenden Transportmechanismen besser charakterisieren zu können.

4.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass NCI-H441 Lungenepithelzellen, die unter Air-Liquid-Kulturbedingungen kultiviert werden, ein resorptives Epithel bilden mit einer durchschnittlichen Flüssigkeitsresorptionsrate von 1,79 ± 0,05 µl/h*cm. Diese Flüssigkeitsresorption wird durch Amilorid stark gehemmt, was dafür spricht, dass eine ENaC-vermittelte Natrium-Resorption die wesentliche Triebkraft für die Flüssigkeitsresorption darstellt.

Zusätzlich zeigt diese Arbeit eine ebenfalls sehr deutliche Reduktion der basalen Wassertransportrate durch die Exposition mit dem unspezifischen Chloridkanalinhibitor NPPB. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis für eine funktionelle Abhängigkeit des ENaC-vermittelten transepithelialen Transports von der Aktivität von Chloridkanälen sein. Diese funktionelle Abhängigkeit wurde auch schon in Veröffentlichungen mit alveolaren Primärzellen [45, 71] und in Versuchen an Lungen (whole-lung) [25, 66] postuliert. Diese Schlussfolgerung wird auch durch Kurzschlussstrommessungen unterstützt, in denen gezeigt werden konnte, dass apikal appliziertes Amilorid und NPPB den I_{sc} vergleichbar stark hemmten.

Mit Hilfe des recht spezifischen CFTR-Inhibitors $CFTR_{inh}$-172 konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von CFTR-Chloridkanälen vermutlich für die basale Wasserresorption eine eher geringe Rolle spielt. Dagegen konnte die Wasserresorption der NCI-H441 Lungenepithelzellen durch Forskolin, das eine cAMP-vermittelte Aktivierung von CFTR-Chloridkanälen bewirkt, stimuliert werden. Dies spricht für eine Rolle der CFTR-Chloridkanäle beispielsweise bei einer β-adrenergen Stimulation der alveolären Flüssigkeitsresorption.

Zusammen genommen sprechen die Ergebnisse für ein funktionelles Zusammenspiel zwischen dem ENaC-vermittelten transepithelialen Transport und der Aktivität von apikalen Chloridkanälen. Die physiologische Bedeutung einer solchen funktionellen Interaktion und die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch aufzuklären.

5 Zusammenfassung

Die Alveolen der Lunge werden von einem Epithel ausgekleidet, welches von einem dünnen Flüssigkeitsfilm (alveolar lining fluid) bedeckt wird. Die dicke dieses Flüssigkeitsfilms beeinflusst die Lungenfunktion und den Gasaustausch über die Alveolarwand. Eine der Hauptaufgaben des Atemwegsepithels ist die Konstanthaltung dieses Flüssigkeitsfilms durch eine entsprechende Steuerung des transepithelialen Ionentransports, der den Wassertransport antreibt.

Ziel der Arbeit war es, den transepithelialen Ionen- und Flüssigkeitstransport des Alveolarepithels näher zu charakterisieren. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, wie sich der Transport über den epithelialen Natriumkanal und der Transport über Chloridkanäle beeinflussen.

Zur Messung des transepithelialen Wassertransports standen bisher nur mikroskopische Techniken oder Verfahren mit der Verwendung von Markersubstanzen zur Verfügung. Beide Methoden weisen relativ große Fehlerquellen und Ungenauigkeiten auf, dadurch ist die Messung des Wassertransports nur eingeschränkt möglich. Die hier verwendete Deuteriumoxid-Dilutionsmethode ermöglicht die genaue Messung des transepithelialen Wassertransports. Um Rückschlüsse auf die dem transepithelialen Flüssigkeitstransport zugrunde liegenden Ionentransportmechanismen zu erhalten, wurden parallel zu den Wassertransportmessungen Kurzschlussstrommessungen mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik durchgeführt. Die Experimente wurden an einem humanen Zellkulturmodell (National Cancer Institute-H441 Lungenepithelzellen) durchgeführt, dessen funktionelle Eigenschaften den Eigenschaften des distalen Atemwegsepithels stark ähneln.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass NCI-H441 Lungenepithelzellen ein resorptives Epithel bilden bei dem der Wassertransport durch eine ENaC (epithelialer Natriumkanal) vermittelte Ionenresorption angetrieben und limitiert wird. Auffallend war, das apikal lokalisierte Chloridkanäle vom CFTR- und nicht-CFTR-Typ (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) wichtig für die ENaC vermittelte Natrium Resorption sind. Während Chloridkanäle des nicht-CFTR-Typs für die basale Natrium und Wasserresorption essentiell sind, lässt sich die Resorption durch cAMP (Cyclisches Adenosinmonophosphat)

Aktivierung von CFTR Kanälen akut steigern. Das zeigt, dass CFTR Kanäle eine cAMP stimulierten Wasserresorption wichtig vermitteln.

Diese Arbeit leistet somit einen Beitrag zum Verständnis des transepithelialen Elektrolyt- und Flüssigkeitstransports distaler Lungenepithelzellen. Sie demonstriert ein wichtiges Zusammenspiel von apikalen Chloridkanälen mit der Natrium- und Wasserresorption und identifizierte eine wichtige Funktion des CFTR als Aktivator für eine stimulierte Wasserresorption.

6 Literaturverzeichnis

1. Al-Alawi, M., P. Buchanan, V. Verriere, G. Higgins, O. McCabe, R.W. Costello, P. McNally, V. Urbach, and B.J. Harvey, *Physiological levels of lipoxin A4 inhibit ENaC and restore airway surface liquid height in cystic fibrosis bronchial epithelium.* Physiol Rep, 2014. 2, e12093.
2. Albertine, K.H., M.F. Soulier, Z. Wang, A. Ishizaka, S. Hashimoto, G.A. Zimmerman, M.A. Matthay, and L.B. Ware, *Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome.* Am J Pathol, 2002. 161, 1783-96.
3. Amin, N., N.S. Alvi, J.H. Barth, H.P. Field, E. Finlay, K. Tyerman, S. Frazer, G. Savill, N.P. Wright, T. Makaya, and T. Mushtaq, *Pseudohypoaldosteronism type 1: clinical features and management in infancy.* Endocrinol Diabetes Metab Case Rep, 2013. 2013, 130010.
4. Bardou, O., N.T. Trinh, and E. Brochiero, *Molecular diversity and function of K+ channels in airway and alveolar epithelial cells.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. 296, L145-55.
5. Basset, G., C. Crone, and G. Saumon, *Significance of active ion transport in transalveolar water absorption: a study on isolated rat lung.* J Physiol, 1987. 384, 311-24.
6. Basset, G., C. Crone, and G. Saumon, *Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium.* J Physiol, 1987. 384, 325-45.
7. Boucher, R.C., *Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration.* Trends Mol Med, 2007. 13, 231-40.
8. Bove, P.F., B.R. Grubb, S.F. Okada, C.M. Ribeiro, T.D. Rogers, S.H. Randell, W.K. O'Neal, and R.C. Boucher, *Human alveolar type II cells secrete and absorb liquid in response to local nucleotide signaling.* J Biol Chem, 2010. 285, 34939-49.
9. Bove, P.F., H. Dang, C. Cheluvaraju, L.C. Jones, X. Liu, W.K. O'Neal, S.H. Randell, R. Schlegel, and R.C. Boucher, *Breaking the in vitro alveolar type II cell proliferation barrier while retaining ion transport properties.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. 50, 767-76.
10. Brauer, M., E. Frei, L. Claes, S. Grissmer, and H. Jager, *Influence of K-Cl cotransporter activity on activation of volume-sensitive Cl- channels in human osteoblasts.* Am J Physiol Cell Physiol, 2003. 285, C22-30.
11. Canessa, C.M., L. Schild, G. Buell, B. Thorens, I. Gautschi, J.D. Horisberger, and B.C. Rossier, *Amiloride-sensitive epithelial Na+ channel is made of three homologous subunits.* Nature, 1994. 367, 463-7.
12. Catalan, M.A., T. Nakamoto, M. Gonzalez-Begne, J.M. Camden, S.M. Wall, L.L. Clarke, and J.E. Melvin, *Cftr and ENaC ion channels mediate NaCl absorption in the mouse submandibular gland.* J Physiol, 2010. 588, 713-24.
13. Cheng, G., Z. Shao, B. Chaudhari, and D.K. Agrawal, *Involvement of chloride channels in TGF-beta1-induced apoptosis of human bronchial epithelial cells.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. 293, L1339-47.
14. Choi, H.C., C.S. Kim, and R. Tarran, *Automated acquisition and analysis of airway surface liquid height by confocal microscopy.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. 309, L109-18.

15. Crapo, J.D., B.E. Barry, P. Gehr, M. Bachofen, and E.R. Weibel, *Cell number and cell characteristics of the normal human lung.* Am Rev Respir Dis, 1982. 126, 332-7.
16. De Boeck, K., F. Vermeulen, and L. Dupont, *The diagnosis of cystic fibrosis.* Presse Med, 2017. 46, e97-e108.
17. Downs, C.A., L.H. Kriener, L. Yu, D.C. Eaton, L. Jain, and M.N. Helms, *beta-Adrenergic agonists differentially regulate highly selective and nonselective epithelial sodium channels to promote alveolar fluid clearance in vivo.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. 302, L1167-78.
18. Duquette, P.P., P. Bissonnette, and J.Y. Lapointe, *Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na(+)/glucose cotransport.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98, 3796-801.
19. Eaton, D.C., M.N. Helms, M. Koval, H.F. Bao, and L. Jain, *The contribution of epithelial sodium channels to alveolar function in health and disease.* Annu Rev Physiol, 2009. 71, 403-23.
20. Edinger, R.S., C.A. Bertrand, C. Rondandino, G.A. Apodaca, J.P. Johnson, and M.B. Butterworth, *The epithelial sodium channel (ENaC) establishes a trafficking vesicle pool responsible for its regulation.* PLoS One, 2012. 7, e46593.
21. Eisenhut, M., *The role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel in beta-receptor-mediated regulation of alveolar fluid clearance.* J Appl Physiol (1985), 2007. 103, 413; author reply 414.
22. Elbert, K.J., U.F. Schafer, H.J. Schafers, K.J. Kim, V.H. Lee, and C.M. Lehr, *Monolayers of human alveolar epithelial cells in primary culture for pulmonary absorption and transport studies.* Pharm Res, 1999. 16, 601-8.
23. Elias, N., B. Rafii, M. Rahman, G. Otulakowski, E. Cutz, and H. O'Brodovich, *The role of alpha-, beta-, and gamma-ENaC subunits in distal lung epithelial fluid absorption induced by pulmonary edema fluid.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. 293, L537-45.
24. Erokhova, L., A. Horner, N. Ollinger, C. Siligan, and P. Pohl, *The Sodium Glucose Cotransporter SGLT1 Is an Extremely Efficient Facilitator of Passive Water Transport.* J Biol Chem, 2016. 291, 9712-20.
25. Fang, X., N. Fukuda, P. Barbry, C. Sartori, A.S. Verkman, and M.A. Matthay, *Novel role for CFTR in fluid absorption from the distal airspaces of the lung.* J Gen Physiol, 2002. 119, 199-207.
26. Fang, X., Y. Song, J. Hirsch, L.J. Galietta, N. Pedemonte, R.L. Zemans, G. Dolganov, A.S. Verkman, and M.A. Matthay, *Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. 290, L242-9.
27. Flodby, P., Y.H. Kim, L.L. Beard, D. Gao, Y. Ji, H. Kage, J.M. Liebler, P. Minoo, K.J. Kim, Z. Borok, and E.D. Crandall, *Knockout Mice Reveal a Major Role for Alveolar Epithelial Type I Cells in Alveolar Fluid Clearance.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2016. 55, 395-406.
28. Fronius, M., W.G. Clauss, and M. Althaus, *Why Do We have to Move Fluid to be Able to Breathe?* Front Physiol, 2012. 3, 146.
29. Gao Smith, F., G.D. Perkins, S. Gates, D. Young, D.F. McAuley, W. Tunnicliffe, Z. Khan, S.E. Lamb, and B.-s. investigators, *Effect of intravenous beta-2 agonist treatment on clinical outcomes in acute respiratory distress syndrome (BALTI-2): a multicentre, randomised controlled trial.* Lancet, 2012. 379, 229-35.

30. Garay, R.P., C. Nazaret, P.A. Hannaert, and E.J. Cragoe, Jr., *Demonstration of a [K+,Cl-]-cotransport system in human red cells by its sensitivity to [(dihydroindenyl)oxy]alkanoic acids: regulation of cell swelling and distinction from the bumetanide-sensitive [Na+,K+,Cl-]-cotransport system.* Mol Pharmacol, 1988. 33, 696-701.
31. Garnett, J.P., E.H. Baker, and D.L. Baines, *Sweet talk: insights into the nature and importance of glucose transport in lung epithelium.* Eur Respir J, 2012. 40, 1269-76.
32. Gates, S., G.D. Perkins, S.E. Lamb, C. Kelly, D.R. Thickett, J.D. Young, D.F. McAuley, C. Snaith, C. McCabe, C.T. Hulme, and F. Gao Smith, *Beta-Agonist Lung injury TrIal-2 (BALTI-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial and economic evaluation of intravenous infusion of salbutamol versus placebo in patients with acute respiratory distress syndrome.* Health Technol Assess, 2013. 17, v-vi, 1-87.
33. Geisow, M.J., *Fluorescein conjugates as indicators of subcellular pH. A critical evaluation.* Exp Cell Res, 1984. 150, 29-35.
34. Gunzel, D. and A.S. Yu, *Claudins and the modulation of tight junction permeability.* Physiol Rev, 2013. 93, 525-69.
35. Harvey, P.R., R. Tarran, S. Garoff, and M.M. Myerburg, *Measurement of the airway surface liquid volume with simple light refraction microscopy.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. 45, 592-9.
36. Hermanns, M.I., R.E. Unger, K. Kehe, K. Peters, and C.J. Kirkpatrick, *Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro.* Lab Invest, 2004. 84, 736-52.
37. Hummler, E., P. Barker, J. Gatzy, F. Beermann, C. Verdumo, A. Schmidt, R. Boucher, and B.C. Rossier, *Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice.* Nat Genet, 1996. 12, 325-8.
38. Huppmann, S., E. Lankes, D. Schnabel, and C. Buhrer, *Unimpaired postnatal respiratory adaptation in a preterm human infant with a homozygous ENaC-alpha unit loss-of-function mutation.* J Perinatol, 2011. 31, 802-3.
39. Icard, P. and G. Saumon, *Alveolar sodium and liquid transport in mice.* Am J Physiol, 1999. 277, L1232-8.
40. Itani, O.A., S.D. Auerbach, R.F. Husted, K.A. Volk, S. Ageloff, M.A. Knepper, J.B. Stokes, and C.P. Thomas, *Glucocorticoid-stimulated lung epithelial Na(+) transport is associated with regulated ENaC and sgk1 expression.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. 282, L631-41.
41. Ito, Y., M. Aoyama, N. Yamada, Y. Mizuno, H. Kume, and K. Yamaki, *[(Dihydroindenyl)oxy]alkonic acid inhibits the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.* Eur J Pharmacol, 2001. 426, 175-8.
42. Jentsch, T.J., V. Stein, F. Weinreich, and A.A. Zdebik, *Molecular structure and physiological function of chloride channels.* Physiol Rev, 2002. 82, 503-68.
43. Ji, H.L., X.F. Su, S. Kedar, J. Li, P. Barbry, P.R. Smith, S. Matalon, and D.J. Benos, *Delta-subunit confers novel biophysical features to alpha beta gamma-human epithelial sodium channel (ENaC) via a physical interaction.* J Biol Chem, 2006. 281, 8233-41.

44. Jiang, X., D.H. Ingbar, and S.M. O'Grady, *Adrenergic stimulation of Na+ transport across alveolar epithelial cells involves activation of apical Cl- channels.* Am J Physiol, 1998. 275, C1610-20.
45. Jiang, X., D.H. Ingbar, and S.M. O'Grady, *Adrenergic regulation of ion transport across adult alveolar epithelial cells: effects on Cl- channel activation and transport function in cultures with an apical air interface.* J Membr Biol, 2001. 181, 195-204.
46. Johnson, M.D., J.H. Widdicombe, L. Allen, P. Barbry, and L.G. Dobbs, *Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99, 1966-71.
47. Knowles, M.R. and R.C. Boucher, *Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways.* Journal of Clinical Investigation, 2002. 109, 571-577.
48. Korbmacher, J.P., C. Michel, D. Neubauer, K. Thompson, B. Mizaikoff, M. Frick, P. Dietl, and O.H. Wittekindt, *Amiloride-sensitive fluid resorption in NCI-H441 lung epithelia depends on an apical Cl(-) conductance.* Physiol Rep, 2014. 2, e00201.
49. Kulaksiz, H., A. Schmid, M. Honscheid, A. Ramaswamy, and Y. Cetin, *Clara cell impact in air-side activation of CFTR in small pulmonary airways.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99, 6796-801.
50. Kunzelmann, K., *ENaC is inhibited by an increase in the intracellular Cl(-) concentration mediated through activation of Cl(-) channels.* Pflugers Arch, 2003. 445, 504-12.
51. Lee, S.Y., P.J. Maniak, R. Rhodes, D.H. Ingbar, and S.M. O'Grady, *Basolateral Cl- transport is stimulated by terbutaline in adult rat alveolar epithelial cells.* J Membr Biol, 2003. 191, 133-9.
52. Li, X., L.G. Vargas Buonfiglio, R.J. Adam, D.A. Stoltz, J. Zabner, and A.P. Comellas, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Potentiation as a Therapeutic Strategy for Pulmonary Edema: A Proof-of-Concept Study in Pigs.* Crit Care Med, 2017. 45, e1240-e1246.
53. Licker, M., J.M. Tschopp, J. Robert, J.G. Frey, J. Diaper, and C. Ellenberger, *Aerosolized salbutamol accelerates the resolution of pulmonary edema after lung resection.* Chest, 2008. 133, 845-52.
54. Lindert, J., C.E. Perlman, K. Parthasarathi, and J. Bhattacharya, *Chloride-dependent secretion of alveolar wall liquid determined by optical-sectioning microscopy.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. 36, 688-96.
55. Ma, T., J.R. Thiagarajah, H. Yang, N.D. Sonawane, C. Folli, L.J. Galietta, and A.S. Verkman, *Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion.* J Clin Invest, 2002. 110, 1651-8.
56. Marti, J., J.A. Padró, and E. Guàrdia, *Molecular dynamics calculation of the infrared spectra in liquid H2O-D2O mixtures.* Journal of Molecular Liquids, 1994. 62, 17-31.
57. Martin, G.M., B. Kandasamy, F. DiMaio, C. Yoshioka, and S.L. Shyng, *Anti-diabetic drug binding site in a mammalian KATP channel revealed by Cryo-EM.* Elife, 2017. 6.

58. Matalon, S., R. Bartoszewski, and J.F. Collawn, *Role of epithelial sodium channels in the regulation of lung fluid homeostasis.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. 309, L1229-38.
59. Matsui, H., B.R. Grubb, R. Tarran, S.H. Randell, J.T. Gatzy, C.W. Davis, and R.C. Boucher, *Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease.* Cell, 1998. 95, 1005-15.
60. Matthay, M.A. and J.P. Wiener-Kronish, *Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans.* Am Rev Respir Dis, 1990. 142, 1250-7.
61. Matthay, M.A., H.G. Folkesson, and A.S. Verkman, *Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung.* Am J Physiol, 1996. 270, L487-503.
62. Matthay, M.A., H.G. Folkesson, and C. Clerici, *Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema.* Physiol Rev, 2002. 82, 569-600.
63. Matthay, M.A., L. Robriquet, and X. Fang, *Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury.* Proc Am Thorac Soc, 2005. 2, 206-13.
64. Matthay, M.A., *Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress.* Am J Respir Crit Care Med, 2014. 189, 1301-8.
65. Mutlu, G.M., V. Dumasius, J. Burhop, P.J. McShane, F.J. Meng, L. Welch, A. Dumasius, N. Mohebahmadi, G. Thakuria, K. Hardiman, S. Matalon, S. Hollenberg, and P. Factor, *Upregulation of alveolar epithelial active Na+ transport is dependent on beta2-adrenergic receptor signaling.* Circ Res, 2004. 94, 1091-100.
66. Mutlu, G.M., Y. Adir, M. Jameel, A.T. Akhmedov, L. Welch, V. Dumasius, F.J. Meng, J. Zabner, C. Koenig, E.R. Lewis, R. Balagani, G. Traver, J.I. Sznajder, and P. Factor, *Interdependency of beta-adrenergic receptors and CFTR in regulation of alveolar active Na+ transport.* Circ Res, 2005. 96, 999-1005.
67. Nagel, G., T. Szellas, J.R. Riordan, T. Friedrich, and K. Hartung, *Non-specific activation of the epithelial sodium channel by the CFTR chloride channel.* EMBO Rep, 2001. 2, 249-54.
68. National Heart, L., N. Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome Clinical Trials, M.A. Matthay, R.G. Brower, S. Carson, I.S. Douglas, M. Eisner, D. Hite, S. Holets, R.H. Kallet, K.D. Liu, N. MacIntyre, M. Moss, D. Schoenfeld, J. Steingrub, and B.T. Thompson, *Randomized, placebo-controlled clinical trial of an aerosolized beta(2)-agonist for treatment of acute lung injury.* Am J Respir Crit Care Med, 2011. 184, 561-8.
69. Neubauer, D., J. Korbmacher, M. Frick, J. Kiss, M. Timmler, P. Dietl, O.H. Wittekindt, and B. Mizaikoff, *Deuterium oxide dilution: a novel method to study apical water layers and transepithelial water transport.* Anal Chem, 2013. 85, 4247-50.
70. O'Brodovich, H., *Fetal lung liquid secretion: insights using the tools of inhibitors and genetic knock-out experiments.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. 25, 8-10.
71. O'Grady, S.M., X. Jiang, and D.H. Ingbar, *Cl-channel activation is necessary for stimulation of Na transport in adult alveolar epithelial cells.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. 278, L239-44.
72. O'Grady, S.M. and S.Y. Lee, *Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. 284, L689-700.

73. Ochs, M., J.R. Nyengaard, A. Jung, L. Knudsen, M. Voigt, T. Wahlers, J. Richter, and H.J. Gundersen, *The number of alveoli in the human lung.* Am J Respir Crit Care Med, 2004. 169, 120-4.
74. Rabe, A., J. Disser, and E. Fromter, *Cl- channel inhibition by glibenclamide is not specific for the CFTR-type Cl- channel.* Pflugers Arch, 1995. 429, 659-62.
75. Rauh, R., C. Hoerner, and C. Korbmacher, *deltabetagamma-ENaC is inhibited by CFTR but stimulated by cAMP in Xenopus laevis oocytes.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017. 312, L277-L287.
76. Reddy, M.M., M.J. Light, and P.M. Quinton, *Activation of the epithelial Na+ channel (ENaC) requires CFTR Cl- channel function.* Nature, 1999. 402, 301-4.
77. Ren, H., N.P. Birch, and V. Suresh, *An Optimised Human Cell Culture Model for Alveolar Epithelial Transport.* PLoS One, 2016. 11, e0165225.
78. Robins, G.G., K.A. MacLennan, R.P. Boot-Handford, and G.I. Sandle, *Rapid stimulation of human renal ENaC by cAMP in Xenopus laevis oocytes.* J Physiol Biochem, 2013. 69, 419-27.
79. Saitta, M., S. Cavalier, R. Garay, E. Cragoe, Jr., and P. Hannaert, *Evidence for a DIOA-sensitive [K+,Cl-]-cotransport system in cultured vascular smooth muscle cells.* Am J Hypertens, 1990. 3, 939-42.
80. Sakuma, T., G. Okaniwa, T. Nakada, T. Nishimura, S. Fujimura, and M.A. Matthay, *Alveolar fluid clearance in the resected human lung.* Am J Respir Crit Care Med, 1994. 150, 305-10.
81. Salomon, J.J., V.E. Muchitsch, J.C. Gausterer, E. Schwagerus, H. Huwer, N. Daum, C.M. Lehr, and C. Ehrhardt, *The cell line NCl-H441 is a useful in vitro model for transport studies of human distal lung epithelial barrier.* Mol Pharm, 2014. 11, 995-1006.
82. Sartori, C., Y. Allemann, H. Duplain, M. Lepori, M. Egli, E. Lipp, D. Hutter, P. Turini, O. Hugli, S. Cook, P. Nicod, and U. Scherrer, *Salmeterol for the prevention of high-altitude pulmonary edema.* N Engl J Med, 2002. 346, 1631-6.
83. Saumon, G. and G. Basset, *Electrolyte and fluid transport across the mature alveolar epithelium.* J Appl Physiol (1985), 1993. 74, 1-15.
84. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *Structure, function, and regulation of cellular tight junctions.* Am J Physiol, 1992. 262, L647-61.
85. Schwede, F., E. Maronde, H. Genieser, and B. Jastorff, *Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs.* Pharmacol Ther, 2000. 87, 199-226.
86. Solymosi, E.A., S.M. Kaestle-Gembardt, I. Vadasz, L. Wang, N. Neye, C.J. Chupin, S. Rozowsky, R. Ruehl, A. Tabuchi, H. Schulz, A. Kapus, R.E. Morty, and W.M. Kuebler, *Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110, E2308-16.
87. Stonebraker, J.R., D. Wagner, R.W. Lefensty, K. Burns, S.J. Gendler, J.M. Bergelson, R.C. Boucher, W.K. O'Neal, and R.J. Pickles, *Glycocalyx restricts adenoviral vector access to apical receptors expressed on respiratory epithelium in vitro and in vivo: role for tethered mucins as barriers to lumenal infection.* J Virol, 2004. 78, 13755-68.
88. Strautnieks, S.S., R.J. Thompson, R.M. Gardiner, and E. Chung, *A novel splice-site mutation in the gamma subunit of the epithelial sodium channel gene in three pseudohypoaldosteronism type 1 families.* Nat Genet, 1996. 13, 248-50.
89. Strautnieks, S.S., R.J. Thompson, A. Hanukoglu, M.J. Dillon, I. Hanukoglu, U. Kuhnle, J. Seckl, R.M. Gardiner, and E. Chung, *Localisation of*

pseudohypoaldosteronism genes to chromosome 16p12.2-13.11 and 12p13.1-pter by homozygosity mapping. Hum Mol Genet, 1996. 5, 293-9.

90. Stutts, M.J., C.M. Canessa, J.C. Olsen, M. Hamrick, J.A. Cohn, B.C. Rossier, and R.C. Boucher, *CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels.* Science, 1995. 269, 847-50.
91. Tarran, R., B. Button, and R.C. Boucher, *Regulation of normal and cystic fibrosis airway surface liquid volume by phasic shear stress.* Annu Rev Physiol, 2006. 68, 543-61.
92. Torimura, M., S. Kurata, K. Yamada, T. Yokomaku, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane, *Fluorescence-quenching phenomenon by photoinduced electron transfer between a fluorescent dye and a nucleotide base.* Anal Sci, 2001. 17, 155-60.
93. Waldmann, R., G. Champigny, F. Bassilana, N. Voilley, and M. Lazdunski, *Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na+ channel.* J Biol Chem, 1995. 270, 27411-4.
94. Walsh, K.B., K.J. Long, and X. Shen, *Structural and ionic determinants of 5-nitro-2-(3-phenylprophyl-amino)-benzoic acid block of the CFTR chloride channel.* Br J Pharmacol, 1999. 127, 369-76.
95. Wang, X., C. Lytle, and P.M. Quinton, *Predominant constitutive CFTR conductance in small airways.* Respir Res, 2005. 6, 7.
96. Wangemann, P., M. Wittner, A. Di Stefano, H.C. Englert, H.J. Lang, E. Schlatter, and R. Greger, *Cl(-)-channel blockers in the thick ascending limb of the loop of Henle. Structure activity relationship.* Pflugers Arch, 1986. 407 Suppl 2, S128-41.
97. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome.* N Engl J Med, 2000. 342, 1334-49.
98. Weibel, E.R., *On the tricks alveolar epithelial cells play to make a good lung.* Am J Respir Crit Care Med, 2015. 191, 504-13.
99. Weibel, E.R., *Lung morphometry: the link between structure and function.* Cell Tissue Res, 2017. 367, 413-426.
100. Wittekindt, O.H., *Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation.* Pflugers Arch, 2017. 469, 135-147.
101. Woollhead, A.M. and D.L. Baines, *Forskolin-induced cell shrinkage and apical translocation of functional enhanced green fluorescent protein-human alphaENaC in H441 lung epithelial cell monolayers.* J Biol Chem, 2006. 281, 5158-68.
102. Zegarra-Moran, O. and L.J. Galietta, *CFTR pharmacology.* Cell Mol Life Sci, 2017. 74, 117-128.
103. Zhang, A.L. and G.M. Roomans, *Multiple intracellular pathways for regulation of chloride secretion in cultured pig tracheal submucosal gland cells.* Eur Respir J, 1999. 13, 571-6.
104. Zhao, R.Z., H.G. Nie, X.F. Su, D.Y. Han, A. Lee, Y. Huang, Y. Chang, S. Matalon, and H.L. Ji, *Characterization of a novel splice variant of delta ENaC subunit in human lungs.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. 302, L1262-72.

7 Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt

8 Lebenslauf und Publikationsregister

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt

Publikationsregister:

Originalarbeiten

Thompson KE, Korbmacher JP, Hecht E, Hobi N, Wittekindt OH, Dietl P, Kranz C, Frick M (2013) Fusion activated cation entry (FACE) via $P2X_4$ couples surfactant secretion and alveolar fluid transport. *FASEB Journal 27:1772-83*

Neubauer D, Korbmacher J, Frick M, Kiss J, Timmler M, Dietl P, Wittekindt OH, Mizaikoff B (2013) Deuterium oxide dilution: A novel method to study apical water layers and transepithelial water transport, *Analytical Chemistry*, 85, 4247-50.

Korbmacher JP, Michel C, Neubauer D, Thompson K, Mizaikoff B, Frick M, Dietl P, Wittekindt OH (2014) Amiloride-sensitive fluid resorption in NCI-H441 lung epithelia depends on an apical Cl^- conductance. *Physiological Reports*, Vol. 2 no. e00201.

Hartung B., Korbmacher J., Nordhaus M., Ritz-Timme S. (2018). Neue Risiken durch neues Spielzeug : Miniarmbrust für Zahnstocherbolzen. *Archiv für Kriminologie : unter bes. Berücksichtigung der gerichtlichen Physik, Chemie und Medizin : Monatsschrift*.

Publizierte Abstracts (Auswahl)

Korbmacher JP, Michel C, Neubauer D, Thompson K, Frick M, Mizaikoff B, Dietl P, Wittekindt OH (2013) Characterization of transepithelial fluid and electrolyte transport by cultured distal airway epithelial cells NCI-H441, *Acta Physiologica*; Volume 207, Supplement 694 :P208

Thompson K, Korbmacher J, Hecht E, Wagner F, Hobi N, Wittekindt O, Dietl P, Kranz C, Radermacher P, Frick M (2013) Fusion-activated cation-entry (FACE) via $P2X_4$ couples surfactant secretion and alveolar fluid transport, *Acta Physiologica*; Volume 207, Supplement 694 :P249

Neubauer D, Korbmacher JP, Frick M, Kiss J, Timmler M, Dietl P, Mizaikoff B, Wittekindt OH, (2013) Deuterium oxide dilution, a novelapproach to measure transepithelial water transport, *Acta Physiologica*; Volume 207, Supplement 694 :P211

Korbmacher J., Schrader S., Geerling G. (2017) Erfahrungen mit „Intense Pulsed Light“-Therapie bei Meibomdrüsendysfunktion, *Verein Rheinisch-Westfälischer Augenärzte. 179. Versammlung des Vereins Rheinisch-Westfälischer Augenärzte. Essen, 03.-04.02.2017. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2017.*

Schrader S., Korbmacher J.P., Geerling G. (2017) Das Düsseldorfer Keratoprothesen-Programm – Ein Update zur Boston-, Osteo-Odonto- und Tibia-Kpro, Verein Rheinisch-*Westfälischer Augenärzte. 179. Versammlung des Vereins Rheinisch-Westfälischer Augenärzte. Essen, 03.-04.02.2017. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2017.*

Korbmacher J., Schrader S., Geerling G. (2018) Das Düsseldorfer Keratoprothesen-Programm: Ein Update zur Boston-, Osteo-Odonto- und Tibia-Kpro, *Verein Rheinisch-Westfälischer Augenärzte. 180. Versammlung des Vereins Rheinisch-Westfälischer Augenärzte. Düsseldorf, 26.-27.01.2018. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2018.*

Korbmacher J.P., Schrader S., Geerling G. (2018) Unser Keratoprothesen-Programm. Ein Update zur Boston-, Osteo-Odonto- und Tibia-Kpro, *Abstractband DOG 2018*, *Ophthalmologe (2018) 115.*

Düsseldorf, September 2019