

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

Einfluss von Entzündungsmediatoren und reaktiven Oxidantien auf die transepitheliale Natriumresorption der Lunge

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades im Fachbereich 08
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Andreas Berk
Gießen, März 2004

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden.....	8
2.1 Das Versuchstier <i>Xenopus laevis</i>	8
2.1.1 Systematik.....	8
2.1.2 Morphologie und Physiologie	8
2.1.3 Tierhaltung	9
2.1.4 Präparation.....	9
2.1.4.1 Entnahme der Lungen.....	9
2.1.4.2 Laparotomie (Oocytenentnahme).....	10
2.2 Elektrophysiologische Messungen	12
2.2.1 Ussing-Kammer	12
2.2.1.1 Aufbau der Ussing-Kammer	12
2.2.1.2 Die Ussing-Kammer Elektroden	13
2.2.1.3 Aufbau der Spannungs-Klemm-Apparatur	13
2.2.1.4 Versuchsbedingungen und Messprotokoll	14
2.2.2 Zwei-Elektroden Spannungsklemme.....	15
2.2.2.1 Aufbau der Messapparatur.....	15
2.2.2.2 Herstellung der Mikroelektroden	15
2.2.2.3 Messprinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme .	15
2.2.2.4 Oocytenaufbereitung.....	17

2.2.2.5 Mikroinjektion der mRNA in <i>Xenopus</i> Oocyten	18
2.2.2.6 Versuchsprotokoll und Lösungen	18
2.2.3 Auswertung der Messdaten.....	20
2.2.4 Statistik	20
2.3 Molekularbiologische Methoden zur Gewinnung von funktionell in <i>Xenopus</i> Oocyten exprimierbarer mRNA.....	21
2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien	21
2.3.2 Bakterien-Transformation.....	22
2.3.3 DNA-Gewinnung aus <i>E. coli</i>	22
2.3.4 In-vitro Transkription	23
2.3.5 Umklonierung verschiedener ENaC-Untereinheiten.....	24
3. Ergebnisse	26
3.1 Messungen transepithelialer Ströme der Lunge von <i>Xenopus laevis</i> mit Hilfe der Ussing-Kammer	26
3.1.1 Wirkungsweise von Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	27
3.1.1.1 Konzentrationsabhängige Wirkung von PGE ₂	29
3.1.1.2 Reproduktion des durch PGE ₂ induzierten Effekts unter chloridfreien Bedingungen.....	30
3.1.1.3 Auswirkungen von Prostaglandin-Rezeptor-Agonisten auf den transepithelialen Strom der <i>Xenopus</i> Lunge...	32
3.1.1.4 cAMP Sensitivität des I _{SC} der <i>Xenopus</i> Lunge	33
3.1.1.5 Additive Gabe von PGE ₂ und Forskolin	35

3.1.1.6 Behandlung der Lunge mit Inhibitoren der Proteinkinase A (PKA).....	36
3.1.1.7 Abhängigkeit des PGE ₂ -induzierten Effekts von [Ca ²⁺] _i	37
3.1.1.8 Einfluss proinflammatorischer Substanzen	38
3.1.1.9 Auswirkung von PGE ₂ auf in <i>Xenopus</i> Oocyten exprimierte ENaCs	39
3.2 Einfluss reaktiver Oxidantien auf die Natriumresorption ENaC-exprimierender <i>Xenopus</i> Oocyten	41
3.2.1 Auswirkung von Peroxynitrit auf I _{ami}	42
3.2.2 Effekt von DetaNONOate bzw. NOC-18 auf I _{ami}	43
3.3 Wirkung cyclischer Nucleosidmonophosphate auf den heterolog in <i>Xenopus</i> Oocyten exprimierten ENaC	44
3.3.1 Effekt von cGMP auf den Amilorid-sensitiven Natriumstrom von ENaC-exprimierenden Oocyten	44
3.3.2 Auswirkung verschieden substituierter Derivate von cAMP bzw. cGMP auf den ENaC-vermittelten I _{ami} unterschiedlicher Spezies.....	45
4. Diskussion	49
4.1 Kennzeichen von Epithelien.....	49
4.2 Wirkung von PGE ₂ auf transepitheliale Ströme der <i>Xenopus</i> Lunge	52
4.2.1 Morphologischer Aufbau der Lunge von <i>Xenopus laevis</i>	52
4.2.2 Bildung von Prostaglandinen in Tier- und Pflanzenreich.....	53
4.2.3 Bedeutung der Cyclo-Oxygenase	54

4.2.4 PGE ₂ als inflammatorisch wirksame Substanz.....	55
4.2.5 Stimulation des I _{ami} der <i>Xenopus</i> Lunge durch apikales PGE ₂	57
4.2.5.1 Untersuchung des Signaltransduktionswegs von PGE ₂	59
4.2.5.2 Identifizierung der beteiligten PGE ₂ -Rezeptoren.....	62
4.3 Einfluss von Tachykininen auf den transepithelialen Natriumstrom der <i>Xenopus</i> Lunge	66
4.4 Auswirkung reaktiver Oxidantien auf den I _{ami} ENaC exprimierender <i>Xenopus</i> Oocyten	67
4.5 Untersuchung der Wirkung von cyclischen Nucleosidmonophos- phaten auf den I _{ami} von ENaC exprimierenden <i>Xenopus</i> Oocyten	71
5. Zusammenfassung	76
6. Abstract	78
7. Literaturverzeichnis	79
8. Anhang	94
8.1 Zusammenstellung von Abkürzungen, Geräten und Zubehör	94
8.2 Versicherung	101
8.3 Danksagung	102

1. Einleitung

Höhere Lebewesen zeichnen sich u.a. durch die Spezialisierung von Gewebeverbänden, eine zunehmende Kompartimentierung sowie die Abgrenzung des Organismus gegenüber der Umwelt aus. Dies ist Voraussetzung für eine weitergehende Entwicklung. Zahlreiche Funktionen, u.a. der Schutz vor exogenen Pathogenen oder das Sicherstellen eines konstanten inneren Milieus, werden dadurch gewährleistet. Zum Überleben höherer Organismen sind jedoch neben der klaren Abgrenzung gegenüber der Umwelt auch Austauschprozesse mit ihr notwendig. Dabei spielen sowohl die Nahrungsaufnahme, die Atmung als auch Ionenaustauschprozesse zur Aufrechterhaltung der Körperhomöostase eine entscheidende Rolle.

Der Begriff der Körperhomöostase beschreibt die Aufrechterhaltung eines inneren Milieus, das in Abhängigkeit unterschiedlicher Kompartimente optimale Zellfunktionen ermöglicht. Zudem liegen definierte Ionenkonzentrationen in der Zelle und dem Organismus vor. Beispielsweise enthalten Vertebratenzellen einen hohen Anteil an Kalium, jedoch nur eine geringe Natriumkonzentration. Im Extrazellularraum sind diese Verhältnisse umgekehrt. Dadurch entstehen elektromotorische Kräfte, welche sich im Zellpotenzial widerspiegeln. Kalium, Natrium und Chlorid sind bei der Bildung des Membranpotenzials die Schlüsselionen. Durch diese ungleiche Ionenverteilung kann potenzielle Energie gespeichert werden. Damit wird die Voraussetzung für aktive Transportprozesse geschaffen. Durch osmotische Ausgleichsbestrebungen kommt es zu einer steten Diffusion der Ionen zum Kompartiment mit der geringeren Konzentration. Daher müssen diese Ionen zur Aufrechterhaltung des Membranpotenzials aktiv zurücktransportiert werden.

Diese Austauschvorgänge erfolgen in erster Linie an Epithelien, spezialisierten Zellverbänden, die nahezu alle Körperoberflächen bedecken und die Grenze zur Umwelt bilden. Sie ermöglichen u.a. die Aufnahme von Nahrungsbestandteilen im Dünndarm, den Gasaustausch in der Lunge und die Ionenresorption in den Nieren. Die Epithelien sind infolge der Zellmorphologie polar angelegt. Die dem Lumen zugewandte, so genannte apikale Zellmembran ist infolge vieler Mikrovilli stark oberflächenvergrößert. So wird die Austauschgeschwindigkeit zwischen Zelle und

Lumen maximiert (Dierichs, 1975). Die dem Organismus zugewandte basolaterale Membran der Epithelzelle ist der Basallamina aufgelagert und über verankernde Proteine, so genannte Zelladhäsions-Proteine, mit ihr verbunden (Rubtsov und Lopina, 2000). Zudem befinden sich auf der basolateralen Membran Hormonrezeptoren, die u.a. eine Modifikation der zahlreichen gewebsspezifischen Transporterproteine vermitteln. Diese Transportproteine sind notwendig, damit Stoffe aus der Umgebung aufgenommen werden können. Sie halten den Konzentrationsgradienten zwischen dem Lumen und der Zelle bzw. dem Gewebe aufrecht. Über die basolaterale Membran erfolgen Austauschprozesse mit den Kapillaren des Blutgefäßsystems. Je nach Dichte des Epithels erfolgt ein regulierbarer transzellulärer Stoffaustausch durch die Epithelzelle oder ein wenig regulierbarer parazellulärer Stoffaustausch durch die Epithelzellzwischenräume.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen resorbierenden und sezernierenden Epithelien. Typische resorbierende Epithelien findet man in der Lunge oder im Dünndarm, typische sezernierende Epithelien befinden sich in Schweiß- und Speicheldrüsen. Allerdings sind die gewebsspezifischen Epithelien nicht auf eine Art des Austauschprozesses festgelegt. Dies zeigt das Beispiel der Säugerlunge. Das Gasaustauschgewebe wird als ein resorbierendes Epithel eingestuft (Illek et al., 1990; Pitkanen und O'Broovich, 1998). Die dortigen Epithelzellen, welche hauptsächlich für diese Charakterisierung verantwortlich sind, erfüllen aber zusätzlich noch sezernierende Aufgaben wie die Freisetzung von Surfactantbestandteilen in das Lungenlumen (Orgeig und Daniels, 2001; Rotin, 2000). Die resorbierende Eigenschaft der adulten Lunge beruht zu einem großen Teil auf der gerichteten Natriumaufnahme. Diese wird gewährleistet durch apikal lokalisierte epitheliale Natriumkanäle (ENaCs) und nicht-selektive Kationenkanäle sowie die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase (O'Grady und Lee, 2003).

Letztere bewirkt unter ATP-Verbrauch einen Austausch von Na^+ -Ionen gegen K^+ -Ionen. Dabei werden drei Natrium-Ionen aus der Zelle heraus und zwei Kalium-Ionen in die Zelle transportiert. Die Rate der Natriumaufnahme aus der Umgebung in das Gewebe wird zusätzlich zur Na^+/K^+ -ATPase durch die ENaCs limitiert. Diese ENaCs sind von zentraler Bedeutung für die Regulation der Aufnahme von luminalem Natrium in dichten Epithelien. Sie wurden funktionell erstmals in der Haut von *Xenopus laevis* nachgewiesen (Sariban-Sohraby und Benos, 1986). Mittlerweile konnte deren Vorkommen in der Wirbeltierrniere, dem Colon und der Lunge von

Vertebraten gezeigt werden (Sharegi und Stoner, 1978; Knowles et al., 1984; Will et al., 1985; Frindt et al., 1990; Boucher und Gatzky, 1983). Daneben wurden auch in systematisch entfernt verwandten Lebewesen wie der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) oder dem Blutegel (*Hirudo medicinalis*) Natriumkanäle mit vergleichbaren Eigenschaften charakterisiert (Weber et al., 1995; Liu et al., 2003). Über die hochkonservierte Struktur des Kanals hinaus sind Homologien zu mechanosensitiven Kanälen, so genannten Degenerinen, bei *Caenorhabditis elegans* zu erkennen (Lingueglia et al., 1996). Wegen der strukturellen Verwandtschaft werden beide zu einer Proteinfamilie gezählt, der auch pH-sensitive Natriumkanäle angehören (Mano and Driscoll, 1999; Waldmann et al., 1999). Die epithelialen Natriumkanäle besitzen eine hohe Selektivität für Natrium. Zudem sind sie spezifisch hemmbar durch das Schleifendiuretikum Amilorid und weisen lange Kanalöffnungszeiten sowie eine Einzelkanalleitfähigkeit zwischen 4 und 5 pS auf. Homologe Kanäle zu dem 1994 erstmals von Canessa et al. aus dem Rattencolon isolierten ENaC wurden mittlerweile auch in nicht epithelialen Geweben wie dem Gehirn (BNC-1 und BNC-2) oder den Hoden gefunden (Lingueglia et al., 1995; Waldmann et al., 1995; Price et al., 1996; Garcia-Anoveros et al., 1997; Ishibashi und Marumo, 1998). Alle Kanäle dieser Proteinfamilie sind aus drei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Bislang sind α -, β - und γ -Untereinheit als Bestandteile des ENaC in Epithelien isoliert worden, die δ -Untereinheit aus dem Gehirn, der Bauchspeicheldrüse, den Hoden und dem Ovar. Alle Untereinheiten bestehen aus kurzen intrazellulären N- und C-terminalen Bereichen, zwei Transmembrandomänen sowie einer großen extrazellulären Schleife. Gemeinsam bilden sie vermutlich als Tetramere, bestehend aus zwei α -, und je einer β -Untereinheit sowie gewebesabhängig einer γ - oder einer δ -Untereinheit, den Amilorid-sensitiven Natriumkanal (Firsov et al., 1998).

Der ENaC kann über eine Vielzahl an Modulatoren reguliert werden. Generell spielen dabei der pH-Wert, die zelluläre Ca^{2+} -Konzentration und sowohl extra- als auch intrazelluläre Natriumkonzentrationen eine entscheidende Rolle (Garty und Palmer, 1997). Außerdem gelten bei Vertebraten die Hormone Aldosteron und Vasopressin als Modulatoren der apikalen Natriumaufnahme (Masilamani et al., 1999; Loffing et al., 2000; Nicod et al., 2002). Das Steroid Aldosteron bewirkt die verstärkte Expression der ENaC-Gene, wodurch die Wirkung über einen längeren Zeitraum ausgerichtet ist. Im Falle der Steroide erfolgt diese über ein GRE (Glucocorticoid-

Response-Element) was im 5' Bereich der α -Untereinheit beim Menschen gefunden wurde (Wang et al., 2000). Das Peptidhormon Vasopressin steigert hingegen über eine Rezeptor-gekoppelte Kaskade die intrazelluläre cAMP-Konzentration was zu einer verstärkten Natriumaufnahme auf Grund einer erhöhten Anzahl aktiver ENaCs in der apikalen Zellmembran führt. Die Regulation der ENaCs kann folglich an mehreren Stellen ansetzen. Diese beinhaltet neben einer verstärkten Genexpression, die Regulation der absoluten Anzahl der in die apikale Zellmembran eingebauten ENaCs, der Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle und die Modulation der Verweildauer zwischen Insertion der apikalen Kanäle und anschließender Internalisierung. Entsprechend kann unterschieden werden zwischen lang und kurz andauernden Effekten. Neuere Untersuchungen weisen zudem auf Regulationsmöglichkeiten durch extrazellulär wirkende Proteasen hin (Vallet et al., 2002).

Neben der direkten Modifikation von ENaC Untereinheiten wie Phosphorylierungen, kann eine Regulation auch über assoziierte zelluläre Proteine stattfinden (Awayda et al., 1996). Eines dieser ENaC-bindenden Proteine ist Nedd4, welches mindestens eine Untereinheit des Kanals ubiquitiniert, was als Signal zum Ausbau des Kanals aus der Membran fungiert. Auswirkungen einer Regulationsstörung auf dieser Ebene sind beim Liddle-Syndrom zu erkennen. Dort führt eine Mutation in der Interaktion mit Nedd4 notwendigen PY-Motiv zu einem verminderten Ausbau der ENaCs aus der Zellmembran durch das fehlende Ubiquitinierungssignal (Staub et al., 2000). Die Folge ist eine vererbte Form des Bluthochdrucks (Abriel et al., 1999). Nedd4 stellte eines der ersten nachgewiesenen ENaC-bindenden und regulierenden Proteine dar. In letzter Zeit werden jedoch verstärkt Faktoren gefunden wie z.B. das Nedd4 verwandte Protein KIAA0439, die in der Lage sind, den ENaC zu binden und die apikale Natriumaufnahme zu beeinflussen (Harvey et al., 2001).

Eine entwicklungsabhängige Regulation der ENaC-Transkriptionsrate wurde in Epithelien der Niere und Lunge nachgewiesen (Vehaskari et al., 1998; Watanabe et al., 1999). Die Expression der ENaCs erreicht etwa zum Zeitpunkt der Geburt den Höhepunkt. Diese Besonderheit deutet auf eine wichtige Rolle des ENaC in der Lunge bei der Umstellung des Alveolarepithels von pränatal sezernierend zu postnatal absorbierend hin (Tchepichev et al., 1995). Denn die pränatal flüssigkeitsgefüllte Lunge macht bei der Umstellung auf Luftatmung ein schnelles Austreiben des Wassers aus den Alveolen erforderlich. Eine wichtige treibende Kraft für diesen Prozess der Wasserdiffusion aus dem Lungenlumen ist die

Natriumaufnahme durch den ENaC, welcher auch in dem postnatal resorbierenden Alveolarepithel für den größten Teil der Natriumabsorption verantwortlich ist. Der beschriebene Regelkreislauf verdeutlicht die sensiblen Zusammenhänge zwischen Elektrolythaushalt und Flüssigkeitsbedeckung des Lungenepithels.

Dieser Flüssigkeitsfilm (engl.: alveolar surface liquid = ASL) umfasst drei verschiedene Schichten, die pericilliare Flüssigkeit, das Surfactant und den abschließenden Mucus (Rubin, 2002). Die Zusammensetzung des Flüssigkeitsfilms ist wichtig für den Gasaustausch (Hallman et al., 2001). Die entscheidende Rolle der Natriumresorption bei der Viskosität der Pericilliarflüssigkeit wurde von Matthay et al. (2000) beschrieben. Diese Natriumresorption erfolgt bei Säugern vornehmlich über die alveolaren Typ II (ATII) Zellen, einem kleinen spezialisierten Zelltyp der Alveolen. Sie machen den größten Teil des resorbierenden Alveolarepithels aus und entstehen aus Vorläuferzellen, so genannten alveolaren Typ I (ATI) Zellen.

Auch bei *Xenopus laevis* erfolgt der Gasaustausch sowohl durch Lungen- als auch durch Hautatmung. Im Gegensatz zu anderen Anuren wie z.B. *Rana pipiens* wird aber ein großer Teil des Sauerstoffbedarfs über die Lungenatmung sichergestellt. In der Literatur differieren die Angaben über den Anteil der Lungenatmung am Gasaustausch der Tiere zwischen 30% und 80% (de Graaf, 1957; Deuchar, 1975). Die Form der Atmung wird als Druckatmung bezeichnet, da Inspiration und Expiration ausschließlich aufgrund der Elastizität der Lungenwand erfolgen (Storch und Welsch, 1993). Die Luft wird über den Bronchus in die, zur Oberflächenvergrößerung mit vielen Trabeculae versehene, große Lunge aufgenommen. Dort findet der Gasaustausch statt.

Sowohl im Hinblick auf die Funktionalität der Epithelzellen, als auch in bezug auf die Zusammensetzung des die Lungen bedeckenden Flüssigkeitsfilms kann man deutliche Parallelen zwischen Säugern und Amphibien erkennen (Meban, 1975; Daniels und Orgeig, 2001; Miller et al., 2001). Die Lungenepithelzellen von *Xenopus laevis* vereinen die Zellfunktionen der ATII-Zellen mit einer den ATI-Zellen der Säuger vergleichbaren Morphologie (Fischer et al., 1989). Aus diesem Grund kann man die *Xenopus*-Lunge als Lungen-Modell für elektrophysiologische Untersuchungen an intakten Epithelien heranziehen. Die hohe Komplexität und verästelte Struktur von Säugерlungen erlaubt dies nicht und Untersuchungen am intakten Organ können lediglich unter immensem Aufwand durchgeführt werden. Versuche mit Zellkulturen stellen hingegen lediglich den Epithelverband ohne

Bindegewebe dar und zeigen aufgrund der ausschließlichen Differenzierung zum ATI-Typ nicht die Diversität der Epithelzellen der Lunge. Die *Xenopus* Lunge erlaubt im Unterschied dazu in einer Ussing-Kammer den intakten Zellverband eines nativen Lungenepithels elektrophysiologisch zu studieren und damit transepitheliale Ionenbewegungen zu charakterisieren.

Da wegen der exponierten Situation der Lunge ein direkter Kontakt zur Umgebung besteht, ist das Alveolarepithel Krankheitserregern oder Noxen wie reaktiven Oxidanzien unmittelbar ausgesetzt. Das Immunsystem begegnet dem zunächst durch die Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen, welche in den Alveolarraum einwandern und sich dort am Ort der Entzündung ansammeln (Baeza-Squiban et al., 1999). Im Rahmen der unspezifischen Immunantwort gehen sie durch Freisetzung von cytotoxischen Substanzen gegen den Krankheitserreger vor. Bei diesen Substanzen handelt es sich vor allem um Histamine, Stickstoffmonoxid (NO), Leukotriene und deren Verwandte, die Prostaglandine (Fels und Cohn, 1986). Folgerichtig konnten bei asthmatischen Lungenerkrankungen oder cystischer Fibrose, deren Krankheitsbilder von Entzündungen im Alveolarraum gekennzeichnet sind, erhöhte Konzentrationen von NO und PGE₂ in der ausgeatmeten Luft nachgewiesen werden (Montuschi und Barnes, 2002). Bei Entzündungen des Lungenepithels bzw. deren Bekämpfung spielt die Pericilliarflüssigkeit eine entscheidende Rolle (Duszyk und Radomsky, 2000). Daraus lässt sich eine Abhängigkeit der erfolgreichen Immunabwehr von der Zusammensetzung des ASL ableiten. Die Regulation dieser Zusammensetzung hängt von Ionenresorptions- und Ionensekretionsprozessen ab. Dies verdeutlicht die Bedeutung von Ionenaustauschprozessen bei Entzündungsprozessen und eröffnet Fragen nach einer möglichen Wechselwirkung von Entzündungsmediatoren und transepitheliale Ionen-transport.

In der vorliegenden Arbeit werden vornehmlich zwei der wichtigsten Entzündungsmediatoren, PGE₂ und NO, in bezug auf deren Einfluss auf den Ionen-transport untersucht. Die Auswirkungen von NO auf die Natriumaufnahme wurde bislang vornehmlich an kultivierten Ratten-Alveolarzellen untersucht. Dabei zeigte sich eine inhibierende Wirkung von NO auf den ENaC-vermittelten Natriumstrom (Guo et al., 1998). Wie Ding et al. (1998) nachwiesen, konnte diese

Reduktion des Natriumstroms auch durch die künstliche Aktivierung von alveolaren Makrophagen hervorgerufen werden.

PGE₂ ist ebenfalls ein wichtiger Faktor, der bei Entzündungen freigesetzt wird. Dessen Produktion wurde außer für Makrophagen und Mastzellen bereits für die Amphibienhaut sowie das Duodenum, die Harnblase und die Lunge von *Xenopus laevis* nachgewiesen (Rytved et al., 1995; Bachteeva et al., 2002). Ein Einfluss von PGE₂ auf den transepithelialen Ionentransport der Froschhaut von *Rana esculenta* und auf den Natriumtransport in A6-Zellen von *Xenopus laevis* konnte von verschiedenen Gruppen verifiziert werden (Matsumoto et al., 1997; Els et al., 1998). Die vorliegende Arbeit soll die Auswirkung von Entzündungsmediatoren auf den Ionentransport in der *Xenopus* Lunge allgemein und zusätzlich den Einfluss reaktiver Oxidantien auf die ENaC-vermittelte Natriumabsorption charakterisieren. Dies wurde mit Hilfe zweier unterschiedlicher Systeme durchgeführt. Als etabliertes Modell bei der Untersuchung der ENaC-Charakteristik erwies sich die Expression der verschiedenen ENaCs in der *Xenopus* Oocyte und die Messung transmembranärer Ströme mittels Zwei-Elektroden Spannungsklemme (George et al., 1989; Asher et al., 1992). Daneben wurde für Untersuchungen des Ionenflusses im nativen Gewebsverbund die Lunge von *Xenopus laevis* herangezogen. Die sackartige Lunge von *Xenopus* lässt sich durch einfache Präparation flach aufspannen, was eine zentrale Voraussetzung für die Anwendung der Ussing-Kammer Technik darstellt. Durch die damit erhaltene Trennung von apikalem und basolateralem Kompartiment können elektrogene transepitheliale Vorgänge charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Das Versuchstier *Xenopus laevis*

Bei den Versuchstieren der vorliegenden Arbeit handelt es sich um Weibchen des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Diese wurden entweder von African Xenopus facility (Knysna, Südafrika) oder von Kähler (Hamburg) bezogen. Die zu den elektrophysiologischen Versuchen herangezogenen Tiere hatten eine Körperlänge von 8 bis 14 cm und wogen zwischen 60 und 120 g.

2.1.1 Systematik

Die systematische Einordnung von *Xenopus laevis* ist nach der von Storch und Welsch (1993) vorgenommenen Unterteilung wie folgt:

Unterreich:	Metazoa
Stamm:	Chordata
Unterstamm:	Vertebrata
Überklasse:	Gnathostomata
Klasse:	Amphibia
Ordnung:	Anura
Unterordnung:	Archaeobatrachia
Superfamilie:	Pipoidea
Familie:	Pipidae
Unterfamilie:	Xenopodinae
Gattung:	<i>Xenopus</i>
Art:	<i>Xenopus laevis</i>

2.1.2 Morphologie und Physiologie

Der euryök lebende *Xenopus laevis* kommt ursprünglich aus dem Südwesten Afrikas. Dort leben sie im Brackwasser oder am Boden schlammiger Seen. Das Namen-

gebende Charakteristikum von *Xenopus laevis* sind die schwärzlichen Krallen an den inneren drei Phalangen der Hinterextremitäten. Anhand verschiedener morphologischer Merkmale lässt sich die rein aquatische Lebensweise erkennen. *Xenopus laevis* verfügen über ausgeprägte hintere, seitlich vom abgeflachten Körper abstehende Schwimmemtremitäten, nach oben gerichtete Augen und ein deutlich ausgeprägtes Seitenlinienorgan. Zudem weist *Xenopus laevis* kein äußerlich sichtbares Trommelfell auf, was ein charakteristisches Merkmal terrestrischer bzw. semiterrestrischer Anuren ist.

2.1.3 Tierhaltung

Die Weibchen wurden in Gruppen von 10 bis 20 Tieren bei 14 bis 15 °C Wassertemperatur in 250-l-Becken gehalten. Die Aquarien verfügten über einen permanenten Wasserdurchfluss und kontinuierliche Sauerstoffbegasung durch Sprudelsteine. Die Fütterung erfolgte einmal pro Woche mit Fisch-Pellets der Firma Kölln. Am darauffolgenden Tag fand die Säuberung der Becken von Nahrungsresten und Fäkalien statt.

2.1.4 Präparation

2.1.4.1 Entnahme der Lungen

Den Versuchstieren wurde 48 und 24 Stunden vor Versuchsbeginn subcutan ACTH (Adenocorticotropes Hormon – 0,02 ng/g Körpergewicht) injiziert, um die transepitheliale Natriumaufnahme maximal zu stimulieren (Hanke und Kloas, 1996; Fronius et al., 2003). Die in dieser Weise vorbehandelten Frösche wurden am Versuchstag zunächst für 60 Minuten hypothermal anästhesiert und anschließend dekapitiert. Nach der Öffnung des Bauchraumes konnten die paarig und lateral angelegten Lungen entnommen werden, indem die bindegewebsartige Verwachsung mit den paarigen Leberlappen getrennt und die Lunge am Bronchus durchgeschnitten wurde. Sobald die Lungen aus dem Frosch entfernt waren, wurde die weitere Präparation in Ringer-Lösung (Zusammensetzung siehe Punkt 2.2.1.4) vorgenommen. Durch einen Schnitt entlang des Bronchus wurde die Lunge geöffnet

und die Septen teilweise zerschnitten, um ein flach aufgespanntes Epithel zu erhalten. Es wurden pro Lunge zwei Plexiglasringe mit Histoacrylkleber (Braun, Melsungen) auf dem Gewebe befestigt. Mittels einer Rasierklinge wurden die beiden Präparate voneinander getrennt und in die Messapparatur der Ussing-Kammer eingespannt.

2.1.4.2 Laparotomie (Oocytenentnahme)

Bei der unter dem vorhergehenden Punkt erläuterten Lungenpräparation wurden die Oocyten entweder direkt nach der Öffnung der Muskelschicht herauspräpariert und in Ringerlösung (KulORi, siehe Tab. 2.1) aufbewahrt oder aus eigens hierfür herangezogenen Tieren entnommen. Dabei erhielten diese Frösche eine 30minütige hypothermale Anästhesie, woraufhin sie für 10 – 15 Minuten in einem Becken mit dem Narkotikum MS-222 (0,13%ig in Ringer/Ethyl-3-Aminobenzoat-Methansulfat) betäubt wurden. Dabei war darauf zu achten, dass die Nasenlöcher der Weibchen sich oberhalb des Flüssigkeitsspiegels befanden, um einem Ertrinken der Tiere vorzubeugen. Bei dem Umgang mit MS-222 wurden Handschuhe getragen, da das Narkotikum unter dem Verdacht der Kanzerogenität steht. Wenn der Umkehrreflex des Frosches, welcher normalerweise beim Drehen des Tieres auf die dorsale Seite einsetzt, nicht mehr funktionierte, begann die Operation. Auf der ventralen Seite wurde ein etwa ein Zentimeter langer Schnitt zwei Zentimeter oberhalb des Ansatzes der hinteren Extremitäten und zwei Zentimeter lateral der Mitte des Tieres durch Haut- und Muskelschicht gemacht. Durch diesen wurde ein Teil des Ovars entnommen und sofort in KulORi gegeben. Nun erfolgte die Vernähung der Wunde mit zwei bis drei Fäden der selbstauflösenden, sterilen Nähseide (Vömel, Kronberg). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Wundränder glatt aneinander abschlossen. Das Weibchen wurde nun unter fließendem Wasser behutsam geweckt bis es wieder den Umkehrreflex aufwies und bis zur Verheilung der Wunde in einem separierten Becken gehalten.

Für Haltung und Oocytenentnahme mittels Laparotomie lag eine Genehmigung des RP Gießen vor (Antrag RD Giessen II 25.3. – 14c 20-15(1) GI 15/2). Da diese im Oktober 2002 auslief, wurden die Oocyten in der Folge nur Fröschen entnommen, deren Tötung im Rahmen der Lungenpräparation erfolgte. Für diese lag die Genehmigung des RP vom 25.7.01 AZ: GI 20/10 – Nr.27.2001 vor.

2.2 Elektrophysiologische Messungen

2.2.1 Ussing-Kammer

2.2.1.1 Aufbau der Ussing-Kammer

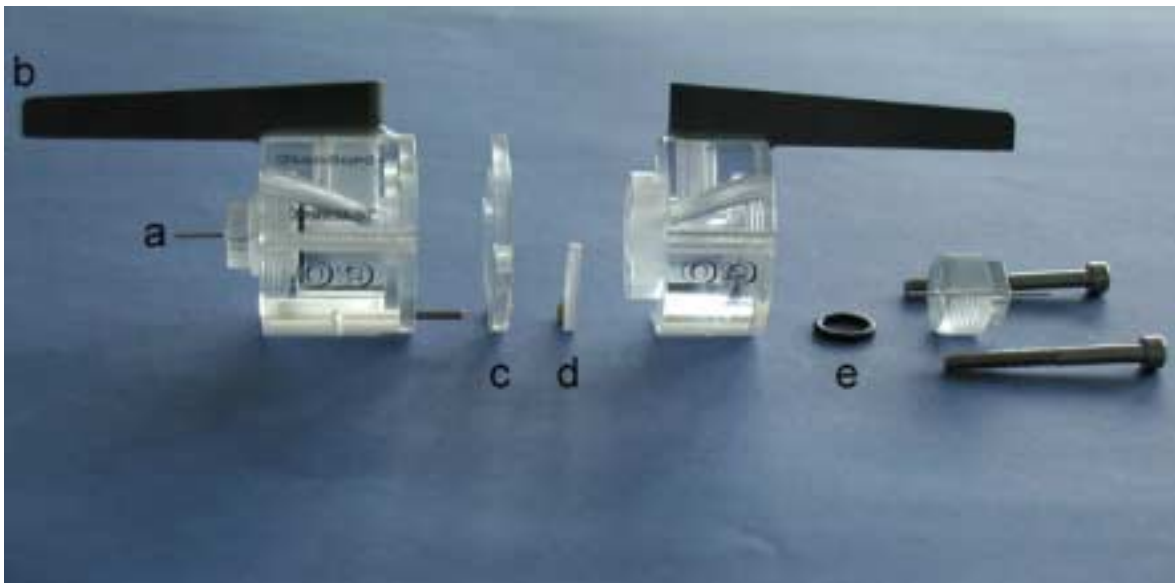


Abb. 2-1: Bestandteile der Ussing-Kammer

Explosionsansicht einer Ussing-Kammer. Die Lunge bildet die einzige Austauschfläche (a= Zufluss; b= Lösungsabfluss; c= Trennscheibe; d= Plexiglasring zum Einspannen des Lungenepithels ; e= Dichtungsring).

Mit Hilfe der Ussing-Kammer ist es möglich, transepitheliale Ströme zu messen. Zu diesem Zweck weist die Ussing-Kammer komplette voneinander getrennte Kompartimente, ein apikales sowie ein basolaterales Kompartiment, auf. Beide verfügen über ein Perfusionssystem mit separatem Zu- und Abfluss. Die einzige Austauschmöglichkeit bietet das die beiden Kammerhälften trennende Lungenepithel. Der Aufbau ist in Abb. 2-1 dargestellt. Wie in Kap. 2.1.4.1 bereits beschrieben, wurden Ringe mit Histoacrylkleber auf der flächigen Lunge fixiert. Diese Ringe besitzen eine Austauschfläche von $0,5 \text{ cm}^2$. Sie wurden zwischen die beiden

Kammerhälften eingesetzt und fest verschraubt. Um Verletzungen des Gewebes zu vermeiden, wurden die Kontaktstellen mit Silikon bestrichen.

2.2.1.2 Die Ussing-Kammer Elektroden

Chlorierte Silberelektroden fungierten als Strom- sowie Spannungselektroden (Eigenpotential < 1 mV). Sie befanden sich in 3 M KCl Lösung, welche über eine 1%ige Agarbrücke der gleichen Salzkonzentration mit den Lösungen im apikalen bzw. basolateralen Kompartiment verbunden waren. Für Experimente mit Chlorid-freien Lösungen bestanden die Agarbrücken aus 3 M K_2SO_4 . Die Potentialelektroden saßen direkt am Gewebe (1 mm Abstand), während die Stromelektroden weiter vom Gewebe entfernt in die Badlösung tauchten.

2.2.1.3 Aufbau der Spannungs-Klemm-Apparatur

Die Ussing-Kammer saß während eines Versuchs auf einem Sockel, welcher die Kontakte für die Ableitung der vier Elektroden zum Vorverstärker enthielt. Der Vorverstärker war direkt mit der Spannungs-Klemme verbunden, welche zum einen die Messinformationen direkt auf einen analogen Zweikanalschreiber (Kipp und Zonen) übertrug und zum anderen über ein Interface (Maclab 2e) mit einem Rechner (Mac LC) verbunden war. Auf diesem wurden mit Hilfe des Programms Chart 3.3 die von der Spannungsklemme gemessenen und anschließend digitalisierten Strom- und Potentialwerte aufgenommen. Zu Beginn eines jeden Versuches erfolgte die Ermittlung des transepithelialen Potentials (V_m), welches im Anschluss mittels Spannungs-Klemme auf ein vorgegebenes Haltepotential von 0 mV eingestellt wurde. Nun war es möglich, den Kurzschlussstrom (I_{sc} – short-circuit current) zu messen. Dabei wurde V_m permanent über die Potentialelektroden gemessen und über die Stromelektroden ein Strom appliziert, welcher notwendig war, um das Potential von 0 mV zu gewährleisten. Der applizierte Strom war dabei jenem äquivalent, welcher über das Lungenepithel fließt. Somit können in dem künstlich herbeigeführten Klemm-Zustand transepitheliale Ströme gemessen werden. Für diese gilt die Konvention, dass eine transepitheliale Aufnahme positiver Ladungsträger (Strom von apikal nach basolateral) bzw. eine transepitheliale Sekretion negativer Ladungen als positiver Strom dargestellt wird. Negative Ströme

erhält man demnach durch transepitheliale Sekretion positiver Ladungen bzw. die transepitheliale Aufnahme negativer Ladungsträger.

Der transepitheliale Widerstand (R_T) wurde durch zwei Sekunden andauernde Spannungspulse von 2 mV bestimmt. Hierbei kam es zu einer Stromänderung, über welche mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes R_T bestimmt wurde.

2.2.1.4 Versuchsbedingungen und Messprotokoll

Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit des Frosch-Ringers (NRS) betrug dabei konstant 5 ml/min. Nach anfänglicher Äquilibration des Epithels wurden apikal 10 μ M Amilorid gegeben und beim Einstellen eines konstanten Stromwertes apikal Na⁺-freier ORi appliziert. In der Folge wurde diese mit NRS ausgewaschen. Die Differenz zwischen dem Stromwert unter Amilorid und demjenigen nach dem Auswaschen, wurde als Amilorid-sensitiver Strom (I_{ami}) bezeichnet, diejenige zwischen dem Plateaustrom unter natriumfreien Bedingungen und dem Stromwert nach dem Auswaschen als Gesamt-Natriumstrom (I_{Na}). Im Anschluß wurde der Effekt verschiedener Pharmaka auf den I_{ami} sowie I_{Na} bestimmt. Dazu wurde nochmals in Anwesenheit der Substanz apikal Amilorid bzw. Na⁺-freier Ringer gegeben.

Frosch-Ringer: 100 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM Glucose.

Amilorid Stammlösung: 10 mM in dd H₂O

Na⁺-freie Lösung: 100 mM N-Methyl-D-Glucamin (NMDG), 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM Glucose.

Cl⁻-freie Lösung: 50 mM Na₂SO₄, 1,5 mM K₂SO₄, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaSO₄, 53,5 mM Mannitol, 5 mM HEPES und 10 mM Glucose.

Der pH-Wert wurde mit 3 M Tris-HCl bzw. 1 M NaOH oder 1 M KOH auf 7,4 eingestellt.

2.2.2 Zwei-Elektroden Spannungsklemme (Voltage-Clamp)

2.2.2.1 Aufbau der Messapparatur

Die Messkammer verfügte über eine Vertiefung für die stabile Lagerung der Oocyte. Der kontinuierliche Lösungsdurchfluss wurde durch einen erhöhten Standort der Vorratsflaschen, welche das Perfusat durch Infusionsschläuche in die Messkammer leiteten, und eine absaugende Vakuumpumpe gewährleistet. Zum Schutz vor elektrischen Störungen ist ein Filter in die Messapparatur integriert (siehe Abb. 2-2). Die Kammer und der Mehrwegehahn, die sich zwischen Vorratsbehältern und Zulauf befinden, sind aus nicht leitendem Plexiglas gefertigt. Außerdem ist die Messapparatur (Messkammer und Elektrodenhalter) auf einem druckluftgedämpften Tisch befestigt. Dieser befand sich in einem Faradayschen Käfig. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur vorgenommen.

2.2.2.2 Herstellung der Mikroelektroden

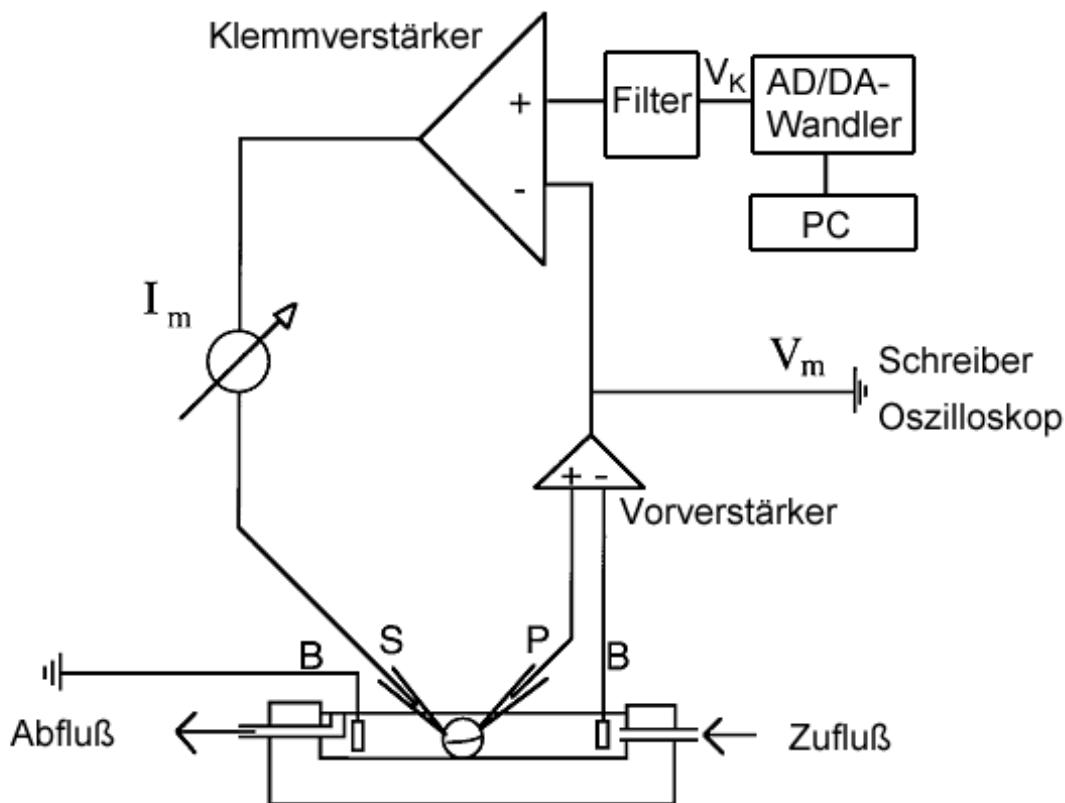
Der Silberdraht der Elektrodenhalter wurde vor der Messung chloriert. Mit einem Laserpuller (Sutter Instrument Co) wurden die von Hilgenberg bezogenen Borosilikat-Filamentkapillaren auf einen Spitzendurchmesser von weniger als einem μm gezogen. Diese wurden im Anschluss luftblasenfrei mit 1 M KCl befüllt und auf den Elektrodenhalter der Potential- und der Stromelektrode gesteckt. Es wurden nur Elektroden eingesetzt, deren Spitzenwiderstand zwischen 0,5 M Ω und 5 M Ω lag.

2.2.2.3 Messprinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die unterschiedliche Verteilung von Ionen in von selektiv permeablen Membranen getrennten Kompartimenten führt zur Bildung eines Potentials. Das elektrochemische Potential von Zellen (V_m) gibt die Differenz zwischen intrazellulärem- und extrazellulärem Potential an, welches für tierische Zellen in der Regel unter 0,1 V liegt (Axon Guide/ Axon Instruments).

Das Membranpotential wird bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durch eine in die Zelle eingestochene Potentialelektrode und die in der Umgebungslösung befindlichen Badelektrode bestimmt. Zusätzlich wird eine Stromelektrode in die Oocyte eingestochen. Dies gewährleistet die Messung transmembranärer Ströme mittels der Spannungs-Klemm-Methode. Die von Hodgkin, Huxley und Katz entwickelte Messmethode ermöglicht das Klemmen des Potentials auf einen willkürlichen Wert. Dabei vergleicht eine Computersoftware, welche über einen AD/DA-Wandler (CED1401) angeschlossen ist, das tatsächliche Membranpotential mit dem Sollwert (siehe Abb. 2-2). Über die Stromelektrode wird beim Klemmvorgang vom Voltage-Clamp Verstärker (OCB-725B, Warner) ein Strom appliziert, welcher notwendig ist, um das Sollpotential zu erreichen. Dieser applizierte Strom entspricht dem durch die Oocytenmembran fließenden Strom. Hierdurch ist eine Messung des Ionenstroms möglich. Bei Versuchen mit *Xenopus* Oocyten wurde ein Klemmpotential von -60 mV gewählt, da dieses dem Membranpotential nativer Oocyten entspricht. Die Aufzeichnung von Potential und Strom erfolgte kontinuierlich durch einen Zweikanalschreiber (Kipp und Zonen). Zudem wurden die Stromwerte mit einem Ampèremeter gemessen und protokolliert. Mit Hilfe eines Oszilloskops wurde die Messung hinsichtlich elektrischer Störungen überwacht.

Ein Computerprogramm des MPI für Biophysik in Frankfurt a. M. ermöglichte die Erstellung von IU-Kurven. Dabei wurde das Potential in Intervallen von einer Sekunde für einen Zeitraum von 400 ms in 10 mV-Stufen von -110 mV bis $+40\text{ mV}$ geklemmt. Das Programm speicherte die bei den Klemmpotentialen fließenden Ströme, was bei einer graphischen Auftragung des Membranstromes gegen den jeweiligen Potentialwert zu charakteristischen Kurven führte. Diese IU-Kurven wurden im Versuchsablauf jeweils direkt vor dem Lösungswechsel erstellt.



Legende:

B: Badelektrode

S: Stromelektrode

P: Potentialelektrode

V_k : Klemmpotential

I_m : Transmembranärer Strom

V_m : Membranpotential

Abb. 2-2: Schematisierter Aufbau der Messapparatur der Zwei-Elektroden Spannungsklemme.

2.2.2.4 Oocytenaufbereitung

Die Entnahme der Oocyten enthaltenden Ovarien wurde bereits in Kap. 2.1.4.1 bzw. 2.1.4.2 beschrieben. Um die Oocyten aus dem Gewebsverband zu lösen und somit zu vereinzeln, wurde zunächst das Ovar per Pinzette mechanisch zerzupft. Daraufhin erfolgte während einer 90minütigen Inkubation auf einem Schüttler (bei Raumtemperatur) die enzymatische Verdauung der anhängenden

Bindegewebsstrukturen durch eine Collagenase-Lösung (1-1,2 U/ml KuLORi; die Zusammensetzung der unterstrichenen Lösungen ist in den Tabellen 2-1 und 2-2 aufgeführt). Die Zell-Zell-Verbindungen zu den der Nährstoffversorgung der Oocyten dienenden Follikelzellen wurden durch anschließende 10minütige Inkubation in Ca²⁺-freiem KuLORi getrennt und die Follikelzellen gewaschen. Somit wurde eine Vereinzelung der Oocyten erzielt. Für die Versuche wurden lediglich runde, gleichmäßig pigmentierte Oocyten der Stadien V und VI (Dumont, 1972) verwendet, die aussortiert und bis zur Injektion der cRNA in KuLORi bei 15°C im Brutschrank (ICE 400, Memmert-Schwalbach) aufbewahrt wurden.

2.2.2.5 Mikroinjektion mRNA in *Xenopus* Oocyten

Zur Verhinderung von Verunreinigungen durch RNasen wurden die hier beschriebenen Vorgänge mit Handschuhen durchgeführt. Mit einem vertikalen Puller wurden Borosilikat-Kapillaren (Hilgenberg) gezogen und luftblasenfrei mit Mineralöl gefüllt. Diese wurde auf die zuvor gründlich von Staub befreite Mikroinjektionspumpe (Nanject) gesteckt und ein Überdruck im Innern der Kapillare erzeugt. Dank dieses Überdrucks wurde die Luft, welche sich noch in der zugeschmolzenen Kapillarspitze befand beim vorsichtigen Abbrechen der Spitze herausgedrückt. Nachdem die Spitze für 5 – 10 Minuten in Öl getaucht worden war, um einen Druckausgleich zu gewährleisten, konnte die unter Mineralöl pipettierte RNA aufgesogen werden. In die aussortierten Oocyten wurden anschließend zwischen 27,6 und 41,4 nl injiziert. Dies entsprach einer Menge von ca. zwei Nanogramm/ ENaC-Untereinheit cRNA pro Oocyte. Die Oocyten lagerten bis zu den Versuchen bei 15° C in NMDG-Ringer im Inkubationsschrank. Die Messungen wurden 16 – 64 Stunden nach der Injektion durchgeführt, wobei der NMDG-Ringer täglich gewechselt wurde.

2.2.2.6 Versuchsprotokoll und Lösungen

Während des Versuchs wurde ORi als Superfusionslösung eingesetzt. Pharmaka wie Amilorid wurden ebenfalls in ORi appliziert, um konstante Bedingungen beizubehalten. Nach dem Einstechen von Spannungs- und Stromelektroden wurde 10 Minuten gewartet. Dies gewährleistete die Verheilung der Einstichstelle. Im

Anschluss wurde das Potential auf -60 mV geklemmt. $10\text{ }\mu\text{M}$ Amilorid wurden appliziert als der Strom der Oocyte konstant war. Hatte der Strom wiederum einen Plateauwert erreicht, wurde der Blocker durch ORi ausgewaschen. Für die Auswertung wurde der Amilorid-sensitive Strom aus der Differenz zwischen dem Stromwert unter Amilorid und demjenigen nach dem Auswaschen bestimmt. Nun folgte die Superfusion z.B. mit cGMP-ORi oder cAMP-ORi. Nachdem der Strom wieder konstant war, wurde additiv $10\text{ }\mu\text{M}$ Amilorid gegeben, woraufhin bei erneutem Erreichen eines Stromplateaus Na⁺-freier ORi den Versuch abschloss.

Tab. 2-1: Bestandteile der Kulturlösungen

Lösungen für die Präparation und Lagerung der Oocyten. Der pH-Wert wurde mit 3 M Tris oder 1 M HCl (NMDG-KulORi) eingestellt. Die Osmolarität wurde mit Mannitol angeglichen.

Substanz	KulORi [mM]	Ca ²⁺ -freier KulORi [mM]	NMDG-KulORi [mM]
NaCl	90	90	10
NMDG	-	-	80
KCl	1	1	1
CaCl ₂	2	-	2
MgCl ₂	-	1	-
HEPES	5	5	-
Na ⁺ -Pyruvat	2,5	-	-
Penicillin	0,06	-	-
Streptomycinsulfat	0,02	-	-

Tab. 2-2: Bestandteile der Superfusionslösungen

Zusammensetzung der Superfusionslösungen für die Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Versuche. Der pH-Wert aller hier aufgeführten Lösungen wurde mit 3 M Tris-HCl auf 7,4 eingestellt.

Substanz	ORi [mM]	Na ⁺ -freier ORi [mM]	cAMP-ORi [mM]	cGMP-ORi [mM]
NaCl	90		90	90
TMA-Cl	-	90	-	-
KCl	1	1	1	1
CaCl ₂	2	2	2	2
HEPES	5	5	5	5
cAMP (8-bromo oder cpt)	-	-	0,05	-
cGMP (8-bromo oder cpt)	-	-	-	0,05
IBMX	-	-	1	1

2.2.3. Auswertung der Messdaten

Bei Ionenströmen, die durch Zellmembranen fließen, gilt die Konvention, dass der Einstrom positiver Ladungsträger in die Zelle, sowie der Ausstrom von Anionen aus der Zelle, als negative Ströme gelten. Analog entsprechen der Ausstrom von Kationen bzw. der Einstrom von Anionen positiven Strömen.

2.2.4. Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes (sem) dargestellt. Signifikanzanalysen wurden mit Hilfe des t-Tests nach Student durchgeführt. Wurde dabei ein $p < 0,05$ ermittelt, galt dies als signifikant verschieden und wurde mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Zusätzlich wird die Zahl der in die Auswertung einfließenden Tiere mit N und die Anzahl der Versuche mit n angegeben.

2.3 Molekularbiologische Methoden zur Gewinnung von cRNA für Expressionsstudien mit *Xenopus* Oocyten

2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Als Ausgangszellen diente der E.coli Stamm IM 109 (Promega). Dieser Stamm wurde auf einer LB-Platte über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Kolonie wurde gepickt und in 2,5 ml LB Medium bei 225 rpm und 37°C über Nacht herangezogen. Diese Übernachtskultur wurde im Verhältnis 1:100 in 250 ml LB-Medium+MgSO₄ verdünnt und für einige Stunden bei 100 rpm und 37°C geschüttelt. Hatte die optische Dichte einen Wert zwischen 0,4 und 0,6 erreicht (Messung im Photometer mit 600 nm-Filter), erfolgte die Pelletierung der Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und 4500 g. Daraufhin wurden die Zellen auf Eis vorsichtig in 100 ml TFB1 resuspendiert und für einen Zeitraum von 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nun erfolgte wiederum die Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 4500 g. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml eiskaltem TFB2 vorsichtig resuspendiert. Nach 60minütiger Inkubation auf Eis wurden 100 µl, 200 µl und 300 µl Aliquots portioniert und die Zellen bei –70°C in einem Bad aus Trockeneis und Isopropanol eingefroren, um sie im Anschluss bei –80°C bis zur Benutzung zu lagern.

LB-Medium: 0,5 % Bacto-Trypon; 1% NaCl; 0,5% Bacto-Yeast Extrakt und 0,1 mg/ml Ampicillin. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt.

LB-Medium+MgSO₄: 2mM MgSO₄ in LB-Medium

TFB1: 30 mM KHCO₃; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 100 mM RbCl und 15% Glycerol. Der pH-Wert wurde mit 1 M Essigsäure auf 5,8 eingestellt und steril filtriert (0,45 µM).

TFB2: 100 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl und 15% Glycerol. pH-Wert mit 1 M KOH auf 6,5 eingestellt.

2.3.2. Bakterien-Transformation

10 µl der Plasmid-DNA ($c = 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$) wurden in einem sterilen Zellkulturröhrchen mit 100 µl der kompetenten Bakterien (IM109 - siehe 2.3.1 oder DH 10 B, Gibco) vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien für 45 Sekunden bei 42°C in ein Wasserbad gestellt. Direkt danach erfolgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis. Daraufhin wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen für eine Stunde bei 160 rpm und 37°C geschüttelt. Die angewachsenen Bakterien wurden dann mit Hilfe eines Drygalski-Spatels in mehreren Verdünnungen auf Agarplatten mit 1,5 ‰ Ampicillin in LB-Medium ausplattiert. Nach 8-12stündiger Inkubation bei 37°C waren die Bakterien, welche das Plasmid mit der Ampicillinresistenz und dem Insert aufgenommen hatten, zu Kolonien herangewachsen.

2.3.3 DNA-Gewinnung aus E.coli

Kulturen der LB-Platten wurden gepickt und über Nacht in 1,5 ml LB-Medium (+1,5 ‰ Ampicillin) bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Die Schüttelkulturen wurden für 30 Sekunden durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Heraeus) bei 11000 g pelletiert und im Anschluss mit 1 ml PPL1 resuspendiert und wiederum für 30 Sekunden, allerdings lediglich mit 9000 g, zentrifugiert. Die Resuspendierung erfolgte mit 100 µl PPL1, woraufhin eine 10minütige Inkubation auf Eis durchgeführt wurde. Nach der Zugabe von 200 µl PPL2 und gründlicher Durchmischung wurde die Lösung für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde sie mit 150 µl 3 M Natriumacetat versetzt und wiederum für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach zentrifugierte man die Lösung für 10 Minuten bei 11000 g und pipettierte den DNA enthaltenden Überstand anschließend in ein neues Eppendorf-Gefäß. Der Überstand wurde mit dem zweifachen Volumen 96%igen Alkohols versetzt und die DNA durch 15minütiges Zentrifugieren bei 11000 g pelletiert. Nachdem das Pellet nochmals mit 70%igem Ethanol gewaschen wurde, erfolgte die Trocknung der DNA unter Vakuumbedingungen im Exsikkator. Die getrocknete DNA wurde anschließend in TE-Puffer aufgenommen.

Midi-Präps wurden mit Hilfe eines Quiagen-Kits und der entsprechenden Anleitung durchgeführt.

<u>PPL1:</u>	50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl/pH 8 und 10 mM EDTA/pH 8.
<u>PPL2:</u>	150 mM NaOH und 1% SDS.
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM Tris-HCl/pH 7,5 und 1 mM EDTA/pH 8.

2.3.4 In-vitro-Transkription

Für die Expression verschiedener ENaC Untereinheiten in X. Oocyten wurde von den in unterschiedlichen Plasmiden integrierten cDNAs eine mRNA synthetisiert. Eine Aufstellung der verschiedenen ENaC-Untereinheiten mit Plasmiden, verwendeten Restriktionsenzymen zur Linearisierung und RNA-Polymerasen für die in vitro Transkription ist in Tab. 2.3 zu finden.

Die Plasmid DNA (3 µg) musste zunächst mit einem Restriktionsenzym linearisiert werden. Dieses Restriktionsenzym wurde im Anschluss an den Verdau mit der Proteinase K inaktiviert und durch zweimalige Phenol/Chloroform-Extraktion aus dem Versuchsansatz beseitigt. Durch Zugabe von 0,1 Volumenteilen 3 M Natriumacetat und 2 Volumenteilen 96%igen Ethanol wurde die DNA gefällt und nach zweimaligem Waschen mit 70%igem Ethanol erfolgte die Trocknung im Exsikkator. Das Pellet wurde in 5 µl RNase-freiem TE-Puffer aufgenommen, woraufhin die DNA transkribiert und das RNA-Produkt mit einem 5'7MeGpppG 5'Cap-Analogon versehen wurde (mCAPTM mRNA Capping Kit/Stratagene). Nach der Konzentrationsbestimmung erfolgte das sofortige Einfrieren in flüssigem Stickstoff und die Lagerung bei -80°C.

Tab. 2-3: Zusammenstellung der verschiedenen ENaC-Untereinheiten

Auflistung der verwendeten ENaC-Untereinheiten mit den jeweiligen im folgenden verwendeten Abkürzungen. Zusätzlich sind die Vektoren, in denen die jeweilige Untereinheit inseriert vorliegt, sowie das zur Linearisierung notwendige Restriktionsenzym und die zur in-vitro-Transkription benutzte RNA-Polymerase aufgeführt.

ENaC-Untereinheit	Abkürzung	Plasmid	Restriktionsenzym zur Linearisierung	RNA-Polymerase
Xenopus α	x α	PSDEasy	Afl III	SP6
Xenopus β	x β	PSDEasy	Bgl II	SP6
Xenopus γ	x γ	PSDEasy	Afl III	SP6
Rat α	r α	PSD 5	Bgl II	SP6
Rat β	r β	PSD 5	Bgl II	SP6
Rat γ	r γ	PSD 5	Pvu II	SP6
Human lung α	hl α	PBSK-Strat.	Not I	T7
Human lung β	hl β	PBSK-Strat.	Not I	T7
Human lung γ	hl γ	PBSK-Strat.	Not I	T7
Guinea-Pig lung α	gpl α	PSD Easy,PBSK,	Bgl II	SP6
Guinea-pig colon α	gpca	pSport1	Xba I	T7

2.3.5 Umklonierung verschiedener ENaC-Untereinheiten

Die cRNA-Konzentration nach der in-vitro-Transkription von gpl α (in Plasmid pBluescript/ Stratagene) war vergleichsweise stets gering, weshalb diese cDNA in einen anderen Vektor (pcDNA 3.1/Invitrogen) umkloniert wurde. Zu diesem Zweck wurden sowohl pcDNA 3.1, als auch pBluescript mit gpl α mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Xho I für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Beendigung des vollständigen Verdaus wurde die DNA durch eine Säule mit einer Silica-Gelmembran eluiert und die DNA-Konzentrationen photometrisch bestimmt. Plasmid und Insert wurden nun im Verhältnis 3:1 in einen Ligationsansatz mit T4 DNA-Ligase gegeben und über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Kompetente E.coli Bakterien des Stammes IM109 wurden mit dem

Ligationsprodukt transformiert (Protokoll siehe 2.2.3.2). Dabei wuchsen über Nacht drei Kolonien, deren DNA per Mini-Präp aufbereitet wurde und im Anschluss zur Kontrolle mit XhoI/EcoRI verdaut wurde. Bei der extern durchgeführten Sequenzierung zeigte sich die fehlerfreie Insertion der cDNA in pcDNA 3.1, weshalb der korrekte Klon nochmals hochgezogen und die DNA über Midi-Präp isoliert wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Messungen transepithelialer Ströme der Lunge von *Xenopus laevis* mit Hilfe der Ussing-Kammer

Durch die in Material und Methoden erläuterte Präparation mit anschließender Fixierung der Lunge in der Ussing-Kammer erhielt man eine völlige Trennung von apikaler und basolateraler Seite des Epithels. Somit war es möglich, transepitheliale Ströme durch das dichte Epithel (Illek et al., 1990) in Abhängigkeit verschiedener Lösungszusammensetzungen zu messen.

Da das Hauptaugenmerk auf die Natriumresorption gelegt wurde, erfolgte im Versuchsablauf zunächst die Bestimmung des amiloridsensitiven Stroms unter Kontrollbedingungen. Im Anschluss wurden unterschiedliche Pharmaka appliziert, deren Auswirkung auf den durch Amilorid hemmbaren Natriumstrom durch additive Gabe des Schleifendiuretikums zur apikalen Perfusionslösung ermittelt wurde. Anschließend wurde der durch Amilorid nicht hemmbare Anteil des Natriumstroms durch den Austausch des apikalen Natriums gegen NMDG bestimmt.

In Tabelle 3.1 sind diese ebenso wie Gewebswiderstände, transepitheliales Potential und transepithelialer Strom direkt nach dem Start der Messung ($t=0$) angegeben.

Tab. 3-1: Vergleich der elektrophysiologischen Parameter:

Darstellung der Gewebswiderstände und transepithelialen Ströme der verschiedenen Untersuchungen der *Xenopus* Lunge. * markiert signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (gepaarter t-test; $p < 0,05$).

	U [mV]	n	R [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	n	I [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	n
NRS	-6,3 $\pm$ 0,6	30	573 $\pm$ 37	30	15,63 $\pm$ 1,45	30
Amilorid			678 $\pm$ 49	30	3,4 $\pm$ 0,46*	30
Na ⁺ -frei			786 $\pm$ 63	25	-5,39 $\pm$ 0,74*	26
PGE ₂			537 $\pm$ 54	16	18,65 $\pm$ 2*	18
PGI ₂			310 $\pm$ 30*	7	24,55 $\pm$ 1,55	7
Forskolin			559 $\pm$ 98	13	30,41 $\pm$ 3,27*	15
Cl ⁻ -frei			579 $\pm$ 68	7	25,25 $\pm$ 4,7	7
Sulproston			476 $\pm$ 35	8	23,33 $\pm$ 6*	8
Misoprostol			610 $\pm$ 81	7	24,46 $\pm$ 2,95*	7
BAPTA/AM			447 $\pm$ 49	6	18,01 $\pm$ 4,16	6
RP-cAMP			436 $\pm$ 72	7	36,1 $\pm$ 3	7

3.1.1 Wirkungsweise von Prostaglandin E₂

Bei Prostaglandin E₂ (PGE₂) handelt es sich um einen der wichtigsten Entzündungsmediatoren, welcher bei Gewebsverletzungen von Makrophagen, jedoch auch von anderen Zellen wie z.B. Epithelzellen, freigesetzt wird. Durch die apikale Applikation von 1 μM PGE₂ steigt der transepitheliale Strom an, was durch die additive Gabe von 10 μM Amilorid gehemmt wird. Ein typischer Versuchsablauf ist in Abbildung 3-1 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Stromanstieg direkt nach der PGE₂-Applikation erfolgte und nach ca. 30 Minuten die maximale Stimulation des Kurzschlussstroms erreicht war. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Steigerung des I_{SC} auf Amilorid-sensitive Natriumkanäle zurückzuführen ist, wurde PGE₂ additiv zu Amilorid bzw. unter Natrium-freien Bedingungen appliziert. In diesem Fall ergab sich keine nachweisbare Veränderung des I_{SC} . Der durch PGE₂

induzierte Effekt auf den I_{SC} war reversibel (nicht dargestellt). Zudem trat die Stimulation nicht auf, wenn Prostaglandin E_2 auf der basolateralen Seite des Epithels gegeben wurde.

Die statistische Auswertung ist in Abbildung 3-2 angegeben. Die Untersuchungen der Wirkung von PGE_2 auf den transepithelialen Strom der *Xenopus*-Lunge zeigten eine Stimulation von I_{SC} ($38\% \pm 9\%$; $n=14$) und I_{ami} ($58\% \pm 13\%$; $n=14$) bei apikaler Gabe von $1\ \mu M$ PGE_2 . Dabei bleibt allerdings der gesamte Na^+ -Strom nahezu unverändert.

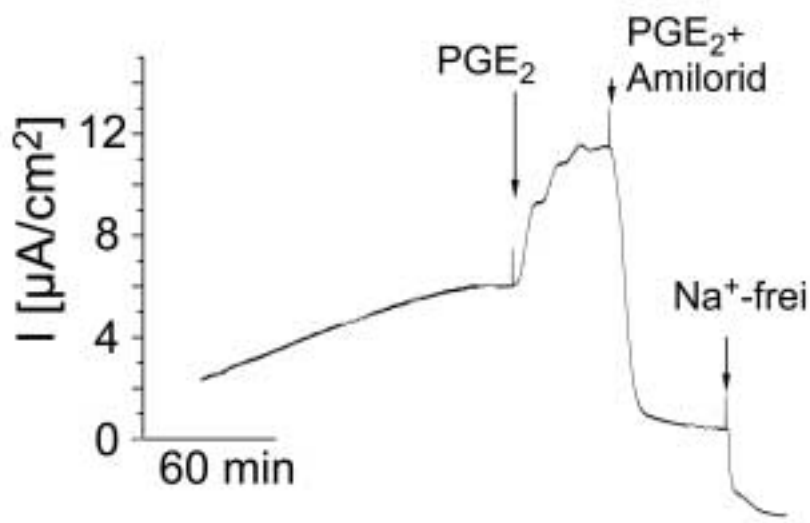


Abb. 3-1: PGE_2 stimuliert den I_{SC}

Zeitlicher Verlauf des I_{SC} eines unter normalen Ringerbedingungen (NRS) durchgeführten Versuchs. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der apikalen Applikation der jeweiligen Substanzen ($1\ \mu M$ PGE_2 , $10\ \mu M$ Amilorid, Na^+ -frei).

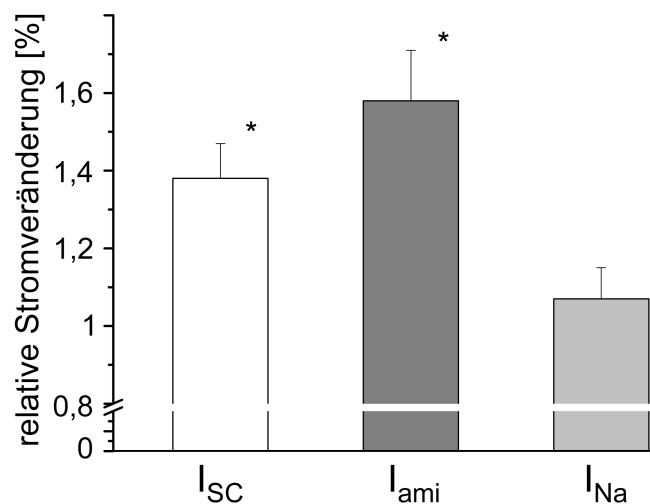


Abb. 3-2: Auswirkung von PGE₂ auf transepitheliale Ströme der X. Lunge
Veränderung von transepithelialem Strom (I_{SC}), Amilorid-sensitivem Strom (I_{ami}) und Gesamt-Natriumstrom (I_{Na}) nach apikaler Applikation von 1 µM PGE₂. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet (n=14).

3.1.1.1 Konzentrationsabhängige Wirkung von PGE₂

Bei Reaktionskinetiken 2. Ordnung liegt eine Proportionalität zwischen der Substratkonzentration und der Veränderung des Stroms vor. Folglich gilt die Gleichung:

$$I_0 = \frac{I_{max} \cdot [PGE_2]}{K_m + [PGE_2]}$$

wobei I_0 die Stimulation des Stroms bei der Konzentration $[PGE_2]$ ist, I_{max} die Stimulation des Stroms bei einem Überschuss PGE₂ und K_m die Michaelis-Menten-Konstante angibt.

Durch die Applikation unterschiedlicher Konzentrationen von Prostaglandin E₂ wurden schrittweise Erhöhungen des I_{ami} bis zum Maximum der Stimulation erzielt. Diese wurden aufgrund der auf Gewebseigenheiten beruhenden Schwankungen der Absolutstromwerte in prozentuale Steigerungen des Amilorid-sensitiven Stroms umgerechnet. Die Abbildung 3-3 stellt den konzentrationsabhängigen Effekt von PGE₂ auf den I_{SC} dar. Der errechnete K_m -Wert von 32,3 nM gibt die Konzentration

der halbmaximalen Stimulation an. Zusätzlich wird deutlich, dass man durch die in der Versuchsanordnung gewählte Konzentration von $1 \mu\text{M}$ PGE_2 die maximale Steigerung von I_{ami} erzielte. Versuche mit höheren Prostaglandinkonzentrationen, welche in der Dosis-Wirkungskurve keine Berücksichtigung fanden, belegten dieses Resultat ebenfalls (nicht dargestellt).

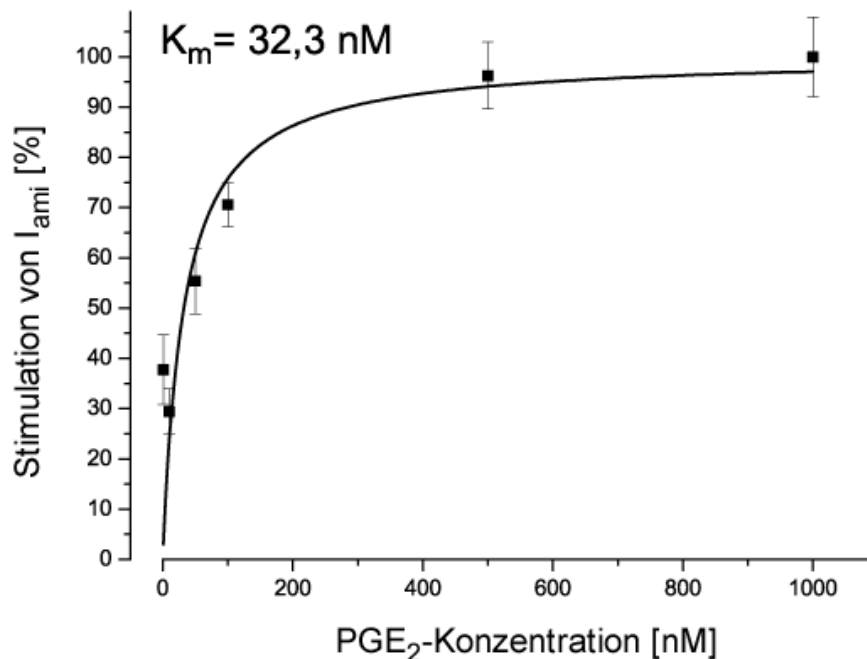


Abb. 3-3: Dosis-Wirkungskurve von PGE_2

Darstellung der prozentualen Stimulation des I_{ami} der *Xenopus* Lunge in Folge unterschiedlicher apikaler Konzentrationen von PGE_2 . Der daraus errechnete K_m -Wert liegt bei $32,3 \text{ nM}$ ($n = 4-14$).

3.1.1.2 Reproduktion des durch PGE_2 induzierten Effekts unter chloridfreien Bedingungen

Aufgrund der erläuterten Erkenntnisse stellte sich die Frage, wieso Prostaglandin E_2 eine Stimulation von I_{SC} und I_{ami} induzierte, I_{Na} jedoch unbeeinflusst blieb. Eine mögliche Ursache ist in einer Beteiligung von Chlorid zu suchen. Die Cl^- Sekretion würde ebenso wie die Natriumaufnahme einen gleichgerichteten Strom zur Folge haben. Deshalb wurden Cl^- -freie Kontrollversuche durchgeführt, in welchen bei unveränderter Osmolarität der Perfusate impermeable zweiwertige Sulfationen die

einwertigen Chloridionen ersetzen. Zunächst wurde das Chlorid auf der apikalen Seite gegen Sulfat ausgetauscht. Beim Erreichen eines stabilen Stromplateaus wurde Sulfat auch auf der basolateralen Seite des Lungenepithels gegeben. Somit erhielt man die Möglichkeit, die Richtung des Chloridstroms unter Normalbedingungen zu analysieren. Unter diesen veränderten Versuchsbedingungen stimulierte die apikale Gabe von $1\ \mu\text{M}$ PGE_2 ebenfalls den I_{sc} sowie den I_{ami} . Der I_{sc} wurde durch PGE_2 signifikant um $27\% \pm 10\%$ gesteigert, der I_{ami} lag ebenfalls um $27\% \pm 4\%$ signifikant höher als der Kontrollwert. Dies stellt einen geringfügig geringeren PGE_2 -induzierten Effekt als unter Chloridhaltigen Bedingungen dar. Die Applikation von $1\ \mu\text{M}$ PGE_2 additiv zu Amilorid verursachte jedoch auch unter Cl^- -freien Lösungen keine Veränderung des I_{sc} . Ein typischer Versuchsverlauf ist in Abbildung 3-4 aufgeführt.

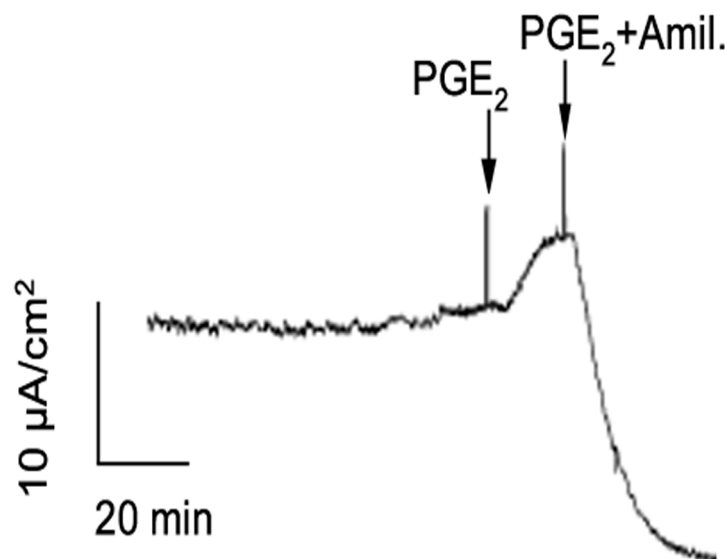


Abb. 3-4: PGE_2 -Effekt unter Chlorid-freien Bedingungen

Aufzeichnung einer Originalstromspur, welche unter Chlorid-freien Bedingungen gemacht wurde. Die Zeitpunkte der apikalen PGE_2 -Applikation bzw. der additiven Amiloridgabe sind mit Pfeilen eingezeichnet.

3.1.1.3 Auswirkungen von Prostaglandin-Rezeptor-Agonisten auf den transepithelialen Strom der *Xenopus* Lunge

Die zelluläre Wirkung von Prostaglandinen wird über Rezeptor-gekoppelte Signaltransduktion vermittelt. Es sind vier verschiedene Rezeptortypen bekannt (EP₁-EP₄). Diese lassen sich mit Einschränkungen aufgrund ihres pharmakologischen Profils identifizieren. Um zu überprüfen, welche dieser Rezeptortypen für die PGE₂ induzierte Stimulation von I_{SC} und I_{ami} verantwortlich sind, wurden in den folgenden Versuchen Rezeptor-Agonisten eingesetzt. Dabei handelte es sich zum einen um Misoprostol, ein EP_{2/3} selektiver Rezeptor-Agonist, und zum anderen um Sulproston, einen EP_{1/3} selektiver Agonist. Die apikale Superfusion von 1 µM Sulproston resultierte in einer signifikanten Stimulation des I_{ami} um $29 \pm 7\%$. Dies ging einher mit einer Stimulation des I_{SC} von $17 \pm 4\%$. Bei der apikalen Applikation von 1 µM Misoprostol war ebenfalls eine signifikante Stimulation des I_{ami} um $35 \pm 6\%$ und des I_{SC} um $20 \pm 5\%$ zu erkennen. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3-5 zusammengefasst.

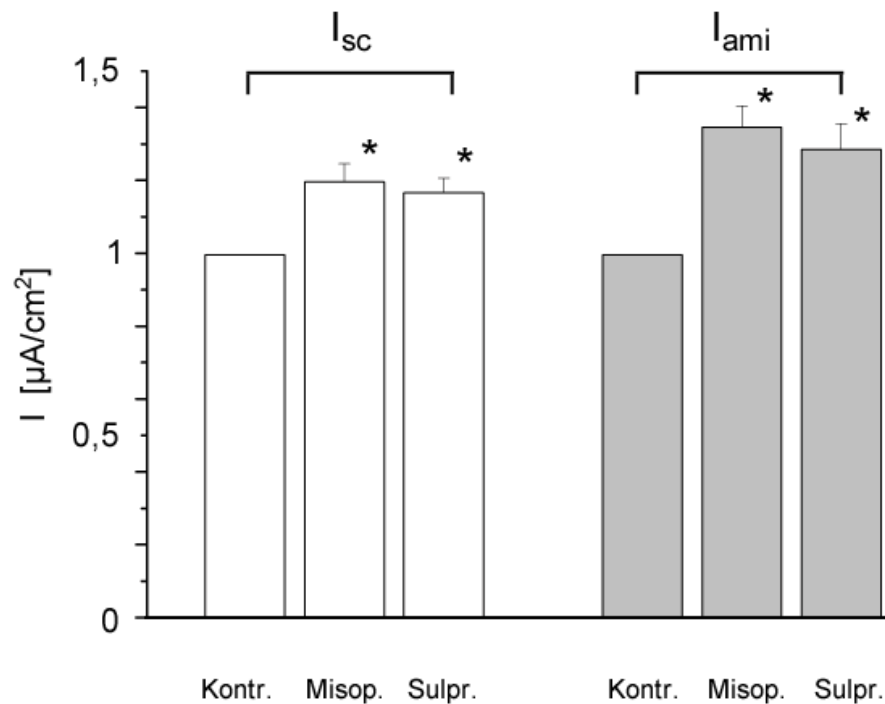


Abb. 3-5: Wirkung verschiedener EP-Rezeptor-Agonisten

Vergleich der Auswirkung apikaler Addition von 1 μM Sulproston (Sulpr./ N=4; n=8) bzw. 1 μM Misoprostol (Misop./ N=4; n=7) auf I_{sc} und I_{ami} . Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur normierten Kontrolle (Kontr.) sind mit * gekennzeichnet (N=7, n=7)

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse über die Wirkungsweise und Signaltransduktion des Prostaglandin E_2 , war es von Interesse andere Prostaglandine hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf den transepithelialen Strom durch das Lungengewebe zu untersuchen. Daher wurde Prostaglandin I_2 (300 nM), ein EP_1 -Rezeptoranalogen sowohl apikal als auch basolateral appliziert. Dabei offenbarte sich jedoch keine direkte Auswirkung auf I_{sc} oder I_{ami} . Allerdings nahm der Gewebswiderstand signifikant ab (siehe Tab. 3-1).

3.1.1.4 cAMP Sensitivität des I_{sc} der *Xenopus* Lunge

EP_2 - und EP_4 - Rezeptoren vermitteln ihre zelluläre Antwort über die Erhöhung der cytosolischen Konzentration des cyclischen AMP (cAMP). Bei Forskolin handelt es sich um einen vielfach eingesetzten membrangängigen Aktivator von

Adenylatzyklen, welche für die cAMP-Bildung in der Zelle verantwortlich sind. Um zu überprüfen, ob der I_{SC} der X. Lunge durch cAMP stimuliert werden kann wurde das Lungenepithel im Versuchsablauf 10 μ M Forskolin ausgesetzt. Vorversuche zeigten, dass Forskolin den I_{SC} stimuliert und dieser Effekt unabhängig von der Applikationsseite war. Dies überrascht nicht, da die Stimulation der Adenylatzykase keine Abhängigkeit von membranständigen Rezeptoren aufweist. In die Auswertung gingen jedoch lediglich Versuche der apikalen Applikation von Forskolin ein. In diesen Experimenten zeigte sich ebenfalls eine Stimulation des transepithelialen Stroms infolge der Perfusion mit 10 μ M Forskolin. Der Kurzschlussstrom wurde um $39 \pm 7\%$ gesteigert, der amiloridsensitive Anteil des Stroms erfuhr eine Stimulation von $37 \pm 7\%$. Im Gegensatz zur Wirkungsweise des PGE_2 , welches den gesamten Natriumstrom unverändert ließ, bewirkte die Gabe von Forskolin jedoch dessen Erhöhung um $36 \pm 5\%$. Diese Resultate sind in Abbildung 3-6 zusammengefasst.

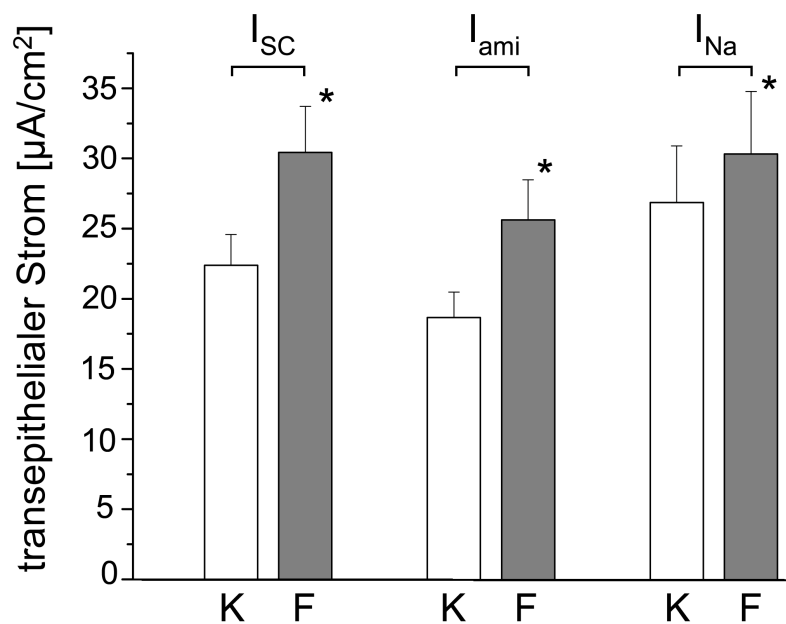


Abb. 3-6: Auswirkung von Forskolin auf transepitheliale Ströme der *Xenopus* Lunge

Vergleich der Wirkung 10 μ M apikal applizierten Forskolins (F) auf I_{SC} , I_{ami} und I_{Na} . Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (K) sind mit einem * gekennzeichnet.

3.1.1.5 Additive Gabe von PGE₂ und Forskolin

Die Experimente mit Forskolin zeigten, dass die Stimulation der Adenylatzyklase den Amilorid-sensitiven Stromanteil in ähnlicher Höhe stimulierte wie PGE₂. Versuche in denen beide Stimulatoren (PGE₂ und Forskolin) apikal gegeben wurden sollten verifizieren, ob sich deren Effekte addieren. Dies würde möglicherweise dafür sprechen, dass beide über die gleiche Signalkaskade wirken. Das Ergebnis zeigte, dass Forskolin zusätzlich zu PGE₂ appliziert zu einer weiteren Stimulation des I_{SC} und des I_{ami} führte. Nach einer Stimulation des I_{SC} mit Forskolin konnte PGE₂ den I_{SC} nicht weiter signifikant verändern. Die Konzentrationen, in welchen PGE₂ bzw. Forskolin eingesetzt wurden, entsprachen denjenigen der in den bereits erläuterten Versuchen eingesetzten (1 µM bzw. 10 µM). Die Resultate für den Amilorid-sensitiven Strom sind in Abbildung 3-7 dargestellt.

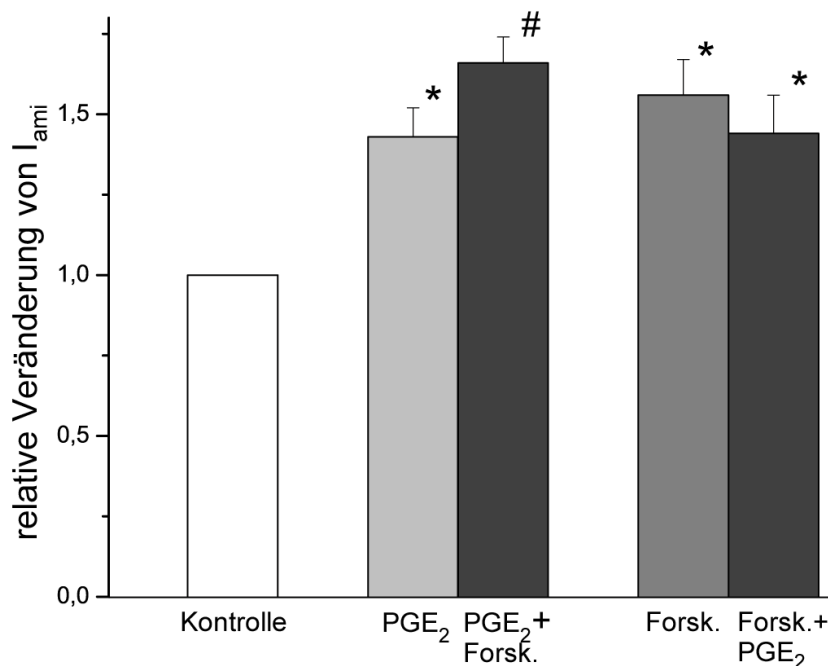


Abb. 3-7: Additive Gabe von PGE₂ und Forskolin

Vergleich der relativen Veränderungen des Amilorid-sensitiven Stroms durch die apikale Applikation von 1 µM PGE₂ und additiver Gabe von 10 µM Forskolin (PGE₂+Forsk.; n=5) bzw. in umgekehrter Reihenfolge (Forsk.+PGE₂; n=6). Mit * gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede zur Kontrolle (p<0,05), mit # dargestellte Balken sind signifikant verschieden vom bereits stimulierten Plateauwert (p<0,05).

3.1.1.6 Behandlung der Lunge mit Inhibitoren der Proteinkinase A (PKA)

Wie aus den dargelegten Ergebnissen mit Forskolin und Misoprostol sowie Sulproston hervorgeht, kommt der durch die cAMP-abhängigen Proteinkinase A vermittelten Signaltransduktion eine Rolle bei der Steigerung von I_{SC} und I_{ami} zu. Um diese Vermutung zu untermauern, wurde ein Versuchsablauf gewählt, in welchem Inhibitoren der Proteinkinase A (PKA) zum Einsatz kamen. Dabei erfolgte die Perfusion der Lunge mit dem PKA-Inhibitor 4-Cyano-3-Methyl-Isoquinolin (100 μ M). Hierbei konnte keine Veränderung der durch PGE_2 oder Forskolin induzierten Effekte festgestellt werden. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die präparierte Lunge vor der Messung für 90 Minuten auf einem Schüttler mit einem weiteren Inhibitor der PKA, 8-bromo-cAMP-RP-Isomer (50 μ M), inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Gewebe in die Ussing-Kammer eingespannt und bei Erreichen eines Stromplateaus unter NRS apikal 1 μ M PGE_2 bzw. 10 μ M Forskolin appliziert. Durch diese Vorbehandlung konnte die durch PGE_2 und Forskolin gezeigte Stimulation des I_{SC} und I_{ami} verhindert werden. Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 3-8 zusammengefasst.

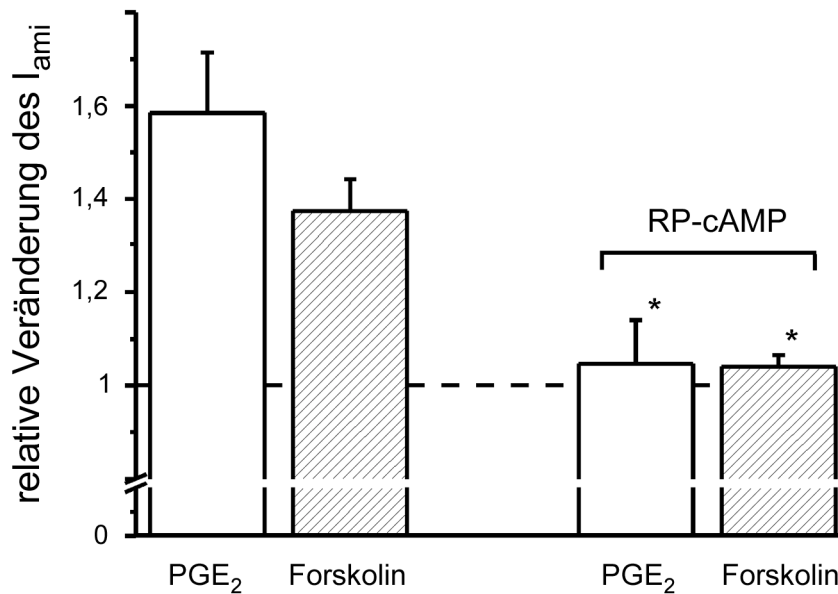


Abb. 3-8: Einfluss von RP-cAMP auf PGE₂- und Forskolin-induzierte Stimulation des I_{ami}

Effekt einer 90minütigen Inkubation des Lungengewebes mit 50 μ M 8-bromo cAMP-RP-Isomer auf den durch 1 μ M PGE₂ bzw. 10 μ M Forskolin induzierten Einfluss auf den Amilorid-sensitiven Natriumstrom (jeweils n=7). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

3.1.1.7 Abhängigkeit des PGE₂-induzierten Effekts von [Ca²⁺]_i

Neben dem Einfluss der Proteinkinase A bei EP induzierten Vorgängen ist bekannt, dass Prostaglandin vermittelte Signaltransduktionen auch von der intrazellulären Calciumkonzentration beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob der Effekt von PGE₂ auf I_{SC} und I_{ami} auch bei Komplexbildung des intrazellulären Calciums noch vorhanden ist. Die Lunge wurde wie in Kapitel 3.1.1.6 beschrieben vor Beginn des Versuchs für 30 Minuten mit 100 μ M BAPTA/AM in Ca²⁺-freiem NRS inkubiert. Bei BAPTA/AM handelt es sich um einen membrangängigen Chelator zweiwertiger Kationen mit einer hohen Affinität für Ca²⁺. Die Vorbehandlung des Gewebes führte nicht nur zu einer Unterdrückung der PGE₂ induzierten Stimulation, sondern es kam zu einem leichten Rückgang von I_{SC} und I_{ami}. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3-9 abgebildet.

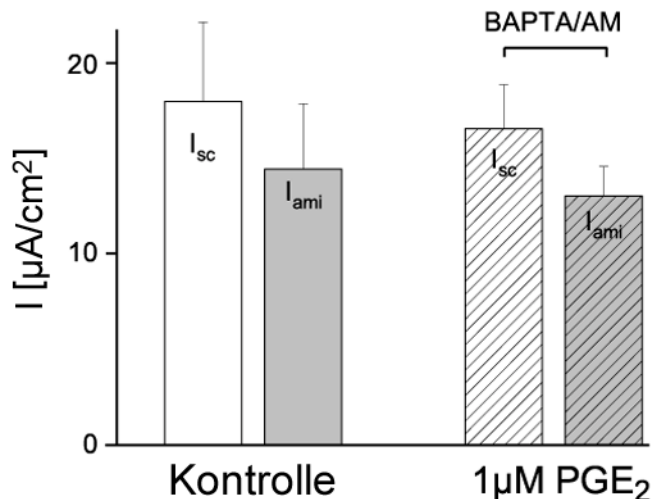


Abb. 3-9: Einfluss von Bapta/AM auf die PGE₂-induzierte Stimulation von I_{sc} und I_{ami}

Vergleich der Wirkung von BAPTA/AM (30minütige Vorinkubation; 100 μM) auf I_{sc} und I_{ami} unter Kontrollbedingungen bzw. unter dem Einfluß von 1 μM PGE₂.

3.1.1.8 Einfluss proinflammatorischer Substanzen

Neben PGE₂ sind eine Reihe weiterer Substanzen bekannt, die bei Entzündungen in der Lunge in erhöhtem Maße gebildet werden. Einer dieser Mediatoren ist Stickstoffmonoxid (NO). SNP (engl.: Sodium-Nitroprussid) setzt in Lösung NO frei. Die apikale Seite des Epithels wurde mit 1 mM SNP superfundiert. Wie in Tabelle 3-2 aufgeführt veränderte dies weder I_{sc} noch I_{ami} . Um die Richtigkeit dieser Aussage zu überprüfen wurde NOC-18, ein weiterer NO-Donor auf seine Wirkung auf den transepithelialen Strom der *Xenopus*-Lunge hin überprüft. NOC-18 zeichnet sich durch eine über mehrere Stunden andauernde Freisetzung von NO aus. Die apikale Gabe von 100 μM NOC-18 konnte ebenfalls keine Veränderung des transepithelialen Stroms hervorrufen (siehe Tab. 3-2).

Bei PGE₂ handelt es sich um eine körpereigene Substanz, welche bei Entzündungsvorgängen ausgeschüttet wird. Um zu überprüfen, ob proinflammatorisch wirksame Mediatoren Einfluss auf den transepithelialen Natriumtransport haben, wurden unterschiedliche Tachykinine zu Versuchen herangezogen. Die bei Säugetieren weit verbreitete Substanz P und das aus der

Haut von Amphibien isolierte Physalaemin wurden in Untersuchungen eingesetzt. Die basolaterale Gabe führte, im Gegensatz zur apikalen Superfusion, bei beiden Tachykininen zu einer Verminderung des I_{SC} begleitet von einer Reduktion des I_{ami} . Dabei blieb der Gewebswiderstand konstant. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Tab. 3-2: Vergleich des Effekts verschiedener inflammatorisch wirksamer Substanzen auf den I_{SC} und den I_{ami} des *Xenopus* Lungenepithels. Signifikante Unterschiede sind mit einem Stern markiert.

	$I_{SC} [\mu A/cm^2]$		$I_{ami} [\mu A/cm^2]$		N
	Kontrolle	Effektor	Kontrolle	Effektor	
Substanz P	36,3 ± 4,6	32,6 ± 4,4*	27,3 ± 4,1	22,2 ± 2,7*	5
Physalaemin	23,8 ± 4,6	20 ± 3,8*	19,7 ± 3,6	15,7 ± 2,7*	6
SNP	32,4 ± 2,1	32,2 ± 2,4	25,6 ± 2,1	24,6 ± 2,7	5
NOC-18	25,1 ± 3,6	25 ± 2,5	21,1 ± 2,4	20,6 ± 1,5	9
8 br-cGMP	21,5 ± 3,1	22,8 ± 2,4	17,3 ± 3	18,6 ± 2,5	7

3.1.1.9 Auswirkung von PGE_2 auf in Oocyten exprimierte ENaCs

Die bisherigen Versuche deuteten daraufhin, dass eine Stimulation des I_{ami} der Froschlunge durch PGE_2 über intrazelluläre Signalkaskaden verläuft, jedoch nicht auf direkte Wechselwirkung mit dem Kanalprotein oder assoziierten Proteinen zurückzuführen ist. Um diese Vermutung zu verifizieren, wurden ENaCs in Oocyten des südafrikanischen Krallenfrosches exprimiert. Bei den exprimierten Kanälen handelte es sich um den ENaC aus der Niere von *Xenopus laevis* (xENaC) oder den ENaC aus der humanen Lunge (hENaC).

Es ist bekannt, dass in *Xenopus* Oocyten nativ keine Prostaglandinrezeptoren vorkommen (Tabata et al., 2002), wodurch man EP-Rezeptor-gekoppelte Auswirkungen des PGE_2 in Oocyten nicht beobachtet. Die Applikation von 1 μM PGE_2 zur superfundierenden Oocytenringer (ORi)-Lösung führte sowohl bei xENaC exprimierenden als auch bei hENaC exprimierenden Oocyten lediglich zu einer nicht

signifikanten schwachen Amilorid-sensitiven Stromsteigerung (siehe Tabelle 3-3). In Abbildung 3-11 werden diese Ergebnisse in Form einer Strom-Spannungs-Kurve gezeigt.

Tab. 3-3: Vergleich der Auswirkung von PGE₂ auf die Amilorid-sensitive Natriumaufnahme in xENaC bzw. hENaC exprimierende Oocyten.

	Kontrolle [nA]	1 μ M PGE ₂ [nA]	n/N
hENaC	150 $\pm$ 17	167 $\pm$ 19	8/5
xENaC	172 $\pm$ 25	189 $\pm$ 22	6/3

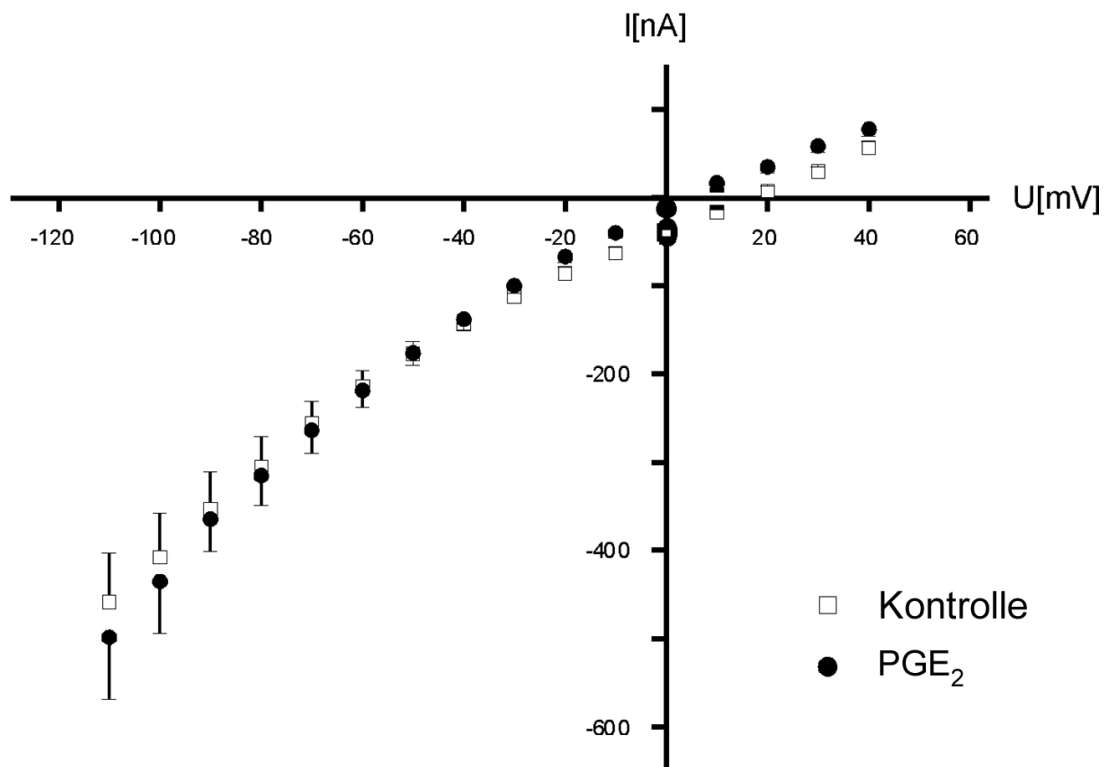


Abb. 3-11: IU-Kurve von xENaC-exprimierenden Oocyten

Strom-Spannungs-Kurve von im Spannungs-Klemm Modus gemessenen xENaC exprimierenden *X.Oocyten*. Über einen Zeitraum von jeweils 400 ms wurde das Membranpotential der Oocyten in 10 mV Schritten von -110 mV bis $+40$ mV geklemmt. Dabei wurde zwischen den einzelnen Klemmschritten eine Pause von einer Sekunde gemacht, in welcher das Klemmpotential -60 mV betrug. Verglichen wurden die transmembranären Ströme unter dem Einfluss von $1 \mu\text{M}$ PGE_2 mit denjenigen von Kontrollloocyten

3.2 Einfluss reaktiver Oxidantien auf die Natriumresorption ENaC-exprimierender *Xenopus* Oocyten

Wie von einigen Autoren nachgewiesen (Kim et al., 1990) sind 80 % des transepithelialen Stroms der Lunge durch Amilorid hemmbar. Wie bereits in der Einleitung erläutert nimmt die Lunge eine zur Umgebung exponierte Stellung ein. Das Lungenepithel steht für den Gasaustausch in direktem Kontakt zur Atemluft. Die Frage, ob Bestandteile der inhalierten Luft die Funktion der ENaCs und damit den

alveolaren Natriumtransport beeinflussen, ist nicht geklärt. Dabei ist es von großem Interesse die Auswirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf die ENaC getragene Natriumresorption zu untersuchen. Daher wurde die Wechselwirkung mit den in *Xenopus*-Oocyten funktionell exprimierten ENaC-Proteinen untersucht.

3.2.1 Auswirkung von Peroxynitrit auf I_{ami}

Peroxynitrit ($ONOO^-$) ist ein hoch reaktiver oxidierend wirkender Stoff. Es sollte die Wirkung von Peroxynitrit auf den Amilorid-sensitiven Strom in Oocyten untersucht werden. Im Vergleich zu den Kontrollen, welche vor der Messung nicht behandelt wurden, zeigte sich bei $gpl\alpha/r\beta\gamma$ -ENaC-exprimierenden Oocyten, dass bereits eine Vorinkubation für 30 Sekunden in 4 μM Peroxynitrit genügte, um den I_{ami} zu hemmen. Im Gegensatz dazu verursachte die Peroxynitrit-Inkubation in $gpc\alpha/r\beta\gamma$ -ENaC- bzw. $rENaC$ -exprimierenden Oocyten keine Veränderung des Amilorid-sensitiven Stroms. In Tabelle 3-4 sind diese Messungen zusammengefasst.

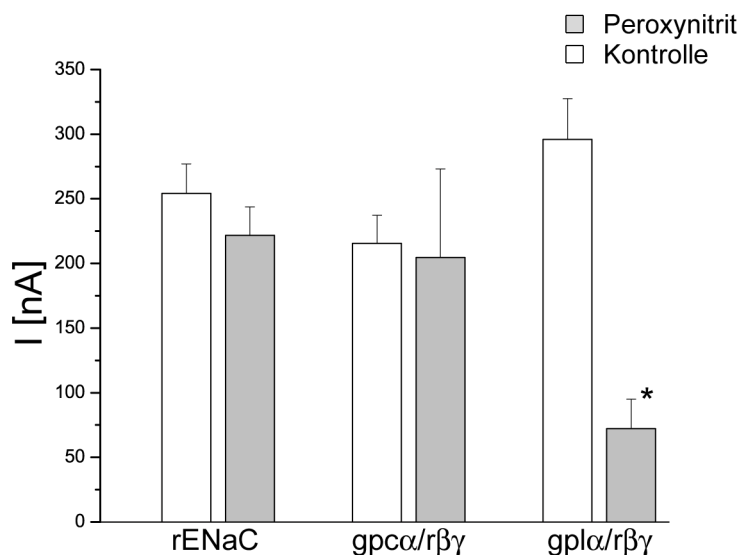


Abb. 3-12: Peroxynitrit inhibiert Na^+ -Strom durch $gpl\alpha/r\beta\gamma$ -ENaC

Vergleich von ENaC unterschiedlicher Spezies exprimierender Oocyten, welche mit 4 μM Peroxynitrit vorinkubierten mit unbehandelten Kontrollen. Signifikant unterschiedliche Werte sind mit * markiert ($p < 0,05$).

3.2.2 Effekt von DetaNONOate bzw. NOC-18 auf I_{ami}

Ein NO-Donor, dessen Halbwertszeit in Lösungen sechs Stunden beträgt und währenddessen kontinuierlich NO freisetzt, ist DetaNONOate (Sigma Corp.) bzw. NOC-18 (Calbiochem.). Die Superfusion der Oocyten mit 100 μ M NOC-18 hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die verschiedenen exprimierten ENaCs. Wie in Abbildung 3-13 gezeigt, hemmt der NO-Donor den I_{ami} von Oocyten signifikant, welche den ENaC der humanen Lunge exprimieren bzw. solche die den Hybrid-Kanal bestehend aus der α -Untereinheit des Lungen-ENaC von *Cavia porcellus* und den β - und γ -Untereinheiten des Ratten-ENaCs exprimierten. Im Gegensatz dazu verursacht NOC-18 schwache, jedoch unsignifikante Veränderungen des I_{ami} bei rENaC, xENaC und dem hybriden gpca/r $\beta\gamma$ -ENaC.

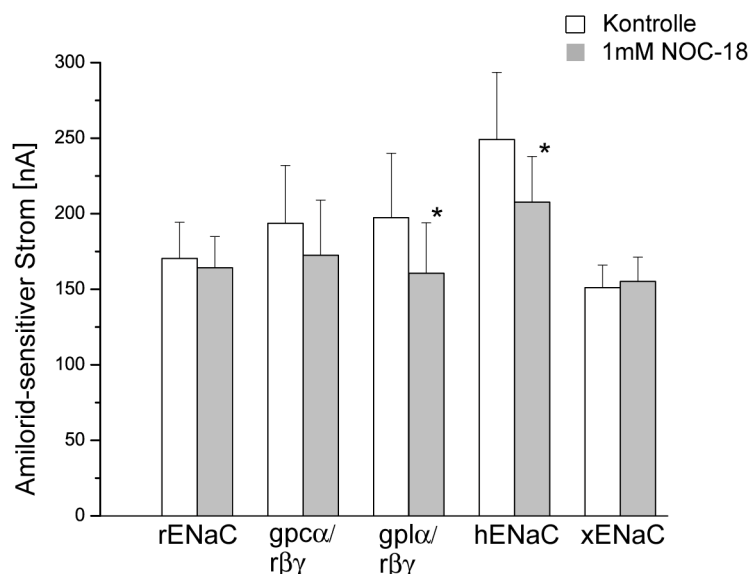


Abb. 3-13: Effekt von NOC-18 auf verschiedene in *Xenopus* Oocyten exprimierte ENaCs

Vergleich der Wirkung von 100 μ M NOC-18 auf den Amilorid-sensitiven Strom von Oocyten, welche ENaCs unterschiedlicher Spezies exprimieren. Nach dem gepaarten t-test signifikant unterschiedliche Resultate ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

3.3 Wirkung von cyclischen Nucleosidmonophosphaten auf den heterolog in *Xenopus* Oocyten exprimierten ENaC

3.3.1 Effekt von cGMP auf den Amilorid-sensitiven Natriumstrom von ENaC exprimierenden Oocyten

Der NO-Donor NOC-18 verringert den I_{ami} in $g\alpha/r\beta\gamma$ -ENaC sowie in hENaC exprimierenden Oocyten. Demgegenüber bleibt der I_{ami} bei xENaC exprimierenden Oocyten unbeeinflusst. Die zelluläre Wirkung von NO wird zumeist über cGMP vermittelt. Daher wurde der Einfluss von cGMP auf die Amilorid-sensitiven Ströme von ENaC exprimierenden Oocyten untersucht.

Durch die Superfusion mit 50 μ M 8 bromo cGMP erfolgte eine signifikante Stimulation des xENaC generierten I_{ami} (Abbildung 3-14).

Bei $g\alpha/r\beta\gamma$ -ENaC und hENaC exprimierenden Oocyten, welche einen durch NOC-18 reduzierten Membranstrom zeigten, blieb I_{ami} konstant (Tabelle 3-4).



Abb. 3-14: Originalstromspur einer xENaC-exprimierenden X. Oocyte

Effekt von 50 μ M 8-bromo cGMP auf den transmembranären Strom einer xENaC exprimierenden *Xenopus* Oocyte bei einem Haltepotential von -60 mV.

Tab. 3-4: Auswirkung von 50 μ M 8-bromo cGMP auf den I_{ami} von ENaC-exprimierenden Oocyten

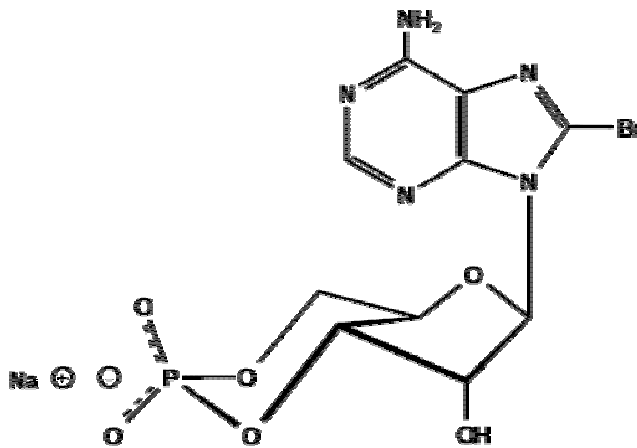
	Kontrolle I_{ami} [nA]	8br-cGMP I_{ami} [nA]	n/N
gpl α /r $\beta\gamma$	145 $\pm$ 28	153 $\pm$ 20	5/3
hENaC	337 $\pm$ 41	318 $\pm$ 34	8/2
xENaC	124 $\pm$ 35	336 $\pm$ 78 *	5/3

3.3.2 Effekte von cpt und 8-bromo substituiertem cAMP bzw. cGMP auf den ENaC vermittelten I_{ami}

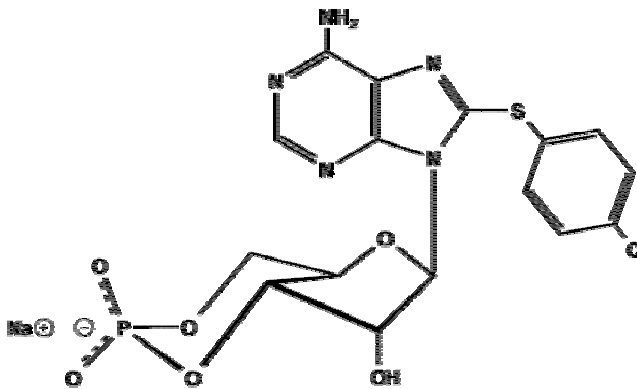
Neben den 8-bromo Derivaten der cyclischen Nucleosidmonophosphate gibt es membrangängiges chlorophenylthio (cpt) substituiertes cAMP und cGMP. Abbildung 3-15 zeigt die Strukturformel von 8-bromo- sowie cpt cAMP.

Es wurde untersucht, ob es einen Einfluss dieser substituierten Derivate auf den Amilorid-sensitiven Strom in Oocyten, die unterschiedliche ENaCs exprimieren, gibt. Diese Fragestellung konnte durch die Versuche positiv beantwortet werden. So wurde der xENaC-vermittelte Strom durch 50 μ M bromo cGMP, wie bereits in Abbildung 3-14 gezeigt ca. um den Faktor 3 erhöht, wohingegen cpt-cGMP keine signifikante Veränderung des I_{ami} bewirkten. Das gegenteilige Resultat ergaben Versuche mit hENaC- und Gpl α /R $\beta\gamma$ exprimierenden Oocyten. In diesen Oocyten stimulierte cpt cGMP die Amilorid sensitive Natriumaufnahme um ein Vielfaches. Das 8-bromo Derivat des cGMP verursachte demgegenüber keine Veränderung des I_{ami} . Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Untersuchung der unterschiedlichen Wirkungsweisen der verschieden substituierten cyclischen Nucleosidtriphosphate auf einen weiteren second messenger, das cAMP ausgeweitet. Dabei zeigte sich ein ähnliches Resultat wie zuvor bei cGMP. Bromo cAMP stimuliert den xENaC getragenen I_{ami} signifikant wohingegen dies cpt cAMP wie durch unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt nicht vermag (Schnizler et al., 2000).

A.



B.

**Abb. 3-15: Membrangängige cAMP-Derivate**

Strukturformel der beiden untersuchten cAMP-Derivate. Teilabbildung A zeigt die an der 8' Position mit Brom substituierte Form des cAMP, Teilabbildung B die an der 8' Position mit der Chlorophenylthio-Gruppe substituierte Form des cAMP.

Forskolin, welches der Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration dient, konnte in diesem Zusammenhang den in Oocyten exprimierten xENaC vermittelten I_{ami} ebenfalls nicht signifikant erhöhen (I_{ami} wurde durch Superfusion mit 10 μ M Forskolin zwar leicht jedoch nicht signifikant von 172 nA $\pm$ 29 nA auf 195 nA $\pm$ 28 nA erhöht). Umgekehrt bedingt cpt cAMP in $g\text{pl}\alpha/r\beta\gamma$ exprimierenden Oocyten eine starke Stimulation des I_{ami} , wohingegen bromo cAMP den Amilorid-sensitiven Strom nicht verändert. Auch in Oocyten, welche hENaC exprimieren bewirkt cpt cAMP eine stärkere Stimulation von I_{ami} als bromo cAMP. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Abbildung 3-16 dargelegt.

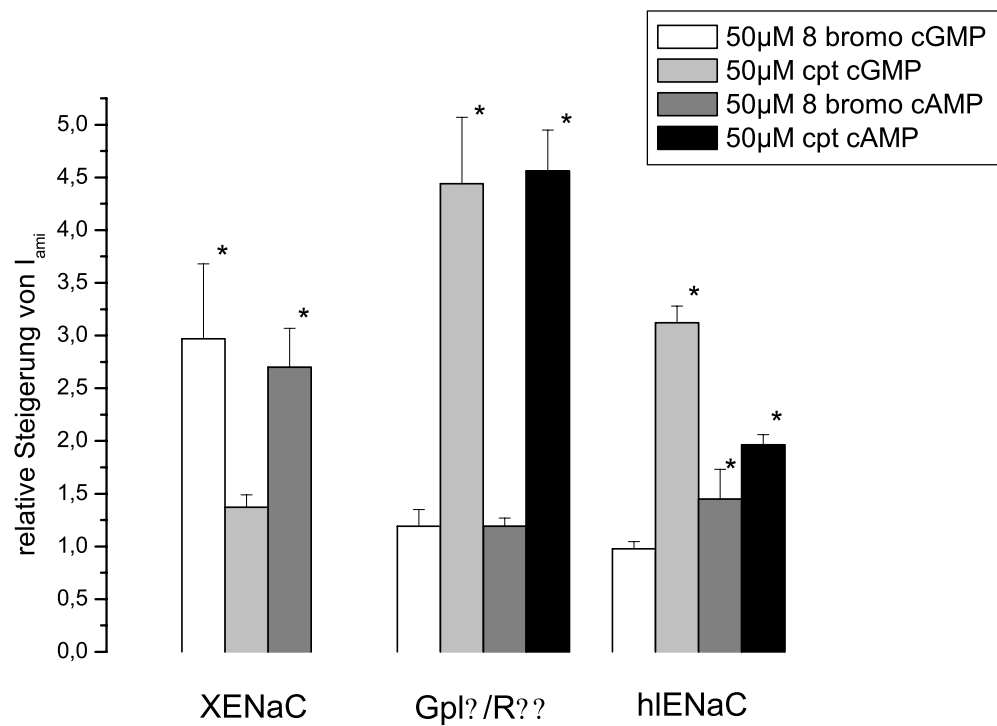


Abb. 3-16: Effekt unterschiedlicher Derivate von cAMP und cGMP auf Amilorid-sensitive Ströme

Vergleich der Wirkung von cpt und 8bromo substituiertem cGMP oder cAMP auf den I_{ami} von Oocyten, welche ENaCs unterschiedlicher Spezies exprimieren.

	10	20	30	40	50	60	70
hl α ENaC	-----MEGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPEPAAPQQPTAE						
gpl α ENaC	MLMRLPLPSLTDGRPLGCCCTCQGSMSKGDDELKAQGGLPPQPLQGGLKGDKEQPGLGPEPTAPQQHTEE						
x α ENaC	-----MTKEEKNE						
	80	90	100	110	120	130	140
hl α ENaC	EEALIEFHRSYRELFEFFCNNTTIHGAIRLVCSQHNRMTAFWAVLWLCTFGMMYWQFGLLFGEYFSYPV						
gpl α ENaC	EEALIEFHRSYRELFFFCNNTTIHGAIRLVCSKHNRMTAFWAVLWLCTFGMMYWQFALLFGEYFSYPV						
x α ENaC	KEALIEFFSSYRELFEFFCSNTTIHGAIRLVCSRRNRMTAFWLVLFVTFGLMYWQFGLLFQYFSYPV						
	150	160	170	180	190	200	210
hl α ENaC	SLNINLNSDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELELDRIETQTLFDLYKYSSFTT---LVAGSRRRDLR						
gpl α ENaC	SLNINLNSDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELELDRIETQTLFDLYKYSSFTT---LLAGARSRRLA						
x α ENaC	SINLNVNSDKLPFPAVTICTLNPYRYKAIQNDLQELDKETQRTLYELYKYNSTGVQGWIPNNQVRKDRD						
	220	230	240	250	260	270	280
hl α ENaC	GTLPHPLQRLRVPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNQNKSDCFYQTYSSGVDVAVREW						
gpl α ENaC	DTLPYPLQRIPIVQPEPRRAR--SSDPSSVRDNNPRVDRRDWRVGFQLCNQNKSDCFYQTYSSGVDGVREW						
x α ENaC	G-LPYLLELLPPGSETHRVS-----RSVIEEELQVKRREWNIGFKLCNETGGDCFYQTYTSGVDAIREW						
	290	300	310	320	330	340	350
hl α ENaC	YRFHYINILSRPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHFHHPMYGNCYTFNDK--NNSNLWMS						
gpl α ENaC	YRFHYINILAQVADTSPRWEETLGNFIFACRFNQAPCTQENYSHFHHPYIGNCYTFNNK--NDSSLWMA						
x α ENaC	YRFHYINILARVPQEA-AIDGEQLENFIFACRFNEESCCKANYSSFHHAITYGNCYTFNQNSDQSNLWSS						
	360	370	380	390	400	410	420
hl α ENaC	SMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEPAFMDGGFNLRPGVETSISMKEITLDRLLGG						
gpl α ENaC	SMPGINNGLSLMLRTEQNDYIPLLSTVTGARVTVHGQDEPAFMDGGFNLRPGVETSISMKEALDRLLGG						
x α ENaC	SMPGIKNGTLVLRLTEQHDYIPLLSSVAGARVLVHGHEPAFMDDNGFNIPPGMETSIGMKKETINRLGG						
	430	440	450	460	470	480	490
hl α ENaC	DYGDCITKNGSDVPVENLYPSKYTQQVCIHSCFQESMIKECGCAYIFYPRPQNVEYCDYRKHSWGYCYK						
gpl α ENaC	SYGDCITKNGSDVPVQNLVPSKYTQQVCIHSCFQENMIKQCGCAYIFYPKPKGVFECDYTNHSAWGYCYK						
x α ENaC	KYSDCSEDGSDVDVKNLFQSEYTEQVCVRSCFQAAMVARCGCYAFYPLSPGDQYCDYNKHKSWGHCCYK						
	500	510	520	530	540	550	560
hl α ENaC	LQVDFSSDHLGCFCKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNYTVNNKRVAKVNIFFK						
gpl α ENaC	LQGAFFSSDSLGCFFNKCRKPCNVITYKLSAGYSRWPSAASQDWIFQMLSLQNNYTVNNKRVAKLNIYFK						
x α ENaC	LIIEFTSNKLGCFCKCRKPCLVSEYQLTAGYSKWPNRVSQDWLHTLSRQYNLTD---RNGIAKLNIYFE						
	570	580	590	600	610	620	630
hl α ENaC	ELNYKTNSPSPSVMTVLTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLLVIMFLMLLRRFRSRYWSPGRGG						
gpl α ENaC	ELNYRTNSPSPSVMTVLTLLSNLGSQWSLWFGSSVLSVVEMAELVFDLLVITLLMLLRRFRSRYWSPGRGA						
x α ENaC	ELNYKTILESPTINMAMLLSLLGSQWSLWFGSSVLSVVEMLELVIDFVIIGVMILLHRY--YKKKANEGE						
	640	650	660	670	680	690	700
hl α ENaC	RGAQEVASTLASSPPSHFCPPHMSLSLSQPGPAPSPALTAPPPAYATLGPRPSPGGSGAGASSSTCPLGGP						
gpl α ENaC	RAAREVACTPPPLSPSRFCAH-----S---AFPTLTAPPPAYATLSACPPLQGLAGASSAACAPREP						
x α ENaC	ETTVPPTPAPAFADLEQQVPHIPRGDLSQR-QISVVAIDTPPPAYESLDLR-SVGTLSRSSSMRSNRSRYEENGRRN						

PKC-Phosphorylierungsstelle

Tyrosinphosphorylierung

mögliche cAMP/cGMP abhängige Phosphorylierungsstelle

schwefelhaltige Aminosäuren, welche durch Bildung von Disulfidbrücken maßgeblich an der Tertiärstruktur beteiligt sind

Abb. 3-17: Vergleich der Aminosäuresequenzen der α -Untereinheiten des ENaC der menschlichen Lunge (hl α ENaC), der Meerschweinchenlunge (gpl α ENaC) und derjenigen aus *Xenopus laevis* (x α ENaC). Unterstrichen dargestellt sind die beiden Transmembrandomänen.

4. Diskussion

4.1 Kennzeichen von Epithelien

Ein Kennzeichen höherer Lebewesen ist die Aufrechterhaltung eines konstanten inneren Milieus. Eine wichtige Voraussetzung dafür sind spezialisierte Gewebeverbände, welche eine Barriere bilden zwischen der extra- und intrazellulären Flüssigkeit. Diese Barrierefunktion übernehmen Epithelien, deren einschichtiger Zellverbund aus polarisierten Zellen besteht, die eine apikale und eine basolaterale Oberfläche besitzen. Die gerichtete Aufnahme oder Abgabe wird durch die unterschiedliche Ausstattung von apikaler und basolateraler Membran mit membranständigen Transportproteinen ermöglicht. Der apikale Teil der Epithelzelle ist dabei zur Organismusumgebung gerichtet (z.B. zum Darmlumen, Lungenlumen oder Nierentubulus) und weist typischerweise eine starke Oberflächenvergrößerung durch Zotten oder Einstülpungen der Membran auf. Die basolaterale Seite ist zum Inneren des Organismus gerichtet. Der dichte Zusammenhalt des Epithels wird durch Tight Junctions und Desmosomen gewährleistet. Diese Strukturen liegen lateral an den Epithelzellen, ermöglichen interzelluläre Bindungen und sind folglich dafür verantwortlich, den unkontrollierten Stoffaustausch auf dem parazellulären Weg zu verhindern. Je nach Anzahl und Häufung dieser Strukturen können dichte, mitteldichte und durchlässige Epithelien unterschieden werden.

Gleichzeitig ist es notwendig auf dem transzellulären Weg Stoffe aufzunehmen bzw. zu resorbieren. Entsprechend erfolgt die Aufnahme von Nährstoffen überwiegend über das Dünndarmepithel, die Resorption von Elektrolyten über das Nierenepithel und der Austausch der Atemgase Sauerstoff und Kohlendioxid über das Lungenepithel.

In der Säuger-Lunge werden transzelluläre Transportprozesse vornehmlich durch Natrium- und Chloridströme vermittelt. Die potenzielle Energie, welche durch die unterschiedliche Verteilung der Ionenspezies und durch den Ladungsgradienten (chemieosmotisches Gleichgewicht) entsteht, kann dabei als der Motor für solche

Transportprozesse angesehen werden. Aufgrund dieser Ungleichverteilung kann die dadurch gespeicherte Energie zum gekoppelten Transport anderer Stoffe wie z.B. Fettsäuren genutzt werden. Zudem ziehen Ionenbewegungen über Zellmembranen eine osmotische Verschiebung nach sich, die durch eine passive Wasserbewegung entlang des osmotischen Gradienten ausgeglichen wird. In diesem Zusammenhang spielt die Aufnahme von Na^+ -Ionen über die apikale Zellmembran bei der Flüssigkeitsresorption aus dem Lungenlumen eine zentrale Rolle (O'Brodivich et al., 1990). Diese Natriumaufnahme erfolgt über apikal lokalisierte Kanäle, bei welchen es sich vornehmlich um epitheliale, durch Amilorid selektiv hemmbare, Na^+ -Kanäle (ENaC) handelt. In Lungenepithelzellen von Säugern weist der ENaC eine besondere Funktion auf. In diesen Zellen erfolgt eine entwicklungsabhängige Expression der Gene für die α -Untereinheit des ENaCs. Direkt vor der Geburt wird die Expression infolge β - und β_2 -adrenerger Stimuli (Brown et al., 1983; Chapman et al., 1991; Chen et al., 2002) sowie cAMP (Walters et al., 1990) und Phosphodiesteraseinhibitoren (Chapman et al., 1991) stark erhöht, um aus dem pränatalen flüssigkeitsezernierenden Organ ein postnatal flüssigkeitabsorbierendes Gewebe zu bilden. Bei Untersuchungen an Knock-Out-Mäusen, welchen die Fähigkeit zur Expression der α -Untereinheit fehlt, wird diese enorme Bedeutung unterstrichen. Dort hat man eine sehr frühe Letalität (6-8 Stunden nach Geburt) festgestellt, die auf einem buchstäblichen Ertrinken der Tiere aufgrund einer mit Flüssigkeit gefüllten Lunge beruht. Diese Flüssigkeit kann nicht in regulärer Weise auf dem transepithelialen Weg aufgenommen werden, wodurch der Gasaustausch extrem beeinträchtigt ist und die Mäuse aufgrund verminderter Sauerstoffaufnahme sterben (Hummler et al., 1996). Neben der α -Untereinheit werden auch die β - und γ -Untereinheit des ENaC zum Zeitpunkt der Geburt verstärkt exprimiert (Gaillard et al., 2000).

Nach der apikalen Natriumaufnahme über ENaCs wird der zweite Schritt der Aufrechterhaltung eines Natriumgradienten als Voraussetzung zur apikalen Natriumaufnahme durch die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase gewährleistet. Diese sorgt unter Aufwendung von Energie in Form von ATP für das Entfernen von Natrium über die basolaterale Membran aus der Zelle. Gleichzeitig pumpt sie Kalium gegen das Konzentrationsgefälle in die Zelle.

Dieser gesamte Prozess der Natriumaufnahme durch das Epithel wird bereits auf der Ebene der ENaCs reguliert. Dabei unterscheidet man kurz- und langfristige Modulationen. cAMP-abhängige Prozesse, wie etwa die Regulation durch Vasopressin, sorgen in Sekunden bzw. Minuten für eine Stimulation der apikalen Amilorid-sensitiven Natriumaufnahme. Demgegenüber stehen Eingriffe auf der Ebene der Gentranskription (Djelidi et al., 1997), welche beispielsweise durch Mineral- und Glucocorticoide hervorgerufen werden (Palmer et al., 1982; Watlington et al., 1982). Aus Lungen-Epithelzellen ist bekannt, dass die Genexpression der α – Untereinheit des ENaC über Glucocorticoid-Response Elemente (GRE) auf Ebene der DNA reguliert werden kann (Wang et al., 2000). Ähnliche Regulationsmechanismen sind aus dem Nierentubulus (Mick et al., 2001) sowie den Speicheldrüsen (Lin et al., 1999) von Säugern bekannt.

4.2 Wirkung von PGE₂ auf den Natriumtransport der Lunge von *Xenopus*

4.2.1 Morphologischer Aufbau der Lunge von *Xenopus laevis*

Analog zur Säugerlunge entstammt die Amphibienlunge phylogenetisch dem Kiemendarm. Bei dem Lungenepithel von *Xenopus* handelt es sich darüber hinaus, wie beim menschlichen Lungenepithel, um ein dichtes Epithel (Illek et al., 1990). Die lateral paarig angelegten Lungen weisen bei *Xenopus laevis* eine sackartige Morphologie auf und sind für 80 % des Gasaustausches der adulten Tiere verantwortlich (Emilio und Shelton, 1974). Durch Septierungen 1. und 2. Ordnung wird die Gasaustauschfläche der relativ großen Alveolen, die hier als Faveolen bezeichnet werden, maximiert (Pohunková und Hughes, 1985; Daniels und Orgeig, 2003). Die Faveolen werden von einer Flüssigkeit bedeckt, dies mit Surfactant angereichert ist, welches hinsichtlich der Bestandteile mit dem der Säugerlunge übereinstimmt und dessen Zusammensetzung dem Surfactant der Säugerlunge ähnelt (Daniels et al., 1994). Die Unterschiede beschränken sich auf die Verhältnisse von Phospholipiden zu Phosphatidylcholinen. Die Bildung des Surfactant geht vornehmlich von stark lamellierten Körpern in humanen ATII-Zellen und *Xenopus* Lungenepithelzellen aus. Das Surfactant verhindert in der Amphibienlunge die Aneinanderheftung der apikalen Membranen der Epithelzellen und somit einer Reduzierung des Gasaustauschs. Zudem spielt das Surfactant eine wichtige Rolle beim Schutz vor eingeatmeten Antigenen oder zellnoxischen Substanzen.

Der Querschnitt durch die *Xenopus* Lunge offenbart 3 Hauptschichten. Die mucosale Lage besteht aus epithelialen Zellen, Kapillaren und Bindegewebe mit glatter Muskulatur. Die mittlere Schicht ist hauptsächlich aus Bindegewebe mit wenigen muskulären Bestandteilen aufgebaut. Die serosale Schicht ist mesodermales Gewebe mit einer Abschlussmembran (Pohunková und Hughes, 1985). Die Epithelzellen der *Xenopus*-Lunge, welche das erste Hindernis der Blut-Luft-Diffusionsbarriere darstellen, sind uniform und vereinen die Funktion und die

Morphologie mammalischer ATI- und ATII-Zellen (Pohunková und Hughes, 1985; Fischer et al., 1989). Die Dicke der Blut-Luft-Diffusionsbarriere beträgt ca. 1 μm (Pohunková, 1975). Zum Vergleich sind es bei Säugern 0,1 μm und bei Vögeln 0,5 μm (Boorman et al., 1980; Abdalla et al., 1982). Bei der Anurenlung handelt es sich um ein absorbierendes Gewebe und somit eine weitere Parallele zu Säugerlungen (Danto et al., 1998). Zudem wurde bereits gezeigt, dass diese resorptiven Eigenschaften hauptsächlich auf Amilorid-hemmbareren Natriumströmen beruhen, welche analog zu ENaCs in Säugerlungen durch Aldosteron reguliert werden (Fischer und Clauss, 1990). Die Lunge von *Xenopus laevis* kann aufgrund ihrer simplen Morphologie und der Ähnlichkeit zur humanen Lunge als Modell elektrophysiologischer Untersuchungsmethoden herangezogen werden. Deshalb stellt sie ein vielversprechendes Untersuchungsobjekt für vergleichende Studien von Gasaustauschprozessen dar.

4.2.2 Bildung von Prostaglandinen im Tier- und Pflanzenreich

Prostaglandine zählen zu den Eicosanoiden, welche Arachidonsäure als gemeinsames Edukt aufweisen. In Abhängigkeit der enzymatischen Umsetzung können aus Arachidonsäuren entweder Epoxyeicosatrien-Säure (Cytochrome P-450 Epoxygenase), Leukotriene (Lipoxygenase) oder Prostaglandine entstehen. Bei letzterer Umsetzung entsteht mit Hilfe der Cyclo-Oxygenase Prostaglandin-Endoperoxid H_2 , was seinerseits wiederum der Vorläufer unterschiedlicher Thromboxane und Prostaglandine wie z.B. PGE_2 und PGI_2 ist (Smith, 1989). Den aus insgesamt 20 Kohlenstoffatomen bestehenden Prostaglandinen ist ein Cyclopentanring gemein, von dem zwei kurze aliphatische Kohlenwasserstoffketten ausgehen. Diese strukturellen Eigenschaften sind für den lipophilen Charakter verantwortlich. Trotz dieser Membrangängigkeit vermitteln Prostaglandine ihre Wirkung in der Regel über membranständige Rezeptoren.

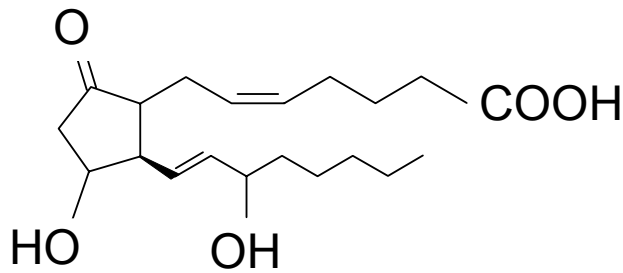


Abb. 4-1: Strukturformel von PGE₂

Die 1933 erstmals bei Säugern nachgewiesenen Prostaglandine zeichnen sich durch eine weite Verbreitung im Tierreich aus und wurden 1969 auch in Invertebraten gefunden. Weinheimer und Spraggins wiesen Prostaglandine in Coelenteraten nach (Weinheimer und Spraggins, 1969). Mittlerweile sind eine Vielzahl von Funktionen der Eicosanoide bekannt. So sind sie beteiligt an der Zellaggregation bei Schwämmen (Rich et al., 1984), der Eireifung bei Seesternen (Meijer et al., 1986), der Eiablage bei Grillen (Stanley-Samuelson et al., 1986) und sie beeinflussen den Natriumtransport bei Süßwasser-Muscheln (Saintsing und Dietz, 1983).

Wie bei Insekten nachgewiesen, zirkulieren Prostaglandine bei Invertebraten längere Zeit in der Hämolymphe und üben ihre Wirkung auf hormonähnliche Weise aus. Demgegenüber ist die Halbwertszeit im Blut von Vertebraten sehr kurz und die Wirkung ist lokal begrenzt (Stanley-Samuelson und Loher, 1990).

Außer bei Invertebraten wurden Prostaglandine auch bei Pflanzen, Pilzen und Einzellern nachgewiesen, was ihre weitreichende Bedeutung unterstreicht (Stanley-Samuelson und Loher, 1990).

4.2.3 Bedeutung der Cyclo-Oxygenase

Analog zur Entstehung beim Menschen erfolgt auch in Anuren die Synthese als Reaktion auf eine Aktivierung des Immunsystems (DuPasquier et al., 2000). Neben der bereits länger bekannten Sekretion von Interleukinen und Prostaglandinen durch makrophagisch tätige Zellen ist PGE₂ nach neueren Studien auch an der humoralen Bekämpfung von körperfremden Stoffen beteiligt. So wird die Expression von MHC II-Komplexen in follikulären dendritischen Zellen durch PGE₂ verhindert (Harizi

et al., 2003). Folglich beeinflusst PGE_2 sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort des Organismus.

In der medizinischen Entzündungsbekämpfung ist die Cyclo-Oxygenase (COX), die in zwei Subformen (COX-1 und COX-2) vorkommt, ein Schlüsselenzym. Bekannte Wirkstoffe wie Acetylsalicylsäure (Aspirin®), Diclofenac oder Ibuprofen sind Inhibitoren der Cyclo-Oxygenasen, welche dadurch schmerzlindernd wirken. Bei diesen Medikamenten handelt es sich um unspezifische COX-Blocker, die als Nebenwirkung Magenprobleme verursachen. Diese werden durch die Inhibierung der COX-1 im Magen hervorgerufen. Dadurch werden vermindert Thromboxane gebildet, die für die Aggregation der Thrombocyten verantwortlich sind. In der Folge können Magenblutungen auftreten. Vor diesem Hintergrund ist es vor einigen Jahren gelungen, mit dem Wirkstoff Rofecoxib (Vioxx®) einen selektiven COX-2 Blocker zu kreieren, der die gleiche Wirksamkeit wie die erwähnten Medikamente besitzt, ohne die erläuterten Nebenwirkungen auf die Magenschleimhaut hervorzurufen.

4.2.4 PGE_2 als inflammatorisch wirksame Substanz

Eicosanoide werden aufgrund ihrer örtlich begrenzten Wirkung auch als lokale Hormone bezeichnet, die lediglich eine kurze Halbwertszeit aufweisen (Smith, 1985). So konnte gezeigt werden, dass intravenös in den Organismus eingebrachtes PGE_2 schon nach einem Blutzirkulationsdurchgang nicht mehr nachzuweisen ist (Ferreira und Vane, 1967). Der Grund ist bei den zahlreich vorkommenden Prostaglandinabbauenden Enzymen zu suchen. Demzufolge tritt die Wirkung der Prostaglandine in Vertebraten örtlich begrenzt auf.

Die Bildung erfolgt unabhängig von bestimmten endokrinen Organen. Prostaglandine können von nahezu allen Zellen synthetisiert werden und sowohl auto- als auch parakrine Reaktionen hervorrufen. Bei Entzündungsprozessen erweist sich jedoch die Mastzelle als eine der wichtigsten Quellen für Prostaglandine (Fels et al., 1986). Nach Stimulation sezerniert sie als Entzündungsbotenstoffe neben Cytokinen und Interleukinen auch Prostaglandine. Die Synthese von Prostaglandinen in alveolaren Makrophagen, sowie alveolaren Epithelzellen wurde schon früh von Orehek et al. (1973) beschrieben.

Die Wirkungsweise von Prostaglandinen umfasst ein weites Spektrum. Sie haben häufig vasodilatorische Effekte, wodurch es zu einer verstärkten Durchblutung der entzündeten Stelle und in Folge dessen zu Rötungen kommt. Im allgemeinen wirken Prostaglandine relaxierend auf glatte Muskulatur, in Sonderfällen wie z.B. bei den Geburtswehen sorgen akkumulierte Prostaglandine für die Steuerung der Kontraktion der Uterusmuskulatur (Lodish et al., 1995).

Die zelluläre Wirkung dieser lipophilen Hormone ist abhängig von membranständigen Rezeptoren, welche für die Vermittlung des Hormonsignals ins Zellinnere verantwortlich sind. Diese Effekte können jedoch in Abhängigkeit vom Zell- bzw. Organtyp vielgestaltig sein. Im Sammelrohr von Kaninchen bewirkt PGE_2 über eine Verminderung des intrazellulären cAMP-Spiegels eine Inhibierung der Natriumresorption. Parallel erfolgt eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration was eine Hemmung der Vasopressin stimulierten Wasserresorption nach sich zieht (Hébert, 1994). In bovinen pigmentierten Epithelzellen verursacht PGE_2 eine Anreicherung von cAMP, was in der Folge zu einer erhöhten Chloridsekretion durch apikale Cl^- -Kanäle führt (Fleischhauer et al., 2001).

Die verstärkte Bildung von PGE_2 ist in einer Vielzahl von Geweben als Antwort auf Entzündungen beschrieben worden (Peskar, 2001; Fujino et al., 2003; Ivanov et al., 2003). Sowohl bei Hypoxie als auch bei durch reaktive Oxidantien hervorgerufene Entzündungen konnte die Beteiligung von PGE_2 nachgewiesen werden (Pisarello et al., 1997; Yang et al., 2002). In Lungengeweben ist zudem die Wechselwirkung von NO und PGE_2 von Bedeutung (Banerjee et al., 2002). In humanen A549-Zellen wird die COX-2-Aktivität durch endogenes Stickstoffmonoxid (NO) erhöht (Watkins et al., 1997). Dieser Effekt wird durch cGMP vermittelt und spricht für einen möglichen Einfluss von NO bei Atemwegsentzündungen. In diesem Zusammenhang gilt es zu erwähnen, dass auch bei Krankheiten wie Asthma eine veränderte Prostaglandinsynthese beobachtet wird (Gray et al., 1992). Die Beteiligung von Prostaglandinen an asthmatischen Atemwegserkrankungen lässt sich auf deren relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur, wie sie in den Atemwegen vorkommt, und auf die inhibitorischen Effekte auf die Acetylcholinfreisetzung aus parasymphatischen Nervenendigungen zurückführen (Walters et al., 1984; Jacoby, 1997).

In Anuren wurde die Synthese von Prostaglandinen quantitativ und qualitativ nachgewiesen (Herman, 1990). Die Bildung wurde durch den Nachweis der Cyclooxygenaseaktivität zudem in unterschiedlichen Geweben wie dem Herzen, der Lunge oder der Harnblase gezeigt (Herman et al., 1987). Das zu den verschiedenen Eicosanoiden umgesetzte Ausgangsprodukt ist dabei analog zum Säuger die Arachidonsäure.

Es gibt eine Reihe von Untersuchungen, die Effekte von Prostaglandinen auf den Elektrolythaushalt in den verschiedenen Organen von Anuren nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die Hydrogencarbonat-Sekretion im Duodenum des Ochsenfrosches (*Rana catesbeiana*) durch den Einfluss von Prostaglandinen (und NO) erhöht wird (Furukawa et al., 2000). Ebenfalls eine Stimulation der Anionensekretion von epithelialen Zellen wurde in den exokrin wirksamen Drüsen der Froschhaut von *Rana esculenta* nachgewiesen. Prostaglandin E₂ erhöht in diesen Zellen die Chloridsekretion und Wassersekretion und steigert zudem die intrazelluläre Calciumkonzentration (Bjerregaard und Nielsen, 1987; Nielsen und Nielsen, 1999).

Die Wirkung von Prostaglandinen auf Ionentransportprozesse der Lunge von Anuren wurde bislang nicht weitergehend untersucht, was die Grundlage der Fragestellung dieser Arbeit bildet.

4.2.5 Stimulation des I_{ami} der *Xenopus* Lunge durch apikales PGE₂

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die apikale Applikation von 1 μ M Prostaglandin E₂ der Kurzschlussstrom um ca. 40% gesteigert wurde. Damit ging die Erhöhung des I_{ami} um ca. 60% einher. Somit lag der Schluss nahe, dass diese Stimulation auf gesteigerter Amilorid-sensitiver Natriumaufnahme beruhte. Dies wurde durch die Ergebnisse untermauert, welche das Ausbleiben einer Stromsteigerung sowohl unter apikal Natrium-freien Bedingungen als auch unter konstanter apikaler Superfusion mit Amilorid verdeutlichten.

Zudem wurden die transepithelialen Ströme der Lunge unter Chlorid-freien Bedingungen hinsichtlich ihrer Sensitivität für Prostaglandin untersucht. Auch wenn kein Chlorid in der Perfusionslösung vorhanden ist, lässt sich sowohl der I_{SC} als auch

der I_{ami} durch 1 μM PGE_2 signifikant erhöhen. Die stimulatorische Potenz des apikal angebotenen PGE_2 liegt bezüglich des I_{SC} bei ca. 30%, die nahezu vollständig durch Amilorid hemmbar waren. Ein möglicher Effekt des PGE_2 auf den Chloridstrom ist jedoch nicht völlig auszuschließen. Der I_{SC} verringerte sich stets nach der Entfernung des Chlorids aus den Superfusionslösung beider Kompartimente. Daraus kann man schließen, dass der I_{SC} sich zu großen Teilen aus natriumabsorbierenden und chloridsezernierenden Strömen zusammensetzt. Dies unterstreicht die eingangs erläuterten Eigenschaften des Lungenepithels, welche die Abhängigkeit des I_{SC} von der Natriumaufnahme und der Chloridsekretion beschrieben.

Von Niere und Haut des Frosches *Xenopus laevis* ist bereits bekannt, dass PGE_2 an der Regulation der durch Amilorid inhibierbaren epithelialen Natriumkanäle beteiligt ist (Kokko et al., 1994; Els et al., 1998). Im Gegensatz zu der dort beschriebenen Wirkung des PGE_2 , welche durch basolaterale Applikation hervorgerufen wurde, stimuliert das Arachidonsäurederivat den I_{ami} in der vorliegenden Arbeit ausschließlich von der apikalen, dem Alveolarlumen zugewandten Seite des Epithels. Versuche mit basolateral appliziertem PGE_2 veränderten weder den Kurzschlussstrom noch I_{ami} . Auch bei Säugern wurde eine derartige Wirkung von PGE_2 bereits beobachtet. Bei Untersuchungen an kultivierten MDCK- (Madin-Darby canine kidney) Nierenzellen wurde eine PGE_2 induzierte Steigerung der apikalen Natriumaufnahme nachgewiesen. Diese Stimulation resultierte sowohl aus der apikalen als auch der basolateralen Applikation von PGE_2 , wobei diese Amilorid-sensitive Steigerung des Stroms nach basolateraler Gabe deutlich größer war (Wegmann und Nusing, 2003).

Dosis-Wirkungs-Untersuchungen ergaben für PGE_2 einen K_i -Wert von 32,4 nM. Dies unterstreicht ebenfalls die Sättigung der PGE -Rezeptoren bei der gewählten Konzentration von 1 μM PGE_2 . Vergleicht man dies mit K_i -Werten von geklonten PGE_2 -Rezeptoren, die in Zellkulturen heterolog exprimiert wurden, ermittelte man dort vergleichbare Konstanten. Diese K_i -Werte liegen zwischen 1 nM für den EP_3 -Rezeptor und 20 nM für den EP_1 -Rezeptor (Tsuboi et al., 2002).

Man kann in den bei der *Xenopus* Lunge ermittelten Resultaten eine typische Folge von Entzündungsvorgängen mutmaßen. Eindringende Krankheitserreger ziehen eine zelluläre Immunantwort nach sich. Diese erfolgt in Form von Makrophagen, welche in

das Lumen einwandern und sich dort zu alveolären Makrophagen differenzieren (Perez-Arellano et al., 1990). Die Makrophagen setzen in der Folge Cytokine und Prostaglandine wie z.B. PGE_2 frei. Dies führt dann u.a. zu einer verstärkten Natriumresorption aus dem Lumen, was wiederum eine erhöhte Wasserresorption aus dem periciliären Flüssigkeitsfilm, welcher die apikale Zelloberfläche bedeckt, hervorruft (Boucher, 2003). Somit wird auch dem darüberliegenden Mucus bzw. dem Surfactant, welche als passive Wasser- und Salzreservoir für die Periciliärflüssigkeit dienen, Wasser entzogen. Dies kann zu einem erschwerten oder ineffizienten Abtransport der Krankheitserreger und Partikel führen und kann in der Folge weitere Schäden der Lungenepithelien bedingen (Fulford und Blake, 1986). Eine verstärkte Natrium- mit folgender Wasserresorption ist aus einer Reihe humaner Erkrankungen wie Hypoxie (Lasnier et al., 1996), sowie hämorrhagischem- und septischem Schock (Pittet et al., 1994; Pittet et al., 1996) bekannt. Zudem tritt dieses Krankheitsbild bei cystischer Fibrose oder Asthma auf (Widdicombe, 2002). Im Gegensatz zu diesen Lungenerkrankungen kann eine verstärkte Wasserresorption einen positiven Einfluss auf die Rückbildung von Lungenödem ausüben. Dieser von Lane et al. (1998) beschriebene Effekt könnte nach den hier erhaltenen Resultaten u.a. auf eine PGE_2 induzierte Stimulation der Natriumaufnahme zurückzuführen sein. Anhand dieser Ausführungen wird deutlich, dass die Regulation der Flüssigkeitsresorption von vielen Faktoren und deren gegenseitiger Interaktion abhängt, PGE_2 jedoch von zentraler Bedeutung ist.

4.2.5.1 Untersuchung des Signaltransduktionswegs von PGE_2

Forskolin ist ein membrangängiger Aktivator der Adenylatzyklase und wurde in den Untersuchungen in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ verwandt. Dies stellt eine Konzentration dar, welche häufig in vergleichbaren Studien mit der Ussing-Kammer Technik benutzt wird und eine maximale Stimulation der Adenylatcyclase induziert (Blaug et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass eine Applikation von Forskolin eine Stimulation des Amilorid-sensitiven Stromes von rund 40% hervorruft, die einer Stimulation des I_{ami} durch apikale Gabe von PGE_2 vergleichbar ist.

Ähnliche Resultate sind von Monolayern aus A6-Zellen der *Xenopus* Niere bekannt. Matsumoto et al. (1997) wiesen für A6-Zellen einen PGE_2 -induzierten Anstieg des I_{sc}

nach, der auch durch Applikation von Forskolin hervorgerufen werden konnte. Butterworth et al. konnten ebenfalls an A6-Zellen zeigen, dass Forskolin die Anzahl aktiver ENaCs in der apikalen Membran signifikant erhöht. Dies hat eine Stimulation des Kurzschlussstromes zur Folge (Butterworth et al., 2001). Die Vergleichbarkeit der Effekte von Forskolin und PGE_2 auf den I_{SC} und den I_{ami} machen die Beteiligung einer PKA vermittelten Signaltransduktion wahrscheinlich.

Diese Hypothese wurde durch Versuche mit Inhibitoren der Proteinkinase A weiter untermauert. Dazu wurde das membrangängige RP-Isomer des cAMPs (RP-cAMP) verwendet. Es setzt sich in die vier cAMP-Bindestellen der beiden regulatorischen Einheiten der Proteinkinase A. Damit wird die Freisetzung der katalytischen Untereinheit unterbunden, wodurch die PKA im inaktiven Zustand verbleibt. Wird das RP-Isomer im Überschuss gegeben, ist es möglich, alle PKA spezifischen Phosphorylierungen zu verhindern und die davon abhängige Signaltransduktion damit abzuschalten. Um eine ausreichende intrazelluläre Anreicherung des RP-cAMP zu erhalten und die Möglichkeit zu gewährleisten, dass die Substanz in die Zellen des Epithels diffundieren kann, wurde die Lunge über einen Zeitraum von 90 Minuten mit $50 \mu\text{M}$ RP-cAMP inkubiert. Bei der im Anschluss durchgeführten Messung zeigte sich, dass die apikale Applikation von $1 \mu\text{M}$ PGE_2 keine Veränderung von I_{SC} und I_{ami} hervorbrachte. Bei Kontrollmessungen von *Xenopus*-Lungen, die ebenfalls mit RP-cAMP vorinkubiert wurden, konnte auch Forskolin I_{SC} und I_{ami} nicht stimulieren. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass die Inhibierung der Proteinkinase A die Stimulation durch PGE_2 und Forskolin unterbindet, womit auf eine Beteiligung der cAMP-abhängigen PKA an der PGE_2 vermittelten Wirkung auf das Lungenepithel geschlossen werden kann. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Erkenntnissen aus Experimenten mit MDCK-Zellen. Dort konnte ebenfalls eine cAMP-Abhängigkeit der durch PGE_2 stimulierten Natriumaufnahme nachgewiesen werden (Wegmann und Nüsing, 2003). Folglich scheint PGE_2 in Lungenepithelzellen von *Xenopus laevis* eine durch die PKA vermittelte Phosphorylierung des Amilorid-sensitiven Natriumkanals zu verursachen, was zu einer Erhöhung der Natriumaufnahme aus dem Lungenlumen führt.

Mit der gleichen Versuchsanordnung wie bei der bereits erläuterten Suppression der Adenylatzyklase wurde untersucht, ob auch intrazelluläres Calcium an der durch

PGE₂ hervorgerufenen Stimulation beteiligt ist. Die Inkubation der Lunge mit 50 µM des membrangängigen Calcium-Chelators BAPTA/AM wurde über einen kürzeren Zeitraum vorgenommen, da weitere zelluläre Vorgänge wie z.B. Zellverbindungen über Tight Junctions calciumabhängig sind. Die Folge des Fehlens von Ca²⁺ wäre das Absinken des transepithelialen Widerstands. Bei diesen Versuchen wurde die in Kontrollversuchen durch PGE₂ hervorgerufene Stimulation von I_{SC} und I_{ami} unterdrückt. Folglich scheint auch die Beteiligung eines Ca²⁺-abhängigen Prozesses an der durch PGE₂ vermittelten Stimulation möglich zu sein. In A6-Zellen von *Xenopus laevis* erfolgt bei der PGE₂-induzierten Modulation des Natriumstroms durch ENaCs ebenfalls die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Kokko et al., 1994). Diese Erhöhung der [Ca²⁺]_i aktiviert die Proteinkinase C (PKC), was initial in A6-Epithelien zu einer Verminderung der Offenwahrscheinlichkeit, nach längerer Zeit aber auch zu einer Reduzierung der Kanalzahl in der Membran führt. Diese PKC-induzierte Inhibierung der ENaCs ist zudem aus einer Reihe weiterer renaler Epithelien bekannt (Satoh und Endou, 1990; Ling et al., 1992; Frindt et al., 1996). Zusätzlich konnte in A6-Epithelien der inhibitorische Einfluss der PKC auf die Expression der drei verschiedenen ENaC-Untereinheiten nachgewiesen werden (Stockand et al., 2000). Daneben bewirkt die stetige PGE₂-Exposition in A6-Zelle zudem die PKA-abhängige Erhöhung des I_{ami} aufgrund verstärkten Einbaus der ENaCs in die apikale Membran. Die dargestellten Resultate ziehen die Frage nach sich, inwiefern der PGE₂ vermittelte Effekt auf den transmembranären Strom von der intrazellulären cAMP- und Ca²⁺-Konzentration abhängig ist.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass Prostaglandine von epithelialen Zellen aufgenommen und abgegeben werden können. Für die Ratten-Lunge wurden die strukturellen Voraussetzungen zur Passage der epithelialen Membran beschrieben (Schuster, 1998). Dabei zeigte sich ein Carrier vermittelter Transport der Prostaglandine E₁, E₂, D₂ und F_{2α}, jedoch lediglich eine verminderte Membranpermeabilität von PGA und PGI₂. Die Funktion der Prostaglandintransporter (PGT) ist allerdings umstritten. Es wird postuliert, dass sie sowohl für den Efflux neu synthetisierter Prostaglandine als auch für deren Degradation sorgen. Über die Aufnahme von Prostaglandinen auf diesem Weg in die Zelle und ihre mögliche intrazelluläre Wirkung gibt es jedoch keine Erkenntnisse. Die PGTs scheinen

vielmehr die Möglichkeit zu bieten, ohne exocytotische Vorgänge, Prostaglandine aus der Zelle zu transportieren, wo sie auto- und parakrin über Rezeptor-gekoppelte Prozesse ihre Wirkung entfalten.

PGE₂ bewirkt wahrscheinlich durch Interaktion mit den Epithelzellen der *Xenopus* Lunge eine Veränderung in deren Natriumaufnahme. Ein zu favorisierender Weg ist dabei die Bindung an einen membranständigen Rezeptor.

4.2.5.2 Identifizierung der beteiligten PGE₂-Rezeptoren

In der Literatur sind bislang unterschiedliche PGE-Rezeptoren beschrieben worden, welche auf Grund ihrer pharmakologischen Eigenschaften in vier verschiedene Subtypen unterteilt werden. Die vier PGE₂-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt und werden als EP₁-EP₄ bezeichnet (Negishi et al., 1995; Tilley et al., 2003). Sie weisen grundlegende Unterschiede hinsichtlich der Signaltransduktionskaskade auf. EP₁-Rezeptoren sind an ein G-Protein gekoppelt, welches insensitiv gegenüber Pertussis- und Cholera toxin ist. Beide Toxine bewirken eine irreversible Aktivierung der Adenylatzyklase, welche im Falle des Pertussistoxins auf einer Hemmung eines inhibierenden G-Proteins beruht, bei Cholera toxin auf einer dauerhaften Aktivierung eines stimulierenden G-Proteins. Die Toleranz der EP₁-Rezeptoren gegenüber den beiden Toxinen ermöglicht eine genauere Charakterisierung des Rezeptors, wobei das involvierte G-Protein bislang nicht ermittelt werden konnte (Tsuboi et al., 2002). Allerdings gibt die Toleranz gegenüber Pertussistoxin einen Hinweis auf G_o als verantwortliches G-Protein (Guo und Schofield, 2002). EP₁-vermittelte Prozesse sind Ca²⁺-abhängige Vorgänge. Durch die Bindung von PGE₂ an EP₁-Rezeptoren kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase C, der Dissoziation von IP₃ ins Cytoplasma und in der Folge zu verstärkter Ca²⁺-Ausschüttung aus intrazellulären Pools (Asboth et al., 1996).

Sowohl EP₂- als auch EP₄-Rezeptoren bewirken über G_s-Proteine eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Der strukturelle Unterschied beider Prostaglandin-Rezeptoren besteht in der Länge des carboxyterminalen Endes, welches beim EP₄-Rezeptor länger ist und eine größere Anzahl von Phosphorylierungsstellen aufweist (Nishigaki et al., 1996; Bastepe und Ashby, 1997).

EP₃-Rezeptoren wirken über eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ und ebenfalls über G-Proteine. Hierbei sind allerdings mit G_s, G_o und G_i drei verschiedene G-Proteine beteiligt. Dies wird bedingt durch eine große Anzahl von Spleißvarianten des EP₃-Rezeptors. Die Unterschiede treten vornehmlich am carboxyterminalen Ende, nicht jedoch in der N-terminalen, die Ligandenbindung vermittelnden Domäne auf (Adam et al., 1994; Breyer et al., 1994).

Es zeigt sich deutlich eine gewebespezifische Abhängigkeit der vermittelten Reaktion. In dendritischen Zellen wirken die EP₂ und EP₄ abhängigen Prozesse stimulierend auf die Immunantwort muriner Zellen und deren Proliferation, diejenigen durch EP₁ und EP₃ vermittelten Prozesse jedoch inhibitorisch (Asboth et al., 1996; Nataraj et al., 2001). Doch wie am Beispiel der Nieren zu erkennen ist, kommt es auch innerhalb eines Organs zu unterschiedlichen Prostaglandin-abhängigen Reaktionen. Diese beruhen auf einer von Zelltyp zu Zelltyp differierenden Ausstattung mit EP-Rezeptoren. EP₁-Rezeptoren werden vornehmlich im Sammelrohr exprimiert, wo PGE₂ die Natriumresorption unterdrückt (Guan et al., 1998). Im juxtaglomerulären Apparat induziert ein cAMP-abhängiger Prozess (vermittelt durch EP₂ oder EP₄) eine verstärkte Reninsynthese, was zu Bluthochdruck führt (Hockel und Cowley, 1979). EP₃-Rezeptoren befinden sich im dicken aufsteigenden Ast von Rattennieren, wo sie nach Aktivierung durch Prostaglandine den Ionentransport modulieren (Good und George, 1996). Zudem ist auch in der Säugerniere die antagonistische Wirkungsweise von EP₁/EP₃ auf der einen und EP₂/EP₄ auf der anderen Seite zu erkennen. Die cAMP vermittelnden Rezeptoren EP₂/EP₄ wirken vasodilatorisch auf die afferenten Arterien, wohingegen EP₁/EP₃ dort vasokonstriktiv wirken (Breyer und Breyer, 2000). Bei Untersuchungen an MDCK-Zellen konnte gezeigt werden, dass die PGE₂-abhängige Stimulation des ENaC auf einer EP₂-induzierten Aktivierung der Adenylatzyklase und folglich erhöhter intrazellulärer cAMP-Konzentration beruht (Wegmann und Nüsing, 2003).

Zur Aufklärung des durch PGE₂ aktivierten Signaltransduktionswegs in den Epithelzellen der *Xenopus* Lunge wurden unterschiedliche PGE₂ Rezeptoragonisten gewählt. Dabei handelte es sich um Sulproston, ein EP_{1/3} selektives Analogon, sowie um Misoprostol, ein EP_{2/3} selektives Rezeptoranalagon und das EP₁-Rezeptoranalagon PGI₂ (Iloprost). Die K_i-Werte von Sulproston für EP₁ und EP₃ liegen bei 21 nM bzw. 0,6 nM. Die eingesetzte Konzentration von 1 µM sollte folglich

eine Sättigung etwaig vorhandener Rezeptoren des passenden Typs ermöglichen. Wie im Ergebnisteil dargelegt, stimulierte die apikale Gabe von Sulproston den Amilorid-sensitiven Strom um $29 \pm 7\%$ ($p < 0,05$). Der signifikante Anstieg des I_{SC} fiel hingegen mit $17 \pm 4\%$ ($p < 0,05$) deutlich geringer aus. Die Tatsache, dass der durch Prostaglandin E_2 hervorgerufene Stromanstieg durch Sulproston ebenfalls zu induzieren ist, lässt jedoch auf die Beteiligung des EP_1 - oder EP_3 -Rezeptors schließen.

Der EP_1 -Agonist Iloprost ist hingegen nicht in der Lage, eine Veränderung von I_{ami} oder I_{SC} zu bewirken. Durch die eingesetzte Konzentration von 300 nM (K_i für $EP_1 = 21$ nM/Tsuboi et al., 2002) änderte sich weder bei apikaler noch bei basolateraler Applikation der transepitheliale Strom. Dies kann als erster Hinweis dafür angesehen werden, dass in der Lunge von *Xenopus laevis* die Prostaglandin E_2 induzierte Stimulation von I_{SC} und I_{ami} nicht auf einer Wechselwirkung mit dem EP_1 -Rezeptor beruht. Trotz nicht nachgewiesenem Einfluss auf die transepithelialen Ströme verringerte sich der Gewebswiderstand nach 20minütiger Perfusion mit 300 nM Iloprost signifikant auf $310 \Omega/cm^2$. Dies entspricht nahezu einer Halbierung des Gewebswiderstand verglichen mit Kontrollbedingungen. Von PGI_2 sind vasodilatorische Effekte bekannt, die Wirkung auf die Atemmuskulatur kann in Abhängigkeit des Rezeptors sowohl vasodilatorisch als auch vasokonstriktiv sein (Gardiner und Collier, 1980 Haye-Legrand, 1987). Zudem sind für humane ATI-Zellen stimulatorische Effekte auf die Surfactant-Sekretion und die Chloridsekretion nachgewiesen worden (Rose et al., 1999; Bliklager et al., 1999). Die Wirkung von PGI_2 könnte aber auch die Leitfähigkeiten der basolateralen Membran erhöhen, wodurch sich der Widerstand verringern würde.

Der EP_2/EP_3 -Agonist Misoprostol bewirkt, ebenso wie Sulproston, eine signifikante Stimulation des transepithelialen Stroms der Lunge. Bei einer apikal eingesetzten Konzentration von 1 μM (K_i -Wert für EP_2 beträgt 250 nM für EP_2 und 67 nM für EP_3 /Tsuboi et al., 2002) wird I_{ami} um $35 \pm 6\%$ gesteigert und I_{SC} um $20 \pm 5\%$.

Schlussfolgernd lässt sich aus den Versuchen mit den verschiedenen Rezeptoragonisten sagen, dass PGE_2 offensichtlich über einen Rezeptor vermittelten Prozess die Stimulation der Amilorid-sensitiven Natriumaufnahme induziert. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um den EP_3 -Rezeptor, welcher sowohl über Erhöhung

der intrazellulären Calciumkonzentration seine Effekte moduliert, als auch über die Stimulation der Proteinkinase A, was zu einer Erhöhung des cAMP in der Zelle führt. Dies wird untermauert durch die Tatsache, dass die Rezeptoren EP₂/EP₄ und EP₁/EP₃ in allen bislang untersuchten Geweben antagonistisch wirken, wodurch die Wahrscheinlichkeit für einen synergistischen Effekt von EP₂ und EP₃ gering ist. Die Beteiligung des EP₁-Rezeptors ist aufgrund des fehlenden Einflusses des EP₁-Rezeptoragonisten Iloprost auf den I_{SC} unwahrscheinlich.

Die postulierte rezeptorvermittelte Wirkung von PGE₂ wurde auch durch die Resultate der Expressionsversuche in *Xenopus laevis* Oocyten untermauert. Die Oocyten, welche keine nativen EP-Rezeptoren besitzen, exprimierten entweder den humanen Lungen-ENaC oder den *Xenopus*-ENaC (Tabata et al., 2002). PGE₂ war hier nicht in der Lage den transmembranären Strom signifikant zu verändern. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die durch PGE₂ vermittelte Stimulation der Amilorid-sensitiven Natriumaufnahme nicht auf direkte Interaktion zwischen PGE₂ und ENaC oder auf andere nicht durch Prostaglandin-Rezeptor vermittelte Mechanismen zurückzuführen ist. Stattdessen favorisiert dieses Ergebnis eine Rezeptor induzierte Stimulation des I_{ami}.

4.3 Einfluss von Tachykininen auf den transepithelialen Natriumstrom der *Xenopus* Lunge

Tachykinine sind Neuropeptide, welche sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten zu finden sind. Sie weisen einen hohen Grad der Konservierung über die unterschiedlichen Tierstämme auf (Severini et al., 2002). Ihre primären Syntheseorte sind neuronale Zellen, wo sie als Neurotransmitter und als Neuromodulatoren fungieren. Tachykinine konnten jedoch auch in nicht-neuronalem Gewebe nachgewiesen werden. So gelten der Darm, das Kardiovaskularsystem und die Lunge von Säugern als Bildungsorte der biogenen Amine (Gamse et al., 1978; Pernow, 1983; Simon et al., 1992; Joos et al., 2001). Die zelluläre Wirkung wird über membranständige Rezeptoren vermittelt, von welchen drei unterschiedliche Typen (NK_1 – NK_3) bekannt sind (Lundberg, 1995). In der Lunge konnte der NK_1 - bzw. NK_2 -Rezeptor in Epithelzellen (Chu et al., 2000) sowie in alveolaren Makrophagen und Mastzellen bereits nachgewiesen (Mapp et al., 2000) werden. Bei Säugern kontrahieren durch Substanz P die Bronchien (Advenier et al., 1987). Im Zuge dessen wurde bei asthmatischen Erkrankungen eine erhöhte Synthese der Neuropeptide in der Lunge gezeigt (Joos et al., 2000).

In Fröschen wurde die Produktion von Physalaemin, einem amphibischen Neuropeptid erstmals in der Haut nachgewiesen (Anastasi et al., 1964). In dem gewählten Versuchsansatz zeigte sich, dass sowohl Physalaemin, als auch Substanz P den Kurzschlussstrom und den I_{ami} der *Xenopus* Lunge bei basolateraler, aber nicht bei apikaler Gabe, signifikant um ca. 20% verringerten. Zudem erhöhte sich durch Physalaemin ebenfalls der Gewebswiderstand signifikant, wohingegen Substanz P keine Auswirkung auf diesen hatte. Dies führt zu der Vermutung, dass sich die konstriktorische Wirkung von Tachykininen auf die Lunge auch hier zeigt. Dieser Effekt kann jedoch nicht durch artfremde Tachykinine hervorgerufen werden. Einen der Wirkung von PGE_2 auf I_{SC} und I_{ami} ähnlichen Effekt konnte Physalaemin als eine in Entzündungsprozesse involvierte Substanz nicht hervorrufen.

4.4 Auswirkung reaktiver Oxidantien auf den I_{ami} von ENaC exprimierenden *Xenopus* Oocyten

Seit einiger Zeit werden Zusammenhänge zwischen Stickstoffmonoxid (NO) und Entzündungsvorgängen nachgewiesen (Kharitonov et al., 1995). Das kleine, hoch diffusible Molekül, dessen Funktion als Neurotransmitter detailliert beschrieben wurde, wird verstärkt als Antwort auf inflammatorische Stimuli freigesetzt (Barnes und Liew, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die durch Krankheitserreger bedingte Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt, wozu auch NO zählt (Moncada et al., 1991). Die quantitative Analyse von mit Lipopolysacchariden (LPS) aktivierten Makrophagen ergab eine NO-Bildungsrate von $0,1 \text{ nmol NO} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^6 \text{ Zellen}$ (Ischiropoulos et al., 1992). Die Bildung von NO (und L-Citrullin) aus dem Vorläufer L-Arginin wird durch das Enzym NO-Synthase (NOS) katalysiert, wobei man drei verschiedenen Subtypen unterscheidet: Die neuronale NOS (nNOS), die endotheliale NOS (eNOS) und die induzierbare NOS (iNOS) (Stamler und Meissner, 2001). Die induzierbare NOS wurde in Makrophagen, Lungenepithelzellen und nahezu allen anderen Zelltypen gefunden (Marletta, 1993). Entzündungen der Lunge wie sie beispielsweise Adenoviren induzieren, verursachen eine verstärkte Expression der iNOS (Zsengeller et al., 2001). Folglich wurden in der Lunge nach Entzündungen erhöhte Konzentrationen von NO in der ausgeatmeten Luft festgestellt (Hamid et al., 1993). Aufgrund der Membrangängigkeit von NO löst es sowohl intrazelluläre Reaktionen als auch extrazelluläre Veränderungen aus. Letztere beinhalten zum einen Nitrosilierungen von Proteinen, wodurch es zu veränderter Funktionalität kommen kann und zum anderen Wechselwirkung mit weiteren reaktiven Oxidantien (Hammarstrom und Gage, 1999). So ist Peroxynitrit ein aus der Reaktion zwischen NO und Superoxid hervorgehendes Produkt. Dieses unter physiologischen Bedingungen nur sehr instabile und kurzlebige Oxidationsmittel ist ebenfalls in der Lage Modifikationen an zellulären Proteinen vorzunehmen wie es beispielsweise in Membranvesikeln von colonalem Rattengewebe gezeigt wurde. Dort bewirkt Peroxynitrit eine Verminderung der Natriumaufnahme (Bauer et al., 1992). Aber auch

in Lungengeweben bewirken solche Oxidantien die Veränderung des Ionenhaushaltes, die zu Erkrankungen wie ARDS führen können (Matthay und Wiener-Kronish, 1990). Das Auftreten einer ungewöhnlich hohen Anzahl von Nitrosilierungen wie sie nach Einwirkung von Peroxynitrit auf distale Lungenzellen zu beobachten ist, wurde postmortal bei histologischen Untersuchungen des Lungengewebes von Patienten mit ARDS nachgewiesen (Haddad et al., 1994). Dass bei solchen Nitrosilierungen auch Kanalproteine betroffen sind, wodurch deren Aktivität und damit der Ionentransport verändert wird, erscheint offensichtlich. Entsprechend konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl Peroxynitrit als auch NO die apikale Natriumaufnahme von in Kultur gehaltenen ATEC-Zellen vermindern (Guo et al., 1998; Hu et al., 1994). Ding et al. (1998) wiesen nach, dass die durch NO gehemmte Natriumaufnahme auf die Inhibierung Amilorid-sensitive Natriumkanäle zurückzuführen ist. Entgegen des gängigen NO-Signaltransduktionswegs, der über die Erhöhung der cGMP-Konzentration zelluläre Prozesse moduliert, wird die Inhibierung nicht durch diesen second-messenger, sondern über einen bislang unbekannten Mechanismus reguliert. Die Expression von CFTR, einem Chlorid-Kanal, vermindert sich ebenfalls durch einen cGMP-unabhängigen Mechanismus von NO (Jilling et al., 1999). Im Gegensatz dazu sind die hemmenden Auswirkungen von NO auf nicht-selektive Kationenkanälen im Sammelrohr der Rattenniere und Calcium aktivierten Kationenkanälen in Fettzellen der Ratte cGMP-abhängig (Light et al., 1988; Koivisto und Nedergaard, 1995; Stoos et al., 1995).

Wie vielfach berichtet, weisen auch südafrikanische Krallenfrösche das Enzym zur Bildung von NO auf. Allaerts et al. (1997) sowie Bruning und Mayer (1996) beschrieben das Vorhandensein von NOS in neuronalem Gewebe.

In den Untersuchungen an der Lunge von *Xenopus* wurden unterschiedliche NO-Donoren eingesetzt. Weder die Applikation von NOC-18, noch die von SNP führten jedoch zu Veränderungen des transepithelialen Stroms oder der Amilorid-sensitiven Natriumaufnahme. Allerdings sank infolge von SNP der transepitheliale Widerstand signifikant.

Auch Arginin, das Substrat für die Synthese von NO, und cGMP, der second messenger von Stickstoffmonoxid bewirkten bei apikaler und basolateraler Gabe auf die Lunge keine Veränderungen von I_{SC} und I_{ami} .

Im System der *Xenopus* Oocyte konnten DuVall et al. (1995) die Hemmung der rENaC-induzierten Natriumaufnahme infolge der Gabe von Sin-1 zeigen. Bei Sin-1 (3-Morpholinsydnonimine) handelt es sich unter physiologischen Bedingungen um einen Donor von NO und Superoxid (O_2^-). Die Autoren führen den Effekt jedoch auf die extrazelluläre Wirkung von Peroxynitrit zurück, was sich wie bereits erläutert durch eine schnelle Reaktion aus dem Superoxid-Anion und Stickstoffmonoxid bildet. Da dieser Effekt auch aufgrund anderer nitrosilierend wirkender Agentien auftrat, ging man von einer entsprechenden Modifikation des ENaC im Bereich der Amiloridbindestelle aus. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Resultate nicht reproduziert werden. Die Inkubation der Oocyten mit 1 mM Sin-1 bewirkten weder in rENaC noch in gplα/rβγ exprimierenden Zellen die Veränderung der Amilorid-sensitiven Natriumaufnahme. Im Gegensatz zu den von DuVall et al. (1995) bei pH 6 durchgeführten Messungen, erfolgte diese Messung bei pH 7,4 und somit physiologischen Konditionen. Zudem fiel auf, dass die mit Sin-1 inkubierten Oocyten häufig eine optisch sichtbare Veränderung der Zellmembran aufwiesen. Diese Zellmembranen wurden rasch undicht, so dass die Experimente vorzeitig abgebrochen wurden.

Bei Messungen nach direkter Inkubation der Oocyten in 4 μ M Peroxynitrit und pH 7,4 zeigten sich andere Resultate. Der durch gplα/rβγ generierte Natriumstrom wurde signifikant inhibiert und fiel um ca. 75% infolge der Peroxynitrit-Inkubation. Bei diesen Versuchen bei einem pH-Wert von 7,4 muss jedoch berücksichtigt werden, dass Peroxynitrit unter diesen Bedingungen mit einer $t_{1/2}$ von einer Sekunde zur entsprechenden Säure zerfällt, die wiederum reagiert zu NO, Nitrat oder Nitrit (Pfeiffer et al., 1997). Somit kann aufgrund des Versuchsansatzes nicht ausgeschlossen werden, dass die Hemmung der Natriumaufnahme auch auf ein Zerfallsprodukt zurückzuführen ist. Der I_{ami} von rENaC- bzw. gpα/rβγ-exprimierenden Oocyten veränderte sich im Gegensatz dazu nach Peroxynitrit-Einwirkung nicht.

Mit dem hENaC wurde ein zusätzlicher aus der Lunge gewonnener Amilorid-sensitiver Natriumkanal zu weiterführenden Untersuchungen herangezogen. Der schon in Versuchen mit der *Xenopus* Lunge benutzte NO-Donor NOC-18 wurde in Experimenten mit ENaC exprimierenden Oocyten eingesetzt. Auch in den Oocyten zeigte sich die schon am intakten Lungengewebe gewonnene Erkenntnis, dass NO

keine Auswirkung auf die Aktivität von xENaC hat. Die Natriumströme durch die $g\text{p}\alpha/r\beta\gamma$ und hENaCs allerdings werden durch Applikation von NOC-18 relativ schwach jedoch signifikant um ca. 20% reduziert. Ferner erwiesen sich die Natriumströme des rENaC aus dem Rattencolon als nicht sensitiv für NO.

Der Membranstrom in Kontrollexperimenten mit H_2O -injizierten Oocyten blieb durch NOC-18 unverändert. Die Tatsache, dass der Effekt von NOC-18 bei Heterotetrameren, deren α -Untereinheit aus Lungengewebe stammt wie z.B. $g\text{p}\alpha/r\beta\gamma$ nicht jedoch $g\text{p}\alpha/r\beta\gamma$ auftritt gibt einen Hinweis darauf, dass der Effekt gewebspezifisch für α -Untereinheiten ist. Diese postulierte direkte Wirkung wird zudem untermauert durch Versuche mit cGMP, welches der second-messenger von NO vermittelten zellulären Reaktionen ist. Das membrangängige 8-bromo-Derivat von cGMP kann die durch NO induzierte Inhibierung des I_{ami} nicht hervorrufen und verursacht bei $g\text{p}\alpha/r\beta\gamma$ und hENaC keine Veränderung von I_{ami} . Diese inhibierende Wirkung von NO auf den I_{ami} , welche auf einem cGMP-unabhängigen Weg verläuft, wurde schon von mehreren Autoren beschrieben (Ding et al., 1998; Guo et al., 1998). Der xENaC vermittelte I_{ami} wird allerdings durch cGMP stimuliert, was in Kapitel 4.5 eingehender besprochen wird.

4.5 Untersuchung der Wirkung von cyclischen Nucleosidmonophosphaten auf den I_{ami} von ENaC exprimierenden *Xenopus* Oocyten

Zur Untersuchung von Kanalproteinen werden schon seit langer Zeit artfremde Expressionssysteme benutzt, von welchen sich dasjenige der *Xenopus* Oocyten bewährt hat (Werner et al., 1985). Diese translatieren exogen eingebrachte mRNA und bauen die prozessierten Fremdproteine im Falle von Kanälen oder Transportern auch in die Zellmembran ein. Aufgrund dessen ist eine elektrophysiologische Charakterisierung der ENaCs in der *X. laevis* Oocyte möglich.

In anderen Systemen wurden derartige Untersuchungen bereits durchgeführt, wobei eine cAMP-abhängige Phosphorylierung des Ratten-ENaC in MDCK-Zellen und 3T3-Fibroblasten bereits nachgewiesen werden konnte (Stutts et al., 1995 Shimkets et al., 1998). Ebenso wurde die cAMP vermittelte Vasopressin induzierte Stimulation der Natriumaufnahme in der Froschhaut oder der Krötenblase beschrieben (Wiesmann et al., 1977; Els et al., 1991). Schnizler et al. (2000) konnten zeigen, dass cpt cAMP in $g\text{pl}\alpha/r\beta\gamma$ exprimierenden Oocyten den I_{ami} signifikant stimuliert, während der in Oocyten exprimierte rENaC gegenüber einer erhöhten cAMP-Konzentration insensitiv ist (Awayda et al., 1996).

Im Rahmen der Arbeit wurde dieser Sachverhalt intensiver untersucht. Dabei ergaben sich augenfällige Unterschiede des Einflusses verschiedener Derivate des cAMPs auf ENaC vermittelte Ströme. Die Stimulation des durch hENaC fließenden Amilorid-sensitiven Natriumstroms war in Folge von cpt cAMP signifikant stärker als aufgrund des 8-bromo cAMP Derivats. Noch deutlicher wurde der Unterschied beim I_{ami} der $g\text{pl}\alpha/r\beta\gamma$ exprimierenden Oocyten. Während 8-bromo cAMP I_{ami} nicht veränderte, stimulierte cpt cAMP diesen um etwa das 4,5fache. Bei xENaC exprimierenden Oocyten war das Gegenteil zu beobachten, eine 2,7fache Stimulation durch 8-bromo cAMP, wohingegen das cpt cAMP keinen Effekt auf I_{ami} hatte.

Schnizler et al. (2000) beschrieben die fehlende Wirkung von cpt cAMP auf den xENaC vermittelten Natriumstrom, 8-bromo cAMP sorgt dagegen für eine ca.

2,5fache Steigerung von I_{ami} . Dieses Bild wird komplettiert durch die Ergebnisse der Untersuchungen, die mit den beiden unterschiedlichen membrangängigen Derivaten des cGMP durchgeführt wurden. Der durch hENaC und $gpl\alpha/r\beta\gamma$ vermittelte I_{ami} wurde durch cpt cGMP, jedoch nicht durch 8-bromo cGMP, signifikant stimuliert. Bei xENaC exprimierenden Oocyten ist wiederum die gegenteilige Regulation zu beobachten. Während cpt cGMP den I_{ami} nicht verändert, bewirkt die Superfusion mit 8-bromo cGMP eine ca. 3fache Erhöhung des Amilorid-sensitiven Stroms. Da diese unterschiedlichen Effekte der verschiedenen ENaCs an Oocyten des gleichen Ovars erzielt wurden, lässt sich eine Abhängigkeit von der *Xenopus*-Oocyte und deren typspezifischen intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen ausschließen. Diese Seitengruppen-abhängigen Effekte wurden auch von Chraibi et al. (2001) gezeigt. Sie beschreiben den ungewöhnlichen Substituenten-abhängigen Effekt an rENaC und $gp\alpha/r\beta\gamma$ exprimierenden Oocyten und konnten nachweisen, dass intrazelluläre PKA-Inhibitoren die durch cpt cAMP verursachte Stimulation des I_{ami} nicht verhindern konnten. Allerdings gilt anzufügen, dass sich die Wirkungen von cGMP und cAMP hinsichtlich der Zeit unterschieden. Während die cGMP-vermittelten Effekte auf die ENaC-Ströme der *Xenopus* Oocyten einen Zeitraum von mindestens 50 Minuten zur maximalen Stimulation benötigten, verursachte cAMP einen schnellen Effekt, der innerhalb von 20 Minuten ein Plateau erreichte. Eine mögliche Erklärung ist in unterschiedlichen Wirkungsweisen der beiden second messenger zu suchen. Der lange andauernde cGMP-abhängige Stimulus könnte z.B. auf die Rekrutierung submembranärer Vesikel, die nach der Fusion mit der Zellmembran eine Erhöhung der absoluten Anzahl an ENaCs bewirken würden, zurückzuführen sein. Der schnelle Effekt des cAMP spricht hingegen eher für Modifikationen direkt am Kanal.

Um eine Erklärung für die konträren Wirkungsweisen der cpt und 8-bromo Derivate zu finden, erfolgte eine Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen der drei unterschiedlichen α -ENaCs. Diese zeigen ein hohes Maß an Übereinstimmung und eine Vielzahl hochkonservierter Bereiche wie z.B. die hydrophobe transmembranäre Domäne. Unterschiede offenbaren sich in möglichen Phosphorylierungsstellen. Wie in Abbildung 3-17 dargestellt weisen alle drei α -ENaCs verschiedene Proteinkinase C- sowie cAMP-abhängige Phosphorylierungsstellen auf. Diese

befinden sich jedoch alle in der langen extrazellulären Schleife, wodurch eine Phosphorylierung durch intrazelluläre Transduktionskaskaden unwahrscheinlich wird. Neben der direkten Wechselwirkung könnte die Stimulation des I_{ami} auf eine Modifizierung der Interaktion von ENaC und bindendem Protein für die unterschiedlichen Reaktionen verantwortlich sein. Ein direkt an die ENaCs bindendes Protein ist Nedd4, welches in einer Vielzahl von Geweben wie auch verschiedenen Spezies (z.B. Mensch, *Xenopus*) vorkommt (Rebhun und Pratt, 1998; Farr et al., 1999). Nedd4 ist ein zelluläres Protein, welches durch die Interaktion mit membrangebundenen Kanälen (z.B. ENaC, CFTR, Kir1.1a) deren Ausbau aus der Membran bewirkt (Konstas et al., 2002). Nedd4 kommt in verschiedenen Subtypen vor, wobei der Ausbau der ENaCs aus der Zellmembran durch Nedd4-2 bewirkt wird. Dieser Subtyp wurde bei Maus und Mensch gefunden, die beide eine enge Verwandtschaft zur *Xenopus* Ubiquitin-Proteinligase xNedd4 aufweisen (Kamynina et al., 2001). Der Mechanismus beruht dabei auf einer Ubiquitinierung des Membranproteins, welches in der Folge aus der Membran ausgebaut wird. Auch beim ENaC wurde eine solche Regulation nachgewiesen (Abriel et al., 1999). Bei der Interaktion zwischen Nedd4 und ENaCs sind das N-terminale PY-Motiv und C-terminale Lysinreste von Bedeutung. Die WW-Domäne des Nedd4 sorgt für die Bindung des PY-Motivs von ENaCs (Staub et al., 2000). Die Aminosäureabfolgen des PY-Motivs liegen über Artgrenzen hinweg hochkonserviert vor. Mutationen im PY-Motiv führen beim Menschen zum sogenannten Liddle-Syndrom, welches auf eine verstärkte Natriumresorption infolge vermehrter apikaler Präsenz des ENaC zurückzuführen ist (Rotin, 2000). Diese erfolgt aufgrund eines verminderten Ausbaus aus der apikalen Zellmembran wegen des fehlenden Ubiquitinierungssignals. Das PY-Motiv ist in allen drei Untereinheiten präsent. Es gibt allerdings kontroverse Resultate an welche Untereinheit die Bindung erfolgt. Eine wichtige Regulationsmöglichkeit dieser Interaktion konnten Shi et al. zeigen (2002), die einen Einfluss der Phosphorylierung C-terminaler Threoninreste auf die Bindung von Nedd4 an ENaCs nachwiesen. Die beschriebene Phosphorylierung erleichterte in Zellkultur den Nedd4 initiierten Ausbau der ENaCs aus der Zellmembran. Diesbezüglich weisen die α -Untereinheiten der ENaCs von *Xenopus*, Meerschweinchen und Mensch einige Unterschiede sowohl im intrazellulären C-, als auch im N-Terminus auf. So tritt das Threonin an Position 68 des Meerschweinchen

ENaCs zwar beim Menschen, jedoch nicht bei *Xenopus* auf. Ein bei *Xenopus* an Position 2 vorkommendes Threonin wiederum, ist weder beim Menschen noch beim Meerschweinchen zu finden. Schließlich weist auch der N-terminale Bereich Unterschiede auf. Hier kommt beim Meerschwein direkt vor dem PY-Motiv an Position 668 ein Threonin vor, welches weder bei Mensch noch bei *Xenopus* zu finden ist (vgl. Abb. 3.17). Weiterführende Untersuchungen, die diese Threoninreste z.B. gegen Alanin austauschen, müssen zeigen, ob diesen Phosphorylierungsstellen wichtige Bedeutung zukommt.

Die Resultate lassen die Vermutung zu, dass der Substituent des cyclischen Nucleosidmonophosphats verantwortlich für die spezifische Wirkung auf Isoformen verschiedener Gewebe und Spezies ist. Dabei ist die Bildung von Disulfidbrücken der cpt-Derivate mit dem Kanalprotein in Betracht zu ziehen. Deren Ausbildung sollte zwischen den schwefelhaltigen Aminosäuren (Cystein, Methionin) und der Chlorophenylthio-Gruppe erfolgen. Die in Abb. 3-17 aufgeführte Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen ENaCs offenbart bezüglich der Cysteine und Methionine eine hohe Übereinstimmung. Interessanterweise liegen alle nicht Organismenübergreifend konservierten Cysteine in den drei verschiedenen ENaC-Untereinheiten an vier Positionen des C-Terminus vor. Es handelt sich dabei um die Cysteine, welche im intrazellulären C-Terminus an den Positionen 639, 650, 682 und 696 des Meerschweinchen-ENaCs vorkommen. Einzig bei der α -Untereinheit dieses ENaCs sind an diesen vier Positionen Cysteine, bei der α -Untereinheit des humanen ENaC lediglich an den Positionen 650 und 696 (Position in bezug auf die Meerschweinchensequenz) und bei der α -Untereinheit aus *Xenopus* fehlt diese schwefelhaltige Aminosäure an den erläuterten Stellen gänzlich. Die Wirkung von cpt-Nucleosidmonophosphaten erscheint in der gleichen Weise abgestuft. Während der Strom durch xENaC infolge der cpt-Derivate nicht beeinflusst wird, stimulieren diese den hENaC getragenen Strom um das 2-3fache und den Natriumstrom durch gplENaC etwa um das 4,5fache. Geht man demnach von der Bildung von Disulfidbrücken aus, verändern diese die Tertiärstruktur des Kanalproteins umso stärker, je häufiger diese Wechselwirkungen möglich sind und hängen daher von der Anzahl der Cysteinreste ab. Die vorstellbaren Folgen der Strukturveränderung umfassen sowohl eine Erleichterung der Diffusion des Natriums in die Zelle als auch die fehlenden Bindungsmöglichkeiten von regulativen Proteinen

wie Nedd4. Diese erfolgt wie bereits erläutert am intrazellulären C-Terminus des PY-Motivs, welches sich an Position 672-676 und somit in unmittelbarer Nachbarschaft der Cysteinreste befindet. Folglich wäre der Ausbau der ENaCs aus der Oocytenmembran gehemmt, was eine Erhöhung des Amilorid-sensitiven Natriumstroms bedingen würde. Diese Schlussfolgerung widerspricht derjenigen von Chraïbi et al. (2001), die eine Interaktion von cpt cAMP oder einem von cpt cAMP beeinflussten Faktor mit der extrazellulären Domäne befürworten.

Schlussfolgernd bleibt der exakte Weg, welcher zu den speziesabhängigen Einflüssen von cpt und 8-bromo Derivaten auf den ENaC getragenen Natriumstrom führt, zunächst weiterhin im Dunkeln. Es wird allerdings deutlich, dass diese der Membrangängigkeit dienenden Substituenten keineswegs ohne Auswirkung auf zelluläre Prozesse sind und in der Lage sind cAMP- bzw. cGMP-unabhängige Effekte auszulösen.

5. Zusammenfassung

Die Lunge von *Xenopus laevis* bietet aufgrund der anatomischen Einfachheit exzellente Voraussetzungen zur Charakterisierung transepithelialer Ströme in der Ussing-Kammer. Darüber hinaus bedingt die funktionelle Ähnlichkeit bezüglich der natriumabhängigen Resorptionsleistung von Lungenepithelzellen aus *Xenopus* und ATI- sowie ATII-Zellen der Säugerlunge die Möglichkeit zur Bearbeitung komplexer Fragestellungen von Transportprozessen am einfachen Modell der Froschlunge. Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Beantwortung der Frage, welchen Einfluss Entzündungsmediatoren, die bei Erkrankungen der Lunge freigesetzt werden, auf die Amilorid-sensitive Natriumresorption des Lungenepithels haben.

Es konnte gezeigt werden, dass apikal appliziertes PGE₂ (1 µM) den transepithelialen Strom über das Lungenepithel von *X. laevis* stimuliert. Diese Stimulation ist vollständig durch Amilorid hemmbar, was auf eine PGE₂-induzierte Aktivierung der apikal lokalisierten ENaCs zurückzuführen ist. Der K_i-Wert dieser Stimulation beträgt 32,2 nM.

Forskolin, ein Aktivator der Adenylatzyklase, ist in der Lage einen vergleichbaren Effekt auf I_{SC} und I_{ami} hervorzurufen. Der PKA-Inhibitor RP-cAMP (RP-Isomer des cAMP) unterbindet sowohl die durch PGE₂ als auch die durch Forskolin induzierte Stimulation von I_{SC} und I_{ami}. Diese wird zudem von Bapta/AM, einem membrangängiger Calciumchelator, inhibiert. Aufgrund dessen konnte gezeigt werden, dass PGE₂ den I_{ami} über cAMP-abhängige, aber ebenso über Ca²⁺-abhängige Signaltransduktionsketten stimuliert.

Man kennt vier verschiedene PGE₂-Rezeptoren (EP₁-EP₄). EP₂- und EP₄-Rezeptoren erhöhen die intrazelluläre cAMP-Konzentration, wohingegen EP₁- und EP₃-Rezeptoren die Calciumkonzentration im Cytosol erhöhen. Einen Sonderfall stellen EP₃-Rezeptoren dar, die sowohl über die Modulierung der cAMP-Konzentration als auch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zelluläre Antworten regulieren können. Durch Applikation der Rezeptoragonisten Sulproston (EP_{1/3}), Misoprostol (EP_{2/3}) und PGI₂ (EP₁), wobei erstere I_{SC} und I_{ami} stimulierten, konnte gezeigt werden, dass PGE₂ wahrscheinlich an apikale EP₃-Rezeptoren bindet und somit eine Signalkaskade startet, welche die Steigerung der Natriumaufnahme der *Xenopus*-Lunge verursacht.

In Versuchsansätzen mit NO wurde kein Einfluss auf den I_{SC} der *Xenopus* Lunge nachgewiesen. Im Modell der *Xenopus* Oocyte bewirkten im Gegensatz dazu NO und Peroxynitrit die Verminderung des I_{ami} nur bei solchen ENaCs, deren α -Untereinheiten von der Lunge des Mensch oder Meerschweinchens stammten. Der Effekt wird aber im Gegensatz zu dem für NO typischen Signaltransduktionsweges nicht über cGMP vermittelt.

Darüber hinaus wurde der Einfluss diverser cAMP- und cGMP-Derivate auf den I_{ami} verschiedener in *Xenopus* Oocyten heterolog exprimierter ENaCs untersucht. Dabei zeigten sich unterschiedliche Effekte, welche eine klare Abhängigkeit vom Substituenten der cyclischen Nucleosinmonophosphate widerspiegeln. Während der I_{ami} des xENaC infolge der cpt-Derivate nicht verändert wurde, bewirkten diese bei $g\text{pl}\alpha/r\beta\gamma$ ENaC und hENaC exprimierenden Oocyten eine starke Stimulation des Amilorid-sensitiven Stroms. Anders verhielt es sich bei den 8-bromo substituierten second messengern. Diese stimulierten den I_{ami} in xENaC exprimierenden Oocyten, hatten aber keinen Einfluss auf $g\text{pl}\alpha/r\beta\gamma$ ENaC abhängige Natriumströme. Diese Effekte beruhten allerdings wahrscheinlich nicht auf Phosphorylierungen der ENaCs durch die cAMP-abhängigen Kinasen, sondern auf noch näher zu charakterisierenden direkt am ENaC in der Oocytenmembran oder an assoziierten Proteinen ansetzenden Regulationsmechanismen.

6. Abstract

Xenopus laevis lung epithelium is like the mammalian lung epithelium a sodium absorbing tissue with a high transepithelial resistance. This amphibian epithelium is covered with alveolar surface liquid (ASL) that consists of layers of pericilliary fluid, mucus and surfactant. The ASL is important for physiological functions as gas exchange but also contains various para- and autocrinely released messengers that e.g. mediate inflammatory responses to inhaled irritants. The viscosity of the ASL depends largely on water flow that passively follows transepithelial sodium and chloride-transport. Water absorption is primarily coupled to sodium uptake by the epithelial cells via apically localized amiloride-sensitive sodium-channels (ENaCs) and the basolateral Na^+/K^+ -ATPases.

This study investigated the regulating influence of inflammatory factors on the transcellular ENaC-mediated sodium uptake in native *Xenopus laevis* lung. For the electrophysiological characterization of the *Xenopus* lung transepithelial currents the Ussing-chamber-technique was used.

In *Xenopus laevis* native lung epithelium, apical application of 1 μM PGE_2 , an inflammatory mediator produced either by epithelial cells or alveolar macrophages increased short-circuit current (I_{SC}) about 40 % and the amiloride-sensitive sodium current (I_{ami}) about 60 % whereas e.g. PGI_2 had no effect. Chloride-free conditions only slightly affected the increase in current by PGE_2 indicating that the additional current is carried by Na ions. Forskolin, an activator of adenylate-cyclases, enhanced I_{SC} and I_{ami} to a similar magnitude. This suggests that PGE_2 acts on lung epithelial cells by a cAMP-mediated regulatory mechanism. This hypothesis is supported by the fact that RP-cAMP, an inhibitor of protein kinase A (PKA), suppressed the PGE_2 -induced effect on I_{SC} and I_{ami} . Further, cytosolic free Ca^{2+} -ions seem to be as well involved in mediating the PGE_2 -effect because an intracellular accumulation of the calcium-chelator Bapta/AM prevented the PGE_2 -induced stimulation of the current.

Prostaglandins bind to four different types of G-protein coupled receptors: the EP_1 – EP_4 . Both, the $\text{EP}_{1/3}$ agonist sulprostone and the $\text{EP}_{2/3}$ specific agonist misoprostol increased I_{ami} in a significant way. These findings indicate, that in the *Xenopus* lung epithelium PGE_2 binds to apical EP_3 -receptors and upregulates amiloride-sensitive Na^+ -transport by cAMP and Ca^{2+} -dependent mechanisms.

7. Literaturverzeichnis

Abdalla MA, Maina JN, King AS, King DZ and Henry J. Morphometrics of the avian lung. 1. The domestic fowl (*Gallus gallus* variant domesticus). *Respir Physiol* 47: 267-278, 1982.

Abriel H, Loffing J, Rebhun JF, Pratt JH, Schild L, Horisberger JD, Rotin D and Staub O. Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest* 103: 667-673, 1999.

Adam M, Boie Y, Rushmore TH, Muller G, Bastien L, McKee KT, Metters KM and Abramovitz M. Cloning and expression of three isoforms of the human EP3 prostanoid receptor. *FEBS Lett* 338: 170-174, 1994.

Advenier C, Naline E, Drapeau G and Regoli D. Relative potencies of neurokinins in guinea pig trachea and human bronchus. *Eur J Pharmacol* 139: 133-137, 1987.

Allaerts W, Ubink R, de Vente J, Tuinhof R, Jenks BG and Roubos EW. Nitric oxide synthase and background adaptation in *Xenopus laevis*. *J Chem Neuroanat* 14: 21-31, 1997.

Anastasi A, Erspamer V and Cei JM. Isolation and amino acid sequence of physalaemin, the main active polypeptide of the skin of *Physalaemus fuscumaculatus*. *Arch Biochem Biophys* 108: 341-348, 1964.

Asboth G, Phaneuf S, Europe-Finner GN, Toth M and Bernal AL. Prostaglandin E₂ activates phospholipase C and elevates intracellular calcium in cultured myometrial cells: involvement of EP1 and EP3 receptor subtypes. *Endocrinology* 137: 2572-2579, 1996.

Asher C, Eren R, Kahn L, Yeger O and Garty H. Expression of the amiloride-blockable Na⁺ channel by RNA from control versus aldosterone-stimulated tissue. *J Biol Chem* 267: 16061-16065, 1992.

Awayda MS, Ismailov II, Berdiev BK, Fuller CM and Benos DJ. Protein kinase regulation of a cloned epithelial Na⁺ channel. *J Gen Physiol* 108: 49-65, 1996.

Bachteeva VT, Fock EM, Lavrova EA, Naboka EV and Parnova RG. Regulation of urea permeability in frog urinary bladder by prostaglandin E(2). *Pflugers Arch* 444: 159-166, 2002.

Baeza-Squiban A, Bonvallot V, Boland S and Marano F. Airborne particles evoke an inflammatory response in human airway epithelium. Activation of transcription factors. *Cell Biol Toxicol* 15: 375-380, 1999.

Banerjee T, Van d, V and Ziboh VA. Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 485-492, 2002.

Barnes PJ and Liew FY. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol Today* 16: 128-130, 1995.

Bastepe M and Ashby B. The long cytoplasmic carboxyl terminus of the prostaglandin E2 receptor EP4 subtype is essential for agonist-induced desensitization. *Mol Pharmacol* 51: 343-349, 1997.

Bauer ML, Beckman JS, Bridges RJ, Fuller CM and Matalon S. Peroxynitrite inhibits sodium uptake in rat colonic membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1104: 87-94, 1992.

Bjerregaard HF and Nielsen R. Prostaglandin E2-stimulated glandular ion and water secretion in isolated frog skin (*Rana esculenta*). *J Membrane Biol* 97: 9-19, 1987.

Blaug S, Hybiske K, Cohn J, Firestone GL, Machen TE and Miller SS. ENaC- and CFTR-dependent ion and fluid transport in mammary epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C633-C648, 2001.

Blikslager AT, Roberts MC and Argenzio RA. Prostaglandin-induced recovery of barrier function in porcine ileum is triggered by chloride secretion. *Am J Physiol Gastrointestinal and Liver Physiol* 276: G28-G36, 1999.

Boorman GA, Schwartz LW and Dungworth DL. Pulmonary effects of prolonged ozone insult in rats. Morphometric evaluation of the central acinus. *Lab Invest* 43: 108-115, 1980.

Boucher RC and Gatzky JT. Characteristics of sodium transport by excised rabbit trachea. *J Appl Physiol* 55: 1877-1883, 1983.

Boucher RC. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflügers Arch* 445: 495-498, 2003.

Breyer MD and Breyer RM. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F12-F23, 2000.

Breyer RM, Emeson RB, Tarng JL, Breyer MD, Davis LS, Abromson RM and Ferrenbach SM. Alternative splicing generates multiple isoforms of a rabbit prostaglandin E2 receptor. *J Biol Chem* 269: 6163-6169, 1994.

Brown MJ, Olver RE, Ramsden CA, Strang LB and Walters DV . Effects of adrenaline and of spontaneous labour on the secretion and absorption of lung liquid in the fetal lamb. *J Physiol* 344: 137-152, 1983.

Bruning G and Mayer B. Localization of nitric oxide synthase in the brain of the frog, *Xenopus laevis*. *Brain Res* 741: 331-343, 1996.

Butterworth MB, Helman SI and Els WJ. cAMP-sensitive endocytic trafficking in A6 epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C752-C762, 2001.

Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD and Rossier BC. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367: 463-467, 1994.

Canessa CM, Merillat AM and Rossier BC. Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 267: C1682-C1690, 1994.

Chapman DL, Carlton DP, Cummings JJ, Poulain FR and Bland RD. Intrapulmonary terbutaline and aminophylline decrease lung liquid in fetal lambs. *Pediatr Res* 29: 357-361, 1991.

Chen XJ, Eaton DC and Jain L. Beta-adrenergic regulation of amiloride-sensitive lung sodium channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L609-L620, 2002.

Chraïbi A, Schnizler M, Clauss W and Horisberger JD. Effects of 8-cpt-cAMP on the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol* 183: 15-23, 2001.

Chu HW, Kraft M, Krause JE, Rex MD and Martin RJ. Substance P and its receptor neurokinin 1 expression in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 106: 713-722, 2000.

Daniels CB, Orgeig S, Wilsen J and Nicholas TE. Pulmonary-type surfactants in the lungs of terrestrial and aquatic amphibians. *Respir Physiol* 95: 249-258, 1994.

Daniels CB and Orgeig S. The comparative biology of pulmonary surfactant: past, present and future. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129: 9-36, 2001.

Daniels CB and Orgeig S. Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing. *News Physiol Sci* 18: 151-157, 2003.

Danto SI, Borok Z, Zhang XL, Lopez MZ, Patel P, Crandall ED and Lubman RL. Mechanisms of EGF-induced stimulation of sodium reabsorption by alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 275: C82-C92, 1998.

De Graaf AR. Investigations into the distribution of blood in the heart and aortic arches of *Xenopus laevis* (Daud.). *J Exp Biol* 34: 143-148, 1957.

Deuchar EM. Regeneration of the tail bud in *Xenopus* embryos. *J Exp Zool* 192: 381-390, 1975.

Dierichs R. Electron microscopic studies of the lung of the frog. II. Topography of the inner surface by scanning and transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res* 160: 399-410, 1975.

Ding JW, Dickie J, O'Brodivich H, Shintani Y, Rafii B, Hackam D, Marunaka Y and Rotstein OD. Inhibition of amiloride-sensitive sodium-channel activity in distal lung epithelial cells by nitric oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274: L378-L387, 1998.

Djelidi S, Fay M, Cluzeaud F, Escoubet B, Eugene E, Capurro C, Bonvalet JP, Farman N and Blot-Chabaud M. Transcriptional regulation of sodium transport by vasopressin in renal cells. *J Biol Chem* 272: 32919-32924, 1997.

Du Pasquier L., Robert J, Courtet M and Musmann R. B-cell development in the amphibian *Xenopus*. *Immunol Rev* 175: 201-213, 2000.

Dumont J. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). *J Morphol* 136: 153-180, 1972.

Duszyk M and Radomski MW. The role of nitric oxide in the regulation of ion channels in airway epithelium: implications for diseases of the lung. *Free Radic Res* 33: 449-459, 2000.

DuVall MD, Zhu S, Fuller CM and Matalon S. Peroxynitrite inhibits amiloride-sensitive Na^+ currents in *Xenopus* oocytes expressing $\alpha\beta\gamma$ -rENaC. *American Journal Physiology - Cell Physiology* 274 (Cell Physiol.43): C1417-C1423, 1998.

Els WJ, Helman SI and Mencio T. Activation of epithelial Na channels by hormonal and autoregulatory mechanisms of action. *J Gen Physiol* 98: 1197-1220, 1991.

Els WJ, Liu X and Helman SI. Differential effects of phorbol ester (PMA) on blocker-sensitive ENaCs of frog skin and A6 epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 275: C120-C129, 1998.

Emilio MG and Shelton G. Gas exchange and its effect on blood gas concentrations in the amphibian, *Xenopus laevis*. *J Exp Biol* 60: 567-579, 1974.

Fels AO, Pawlowski NA, Abraham EL and Cohn ZA. Compartmentalized regulation of macrophage arachidonic acid metabolism. *J Exp Med* 163: 752-757, 1986.

Fels AO and Cohn ZA. The alveolar macrophage. *J Appl Physiol* 60: 353-369, 1986.

Ferreira SH and Vane JR. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. *Nature* 216: 868-873, 1967.

Firsov D, Gautschi I, Merillat AM, Rossier BC and Schild L. The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J* 17: 344-352, 1998.

Fischer H, Van Driessche W and Clauss W. Evidence for apical sodium channels in frog lung epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 256: C764-C771, 1989.

Fischer H and Clauss W. Regulation of Na^+ channels in frog lung epithelium: a target tissue for aldosterone action. *Pflugers Arch* 416: 62-67, 1990.

Fleischhauer JC, Mitchell CH, Peterson-Yantorno K, Coca-Prados M and Civan MM. $\text{PGE}(2)$, $\text{Ca}(2+)$, and cAMP mediate ATP activation of $\text{Cl}(-)$ channels in pigmented ciliary epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1614-C1623, 2001.

Frindt G, Sackin H and Palmer LG. Whole-cell currents in rat cortical collecting tubule: low-Na diet increases amiloride-sensitive conductance. *Am J Physiol Renal Physiol* 258: F562-F567, 1990.

Frindt G, Palmer LG and Windhager EE. Feedback regulation of Na channels in rat CCT. IV. Mediation by activation of protein kinase C. *Am J Physiol Renal Physiol* 270: F371-F376, 1996.

Fronius M, Clauss W and Schnizler M. Stimulation of transepithelial Na⁽⁺⁾ current by extracellular Gd⁽³⁺⁾ in *Xenopus laevis* alveolar epithelium. *J Membr Biol* 195: 43-51, 2003.

Fujino H, Xu W and Regan JW. Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 278: 12151-12156, 2003.

Fulford GR and Blake JR. Muco-ciliary transport in the lung. *J Theor Biol* 121: 381-402, 1986.

Furukawa O, Kawauchi S, Mimaki H and Takeuchi K. Stimulation by nitric oxide of HCO₃⁻ secretion in bullfrog duodenum in vitro--roles of cyclooxygenase-1 and prostaglandins. *Med Sci Monit* 6: 454-459, 2000.

Gaillard D, Hinnrasky J, Coscoy S, Hofman P, Matthay MA, Puchelle E and Barbry P. Early expression of beta- and gamma-subunits of epithelial sodium channel during human airway development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L177-L184, 2000.

Gamse R, Mroz E, Leeman S and Lembeck F. The intestine as source of immunoreactive substance P in plasma of the cat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 305: 17-21, 1978.

Garcia-Anoveros J, Derfler B, Neville-Golden J, Hyman BT and Corey DP. BNaC1 and BNaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1459-1464, 1997.

Gardiner PJ and Collier HO. Specific receptors for prostaglandins in airways. *Prostaglandins* 19: 819-841, 1980.

Garty H and Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 77: 359-396, 1997.

George AL, Jr., Staub O, Geering K, Rossier BC, Kleyman TR and Kraehenbuhl JP. Functional expression of the amiloride-sensitive sodium channel in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7295-7298, 1989.

Good DW and George T. Regulation of HCO₃⁻ absorption by prostaglandin E2 and G proteins in rat medullary thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol* 270: F711-F717, 1996.

Gray PR, Derksen FJ, Broadstone RV, Robinson NE and Peters-Golden M. Decreased airway mucosal prostaglandin E2 production during airway obstruction in an animal model of asthma. *Am Rev Respir Dis* 146: 586-591, 1992.

Guan Y, Zhang Y, Breyer RM, Fowler B, Davis L, Hebert RL and Breyer MD. Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na⁺ absorption by activating the EP1 receptor. *J Clin Invest* 102: 194-201, 1998.

Guo J and Schofield GG. Activation of a PTX-insensitive G protein is involved in histamine-induced recombinant M-channel modulation. *J Physiol* 545: 767-781, 2002.

Guo Y, DuVall MD, Crow JP and Matalon S. Nitric oxide inhibits Na⁺ absorption across cultured type 2 monolayers. *American Journal Physiology - Lung Cell Mol Physiology* 274: L369-L377, 1998.

Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS and Matalon S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 94: 2407-2413, 1994.

Hallman M, Glumoff V and Ramet M. Surfactant in respiratory distress syndrome and lung injury. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129: 287-294, 2001.

Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S and Polak JM. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 342: 1510-1513, 1993.

Hanke, W. and Kloas, W. Kinetic, storage and release of corticosteroids in *Xenopus laevis*. Int.Symposium on amphibian endocrinology . 1996.

Harizi H, Grosset C and Gualde N. Prostaglandin E2 modulates dendritic cell function via EP2 and EP4 receptor subtypes. *J Leukoc Biol* 73: 756-763, 2003.

Harvey KF, Dinudom A, Cook DI and Kumar S. The Nedd4-like protein KIAA0439 is a potential regulator of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 276: 8597-8601, 2001.

Haye-Legrand I., Bourdillat B, Labat C, Cerrina J, Norel X and Brink C. Relaxation of isolated human pulmonary muscle preparations with prostacyclin (PGI₂) and its analogs. *Prostaglandins* 33: 845-854, 1987.

Herman CA, Hamberg M and Granstrom E. Quantitative determination of prostaglandins E1, E2 and E3 in frog tissue. *J Chromatogr* 394: 353-362, 1987.

Herman CA. Prostaglandins in lower vertebrates. *Prog Clin Biol Res* 342: 608-613, 1990.

Hébert RL, Jacobson HR and Breyer MD. Prostaglandin E2 inhibits sodium transport in rabbit cortical collecting duct by increasing intracellular calcium. *J Clin Invest* 87: 1992-1998, 1991.

Hébert RL. Cellular signalling of PGE2 and its selective receptor analogue sulprostone in rabbit cortical collecting duct. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 51: 147-155, 1994.

Hockel GM and Cowley AW, Jr. Prostaglandin E2-induced hypertension in conscious dogs. *Am J Physiol* 237: H449-H454, 1979.

Hu P, Ischiropoulos H, Beckman JS and Matalon S. Peroxynitrite inhibition of oxygen consumption and sodium transport in alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 266: L628-L634, 1994.

Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, Boucher R and Rossier BC. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 12: 325-328, 1996.

Illek B, Fischer H and Clauss W. Aldosterone regulation of basolateral potassium channels in alveolar epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 259: L230-L237, 1990.

Ischiropoulos H, Zhu L and Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 298: 446-451, 1992.

Ishibashi K and Marumo F. Molecular cloning of a DEG/ENaC sodium channel cDNA from human testis. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 589-593, 1998.

Ivanov AI, Scheck AC and Romanovsky AA. Expression of genes controlling transport and catabolism of prostaglandin E2 in lipopolysaccharide fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R698-R706, 2003.

Jacoby DB. Role of the respiratory epithelium in asthma. *Res Immunol* 148: 48-58, 1997.

Jilling T, Haddad IY, Cheng SH and Matalon S. Nitric oxide inhibits heterologous CFTR expression in polarized epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 277: L89-L96, 1999.

Joos GF, Germonpre PR and Pauwels RA. Role of tachykinins in asthma. *Allergy* 55: 321-337, 2000.

Joos GF, De Swert KO and Pauwels RA. Airway inflammation and tachykinins: prospects for the development of tachykinin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 429: 239-250, 2001.

Kamynina E, Tauxe C and Staub O. Distinct characteristics of two human Nedd4 proteins with respect to epithelial Na(+) channel regulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F469-F477, 2001.

Kharitonov SA, Yates D and Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections. *Eur Respir J* 8: 295-297, 1995.

Kim KJ. Active Na⁺ transport across *Xenopus* lung alveolar epithelium. *Respir Physiol* 81: 29-39, 1990.

Knowles M, Murray G, Shallal J, Askin F, Ranga V, Gatzky J and Boucher R. Bioelectric properties and ion flow across excised human bronchi. *J Appl Physiol* 56: 868-877, 1984.

Koivisto A and Nedergaard J. Modulation of calcium-activated non-selective cation channel activity by nitric oxide in rat brown adipose tissue. *J Physiol* 486 (Pt 1): 59-65, 1995.

Kokko KE, Matsumoto PS, Ling BN and Eaton DC. Effects of prostaglandin E2 on amiloride-blockable Na-channels in adistal nephron cell line (A6). *Am J Physiol Cell Physiol* 267: C1414-C1425, 1994.

Konstas AA, Shearwin-Whyatt LM, Fotia AB, Degger B, Riccardi D, Cook DI, Korbmacher C and Kumar S. Regulation of the epithelial sodium channel by N4WBP5A, a novel Nedd4/Nedd4-2-interacting protein. *J Biol Chem* 277: 29406-29416, 2002.

Lane SM, Maender KC, Awender NE and Maron MB. Adrenal epinephrine increases alveolar liquid clearance in a canine model of neurogenic pulmonary edema. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 760-768, 1998.

Lasnier JM, Wangenstein OD, Schmitz LS, Gross CR and Ingbar DH. Terbutaline stimulates alveolar fluid resorption in hyperoxic lung injury. *J Appl Physiol* 81: 1723-1729, 1996.

Light DB, McCann FV, Keller TM and Stanton BA. Amiloride-sensitive cation channel in apical membrane of inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 255: F278-F286, 1988.

Lin HH, Zentner MD, Ho HL, Kim KJ and Ann DK. The gene expression of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel α -subunit is regulated by antagonistic effects between glucocorticoid hormone and ras pathways in salivary epithelial cells. *J Biol Chem* 274: 21544-21554, 1999.

Ling BN, Kokko KE and Eaton DC. Inhibition of apical Na^+ channels in rabbit cortical collecting tubules by basolateral prostaglandin E_2 is modulated by protein kinase C. *J Clin Invest* 90: 1328-1334, 1992.

Lingueglia E, Champigny G, Lazdunski M and Barbry P. Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel. *Nature* 378: 730-733, 1995.

Lingueglia E, Voilley N, Lazdunski M and Barbry P. Molecular biology of the amiloride-sensitive epithelial Na^+ channel. *Exp Physiol* 81: 483-492, 1996.

Liu L, Johnson WA and Welsh MJ. Drosophila DEG/ENaC pickpocket genes are expressed in the tracheal system, where they may be involved in liquid clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2128-2133, 2003.

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P and Darnell J. *Molecular Cell Physiology*. W.H. Freeman and Comp., New York and Basingstoke, 1995.

Loffing J, Pietri L, Aregger F, Bloch-Faure M, Ziegler U, Meneton P, Rossier BC and Kaissling B. Differential subcellular localization of ENaC subunits in mouse kidney in response to high- and low-Na diets. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F252-F258, 2000.

Lundberg JM. Tachykinins, sensory nerves, and asthma--an overview. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 908-914, 1995.

Mano I and Driscoll M. DEG/ENaC channels: a touchy superfamily that watches its salt. *Bioessays* 21: 568-578, 1999.

Mapp CE, Miotto D, Braccioni F, Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Krause JE, Karpitskiy V, Boyd N, Geppetti P and Fabbri LM. The distribution of neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors in human central airways. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 207-215, 2000.

Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 268: 12231-12234, 1993.

Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB and Knepper MA . Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 104: R19-R23, 1999.

Matsumoto PS, Mo L and Wills NK. Osmotic regulation of Na transport across A6 epithelium: Interactions with Prostaglandin E2 and cyclic AMP. *J Membrane Biol* 160: 27-38, 1997.

Matthay MA and Wiener-Kronish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis* 142: 1250-1257, 1990.

Matthay MA, Fukuda N, Frank J, Kallet R, Daniel B and Sakuma T. Alveolar epithelial barrier. Role in lung fluid balance in clinical lung injury. *Clin Chest Med* 21: 477-490, 2000.

Meban C. The mucosubstance coating the pneumonocytes in the lungs of *Xenopus laevis* and *Lacerta viridis*. *Histochem J* 7: 57-65, 1975.

Meijer L, Maclouf J and Bryant RW. Contrasting effects of fatty acids on oocyte maturation in several starfish species. *Prostaglandins Leukot Med* 23: 179-184, 1986.

Mick VE, Itani OA, Loftus RW, Husted RF, Schmidt TJ and Thomas CP. The alpha-subunit of the epithelial sodium channel is an aldosterone-induced transcript in mammalian collecting ducts, and this transcriptional response is mediated via distinct cis-elements in the 5'-flanking region of the gene. *Mol Endocrinol* 15: 575-588, 2001.

Miller LD, Wert SE and Whitsett JA. Surfactant proteins and cell markers in the respiratory epithelium of the amphibian, *Ambystoma mexicanum*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129: 141-149, 2001.

Moncada S, Palmer RMJ and Higgs EA. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43 No.2: 109-134, 1991.

Montuschi P and Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109: 615-620, 2002.

Nataraj C, Thomas DW, Tilley SL, Nguyen MT, Mannon R, Koller BH and Coffman TM. Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest* 108: 1229-1235, 2001.

Negishi M, Sugimoto Y and Ichikawa A. Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. *Biochim Biophys Acta* 1259: 109-119, 1995.

Nicod M, Michlig S, Flahaut M, Salinas M, Fowler JN, Horisberger JD, Rossier BC and Firsov D. A novel vasopressin-induced transcript promotes MAP kinase activation and ENaC downregulation. *EMBO J* 21: 5109-5117, 2002.

Nielsen MS and Nielsen R. Effect of carbachol and prostaglandin E2 on chloride secretion and signal transduction in the exocrine glands of frog skin (*Rana esculenta*). *Pflugers Arch* 438: 732-740, 1999.

Nishigaki N, Negishi M and Ichikawa A. Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Mol Pharmacol* 50: 1031-1037, 1996.

Nishikawa A, Murata E, Akita M, Kaneko K, Moriya O, Tomita M and Hayashi H. Roles of macrophages in programmed cell death and remodeling of tail and body muscle of *Xenopus laevis* during metamorphosis. *Histochem Cell Biol* 109: 11-17, 1998.

O'Brodvich H, Hannam V, Seear M and Mullen JB. Amiloride impairs lung water clearance in newborn guinea pigs. *J Appl Physiol* 68: 1758-1762, 1990.

O'Grady SM and Lee SY. Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L689-L700, 2003.

Orehek J, Douglas JS, Lewis AJ and Bouhuys A. Prostaglandin regulation of airway smooth muscle tone. *Nat New Biol* 245: 84-85, 1973.

Orgeig S and Daniels CB. The roles of cholesterol in pulmonary surfactant: insights from comparative and evolutionary studies. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129: 75-89, 2001.

Palmer LG, Li JH, Lindemann B and Edelman IS. Aldosterone control of the density of sodium channels in the toad urinary bladder. *J Membr Biol* 64: 91-102, 1982.

Perez-Arellano JL, Alcazar-Montero MC and Jimenez-Lopez A. Alveolar macrophage: origin, kinetics and relationship with cells of the alveolo-interstitial region. *Allergol Immunopathol (Madr)* 18: 175-183, 1990.

Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev* 35: 85-141, 1983.

Peskar BM. Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defence. *J Physiol Paris* 95: 3-9, 2001.

Pfeiffer S, Gorren AC, Schmidt K, Werner ER, Hansert B, Bohle DS and Mayer B. Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *J Biol Chem* 272: 3465-3470, 1997.

Pisarello JB, Flores D and Jackson RM. Effects of hypoxia and hyperoxia on lung prostaglandin E1 metabolism. *Am J Med Sci* 313: 147-152, 1997.

Pitkanen OM and O'Brodivich HM. Significance of ion transport during lung development and in respiratory disease of the newborn. *Ann Med* 30: 134-142, 1998.

Pittet JF, Wiener-Kronish JP, McElroy MC, Folkesson HG and Matthay MA. Stimulation of lung epithelial liquid clearance by endogenous release of catecholamines in septic shock in anesthetized rats. *J Clin Invest* 94: 663-671, 1994.

Pittet JF, Brenner TJ, Modelska K and Matthay MA. Alveolar liquid clearance is increased by endogenous catecholamines in hemorrhagic shock in rats. *J Appl Physiol* 81: 830-837, 1996.

Pohunková H. Histochemical study of the respiratory organs of amphibians and reptiles. *Folia Morphol (Praha)* 23: 109-115, 1975.

Pohunková H and Hughes GM. Structure of the lung of the clawed toad (*Xenopus laevis* Daudin). *Folia Morphol (Praha)* 33: 385-390, 1985.

Price MP, Snyder PM and Welsh MJ. Cloning and expression of a novel human brain Na⁺ channel. *J Biol Chem* 271: 7879-7882, 1996.

Rebhun JF and Pratt JH. Molecular cloning of Nedd4 from *Xenopus laevis*. *DNA Seq* 9: 295-306, 1998.

Rich AM, Weissmann G, Anderson C, Vosshall L, Haines KA, Humphreys T and Dunham P. Calcium dependent aggregation of marine sponge cells is provoked by leukotriene B4 and inhibited by inhibitors of arachidonic acid oxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 121: 863-870, 1984.

Rose F, Zwick K, Ghofrani HA, Sibelius U, Seeger W, Walmrath D and Grimminger F. Prostacyclin enhances stretch-induced surfactant secretion in alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 846-851, 1999.

Rotin D. Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by accessory proteins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9: 529-534, 2000.

Rubin BK. Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care* 47: 761-768, 2002.

Rubtsov AM and Lopina OD. Ankyrins. *FEBS Lett* 482: 1-5, 2000.

Rytved KA, Brodin B and Nielsen R. Prostaglandin E2 release from dermis regulates sodium permeability of frog skin epithelium. *Acta Physiol Scand* 153: 263-270, 1995.

Saintsing DG and Dietz TH. Modification of sodium transport in freshwater mussels by prostaglandins, cyclic AMP and 5-hydroxytryptamine: effects of inhibitors of prostaglandin synthesis. *Comp Biochem Physiol C* 76: 285-290, 1983.

Sariban-Sohraby S and Benos DJ. The amiloride-sensitive sodium channel. *Am J Physiol* 250: C175-C190, 1986.

Satoh T and Endou H. Inhibitory effect of phorbol ester on sodium transport in frog urinary bladder. *Am J Physiol Renal Physiol* 259: F425-F431, 1990.

Schnizler M, Mastroberardino L, Reifarth F, Weber WM, Verrey F and Clauss W. cAMP sensitivity conferred to the epithelial Na⁺ channel by alpha-subunit cloned from guinea-pig colon. *Pflügers Arch* 439: 579-587, 2000.

Schuster VL. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. *Annu Rev Physiol* 60: 221-242, 1998.

Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S and ERSPAMER V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev* 54: 285-322, 2002.

Shareghi GR and Stoner LC. Calcium transport across segments of the rabbit distal nephron in vitro. *Am J Physiol* 235: F367-F375, 1978.

Shen SC, Lee WR, Lin HY, Huang HC, Ko CH, Yang LL and Chen YC. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E(2) production. *Eur J Pharmacol* 446: 187-194, 2002.

Shepard JL and Zon LI. Developmental derivation of embryonic and adult macrophages. *Curr Opin Hematol* 7: 3-8, 2000.

Shi H, Asher C, Chigaev A, Yung Y, Reuveny E, Seger R and Garty H. Interactions of beta and gamma ENaC with Nedd4 can be facilitated by an ERK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 277: 13539-13547, 2002.

Shimkets RA, Lifton R and Canessa CM. In vivo phosphorylation of the epithelial sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3301-3305, 1998.

Simon C, Portalier P, Chamoin MC and Ternaux JP. Substance P like-immunoreactivity release from enterochromaffin cells of rat caecum mucosa. Inhibition by serotonin and calcium-free medium. *Neurochem Int* 20: 529-536, 1992.

Smith WL. *Biochemistry of Arachidonic Acid Metabolism (Prostaglandins, Leukotrienes, and Cancer)*. Boston: Martinus Nijhoff, 1985.

Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 259: 315-324, 1989.

Stamler JS and Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 81: 209-237, 2001.

Stanley-Samuelson D, Jurenka RA, Blomquist GJ and Loher W. De novo biosynthesis of prostaglandins by the Australian field cricket, *Teleogryllus commodus*. *Comp Biochem Physiol C* 85: 303-307, 1986.

Stanley-Samuelson DW and Loher W. Evolutionary aspects of prostaglandins and other eicosanoids in invertebrates. *Prog Clin Biol Res* 342: 614-619, 1990.

Staub O, Abriel H, Plant P, Ishikawa T, Kanelis V, Saleki R, Horisberger JD, Schild L and Rotin D. Regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 and ubiquitination. *Kidney Int* 57: 809-815, 2000.

Stockand JD, Bao HF, Schenck J, Malik B, Middleton P, Schlanger LE and Eaton DC. Differential effects of protein kinase C on the levels of epithelial Na⁺ channel subunit proteins. *J Biol Chem* 275: 25760-25765, 2000.

Stoos BA, Garcia NH and Garvin JL. Nitric oxide inhibits sodium reabsorption in the isolated perfused cortical collecting duct. *J Am Soc Nephrol* 6: 89-94, 1995.

Storch V and Welsch U. *Kükenhals Leitfaden für das Zoologische Praktikum.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und Jena, 1993.

Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC and Boucher RC. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269: 847-850, 1995.

Tabata H, Tanaka S, Sugimoto Y, Kanki H, Kaneko S and Ichikawa A. Possible coupling of prostaglandin E receptor EP(1) to TRP5 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 398-402, 2002.

Tchepichev S, Ueda J, Canessa C, Rossier B and O'Brodvich H. Lung epithelial Na channel subunits are differentially regulated during development and by steroids. *American Journal Physiology - Cell Physiology* 269: C805-C812, 1995.

Tilley SL, Hartney JM, Erikson CJ, Jania C, Nguyen M, Stock J, McNeisch J, Valancius C, Panettieri RAJ, Penn RB and Koller BH. Receptors and pathways mediating the effects of prostaglandin E2 on airway tone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L599-L606, 2003.

Tsuboi K, Sugimoto Y and Ichikawa A. Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 535-556, 2002.

Vallet V, Pfister C, Loffing J and Rossier BC. Cell-surface expression of the channel activating protease xCAP-1 is required for activation of ENaC in the *Xenopus* oocyte. *J Am Soc Nephrol* 13: 588-594, 2002.

Vehaskari VM, Hempe JM, Manning J, Aviles DH and Carmichael MC. Developmental regulation of ENaC subunit mRNA levels in rat kidney. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274: C1661-C1666, 1998.

Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Voilley N and Lazdunski M. Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na⁺ channel. *J Biol Chem* 270: 27411-27414, 1995.

Waldmann R, Champigny G, Lingueglia E, De Weille JR, Heurteaux C and Lazdunski M. H(+)-gated cation channels. *Ann N Y Acad Sci* 868: 67-76, 1999.

Walters DV, Ramsden CA and Olver RE. Dibutyl cAMP induces a gestation-dependent absorption of fetal lung liquid. *J Appl Physiol* 68: 2054-2059, 1990.

Walters EH, O'Byrne PM, Fabbri LM, Graf PD, Holtzman MJ and Nadel JA. Control of neurotransmission by prostaglandins in canine trachealis smooth muscle. *J Appl Physiol* 57: 129-134, 1984.

Wang HC, Zentner MD, Deng HT, Kim KJ, Wu R, Yang PC and Ann DK. Oxidative stress disrupts glucocorticoid hormone-dependent transcription of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha-subunit in lung epithelial cells through ERK-dependent and thioredoxin-sensitive pathways. *J Biol Chem* 275: 8600-8609, 2000.

Watanabe S, Matsushita K, McCray PB, Jr. and Stokes JB. Developmental expression of the epithelial Na⁺ channel in kidney and uroepithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* 276: F304-F314, 1999.

Watkins DN, Garlepp MJ and Thompson PJ. Regulation of the inducible cyclo-oxygenase pathway in human cultured airway epithelial (A549) cells by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 121: 1482-1488, 1997.

Watlington CO, Perkins FM, Munson PJ and Handler JS. Aldosterone and corticosterone binding and effects on Na⁺ transport in cultured kidney cells. *Am J Physiol* 242: F610-F619, 1982.

Weber WM, Liebold KM and Clauss W. Amiloride-sensitive Na⁺ conductance in native *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1239: 201-206, 1995.

Wegmann M and Nusing RM. Prostaglandin E₂ stimulates sodium reabsorption in MDCK C7 cells, a renal collecting duct principal cell model. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69: 315-322, 2003.

Weinheimer AJ and Spraggins RL. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA₂ and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla* chemistry of coelenterates. XV. *Tetrahedron Lett* 59: 5185-5188, 1969.

Werner R, Miller T, Azarnia R and Dahl G. Translation and functional expression of cell-cell channel mRNA in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol* 87: 253-268, 1985.

Widdicombe JH. Regulation of the depth and composition of airway surface liquid. *J Anat* 201: 313-318, 2002.

Wiesmann W, Sinha S and Klahr S. Effects of ionophore A23187 on base-line and vasopressin-stimulated sodium transport in the toad bladder. *J Clin Invest* 59: 418-425, 1977.

Will PC, Cortright RN, Groseclose RG and Hopfer U. Amiloride-sensitive salt and fluid absorption in small intestine of sodium-depleted rats. *Am J Physiol Gastrointestinal and Liver Physiol* 248: G133-G141, 1985.

Yang X, Sheares KK, Davie N, Upton PD, Taylor GW, Horsley J, Wharton J and Morrell NW. Hypoxic induction of cox-2 regulates proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 688-696, 2002.

Zsengeller ZK, Ross GF, Trapnell BC, Szabo C and Whitsett JA. Adenovirus infection increases iNOS and peroxynitrite production in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L503-L511, 2001.

8.1 Zusammenstellung von Abkürzungen, Geräten und Zubehör

Tab. 8- 1: Verwendete Abkürzungen

a. Abkürzung von Einheiten und deren Präfixen

cm	Zentimeter
°C	Grad Celsius
g	Gramm
l	Liter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mV	Millivolt
min	Minuten
MΩ	Megaohm
M	Mol
μm	Micrometer
μM	Micromol
ng	Nanogramm
pS	Picosiemens
U/ml	Aktivitätseinheiten pro Milliliter

b. Spezielle Abkürzungen für electrophysiologische Sachverhalte

I_{ami}	Amilorid-sensitiver Strom
I_m	Transmembranärer Strom
I_{Na}	Gesamt-Natriumstrom
I_{SC}	Kurzschlussstrom
I/U-Kurve	Strom/Spannungs-Kurve
K_M -Wert	Halbmaximale Substratkonzentration
R_T	Transmembranärer Widerstand

c. Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AD/DA-Wandler	Analog-Digital/Digital-Analog Wandler
ASL	Alveolar surface liquid
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
AT I-Zelle	Alveolar Typ I Zelle
AT II-Zelle	Alveolar Typ II Zelle
ATP	Adenosintri-phosphat
Bapta/AM	1,2-bis (2-Aminophenoxy)-Ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure; Membrangängiger Calciumchelator
BNC	Amilorid-sensitiver Natriumkanal im Gehirn
bzw.	Beziehungsweise
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre Calciumkonzentration
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat

CAP	Kanal-aktivierende Protease (channel activating protease)
CFTR	Cystische Fibrose Transmembran Regulator
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
cpt	Chloro-Phenyl-Thio
cRNA	Codierende RNA, welche Poly A-Schwanz und Trimethyl G-Cap besitzt
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEP-H ₂ O	mit Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
eNOS	Epitheliale Stickstoffmonoxidsynthase
EP	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor
g	Erdbeschleunigung
G _i	Inhibitorisches G-Protein der Adenylatcyclase
G _o	Mit Proteinkinase C gekoppeltes stimulatorisches G-Protein
G _s	Stimulierendes G-Protein der Adenylatcyclase
gplα	α-Untereinheit des ENaCs aus der Meerschweinchen-Lunge
gpca	α-Untereinheit des ENaCs aus dem Meerschweinchen-Colon
GRE	Glucocorticoid sensitives Element auf DNA-Ebene
hlα	α-Untereinheit des ENaCs aus der humanen Lunge
hlβ	β-Untereinheit des ENaCs aus der humanen Lunge
hlγ	γ-Untereinheit des ENaCs aus der humanen Lunge
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
Kap.	Kapitel
KIAA 0439	ENaC-bindendes Protein
KiR 1.1	Kaliumkanal, der Einstrom der Kaliumionen in die Zelle ermöglicht
KuORI	Kultur-Oocytenringer
LB-Medium	Nährmedium zur Anzucht von Bakterienkulturen
LPS	Lipopolysaccharide
MDCK-Zellen	Madin-Darby Nierenzellen
MHC II	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
mRNA	messenger RNA
MS-222	Tricain, Amphibien-Narkotikum
N	Anzahl der Versuche
N	Anzahl der Tiere
Nedd4	Protein zur Ubiquitinierung des ENaC
NK	Tachykinin-Rezeptor
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NRS	Normale Ringerlösung
ORi	Oocytenringer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ / Iloprost
PGT	Prostaglandintransporter
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PY-Motiv	Aminosäureabschnitt eines Proteins mit einer charakteristischen Abfolge von Prolin (P) und Tyrosin (Y)
rα	α-Untereinheit des ENaCs aus dem Rattencolon
rβ	β-Untereinheit des ENaCs aus dem Rattencolon
rγ	γ-Untereinheit des ENaCs aus dem Rattencolon
RNA	Ribonukleinsäure
RP-cAMP	RP-Isomer des cyclischen Adenosinmonophosphats
rpm	Umdrehungen pro Minute
Sin-1	3-Morpholino-Sydnonimine
SNP	Natrium-Nitroprussid
t=0	Startpunkt des Experiments zum Zeitpunkt des Klemmens des Potentials
Tab.	Tabelle
TMA-Cl	Tetramethylammoniumchlorid
u.a.	unter anderem
WW-Domäne	Aminosäuresequenz eines Proteins mit häufigen Tryptophanresten (W)
xα	α-Untereinheit des ENaCs aus A6-Nierenzellen von <i>Xenopus laevis</i>
xβ	β-Untereinheit des ENaCs aus A6-Nierenzellen von <i>Xenopus laevis</i>
xγ	γ-Untereinheit des ENaCs aus A6-Nierenzellen von <i>Xenopus laevis</i>
z.B.	zum Beispiel

Tab. 8- 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
ACTH	Sigma
Agarose (DNA grade)	BioRad
Amilorid	Sigma
Ampicillin	Stratagene
Bapta/AM	Sigma
Bacto-Hefeextrakt	Gibco BRL
Bacto/Trypton	Gibco BRL
Bromphenolblau	Fluka
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma
Calciumchlorid (CaCl_2)	Fluka
Calciumsulfat (CaSO_4)	Fluka
cAMP 8-bromo	Sigma
cAMP cpt	Sigma
cAMP RP-Isomer	Sigma
Chloroform	Roth
Collagenase	Serva
DetaNONOate	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEP)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylediamintetraessigsäure (EDTA)	Serva
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
Glucose	Fluka
Glycerin	Roth
cGMP 8-bromo	Sigma
cGMP cpt	Sigma
Histoacrylkleber	B.Braun Aesculap AG
Isoamylalkohol	Roth

3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma
HEPES	Fluka
Kaliumacetat	Fluka
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Fluka
Kaliumsulfat (K ₂ SO ₄)	Fluka
LPS	Sigma
Mannitol	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Fluka
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Fluka
Manganchlorid (MnCl)	Fluka
Mannitol	Sigma
N-Methyl-D-Glucamin (NMDG)	Fluka
Mineralöl	Sigma
3-[N-Morpholino]-Propansulfatsäure (MOPS)	Sigma
3-Morpholino-Sydnonimine (Sin-1)	Sigma
Natriumazid	Merck
Natriumaurylsulfat (SDS)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumnitroprussid (SNP)	Sigma
Natrium-Pyruvat	Fluka
Natriumsulfat (NaSO ₄)	Fluka
NOC-18	Calbiochem
Penicillin G	Sigma
Peroxyinitrit	Sigma
Phenol	Merck
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma
Salzsäure (HCl)	Fluka
Streptomycinsulfat	Sigma
Tetramethylammoniumchlorid (TMA-Cl)	Fluka
Tricaine (MS 222)	Sigma
Tris-HCl	Serva
Triton® X-100	Sigma

Tab. 8- 3: Enzyme für molekularbiologische Untersuchungen

Afl III (Restriktionsenzym)	New England Biolabs
Bgl II (Restriktionsenzym)	Stratagene
Eco RI (Restriktionsenzym)	New England Biolabs
Not I (Restriktionsenzym)	New England Biolabs
SP 6 RNA-Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Stratagene
Pvu II (Restriktionsenzym)	Stratagene
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
T7-RNA-Polymerase	Stratagene
Xba I (Restriktionsenzym)	Gibco BRL

Tab. 8- 4: Geräte für molekularbiologische Versuche

Zentrifuge Modell J218	Beckman
Tischzenrifuge Biofuge 13	Hereaus Sepatech
Spannungsgeber Modell 1000/500	BioRad
Wasserbad Thermomix	B. Braun
Schüttelwasserbad	GFL
Schüttler Certomat U	B. Braun
Inkubator Certomat HK	B Braun
IKA-Vortex MTS 4	Janke und Kunkel
Thermomix UB	B. Braun
Photometer	Pharmacia Gene Quant
pH-Meter	Knick
Heizrührer	Janke und Kunkel IKAMAG RCT
Feinwaage P 163	Mettler
UV-Kontaktlampe Modell 42	Chroma
Kamera-System	Polaroid MP 4 ⁺
Film	Polaroid 667
Autoklav DS 202	WEBECO

Tab. 8- 5: Vektoren

pBluescript II SK+	Stratagene
pcDNA 3.1	Invitrogen
pSD5	B. Rossier, Lausanne
pSDEasy	B. Rossier, Lausanne
pSport1	Gibco BRL

Tab. 8- 6: Geräte für elektrophysiologische Untersuchungen

AD/DA-Wandler CED 1401	Cambridge Electronic Design Ltd.
Digitalvoltmeter M3610D	Conrad, Hirschau
Injektionskapillaren-Puller PA-81	Bachofer, Reutlingen
Klemmverstärker OocyteClamp OC 725B	Warner Instruments Corp., Hamden, USA
Laser-Elektrodenpuller Sutter P-2000	Science Products Trading GmbH, Frankfurt/Main
Low-Pass Filter LPF 202	Warner Instruments Corp., Hamden, USA
Mikroinjektionspumpe Nanoject Variable	Drummond Scientific Co, Broomall, USA
Mikromanipulatoren	Bachofer, Reutlingen
Oocyten-Brutschrank ICE 400	Memmert, Schwabach
Oszilloskop HM 205-3	Hameg, Frankfurt/Main
PC 486 SX/3	
Pumpe	KNF, Freiburg
Schreiber Kipp und Zonen BD 112	Bachofer, Reutlingen

8.2 Versicherung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, die Untersuchungen durchgeführt und keine weiteren als die hier angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Alle Zitate und übernommenen Inhalte, Sachverhalte und Darstellungen sind durch Quellenangaben entsprechend gekennzeichnet.

Fernwald, März 2004

(Andreas Berk)

8.3 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt

- Herrn Prof. Dr. Clauss für die Überlassung des Themas, Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die lehrreichen Erfahrungen unter seiner Führung,

- Herrn Prof. Dr. Diener für die Unterstützung bei der Erstellung der Dissertation und die hilfreiche Diskussionsbereitschaft,

- Herrn Prof. Dr. Grimminger und dessen Arbeitsgruppe für deren Hilfe und das zur Verfügung gestellte PGI₂,

- Herrn Dr. Mikael Schnizler für die fachliche Unterstützung und sein großes freundschaftliches Engagement bei der Lösung von Problemen jedweder Natur,

- Herrn Dr. Martin Fronius für die tolle Zusammenarbeit, die hervorragende und den Alltag erleichternde Arbeitsatmosphäre sowie dessen Beistand mit Rat(d) und Tat,

- allen Mitarbeitern des Instituts für Tierphysiologie, die auf unterschiedliche Weise zum „Projekt Dissertation“ beitrugen,

- Frauke Niehues für ihre immerwährende moralische sowie inhaltliche Hilfe, ihre Geduld mit mir und ihre Liebe,

- Maïke und Lasse Niehues, die mir jeden Tag zeigen, die Wunder des Lebens neu zu entdecken und deren Lachen auch die größten Sorgen im Handumdrehen wegfegt,

- Kirsten Grashoff und Stefan Heussner für die engagierte Hilfe bei der textlichen Ausarbeitung der Arbeit und die darüber hinaus gehende freundschaftliche Unterstützung während der gesamten Promotionszeit,

- Detlef Faber, Yann LeMarec und Lars Nissen, die mein biologisches und menschliches Wissensspektrum enorm erweitert haben und die zu jeder Tages- und Nachtstunde ein offenes Ohr hatten,

- allen weiteren nicht namentlich genannten Freunden, die mir in unterschiedlicher Art und Weise durch schöne gemeinsame Freizeitaktivitäten halfen, zumindest einen Fuß außerhalb des Elfenbeinturms zu belassen,
- meiner Schwester Ingrid Berk und deren Familie für ihre moralische Unterstützung und das Vertrauen in den „Studentekopp“,
- in besonderer Weise meinen Eltern, die stets voll hinter mir standen, mir in jeder nur erdenklichen Situation geholfen haben und niemals kontraproduktiven Druck ausübten, sondern auf meine mehr oder minder ausgeprägten Fähigkeiten vertrauten.