Universität Ulm

Institut für Allgemeine Physiologie

Direktor: Prof. Dr. P. Dietl

Effekt einer apikalen Volumenexpansion auf den Wassertransport in Atemwegsepithelien

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät Universität Ulm

Hanna Schmidt

Crailsheim

2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Dietl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. P. Radermacher

Tag der Promotion: 08.02.2018

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikation eingegangen:

Schmidt H, Michel C, Braubach P, Fauler M, Neubauer D, Thompson KE, Frick M, Mizaikoff B, Dietl P, Wittekindt OH. “Water permeability adjusts resorption in lung epithelia to increased apical surface liquid volumes.” *Am J Respir Cell Mol Biol. 56:372-382 (2017)*
DOI: 10.1165/rcmb.2016-0161OC

Reprinted with permission of the American Thoracic Society. Copyright (c) 2018 American Thoracic Society.
The American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology is an official journal of the American Thoracic Society.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis IV

Abkürzungsverzeichnis VI

1. Einleitung 1

1.1. Das Atemwegsepithel 1

1.2. Bedeutung der Volumenhomöostase des Atemwegepithels 3

1.3. Mechanismen der Volumenresorption am Atemwegsepithel 5

1.3.2. Struktur und Funktion des parazellulären Transportweges 6

1.3.3. Rolle von Aquaporinen für die Volumenresorption 7

1.4. Ziele der Arbeit 9

2. Material und Methoden 10

2.1. Materialien 10

2.1.1. Chemikalien 10

2.1.2. Lösungen und Medien 12

2.1.3. Kits 13

2.1.4. Antikörper 14

2.1.5. Primer 14

2.1.6. Zellen und Vektoren 15

2.1.7. Geräte 16

2.1.8. Verbrauchsmaterialien 17

2.1.9. Software 17

2.2. Zellkultur 18

2.3. Funktionelle Methoden 20

2.4. Molekularbiologische Methoden 26

2.5. Immunzytochemie 29
2.6. Statistische Analyse 30
3. Ergebnisse 31
3.1. Volumenresorption nach apikaler Volumenexpansion (AVE) 31
3.2. Modulation des aktiven Natriumtransportes infolge einer AVE 38
3.3. Einfluss der AVE auf den parazellulären Transport 42
3.4. Modulation der epithelialen Wasserpermeabilität nach AVE 48
3.5. Knockdown von Aquaporin 3 führt zu einer Verzögerung des HRS 57
4. Diskussion 60
4.1. Methodische Ansätze zur Messung der Volumenresorption 60
4.2. ENaC abhängige Mechanismen der Volumenresorption 62
4.3. Modulation von parazellulären Parametern 64
4.4. Die Wasserpermeabilität als flusslimitierender Faktor 66
4.5. Modell für die Volumenresorption in LRS und HRS 69
5. Zusammenfassung 72
6. Literaturverzeichnis 74
Danksagung 87
Lebenslauf 88

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretisches Hormon
ALI	Air-Liquid-Interface
AQP	Aquaporin
ARDS	acute respiratory distress syndrome = akutes Atemnotsyndrom
ASL	apical surface liquid = apikale Oberflächenflüssigkeit
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATR	total attentuated reflection = abgeschwächte Totalreflexion
AVE	apikale Volumenexpansion
BPE	bovine pituitary extract = Rinderhypophysenextrakt
BSS	balanced salt solution = balancierte Salzlösung
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid = komplementäre Deoxyribonukleinsäure
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator = Regulator der Transmembranleitfähigkeit bei Zystischer Fibrose
CLDN	Claudin
COPD	chronic obstructive pulmonary disease = chronisch obstruktive Lungenkrankheit
csFBS	charcoal stripped fetal bovine serum = Holzkohle gereinigtes fetales Kälberserum
CCSP	Clara cell secretory protein = sekretorisches Protein der Clarazellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Deoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor = epidermaler Wachstumsfaktor
ENaC	epithelial Na^+-channel = Epithelialer Natriumkanal
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FT-IR	Fouriertransformationsinfrarotspektroskopie
H441	NCI-H441
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HMBS	Hydroxymethylbilansynthase
HRS	high resorptive state = Phase hoher Resorptionsrate

hs	human species = human
hTEpC	human tracheal epithelial cells = humane Trachealepithelzellen
I_{SC}	short circuit current = Kurzschlussstrom
IgG	Immunglobulin G
ITS	Insulin/Transferrin/Selen
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LE	low electroendosmosis = niedrige Elektroendsomose
lis	lateraler interzellulärer Spalt
LRS	low resorptive state = Phase niedrieger Resorptionsrate
MCT	mercury-cadmium-telluride = Quecksilber-Cadmium-Tellurid
mRNA	messenger ribonucleic acid = Boten-Ribonukleinsäure
P_{app}	apparenter Permeabilitätskoeffizient
PBS	phosphate buffered saline = Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RT-PCR	real time polymerase chain reaction = Echzeitpolymerasekettenreaktion
rpm	revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
SDS	sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
shRNA	short hairpin ribonucleic acid = kleine Haarnadel-Ribonukleinsäure
TEER	transepithelial electrical resistance = transepithelialer elektrischer Widerstand
TrypLE:	trypsin like enzyme = Trypsin ähnliches Enzym
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

1.1. Das Atemwegsepithel

Das respiratorische System wird in obere und untere Atemwege eingeteilt. Zu den oberen Atemwegen zählen das Cavum nasi, die Sinus paranasales sowie der Pharynx (Sahin-Yilmaz und Naclerio 2011). Die unteren Atemwege bestehen aus Trachea, Bronchien, Bronchiolen und den Alveolen. Hierbei bilden die proximalen Abschnitte des luftleitenden Systems den konduktiven Anteil mit der Funktion der Erwärmung und Anfeuchtung der Atemluft. Die Bronchioli terminales stellen die letzte konduktive Einheit des Bronchialbaums dar. Die folgenden weiter distal gelegenen Atemwege bilden den respiratorischen Abschnitt, der dem Gasaustausch dient.

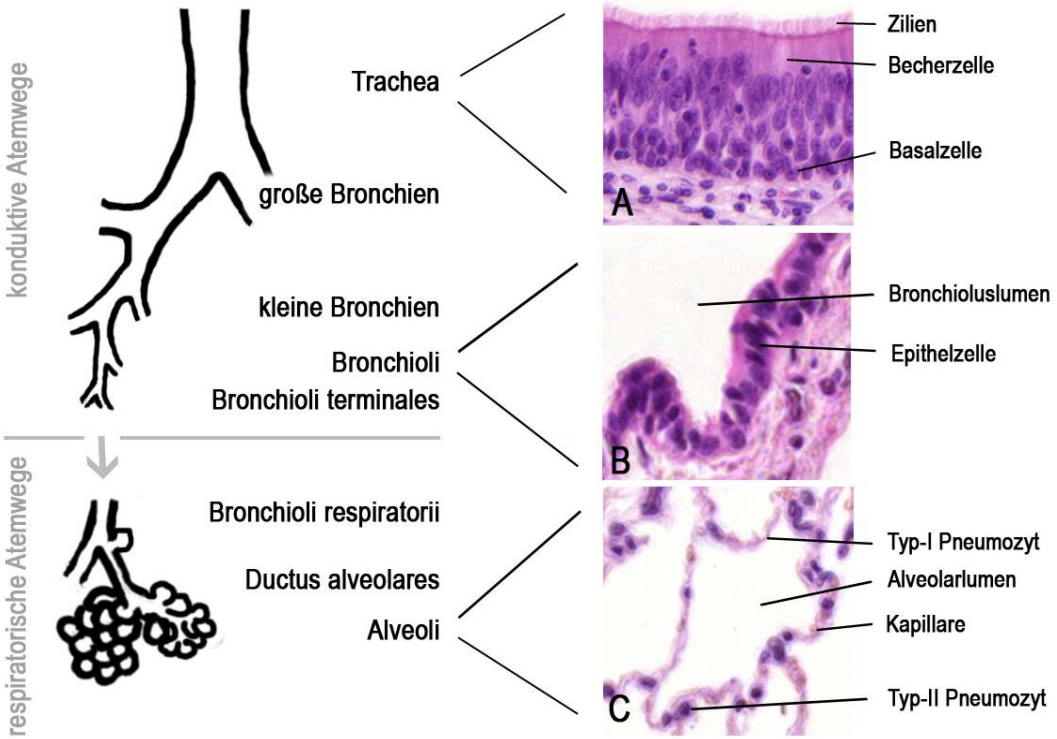

Abbildung 1 Anatomie der unteren Atemwege. Schematischer Aufbau der Atemwege (links) und Histologie der Atemwegsepithelien in H.E.-Färbung (rechts). **A:** Mehrreihiges, hochprismatisches Epithel mit Zilien und Becherzellen in der Trachea. **B:** Einschichtiges, isoprismatisches Epithel im Bronchiolus. **C:** Alveolarepithel mit Typ-1 und Typ-2 Pneumozyten.

Die Abbildungen **A-C** entstammen histologischen Präparaten des Instituts für Molekulare und Zelluläre Anatomie (Universität Ulm) mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Britsch.

Das Atemwegsepithel bildet eine Barriere zwischem dem luftgefüllten Kompartiment der Atemwege und dem flüssigen Interstitialmilieu des Organismus. Die oberen Atemwege sowie die Trachea und die großen Bronchien sind von einem mehrreihigen hochprismatischen Epithel ausgekleidet, das aus Basalzellen, zilierten Zellen, Mukus produzierenden Becherzellen und wenigen Clubzellen (ehemals Clara-Zellen) besteht. Basalzellen stellen die Stammzellen für das Epithel dar. Die zilierten und Mukus produzierenden Zellen sind für die mukoziliäre Clearance notwendig, auf die in Abschnitt 1.2. näher eingegangen wird. Clubzellen sind für die Regeneration des Epithels von Bedeutung (Boers et al. 1999, Rock et al. 2010) und haben zudem immunmodulatorische und metabolische Funktionen (Reynolds und Malkinson 2010). Sie sezernieren CCSP (Clara Cell Secretory Protein), das antimikrobielle und immunmodulatorische Eigenschaften besitzt. In den weiter distal gelegenen Atemwegen nehmen die Höhe des Epithels sowie der Anteil an zilierten Zellen kontinuierlich ab, während der Anteil an Clubzellen zunimmt (Hyde et al. 2009). In den Bronchioli terminales liegt schließlich ein einschichtiges unziliertes Epithel vor. Das Alveolarepithel hingegen besteht aus Typ-1 und Typ-2 Pneumozyten. Die flachen Typ-1 Pneumozyten kleiden 96 % der Alveolaroberfläche aus (Guillot et al. 2013). Die kubischen Typ-2 Pneumozyten produzieren Surfactant, der durch eine dynamische Reduktion der Obeflächenspannung einem Kollaps der Alveolen entgegenwirkt und dienen zudem als Stammzellreservoir für Typ-1 Pneumozyten (Desai et al. 2013, Ward et al. 1984).

1.2. Bedeutung der Volumenhomöostase des Atemwegepithels

Die apikale Oberfläche des Lungenepithels ist von einem dünnen Flüssigkeitsfilm (ASL = apical surface liquid) überlagert (Abbildung 2). Die Volumenhomöostase des ASL durch das Epithel ist von besonderer Bedeutung für die Gewährleistung der Lungenfunktion (Fronius et al. 2012).



Abbildung 2 Das ASL (apical surface liquid = apikale Oberflächenflüssigkeit) liegt den Epithelzellen der proximalen Atemwegen (links) und der Alveolen (rechts) auf.

In den proximalen Abschnitten ist die exakte Regulation des ASL-Volumens die Voraussetzung für die Funktionalität des mukoziliären Transportes. Das ASL ist hier circa 7 µm tief (Song et al. 2009) und besteht aus einer niedrig viskösen periziliären Schicht, der eine muköse Schicht aufliegt. Diese Mukusschicht wird von intraepithelialen Mukus produzierenden Zellen und seromukösen Drüsen der Submukosa gebildet und bindet inhalierte Partikel, Bakterien und andere Pathogene. Diese können durch geregelte Zilienbewegung in den Oropharynx transportiert werden (Randell und Boucher 2006). Hierbei ist die Volumenhomöostase der periziliären Schicht ein essentieller Mechanismus, um die Funktionalität der Zilienbeweglichkeit zu gewährleisten (Mall et al. 2004). Der gestörte mukoziliäre Transport stellt ein wesentliches Problem in Krankheiten wie Zystischer Fibrose, Asthma bronchiale oder der chronisch obstruktiven Lungenkrankheit (COPD) dar (Birket et al. 2014, Yaghi et al. 2012). Diese Krankheiten können nicht nur eine erhöhte Mukusproduktion zur Folge haben (Hogg et al. 2004), sondern auch mit einer Hyperresorptivität des Epithels einhergehen (Corcoran et al. 2013, Matsui et al. 1998, Boucher et al. 1986), die zu einem verminderten ASL-Volumen und einer beeinträchtigten

mukoziliären Clearance führt. Die Dysregulation des mukoziliären Transportes trägt durch den erhöhten Atemwegswiderstand zu einer obstruktiven Ventilationsstörung bei. Die Mukusretention begünstigt zudem inflammatorische Prozesse im Bronchialsystem, die zum Fortschreiten dieser Atemwegserkrankungen beitragen können (Hogg et al. 2004).

In den Alveolen liegt das ASL den Typ-1 und Typ-2 Pneumozyten auf und stellt einen Teil der Sauerstoffdiffusionstrecke dar. Somit kann eine inadäquate Erhöhung des ASL-Volumens im Sinne eines alveolären Lungenödems zu einer Beeinträchtigung des alveolären Gasaustausches führen. Im Falle des Lungenödems kardialer Genese wurde gezeigt, dass eine vermehrte Flüssigkeitssekretion, die durch aktive Chloridsekretion angetrieben wird, maßgeblich zur Pathogenese beiträgt (Solymosi et al. 2013). Beim Lungenödem im Rahmen einer akuten Lungenschädigung werden mechanische Faktoren, oxidativer Stress (Ronchi et al. 2014), mikrobielle Pathogene und inflammatorische Prozesse (Rittirsch et al. 2008) als Auslöser diskutiert. Es kommt hierbei zu einer Schädigung des Lungenepithels, die mit einer Dysregulation des ASL-Volumens einhergeht (Berger et al. 2011, Ware und Matthay 2001). Aus einem Lungenödem kann sich ein lebensbedrohliches ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrom) mit respiratorischem Versagen entwickeln. Für die Prognose des Lungenödems ist daher die alveoläre Resorption des expandierten Volumens von entscheidender Bedeutung (Azzam und Sznajder 2015).

1.3. Mechanismen der Volumenresorption am Atemwegsepithel

Um die Volumenhomöostase des ASL zu gewährleisten, finden regulatorische Flüssigkeitsverschiebungen über die Atemwegsepithelien statt. Hierbei können resorptive und sekretorische Prozesse unterschieden werden. Die Regulation der Balance beider Prozesse bestimmt den Nettovolumenstrom in resorptive oder sekretorische Richtung (Chambers et al. 2007).

1.3.1. Bedeutung des ENaC für die Volumenresorption

Für den Volumenfluss über das Epithel sind sowohl Ionen- als auch Wassertransportprozesse notwendig. Hierbei hat sich die Vorstellung etabliert, dass einem aktiven Ionentransport ein passiver Wasserfluss folgt. Als wichtigster Mechanismus für die Resorption am Lungenepithel gilt die apikale Natriumaufnahme via epithelialer Natriumkanäle (ENaC). Dies wurde sowohl für die proximalen (Blouquit et al. 2002, Mall et al. 2000) als auch für die distalen Atemwege (Shamsuddin und Quinton 2012, Sakuma et al. 1994) gezeigt. Der Natriumtransport wird durch die Na^+/K^+-ATPase angetrieben, die einen Natriumgradienten über die basolaterale Membran aufrechterhält (Wang et al. 2013).

Die Chloridsekretion über apikal lokalisierte CFTR-Kanäle gilt als limitierender Schritt der Flüssigkeitsekretion (Lindert et al. 2008) sowohl in den proximalen als auch in den distalen Atemwegen (Regnier et al. 2008). Auch für den resorptiven Transport wurde die Bedeutung von sowohl CFTR-Kanälen (Jiang et al. 1998) als auch nicht-CFTR Chloridkanälen (Korbmacher et al. 2014) gezeigt, wobei postuliert wird, dass die Chloridleitfähigkeit die apikale Membran hyperpolarisiert und dadurch die apikale Natriumresorption begünstigt. Ebenso besteht Evidenz, eine apikale Kaliumleitfähigkeit (Greenwood et al. 2009) für die Aufrecherhaltung des Natriumstromes von Bedeutung sind.

Die Modulation der ENaC-Aktivität infolge eines erhöhten oder erniedrigten ASL ist ein gut untersuchter Mechanismus, von dem postuliert wird, dass er für die Regulation des ASL-Volumens von Bedeutung ist (Garcia-Caballero et al. 2009, Myerburg et al. 2006, Tarran et al. 2006). Die proteolytische Spaltung der α- und γ-Untereinheiten durch intrazelluläre Furinproteasen ist am Reifungsprozess des ENaC beteiligt und führt zu einer erhöhten ENaC-Aktivität (Hughey et al. 2004, Sheng et al. 2006). ENaC können in der apikalen

Membran in einem „near-silent“-Zustand vorliegen, in welchem sie nur eine geringe Natriumpermeabilität haben, jedoch schnell proteolytisch aktiviert werden können (Diakov et al. 2008). Für diesen Aktivierungsmechanismus sind extrazelluläre membrangebundene Serinproteasen wie CAPs (channel activating proteases) notwendig (Gaillard et al. 2010, García-Caballero et al. 2008). Es ist bekannt, dass eine Erhöhung des ASL-Volumens eine proteolytische ENaC-Aktivierung induziert (Tan et al. 2011). Als Mechanismus werden lösliche Proteaseinhibitoren wie SPLUNC-1 (short palate, lung and nasal epithelium clone-1) (Garcia-Caballero et al. 2009) und PN-1 (cognate serpin protease nexin-1) (Myerburg et al. 2008) diskutiert, deren Konzentration durch einen Verdünnungseffekt bei ASL-Erhöhung abnimmt (Tarran et al. 2006).

1.3.2. Struktur und Funktion des parazellulären Transportweges

Neben den transzellulären Resorptionsmechanismen existiert ein parazellulärer Transportweg mittels Diffusion von Ionen und Wassermolekülen über die tight junctions. Lungenepithelzellen sind durch die tight junction Komplexe verbunden, die eine Diffusionsbarriere zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment darstellen. Die tight junctions bestehen aus integralen Membranproteinen wie den Claudinen, Occludin, Tricellulin und den JAMs (junctional adhesional molecules) (Van Itallie und Anderson 2014). Diesen lagern sich intrazelluläre Gerüstproteine wie ZO-1, ZO-2, ZO-3 und Cingulin (Tsukita et al. 2009) an. Tight junctions verschiedener Gewebe unterscheiden sich funktionell in ihrer jeweiligen Permeabilität und Ladungsselektivität. Diese Eigenschaften sind abhängig von der Claudinzusammensetzung sowie deren Interaktionen. Bislang wurden 27 Claudine identifiziert, deren spezifische Funktionen jedoch nur zum Teil bekannt sind (Krug et al. 2014). Claudine können homologe oder heterologe Interaktionen sowie Interaktionen mit Claudinen derselben Zellmembran („cis“) oder der Zellmembran der gegenüberliegenden Zelle („trans“) ausbilden (Sasaki et al. 2003). Tight junctions bilden eine Diffusionsbarriere gegenüber Ionen und größeren Molekülen aus, deren Dichtigkeit sich im TEER (transepithelial electrical resistance = transepithelialer elektrischer Widerstand) wiederspiegelt. Zudem können sie kanalähnliche Eigenschaften ausbilden, die eine selektive Permeabilität für Anionen oder Kationen zulassen (Colegio et al. 2003). Claudin 2

gilt bislang als das einzige Claudin, dass eine parazelluläre Wasserpermeabilität vermittelt (Rosenthal et al. 2010).

In der Lunge sind in den proximalen Atemwegen Claudin 1, 3, 4, 5, 7, 8 und 10 exprimiert (Schlingmann et al. 2015). Im Alveolarepithel wurden überwiegend Claudin 3, 4 und 18 aber auch Claudin 5 und 7 in den tight junctions identifiziert (Overgaard et al. 2012, Wang et al. 2003).

Die Rolle des parazellulären Transportweges für die Volumenresorption in der Lunge ist bislang wenig untersucht. Jedoch gibt es Hinweise auf eine Beteiligung des parazellulären Transportweges an der ASL-Volumenhomöostase. So ist die Expression von Claudin 4 im Alveolarepithel in Modellen der akuten Lungenschädigung mit einer Verbesserung der alveolären Resorption assoziiert (Chen et al. 2004).

1.3.3. Rolle von Aquaporinen für die Volumenresorption

Am Lungenepithel wird die ENaC mediierte Natriumresorption meist als der entscheidende limitierende Faktor für die Volumenresorption angesehen. Jedoch ist für andere Epithelien, beispielsweise das Sammelrohrepithel der Niere, eine Abhängigkeit der Flüssigkeitsresorption von der transepithelialen Wasserpermeabilität bekannt. Hierbei wird AQP 2 in Abhängigkeit von ADH (antidiuretisches Hormon) in die apikale Membran eingebaut (Pearce et al. 2014). Aquaporine sind integrale Membranproteine, die selektive Wasserporen darstellen und die Wasserpermeabilität von Zellmembranen 5 bis 50-fach erhöhen können (Wang et al. 2007). Studien an Knockout-Mäusen zeigten, dass Aquaporine entscheidend zur Funktion von transportierenden Epithelien z.B. in der Niere und den Speicheldrüsen beitragen (Verkman 2000). Zur Rolle der Wasserpermeabilität für die Volumenresorption am Lungenepithel bestehen dagegen kontroverse Daten. Verschiedene Aquaporine sind in der humanen Lunge exprimiert. In den mikrovaskulären Endothelzellen findet sich AQP 1, in den Epithelien der Atemwege sind dagegen vor allem AQP 3, 4 und 5 exprimiert. In den Alveolen wurden AQP 3 und 5 identifiziert (Kreda et al. 2001). Untersuchungen an Knockout-Mäusen der AQP 1-5 zeigten zwar eine signifikante Reduktion der osmotischen Wasserpermeabilität, jedoch nur einen marginalen Einfluss auf das ASL-Volumen und die alveoläre Flüssigkeitsresorption (Song et al. 2001, Song et al.

2000). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise für die Bedeutung von AQPs in verschiedenen pathophysiologischen Situationen. So wurden beim Lungenödem der Ratte (Sato et al. 2004) sowie in einem Mausmodell für Asthma (Krane et al. 2009) eine Dysregulation der AQP 3, 4 und 5 gefunden. Weiterhin zeigt eine Studie an alternden Mäusen eine Assoziation zwischen beeinträchtigtem Flüssigkeitstransport in der Lunge und einer verminderten Expression von AQP 1 und 5 (Zhang et al. 2009).

1.4. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer apikalen Volumenexpansion auf Atemwegsepithelien untersucht. In vorangehenden Experimenten von Christiane Michel an Epithelien der Zelllinie NCI-H441 wurde bereits gezeigt, dass eine apikale Volumenexpansion (AVE) zu einer Resorption des hinzugefügten Volumens führt. Hierbei fiel auf, dass infolge der AVE mit circa 4 bis 6 h Latenz eine Erhöhung der Resorptionsrate stattfand. Daraus wurde die Hypothese entwickelt, dass eine AVE langfristig zu einer Adaptation des Epithels führt, wodurch eine kompensatorische Zunahme der Resorptionsrate induziert wird. In dieser Arbeit sollte daher zunächst untersucht werden, welchen Effekt eine AVE auf den Ionentransport, den parazellulären Transportweg und die Wasserpermeabilität in Atemwegsepithelien hat. Weiterhin sollte gezeigt werden, welcher Mechanismus für die Zunahme der Resorptionsrate einige Stunden nach AVE verantwortlich istss. Hierfür wurden die NCI-H441 Zelllinie als Modell für die distalen Atemwegsepithelien und humane Trachealepithelzellen (hTEpC) als Primärzellkulturmodell für die proximalen Atemwege verwendet.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Tabelle 1 Chemikalien. (BPE: bovine pituitary extract = Rinderhypophysenextrakt, BSS: balanced salt solution = balancierte Salzlösung , csFBS: charcoal stripped fetal bovine serum = Holzkohle gereinigtes fetales Kälberserum; DMSO: Dimethylsulfoxid; DNase: Deoxyribonuklease; EDTA: Ethylendiamintetraacetat; EGF: epidermal growth factor = epidermaler Wachstumsfaktor; FITC: Fluoresceinisothiocyanat; ITS: Insulin/Transferrin/Selen; HEPES: Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure; LE low electroendosmosis = niedrige Elektroendsomose; PBS: phosphate buffered saline = Phosphat gepufferte Salzlösung; TrypLE: trypsin like enzyme = Trypsin ähnliches Enzym)

Chemikalien	**Hersteller (Ort)**
70% Isopropanol	Apotheke des Universitätsklinikums Ulm (Ulm)
Airway Epithelial Growth Medium	PromoCell GmbH (Heidelberg)
Amilorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Bacillol	BODE Chemie GmbH (Hamburg)
BPE	PromoCell GmbH (Heidelberg)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Merck KGaA (Darmstadt)
csFBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
$CuSO_4$	Merck KGaA (Darmstadt)
DEPC behandeltes Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Deuteriumoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
DNAse 1	QIAGEN GmbH (Hilden)
EGF	PromoCell GmbH (Heidelberg)
Epinephrin	PromoCell GmbH (Heidelberg)
Fluorescein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
FITC-Dextran 20 kDa	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
FITC-Dextran 4 kDa	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Flüssigstickstoff	Apotheke des Universitätsklinikums Ulm (Ulm)
Glucose	Merck KGaA (Darmstadt)
Heparin	STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Frankreich)
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
HEPES-BSS	PromoCell GmbH (Heidelberg)
HOECHST 33342	Invitrogen (Karlsuhe)
Hydrocortison	PromoCell GmbH (Heidelberg)

Insulin	PromoCell GmbH (Heidelberg)
Isotone NaCl-Lösung (0,9 %)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
ITS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
KCl	Merck KGaA (Darmstadt)
KH_2PO_4	Merck KGaA (Darmstadt)
Kollagen Typ I Lösung	STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Frankreich)
Kryokonservierlösung	PromoCell GmbH (Heidelberg)
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Merck KGaA (Darmstadt)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
NaCl	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
NuPAGE® Antioxidant	Life technologies (Darmstadt)
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Life technologies (Darmstadt)
NuPAGE® MES SDS Running Buffer	Life technologies (Darmstadt)
NuPAGE® Sample Reducing Agent	Life technologies (Darmstadt)
NuPAGE® Sharp Pre-Stained Protein	Life technologies (Darmstadt)
PBS ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}	Merck KGaA (Darmstadt)
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe)
PneumaCult™-ALI Basal Medium	STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Frankreich)
PneumaCult™-ALI Expansion Supplement	STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Frankreich)
PneumaCult™-ALI Induction Supplement	STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Frankreich)
PneumaCult™-ALI Maintenance Supplement	STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Frankreich)
PneumaCult™-ALI Supplement	STEMCELL Technologies SARL (Grenoble, Frankreich)
Ponceau S	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Puromycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Retinsäure	PromoCell GmbH (Heidelberg)
RPMI-1640 Medium	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
SeaKem® LE-Agarose	Cambrex Bio Science Rockland, Inc. (Rockland, USA)
Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Sucrose	Merck KGaA (Darmstadt)
SYBR GreenER qPCR SuperMix	Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA)
Transferrin	PromoCell GmbH (Heidelberg)
Triiodthyronin	PromoCell GmbH (Heidelberg)
Triton X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
TrypLE™ Express	Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA)
Trypsin/EDTA Lösung	PromoCell GmbH (Heidelberg)
Trypsin-Neutralisierlösung	PromoCell GmbH (Heidelberg)

2.1.2. Lösungen und Medien

Zellkultur

Tabelle 2 Lösungen und Medien der Zellkultur. (BPE: bovine pituitary extract = Rinderhypophysenextrakt; EGF: epidermal growth factor = epidermaler Wachstumsfaktor; csFBS: charcoal stripped fetal bovine serum = Holzkohle gereinigtes fetales Kälberserum; ALI-Medium: Air-Liquid-Interface-Medium; DMSO: Dimethysolfoxid; ITS: Insulin/Transferrin/Selen)

ALI-Medium	RPMI-1640 Medium mit 10% csFBS, 1% Natrium-Pyruvat, 1% ITS, 30 nM Dexamethason
Differenzierungsmedium	PneumaCult™-ALI Basal Medium mit 10% PneumaCult™-ALI Supplement, 1% PneumaCult™-ALI Maintenance Supplement, 10 mg/ml Streptomycin, 4 µg/ml Heparin, 0,48 µg/ml Hydrocortison, 10 000 U/ml Penicillin G
Expansionsmedium	PneumaCult™-ALI Basal Medium mit 10% PneumaCult™-ALI Supplement, 1% PneumaCult™-ALI Expansion Supplement, 10 mg/ml Streptomycin, 4 µg/ml Heparin, 0,48 µg/ml Hydrocortison, 10 000 U/ml Penicillin G
Induktionsmedium	PneumaCult™-ALI Basal Medium mit 10% PneumaCult™-ALI Supplement, 1% PneumaCult™-ALI Induction Supplement, 10 mg/ml Streptomycin, 4 µg/ml Heparin, 0,48 µg/ml Hydrocortison, 10 000 U/ml Penicillin G
Kollagenlösung	PBS mit 1% Kollagen Typ I Lösung
Kryokonserviermedium	95% Kulturmedium (RPMI-1640 Medium mit 10% csFBS, 1% Natrium-Pyruvat), 5% DMSO
Kulturmedium	RPMI-1640 Medium mit 10% csFBS, 1% Natrium-Pyruvat
Wachstumsmedium	Airway Epithelial Cell Growth Medium mit 0,4 % BPE, 10 µg/ml Transferrin, 5 µg/ml Insulin, 0,5 µg/ml Epinephrin, 0,5 µg/ml Hydrocortison, 10 ng/ml EGF, 6,7 ng /ml Triiodthyronin, 0,1 ng/ml Retinsäure

Funktionelle Methoden

Tabelle 3 Lösungen der Elektrophysiologie und der D_2O-Dilutionsmethode.
(HEPES: Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure)

D_2O-Lösung	D_2O mit 0,9% NaCl
Elektroden Lösung	140 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM KCl, 2,5 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 mM KH_2PO_4, 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
HEPES-Ringer Lösung	140 mM NaCl, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES, 5 mM KCl, 2,5 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 mM KH_2PO_4, 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; pH 7,4 (mit NaOH titriert)
Puffer A	145 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
Puffer B	130 mM Sucrose, 80 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
RPMI 1640-Eletrolytlösung	6 $\frac{g}{l}$ NaCl, 2 $\frac{g}{l}$ $NaHCO_3$, 2 $\frac{g}{l}$ Glucose, 1 $\frac{g}{l}$ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0,4 $\frac{g}{l}$ KCl, 0,1 $\frac{g}{l}$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 $\frac{g}{l}$ $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$

Immunzytochemie

Tabelle 4 Lösungen der Immunzytochemie. (FBS: fetal bovine serum = Fetales Kälberserum; HEPES: Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure; PBS: phosphate buffered saline = Phosphat gepufferte Salzlösung)

Antikörperlösung	PBS mit 1 % FBS, 0,1 % Triton X-100
Blockierungspuffer	PBS mit 10 % FBS, 1 % Triton X-100

2.1.3. Kits

Tabelle 5 Kits. (cDNA: complementary deoxyribonucleic acid = komplementäre Deoxyribonukleinsäure; RNA: ribonucleic acid = Ribonukleinsäure)

my Budget RNA Mini Kit	Biobudget (Krefeld)
SuperScript® VILO™ cDNA Synthese Kit	Life Technologies (Darmstadt)
Western Breeze™ Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit – Anti Rabbit	Invitrogen (Karlsruhe)
Western Breeze™ Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit – Anti Mouse	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.4. Antikörper

Tabelle 6 Antikörper. (ATPase: Adenosintriphosphatase; IgG: Immunglobulin G)

Antikörper	Hersteller (Ort)
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG	Life Technologies (Darmstadt)
Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse IgG	Life Technologies (Darmstadt)
Anti-Aquaporin 3 rabbit IgG ab125219	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Aquaporin 4 rabbit IgG ab81355	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Aquaporin 5 rabbit IgG ab78486	Invitrogen (Karlsuhe)
Anti-Claudin 12 rabbit IgG LS-B2181	LifeSpan BioSciences (Seattle, USA)
Anti-Claudin 4 rabbit IgG ab53156	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Claudin 7 rabbit IgG ab27487	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Claudin 8 rabbit IgG, LS-B5505	LifeSpan BioSciences (Seattle, USA)
Anti-Na^+/K^+-ATPase alpha subunit mouse IgG ab7671	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Occludin mouse IgG MAB7074	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Anti-β-Actin mouse IgG A1978	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

2.1.5. Primer

Tabelle 7 Primer. (CLDN: Claudin; ENaC: epithelial Na^+-channel = epithelialer Natriumkanal; HMBS: Hydroxymethylbilansynthase; hs: humane species = human, RT-PCR: real-time polymerase chain reaction = Echzeit-Polymerasekettenreaktion)

Primer	Hersteller (Ort)
hs Aquaporin 1 QT00013237	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs Aquaporin 10 QT00043393	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs Aquaporin 11 QT00230636	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs Aquaporin 12A QT00236432	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs Aquaporin 2 QT00022757	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs Aquaporin 3 QT00212996	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs Aquaporin 4 QT00054761	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs Aquaporin 5 QT00036099	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs Aquaporin 6 QT00010633	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs Aquaporin 7 QT00067592	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs Aquaporin 8 QT00039123	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs Aquaporin 9 QT00017710	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 1 QT00225764	QIAGEN GmbH (Hilden)

hs CLDN 10 QT00031101	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 11 QT00008085	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 12 QT01012186	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 14 QT00234731	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 15 QT01017723	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 16 QT00039655	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 17 QT01018507	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 18 QT00039550	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 19 QT00083475	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 2 QT00089481	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 3 QT00201376	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 4 QT00241073	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 5 QT01681232	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 6 QT00235193	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 7 QT00236061	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 8 QT00212268	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs CLDN 9 QT00209482	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs HMBS PPH10257F	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs α-ENaC QT00022883	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs β-ENaC QT00051597	QIAGEN GmbH (Hilden)
hs γ-ENaC QT00063217	QIAGEN GmbH (Hilden)

2.1.6. Zellen und Vektoren

Tabelle 8 Zellen und Vektoren. (shRNA: short hairpin ribonucleic acid = kleine Haarnadel-Ribonukleinsäure)

Zellen / Vektor	**Hersteller (Ort)**
Humane Trachealepithelzellen	PromoCell GmbH (Heidelberg)
NCI-H441	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
pGIPZ™ Lentiviral shRNA RHS4348	GE Healthcare Dharmacon (Little Chalfont, UK)
pGIPZ™ Lentiviral shRNA V2LHS_62430	GE Healthcare Dharmacon (Little Chalfont, UK)

2.1.7. Geräte

Tabelle 9 Geräte. (ATR: total attentuated reflection = abgeschwächte Totalreflexion; FT-IR: Fouriertransformationsinfrarotspektroskopie, MCT: mercury-cadmium-telluride = Quecksilber-Cadmium-Tellurid ; UV: Ultraviolett)

Geräte	Hersteller (Ort)
Absaugpumpe MINI-VAC EC	Axon Lab AG (Reichenbach/Stuttgart)
Ag/AgCl-Elektroden	Physiologic Instruments (San Diego, USA)
Axiovert 40 CFL inverses Mikroskop	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Bioair SAFEFLOW 1.2	Euroclone SpA (Siziano, Italien)
BioATRCell-II-Einheit	Bruker optics (Ettlingen)
DCP 7070 dw Scanner	Brother International GmbH (Emmerich)
Easy-Mount Diffusionskammer	Physiologic Instruments (San Diego, USA)
E-Gel® iBase™ electrophoresis system	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Eppendorf Research Pipettes	Eppendorf AG (Hamburg)
HERAcell 150 incubator	Kendro Laboratory Products (Hanau)
iMic Digital Microscope	Till Photonics GmbH (Gräfeling)
Impedanzmessesgerät cellZscope®	nanoAnalytics GmbH (Münster)
MC 1 AC120 Analytical Balance	Sartorius GmbH (Göttingen)
MCT-Detektor	Bruker optics (Ettlingen)
Microplate reader Infinite®200	Tecan (Männesdorf, Schweiz)
NanoDrop 2000c	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Osmometer OM 801	Vogel GmbH & Co. KG (Gießen)
pH-Meter CG 822	Schott® Geräte GmbH (Mainz)
Pipetus® Pipetierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG
Präzisionswaage	Sartorius AG (Göttingen)
realplex² Mastercycler epgradient S	Eppendorf AG (Hamburg)
S@feflow1.2 Sicherheitswerkbank	NuncTM Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co., Inc. (Edison,
Sonifier® Cell Disrupter S-250A	Branson Ultrasonic Corporation (Danbury, USA)
TCS SP5 Konfokalmikroskop	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
Thermomixer compact	Eppendorf AG (Hamburg)
Ussing-Kammer Verstärker	Böhringer Ingelheim (Biberach)
UV-Crosslinker	Amersham Life Science (Buckinghamshire, UK)
Vertex 70 FT-IR Spektrometer	Bruker optics (Ettlingen)
Zählkammer nach Neubauer	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Zentrifuge 5427 R	Gerätebau Eppendorf GmbH (Engelsdorf)

2.1.8. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10 Verbrauchsmaterialien. (PCR: polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion)

Verbrauchsmaterialien	Hersteller (Ort)
µ-Slide 8-Well	Ibidi GmbH (Martinsried)
24-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
96-Well PCR-Platten	Eppendorf AG (Hamburg)
96-Well Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Einmalspritzen	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Falcon Tubes	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
iBlot® Transfel Stack, Nitrocellulose	Life Technologies (Darmstadt)
Injektionskanülen	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Kryoröhrchen	Thermo Scientific GmbH (Langenselbold)
NuPAGE® Bis-Tris Mini Gel	Life Technologies (Darmstadt)
Pipettenspitzen mit Filter 10 µl / 1000 µl	Eppendorf AG (Hamburg)
Pipettenspitzen mit Filter 20 µl / 100 µl / 200 µl	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße 0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml	Eppendorf AG (Hamburg)
Sterilfilter 0,22 µm	Milipore Corporation (Bedford, USA)
Transwell Membraneinsätze	Corning Incorporated (Corning, USA)
Zellkulturflaschen 25 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)

2.1.9. Software

Tabelle 11 Software.

Software	Hersteller (Ort)
cellZscope® software	nanoAnalytics GmbH (Münster)
Image J	NIH (Bethesda, USA)
LabVIEW Software Package	National Instruments (München)
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft Office Word 2007	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
NanoDrop Software	PeqLab Biotechnologies GmbH (Erlangen)
Realplex software	Eppendorf AG (Hamburg)
Leica Application Suite AF 2.4.1/6348	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
OPUS 6.5 software package	Bruker optics (Ettlingen)
i-control™ 1.6	Tecan (Männedorf, Schweitz)
Live Acquisition 2.1.0.10	TILL Photonics GmbH (Gräfeling)

2.2. Zellkultur

Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2. Arbeiten mit der Zellkultur wurden in einer Sterilbank durchgeführt. Das Medium wurde jeweils dreimal pro Woche gewechselt. Zur Beobachtung des Zellwachstums wurde ein inverses Phasenkontrastmikroskop verwendet.

2.2.1. NCI-H441 Zellen

NCI-H441 Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen mit 10 ml Kulturmedium (s. Tabelle 2) kultiviert und nach sieben Tagen bei einer durchschnittlichen Konfluenz von 90 % passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml Trypsin-LE für zwei bis drei Minuten bei 37°C inkubiert und das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet. Wenn 80 bis 90 % der Zellen abgelöst waren, wurde die Trypsin-LE-Reaktion durch Zugabe von 9 ml Kulturmedium beendet, die Zellen in Suspension gebracht und bei 800 rpm 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmen der Zellanzahl mithilfe einer Neubauerkammer wurden die Zellen in einer Dichte von 16 000 Zellen pro cm² in Zellkulturflaschen ausgesät.

Zellen, die für Experimente verwendet wurden, wurden auf 0,33 cm² Transwellfiltern in 24-Well-Zellkulturplatten als Air-Liquid-Interface (ALI) kultiviert. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben in Suspension gebracht und in einer Dichte von 30 000 Zellen pro cm² auf den Filtern ausgesät. In das apikale Kompartiment des Filters wurden 200 µl der Zellsuspension gegeben und das basolaterale Kompartiment der Zellkulturplatte mit 500 µl Kulturmedium befüllt. Nach vier Tagen wurde das ALI etabliert. Dazu wurde das basolaterale Medium gegen ALI-Medium (s. Tabelle 2) ausgetauscht und das apikale Medium entfernt. In das apikale Kompartiment zurückleckende Flüssigkeit wurde täglich entfernt bis das ALI nach drei bis vier Tagen stabil war.

Die Experimente wurden jeweils an Tag sieben nach der ALI-Etablierung durchgeführt.

2.2.2. Humane Trachealepithelzellen (HTEpC)

Humane Trachealepithelzellen (HTEpC) wurden in kryokonservierter Form erworben und nach dem Auftauen in einer Dichte von 10 000 Zellen pro cm² in 25 cm² Zellkulturflaschen in 10 ml Wachstumsmedium (s. Tabelle 2) ausgesät. Wenn nach fünf bis sechs Tagen eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht war, wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit HEPES-BSS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 4 bis 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem dem Mikroskop beobachtet und die Trypsinreaktion durch Zugabe von 2 ml Trypsinneutralisierlösung beendet. Nach Zentrifugation der Zellsuspension bei 5 min bei 500 rpm wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 3 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellanzahl wurde mithilfe einer Neubauerkammer bestimmt und die Zellen erneut wie oben beschrieben in Zellkulturflaschen ausgesät.

Alternativ wurden die Zellen zur erneuten Kryokonservierung nach der Zentrifugation in Kryokonservierlösung resuspendiert und in einer Dichte von 500 000 Zellen pro ml in Kryokonservierröhrchen eingefroren und in Flüssigstickstoff gelagert.

Zur Kultivierung der Zellen als ALI-Epithel wurde eine Kollagenbeschichtung von 0,33 cm² Transwellfiltern durchgeführt, indem 300 µl pro cm² einer Kollagenlösung (s. Tabelle 2) auf den Filter gegeben wurden. Nach 24-stündigem Trocknen erfolgte eine 30-minütige UV-Bestrahlung zur Sterilisation und Querverlinkung des Kollagens. Das Medium der Zellkulturflasche wurde gegen Induktionsmedium (s. Tabelle 2) ausgetauscht. 24 h später wurden die Zellen wie oben beschrieben passagiert, wobei die Resuspension des Zellpellets in Expansionsmedium (s. Tabelle 2) erfolgte. Die Zellen wurden in einer Dichte von 100 000 Zellen pro cm² ausgesät, indem 200 µl der Zellsuspension in das apikale Kompartiment des Filters gegeben wurden. Das basolaterale Kompartiment der 24-Well-Zellkulturplatten wurde mit 500 µl Expansionsmedium gefüllt. Sobald sich nach drei bis vier Tagen eine konfluente Zellschicht ausgebildet hatte, wurde das ALI etabliert. Dazu wurde das apikale Medium entfernt und das basolaterale Medium gegen Differenzierungsmedium (s. Tabelle 2) ausgetauscht.

Um eine Akkumulation des von den Zellen gebildeten Mukus zu verhindern, wurden die Zellen eine Woche nach ALI gewaschen. Hierzu wurden 100 µl PBS apikal auf den Filter

gegeben und nach 10 min Inkubation bei 37°C wieder entfernt. Ab 14 Tagen nach ALI wurden die Zellen zweimal wöchentlich mit einer Inkubation von 30 min gewaschen.
Experimente wurden an Tag 21 bis 35 nach ALI durchgeführt. 24 h Stunden vor Beginn des Experiments wurden die Zellen wie beschrieben mit einer Inkubation von 30 min mit PBS gewaschen.

2.2.3. Generierung von stabil transfizierten H441-Zelllinien

H441-Zelllinien, die die AQP 3 Expression unterdrücken, wurden mittels lentiviralen Vektoren generiert, die AQP 3 spezifische shRNA exprimieren (V2LHS_62430). Nicht kodierende shRNA (RHS4348) exprimierende Lentiviren dienten als Negativkontrolle. Für die Transfektion wurden H441-Zellen in Kulturmedium (s. Tabelle 2) in einer Zellkulturplatte kultiviert und für 24 h mit den ensprechenden lentiviralen Partikel inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Kulturmedium gewaschen, um die Viruspartikel zu entfernen. Die weitere Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen und auf Filtern wie oben beschrieben. Zur Selektion von transfizierten Zellen erfolgte die Kultur mit Puromycin ($4\ \frac{\mu g}{ml}$).

2.3. Funktionelle Methoden

2.3.1. D_2O-Dilutionsmethode

Die Wasserresorption der Epithelien wurde mit der D_2O-Dilutionsmethode (Neubauer et al. 2013) erfasst. Die auf Filtern kultivierten Zellen wurden zu Beginn des Experiments in eine Zellkulturplatte überführt, wobei das basolaterale Kompartiment mit 500 µl bei 37°C und 5% CO_2 äquilibriertem ALI-Medium (s. Tabelle 2) befüllt war. Um Volumenveränderungen durch Evaporation zu minimieren, wurden Zwischenräume in der Zellkulturplatte mit isotoner NaCl-Lösung aufgefüllt. Sofern nicht anders angegeben, wurde eine AVE durchgeführt, indem 25 µl isotoner NaCl-Lösung auf die apikale Oberfläche der Zellen gegeben und für die jeweils genannte Zeit bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden.

Nach der Inkubation wurde das verbleibende apikale Volumen gemessen, indem 25 µl isotoner D_2O-Lösung (s. Tabelle 3) in das apikale Kompartiment hinzugegeben und mit dem Restvolumen durch Pipettieren gemischt wurden. Die resultierende H_2O/D_2O-Mischung wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben und die Probe mittels MIR-ATR-Spektroskopie analysiert. Hierzu wurde ein FT-IR Spektrometer mit durch Flüssigstickstoff gekühltem MCT-Detektor und einer BioATRCell-II-Einheit verwendet. Vor jeder Probenreihe wurde ein Hintergrund durch eine Leermessung aufgezeichnet und anschließend 15 µl der Probe mit 100 Scans in einer Wellenzahl von 4000 bis 400 cm^{-1} bei einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} gemessen. Zur Analyse wurde eine Integration der Absorption der H-O Streckschwingungsbande zwischen 3810,6 cm^{-1} und 2805 cm^{-1}, der D-O Streckschwingungsbande zwischen 2774 cm^{-1} und 2070 cm^{-1} und der D-O-D Deformationsschwingungsbande zwischen 1818 cm^{-1} und 1090 cm^{-1} verwendet. Für die Messwerte einer Kalibrierungsreihe mit 15, 25, 40, 50 und 65 % H_20-Anteil wurde mittels linearer Regression ($R^2 \geq 0{,}992$) eine Geradengleichung der Form $Int = m \cdot rel_{H2O} + c$ für jede der genannten Schwingungsbanden berechnet (Int = Integral der Absorptionsbande; m = Geradensteigung; rel_{H2O} = H_2O-Anteil in Prozent; c = Y-Achsenabschnitt). Der prozentuale H_2O-Anteil der Proben wurde nun nach $rel_{H2O} = \frac{m \cdot c}{Int}$ bestimmt. Das H_2O-Volumen V_{H2O} wurde nach $V_{H2O} = \frac{rel_{H2O} \cdot V_{D2O}}{100 - rel_{H2O}}$ ermittelt, wobei V_{D2O} = 25 µl. Der Volumenfluss wurde mittels linearer Regression durch die Datenpunkte eines Volumen–Zeit–Diagramms berechnet.

2.3.2. Bestimmung der osmotischen Permeabilität

Zur Bestimmung der osmotischen Permeabilität der Epithelien wurde der Volumenfluss in Abhängigkeit eines osmotischen Gradienten gemessen, wie bereits von Larsen et. al beschrieben (Larsen et al. 2006). Osmotische Gradienten zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment wurden mittels Sucrose eingestellt. Die Zellen wurden für 1 h oder 8 h mit 25 µl apikalen Volumens vorinkubiert. Um Ionengradienten zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment zu vermeiden, wurde hierzu eine isotone RPMI 1640-Elektrolytlösung (s. Tabelle 3) verwendet. Zur Messung der osmotischen Permeabilität wurde nach der Vorinkubation ein osmotischer Gradient angelegt. Hierbei wurde ein

resorptiver Gradient eingestellt, indem das basolaterale Medium durch hyperton eingestelltes Medium ersetzt wurde. Dem apikalen Kompartiment wurden zusätzlich 25 µl isotone RPMI-Elektrolytlösung hinzugegeben. Die Einstellung eines sekretorischen Gradienten erfolgte durch Zugabe von 25 µl hypertoner RPMI-Elektrolytlösung zum apikalen Kompartiment. Die entsprechende Hypertonizität der Lösungen oder Medien wurde durch die Zugabe von Sucrose eingestellt. Die Osmolalitätsdifferenz $\Delta\pi$ ist dabei definiert als: $\Delta\pi = \text{Osmolalität}_{\text{apikal}} - \text{Osmolalität}_{\text{basolateral}}$.

Nach den Inkubationszeiten $t_1 = 30$ min und $t_2 = 60$ min bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit wurde das apikale Volumen mittels D_2O-Dilutionsmethode gemessen. Hierbei war das hinzugegebene D_2O-Volumen $V_{D2O} = 50$ µl. Der Volumenflux J_V wurde gemäß $J_V = \frac{\Delta V}{\Delta t\, A}$ berechnet ($\Delta V = V_{60\,\text{min}} - V_{30\,\text{min}}$; $\Delta t = t_2 - t_1$; A = nominale Epitheloberfläche).

2.3.3. Permeabilitätsmessung

Die größenselektive Permeabilität des Epithels wurde mit Fluorescein und FITC konjugierten Dextranen verschiedener Molekulargewichte gemessen. Zunächst wurde auf den Epithelien eine AVE mit 25 µl isotoner NaCl-Lösung für 0 h, 1 h, 8 h oder 16 h durchgeführt. Anschließend wurde das basolaterale Medium gegen 500 µl frisches ALI-Mediums ausgetauscht und apikal weitere 175 µl isotoner NaCl-Lösung hinzugegeben. Hierbei wurden zum basolateralen Donormedium die genannten Fluoreszenzmarker in der entsprechenden initialen Konzentration c_i hinzugefügt. Nach 30 min Inkubation wurde die Fluoreszenz einer 50 µl Probe des apikalen Akzeptormediums (Exzitationswellenlänge: 480 nm; Emissionswellenlänge: 510 nm) gemessen. Um eine Beeinflussung des Fluoreszenzverhaltens der Farbstoffe durch pH-Wertänderungen zu vermeiden, wurden vor der Messung 5 µl TE-Puffer pH 7,4 zugegeben. Zur Bestimmung der Farbstoffkonzentration wurde eine Kalibrierungsreihe für den jeweils entsprechenden Konzentrationsbereich gemessen und mittels linearer Regression ($R^2 \geq 0{,}990$) eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Form $F = m \cdot c + F_0$ erstellt (F = Fluoreszenz; m = Geradensteigung; c = Farbstoffkonzentration; F_0: Hintergrundfluoreszenz). Die Farbstoffkonzentration der Proben wurde gemäß $c = \frac{F}{m\, F_0}$ ermittelt und daraus der

Farbstoffflux J nach $J = \frac{c\ V_{Akzeptor}}{\Delta t \cdot A}$ berechnet ($V_{Akzeptor}$ = Volumen des Akzeptormediums; Δt = 30 min; A = nominale Epitheloberfläche). Hieraus wurde der apparente Permeabilitätskoeffizient P_{app} wie folgt bestimmt: $P_{app} = \frac{J}{c_i}$ (Steimer et al. 2007).

2.3.4. TEER-Messung

Zur Messung des transepithelialen elektrische Widerstand (TEER) wurde das Impedanzspektroskopiemessgerät cellZscope®verwendet.

Die Epithelien wurden unter ALI-Bedingungen kultiviert und zur Messung in das cellZscope® überführt. Basolateral wurden hierbei 500 µl ALI-Medium (s. Tabelle 2) verwendet und apikal 150 µl isotone NaCl-Lösung hinzugeben.

Zur Messung wurde zwischen einer apikalen und basolateralen Elektrode Wechselstrom angelegt und die Impedanz frequenzabhängig gemessen. Der Epithelwiderstand wurde mittels der cellZscope® Software berechnet, wobei die Widerstände des Transwell Filters, der Elektroden und des Mediums berücksichtigt wurden.

2.3.5. Ussing-Kammer

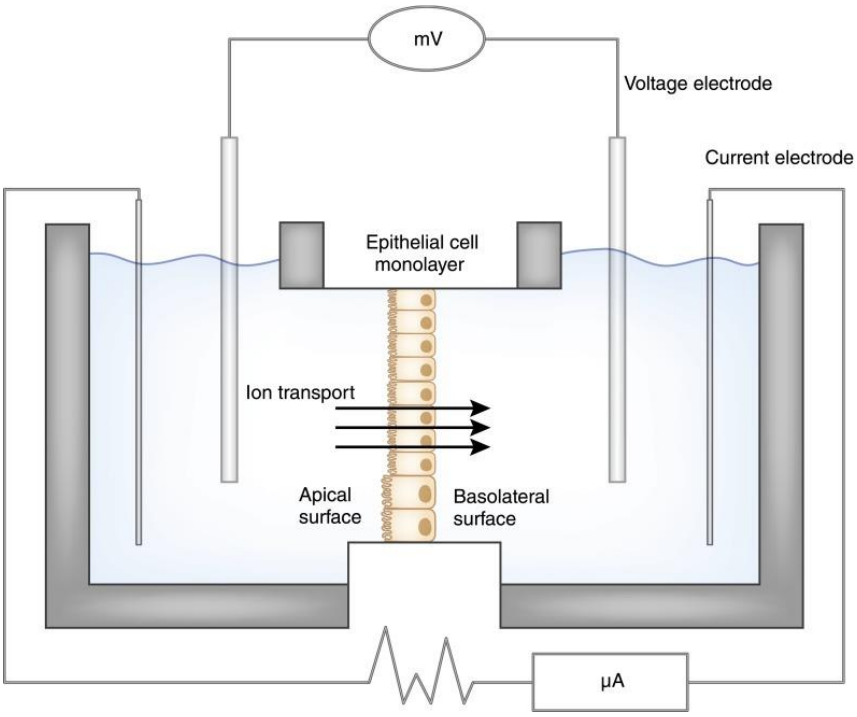

Abbildung 3 Schematische Darstellung einer Ussing-Kammer (aus Hoenig et al. 2014). Das Epithel (epithelial cell monolayer) wird zwischen eine apikale und basolaterale Kammer eingesetzt. Zwischen den beiden Kammern werden Spannung (im mV) und Strom (in µA) gemessen (voltage electrode: Spannungselektrode; current electrode: Stromelektrode). Zwischen der apikalen Oberfläche der Zellen (apical surface) zur basolateralen Oberfläche (basolateral surface) findet ein Ionentransport statt (ion transport). Bei der Kurzschlussstrommessung wird über die Stromelektroden ein Strom angelegt, der dem Ionenstrom des Epithels entgegengesetzt ist, wobei die Spannung über das Epithel auf 0 mV geregelt wird.

Kurzschlussstrommessung

Epithelien wurden unter ALI-Bedingungen kultiviert und in eine Ussing-Kammer (Abbildung 3) eingesetzt. Unmittelbar nach Einsetzen des Filters wurde zunächst die basolaterale und darauffolgend die apikale Kammer mit je 5 ml einer Ringer-Lösung (s. Tabelle 3) befüllt. Um Konzentrationsunterschiede von Elektrolyten und zugegebenen Substanzen innerhalb einer Kammer auszugleichen, wurde durch das Anlegen eines Luftstroms eine Zirkulation der Lösung bewirkt. Die Spannung U wurde durch das Anlegen eines Stromes auf 0 mV reguliert und der Kurzschlussstrom I_{SC} in einem Intervall von 5 s

gemessen. Der Widerstand R über das Epithel wurde durch das Anlegen einer Spannung U als $R = \frac{U}{\Delta I}$ bestimmt. Widerstände und I_{SC} wurden auf die Filteroberfläche normiert.

Nachem der I_{SC} ein stabiles Niveau erreicht hatte wurden 30 µM Amilorid zur Inhibition von ENaC in die apikale Kammer hinzugegeben.

Um die Na/K-ATPase Aktivität zu messen wurde ENaC durch die apikale Zugabe von Amilorid (30 µM) gehemmt. Nach Erreichen eines konstanten I_{SC} wurde die apikale Membran durch Zugabe von Amphotericin B (20 µM) permeabilisiert. Sobald der I_{SC} ein Plateau erreichte hatte, wurde die Na^+/K^+-ATPase-Aktivität durch Zugabe von Ouabain (1 mM) zur basolateralen Kammer bestimmt.

Dilutionspotenzial

Die Messung und Analyse des Dilutionspotenzials wurde in Anlehnung an die Protokolle von Boravac et al. und Hou et al. etabliert (Borovac et al. 2012, Hou et al. 2005). Es wurde hierzu eine perfundierte Ussing-Kammer verwendet, die den Austausch von Lösungen während der Messung ermöglichte.

Unter ALI-Bedingungen kultivierte Zellen wurden in die Ussing-Kammer eingesetzt und die apikale und basolaterale Kammer mit Puffer A (s. Tabelle 3) perfundiert (Bedingung $A_{api}A_{baso}$). Die über das Epithel gemessene Spannung wurde in einem Intervall von 5 s aufgezeichnet. Zur Bestimmung des Widerstandes über das Epithel wurde ein Gleichstrom von 1 µA angelegt und der Widerstand R nach $R = \frac{\Delta U}{I}$ berechnet. Die Lösungen wurden gewechselt, wenn die gemessene Spannung ein Plateau erreicht hatte. Dabei wurde zunächst apikal Puffer A gegen Puffer B (s. Tabelle 3) ausgetauscht (Bedingung $B_{api}A_{baso}$) und danach die Bedingung $A_{api}B_{baso}$ eingestellt. Um den Anteil der Potenzialänderung zu erfassen, der durch das Epithel bedingt ist, wurde anschließend ein leerer Filter ebenfalls wie beschrieben zur Bestimmung der Hintergrundspannungen gemessen.

Zur Analyse wurden die im Plateau gemessenen Spannungen verwendet und die Hintergrundwerte der entsprechenden Bedingung subtrahiert. Die gemessene Spannungsdifferenz wurde unter Bedingung $B_{api}A_{baso}$ als $V(BA) = V(B_{api}A_{baso}) - V(A_{api}A_{baso})$ definiert. Für die Bedingung $A_{api}B_{baso}$ gilt entsprechend $V(AB) = V(A_{api}B_{baso}) - V(A_{api}A_{baso})$. Die Selektivität des Epithels wurde als das Verhältnis der Permeabilität für Natrium und Chlorid

als $\eta = \frac{P_{Na+}}{P_{Cl-}}$ definiert. Mittels modifizierter Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung ergibt sich $\eta = -\frac{\varepsilon - e^{V}}{1 - \varepsilon e^{V}}$, wobei $\varepsilon = \frac{[NaCl]_{basolateral}}{[NaCl]_{apikal}}$.

P_{Na+} und P_{Cl-} wurden mit der Kimizuka-Koketsu-Gleichung (Kimizuka 1964) nach $P_{Na+} = \eta \frac{G R T}{C F^2 (1 + \eta)}$ bzw. $P_{Cl-} = \frac{G R T}{C F^2 (1 + \eta)}$ berechnet. Hierbei ist $G = R^{-1}$, C = NaCl-Konzentration der Lösung, R = allgemeine Gaskonstante, T = Temperatur und F = Faraday-Konstante.

2.4. Molekularbiologische Methoden

2.4.1. qRT-PCR

Um die Expression eines Zielgenes zu untersuchen, wurdes die mRNA-Transkripte des entsprechenden Genes mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR) analysiert.

RNA-Isolation

RNA wurde mit den Reagenzien des my-Budget RNA Mini Kits isoliert. Die Zellen wurden unter ALI-Bedingungen kultiviert und in 200 µl Lysepuffer lysiert. Die Suspension wurde auf eine Lysesäule gegeben und bei 12 000 rpm 2 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 200 µl 70 % Ethanol gemischt, zum Binden der RNA auf eine Bindesäule gegeben und bei 12 000 rpm 2 min zentrifugiert. Zum Waschen der Säule wurden 350 µl HS Waschpuffer auf die Säule gegeben und bei 12 000 rpm 30 s zentrifugiert. Anschließend wurde ein DNase-Verdau durchführt. Hierzu wurde die Säule mit 80 µl einer DNase I Lösung, die 125 Kunitz-Einheiten DNase I in RDD-Puffer enthielt, überschichtet und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Säule wie oben beschrieben mit 500 µl HS Waschpuffer und anschließend mit LS Waschpuffer gewaschen. Zum Enfernen von Pufferrückständen wurde die Säule durch Zentrifugation bei 10 000 rpm für 2 min getrocknet. Zur Elution der RNA wurden 20 µl Wasser auf die Säule gegeben und diese bei 8 000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der RNA-Gehalt des Eluats wurde mit dem NanoDrop Spektrometer anhand der UV-Absorption bei 260 nm und dem 206/280-Verhältnis bestimmt.

cDNA-Synthese

Mittels reverser Transkription mit dem SuperScript® VILO™ cDNA Synthese Kit wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 12 Ansatz der cDNA-Synthese (cDNA: complementary deoxyribonucleic acid = komplementäre Deoxyribonukleinsäure; RNA: ribonucleic acid = Ribnukleinsäure)

VILO MasterMix 5x	4 µl
VILO SuperScript 10x	2 µl
RNA und H_2O	16 µl
Gesamt	20 µl

Dabei wurden 600 – 800 ng RNA pro Ansatz eingesetzt und der Anteil an RNA und H_2O entsprechend der gemessenen RNA-Konzentration gewählt. Die Proben wurden in einem PCR-Gerät für 10 min bei 25°C, 1 h bei 42°C und 5 min bei 85°C inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert.

RT-PCR

Zur Quantifizierung der Transkripte eines Zielgenes wurde eine RT-PCR mit folgenden Protokollen durchgeführt.

Tabelle 13 Reaktionansatz (links) und Protokol (rechts) der RT-PCR (cDNA: complementary deoxyribonucleic acid = komplementräe Deoxyribonukleinsäure; RT-PCR: real-time polymerase chain reaction = Echtzeitpolyermasekettenreaktion)

SYBR Green Super Mix 2x	7,5 µl
cDNA	1 µl
Primer	0,75 µl
H_2O	5,75 µl
Gesamt	15 µl

1.	Initiale Denaturierung	120 s	95°C
2.	40 Zyklen		
	2a. Denaturierung	15 s	95°C
	2b. Primeranlagerung und Elongation	135 s	60°C
3.	Schmelzkurvenanalyse	15 s	95°C
		15 s	60°C
		0,05°C/s bis 95°C	

Hydroxymethylbilansynthase (HMBS) wurde als Haushaltsgen verwendet und die Expression der untersuchten Zielgene relativ zur Expression von HMBS ermittelt. Zur Ermittlung der Primereffizienzen wurden Verdünnungsreihen der cDNA angefertigt. Aus den resultierenden C_t-Werten (Zyklus bei Überschreiten eines Fluoreszenzschwellenwertes) und den Logarithmen der cDNA-Konzentration wurde mittels linearer Regression die Steigung bestimmt. Die Primereffizienz (Eff_{Primer}) wurde als $Eff_{Primer} = 10^{-\frac{1}{Steigung}}$ bestimmt. Die relative Expression (Exp_{rel}) wurde nach der Formel $Exp_{rel} = Eff_{Primer}{}^{\Delta Ct}$ berechnet, wobei $\Delta Ct = Ct_{Zielgen} - Ct_{HMBS}$. Als relative Expression einer Probe wurde die mittlere Expression drei technischer Replikate verwendet.

2.4.2. Western Blot

Western Blot Experimente wurden zur semiquantitativen Analyse von Proteinen durchgeführt. Hierzu wurden Epithelien als ALI kultiviert und durch Zugabe von 25 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer und 25 µl H_2O lysiert. Die Proben wurden in Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert. Zum Zellaufschluss wurden die Proben einer Ultraschallbehandlung ausgesetzt. Es wurden 5 µl Sample Reducing Agent hinzugegeben und die Proben zur Denaturierung der Proteine 10 min bei 70°C erhitzt.

Je 20 µl einer Probe wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel mit einem Totalmonomerkonzentrationsgradienten von 4-12 % aufgetragen und die Proteine mittels Gelelektrophorese in MES-Puffer nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Elektrophoresekammer wurde mit einer Spannung von 200 mV betrieben. Im Anschluss wurden die Proteine durch Elektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Detektion der Zielproteine wurde mit dem Western Breeze™ Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit durchgeführt. Mit dem Proteinfarbstoff Ponceau S wurde eine Kontrollfärbung durchgeführt und die Membran danach 30 min in Blockierungspuffer inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation für 60 min mit dem Primärantikörper, der 1:500 in einer Antikörperlösung verdünnt wurde. Ein Antikörper gegen β-Actin, das als Referenzprotein diente, wurde 1:2500 verdünnt eingesetzt. Anschließend wurde die Membran viermal mit einer Waschlösung gewaschen und für 30 min mit einer Sekundärantikörperlösung inkubiert. Es folgte erneut ein viermaliges Waschen mit

Waschlösung sowei ein zweimaliges Waschen mit Wasser. Zur Darstellung der Proteinbanden wurde die Membran nun mit chromogenem Substrat inkubiert.

2.5. Immunzytochemie

Zur immunzytochemischen Darstellung von Proteinen wurden die Zellen mit Methanol fixiert. Hierzu wurden ALI-Epithelien in eine Zellkulturplatte überführt und basolateral 400 µl sowie apikal 50 µl eiskaltes Methanol hinzugegeben und für 12 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Epithelien mit PBS gewaschen, indem das Methanol gegen PBS ausgetauscht wurde. Um einen abrupten Temperaturwechsel zu verhindern, wurde bei der ersten Waschung eisgekühltes PBS, bei der zweiten Waschung PBS mit 4°C und bei der dritten Waschung PBS mit Raumtemperatur verwendet. Zur Permeabilisierung der Zellen folgte eine Inkubation in Triton-X 100 haltigem Blockierungspuffer (s. Tabelle 3) mit 400 µl basolateral und 50 µl apikal für 30 min. Danach wurden Primärantikörper gegen die Zielproteine 1:300 in Antikörperlösung (s. Tabelle 3) verdünnt. Der Blockierungspuffer wurde entfernt und die Epithelien apikal mit 50 µl des verdünnten Primärantikörpers überschichtet und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Zellen im Anschluss dreimal mit PBS gewaschen. Fluoreszierenden Sekundärantikörper wurden 1:800 in Antikörperlösung verdünnt. Zur Darstellung der Zellkerne wurden 2 $\frac{ng}{ml}$ des DNA-Farbstoffes HOECHST 33342 hinzugegeben. Die Epithelien wurden apikal mit 50 µl der verdünnten Sekundärantikörper überschichtet und 35 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Epithelien erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Bilder der gefärbten Epithelien wurden mit dem iMic Digital Microscope als Epifluoreszenz oder mit strukturierter Beleuchtung aufgenommen. Bearbeitung und Analyse der Bilder wurde mit Image J durchgeführt.

2.6. Statistische Analyse

Ergebnisse wurden als arithmetisches Mittel ± SEM (standard error of the mean = Standardfehler) dargestellt. Dabei gilt SEM $= \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ mit σ = Standardabweichung der Grundgesamtheit und n = Stichprobenumfang. Abweichende Darstellungen sind entsprechend angegeben.

Bei in dieser Arbeit vorgelegten Daten handelte es sich stets um unabhängige, proportionalskalierte Stichproben, die nicht-normalverteilt waren. Um zu überprüfen, ob sich die zentrale Tendenz zweier Stichproben statistisch signifikant unterscheidet, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Rangsummentest eingesetzt. Wurden mehr als zwei Stichproben miteinander verglichen, erfolgte die Ermittlung der sich signifikant unterscheidenden Stichproben mit der zweiseitigen Dunns Prozedur als Post-Hoc Test. Da es sich hierbei um multiples Testen handelt, was mit einer Akkumulation des α-Fehlers einhergeht, wurde das Signifikanzniveaus nach der Bonferroni-Methode korrigiert. Hierbei wurde das adjustierte Signifikanzniveau p^* als $p^* < \frac{\alpha}{n}$ berechnet, wobei α = Signifikanzniveau und n = Anzahl der Paarvergleiche ist.

In den Abbildungen 4 - 8 und 27 wurde für die Ermittlung des Volumenflusses eine lineare Regression durch die Daten des jeweils korrelierenden Volumen-Zeit-Diagrammes durchgeführt. Um zu überprüfen, ob sich die Steigungen der Regressionsgeraden zweier Stichproben statistisch signifikant unterscheiden, wurde hier der F-Test eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Volumenresorption nach apikaler Volumenexpansion (AVE)

3.1.1. LRS (low resorptive state) und HRS (high resorptive state)

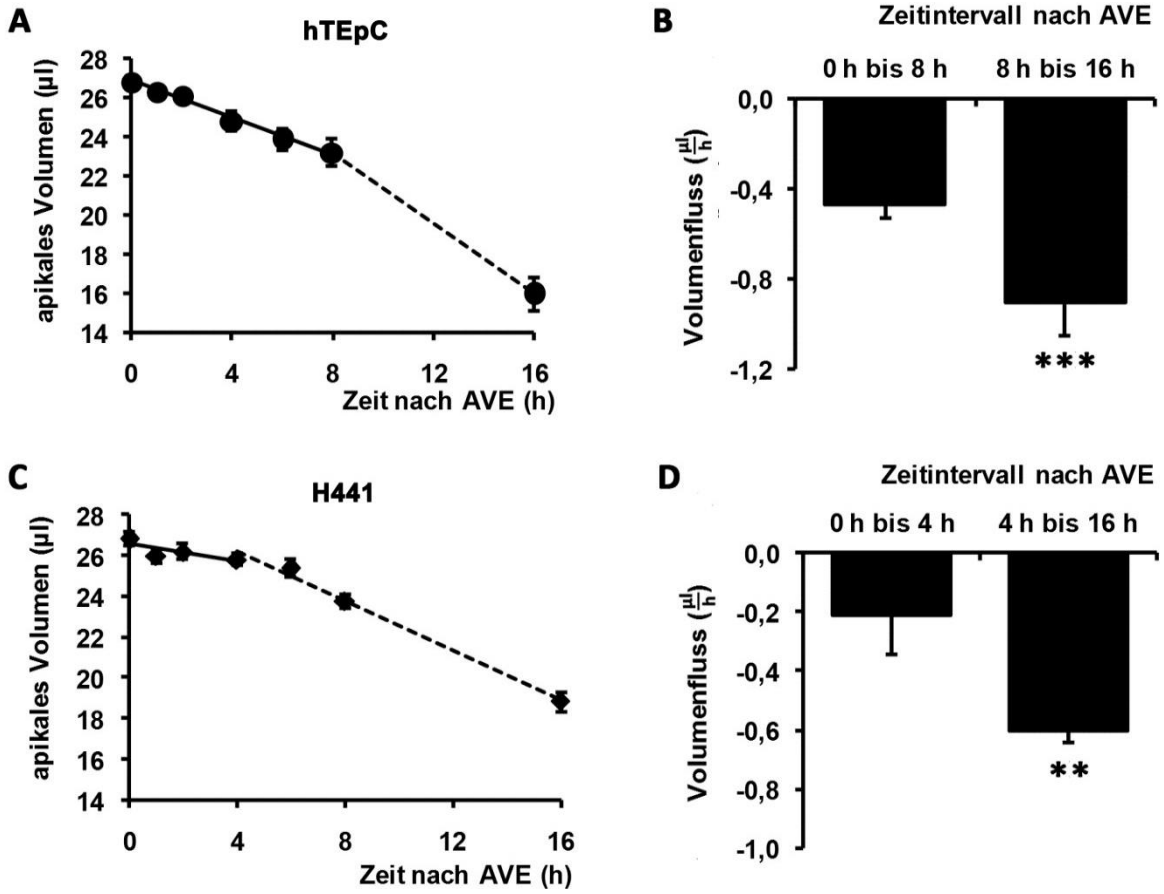

Abbildung 4 Volumenresorption nach AVE (apikale Volumenexpansion) in hTEpC (human tracheal epithelial cells = humane Trachealepithelzellen) (**A**+**B**) (n=9) und NCI-H441-Zellen (**C**+**D**) (n=18). Auf die apikale Oberfläche des Epithels wurden 25 µl isotoner NaCl-Lösung zugegeben und das apikale Volumen im Zeitverlauf mittels D_2O-Dilutionsmethode gemessen. Der Volumenfluss (**B**+**D**) entspricht der Steigung der Regressiongeraden im entsprechenden Zeitintervall aus **A** bzw. **C** ± Standardfehler der Steigung. F-Test: $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***).

Um die Volumenresorption nach einer apikalen Volumenexpansion (AVE) zu untersuchen, wurden 25 µl isotonischer Kochsalzlösung auf die apikale Oberfläche des Epithels gegeben.

Das apikale Restvolumen wurde mittels der Deuteriumoxiddilutionsmethode über einen Zeitraum von 16 h nach AVE (Abbildung 4) gemessen. Unmittelbar nach der AVE konnte eine Phase mit niedriger Resorptionsrate (LRS = low resorptive state) beobachtet werden. Die Resorptionsrate betrug hierbei 0,46 ± 0,06 $\frac{\mu l}{h}$ in hTEpC-Epithelien und 0,21 ± 0,13 $\frac{\mu l}{h}$ in H441-Epithelien. Auf diese LRS folgte eine Phase mit hoher Resorptionsrate (HRS = high resorptive state) mit Transportraten von 0,91 ± 0,14 $\frac{\mu l}{h}$ (hTEpC) bzw. 0,60 ± 0,04 $\frac{\mu l}{h}$ (H441). Der Beginn des HRS lag in hTEpC-Epithelien etwa bei 8 h und in H441-Epithelien bei 4 h nach AVE. Diese Experimente zeigen, dass ALI-Epithelien unterschiedliche resorptive Zustände einnehmen können.

3.1.2. Abhängigkeit des resorptiven Zustandes vom apikalen Volumen

Ein möglicher Mechanismus, um das ASL-Volumen zu regulieren, könnte die Modulation der Transportrate über das Epithel in Abhängigkeit des apikalen Volumens sein. Um dies zu untersuchen, wurde die Resorption in H441-Epithelien nach AVE mit 5 µl, 10 µl, 15 µl und 25 µl gemessen (Abbildung 5).

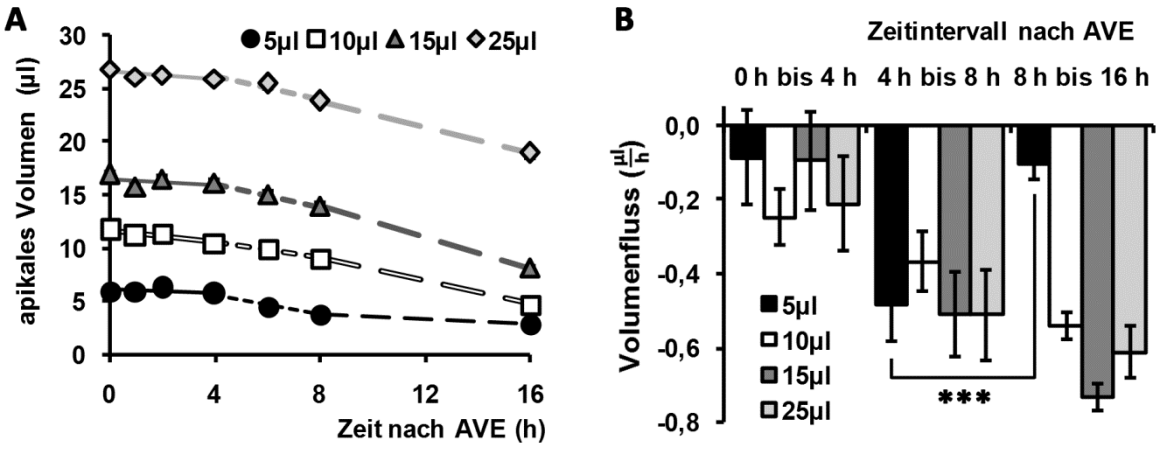

Abbildung 5 Volumenresorption nach AVE (apikale Volumenexpansion) in NCI-H441-Epithelien (n=18). Auf die apikale Oberfläche des Epithels wurden 5, 10, 15 oder 25 µl isotoner NaCl-Lösung zugegeben und das apikale Volumen im Zeitverlauf mittels D_2O-Dilutionsmethode gemessen. Der Volumenfluss (**B**) entspricht der Steigung der Regressiongeraden im entsprechenden Zeitintervall aus **A** ± Standardfehler der Steigung. F-Test: $p < 0,001$ (***).

In allen vier Bedingungen war zwischen 0 h und 4 h ein LRS zu sehen, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Resorptionsraten bestand. 4 h nach AVE begann in allen Bedingungen ein HRS mit einer ca. 2,5-fach gesteigerten Resorptionsrate gegenüber dem LRS. Bei einer AVE mit 10 µl, 15 µl und 25 µl hielt das HRS bis zum Messpunkt nach 16 h an. Wurde die AVE mit 5 µl durchgeführt, zeigte sich hingegen nach 8 h eine Abnahme der Resorptionsrate auf LRS-Niveau. Zu diesem Zeitpunkt war noch ein apikales Restvolumen von 3,71 ± 0,19 µl vorhanden. Nach 16 h betrug das verbleibende apikale Volumen 2,88 ± 0,27 µl. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass der Übergang von LRS zu HRS reversibel ist. Um diese Reversibilität zu testen, wurden H441-Epithelien zunächst für 24 h mit 5 µl AVE vorinkubiert, um eine nahezu vollständige Resorption des hinzugegebenen apikalen Volumens zu erreichen. Im Anschluss wurde eine AVE mit 25 µl durchgeführt und die Resorption über einen Zeitraum vom 16 h gemessen (Abbildung 6).

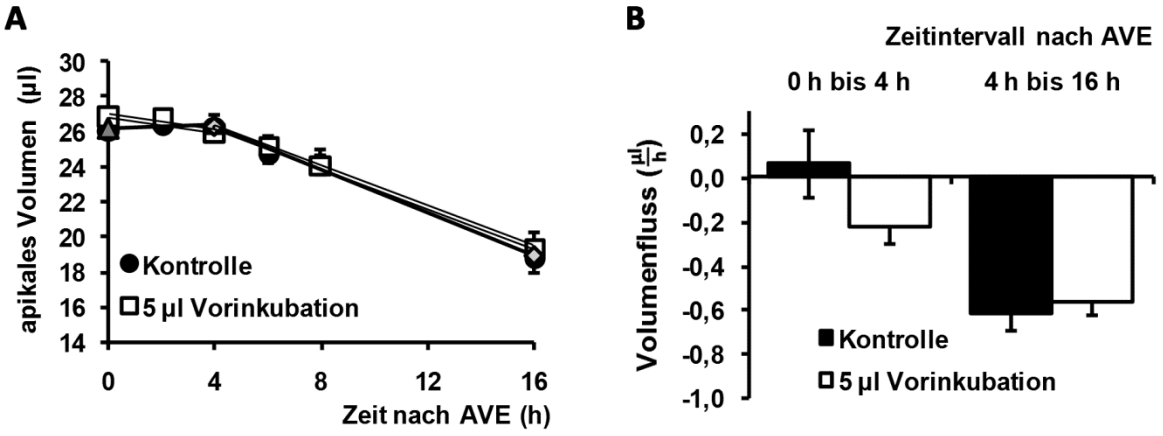

Abbildung 6 Volumenresorption nach AVE (apikale Volumenexpansion) in NCI-H441-Epithelien (n=8). Die Hälfte der Epithelien wurde für 24 h mit 5 µl isotoner NaCl-Lösung auf der apikalen Oberfläche vorinkubiert. Im Anschluss wurden alle Epithelien mit 25 µl isotoner NaCl-Lösung auf der apikalen Oberfläche beladen und das apikale Volumen im Zeitverlauf mittels D_2O-Dilutionsmethode gemessen. Der Volumenfluss (**B**) entspricht der Steigung der Regressiongeraden im entsprechenden Zeitintervall aus **A** ± Standardfehler der Steigung.

Die vorinkubierten Zellen zeigten wie die Kontrollbedingung zu Beginn ein LRS, wobei die Resorptionsrate bei den vorinkubierten Zellen geringgradig gegenüber der Kontrolle erhöht

war. Der Beginn des HRS sowie die Resorptionsrate im HRS waren unter beiden Bedingungen identisch.

Somit zeigte sich, dass der Beginn des HRS sowie die Transportrate im HRS unabhängig vom apikalen Volumen sind. Der Übergang von LRS zum HRS ist dabei reversibel.

3.1.3. Einfluss von Amilorid und Proteaseinhibitoren auf die Resorption

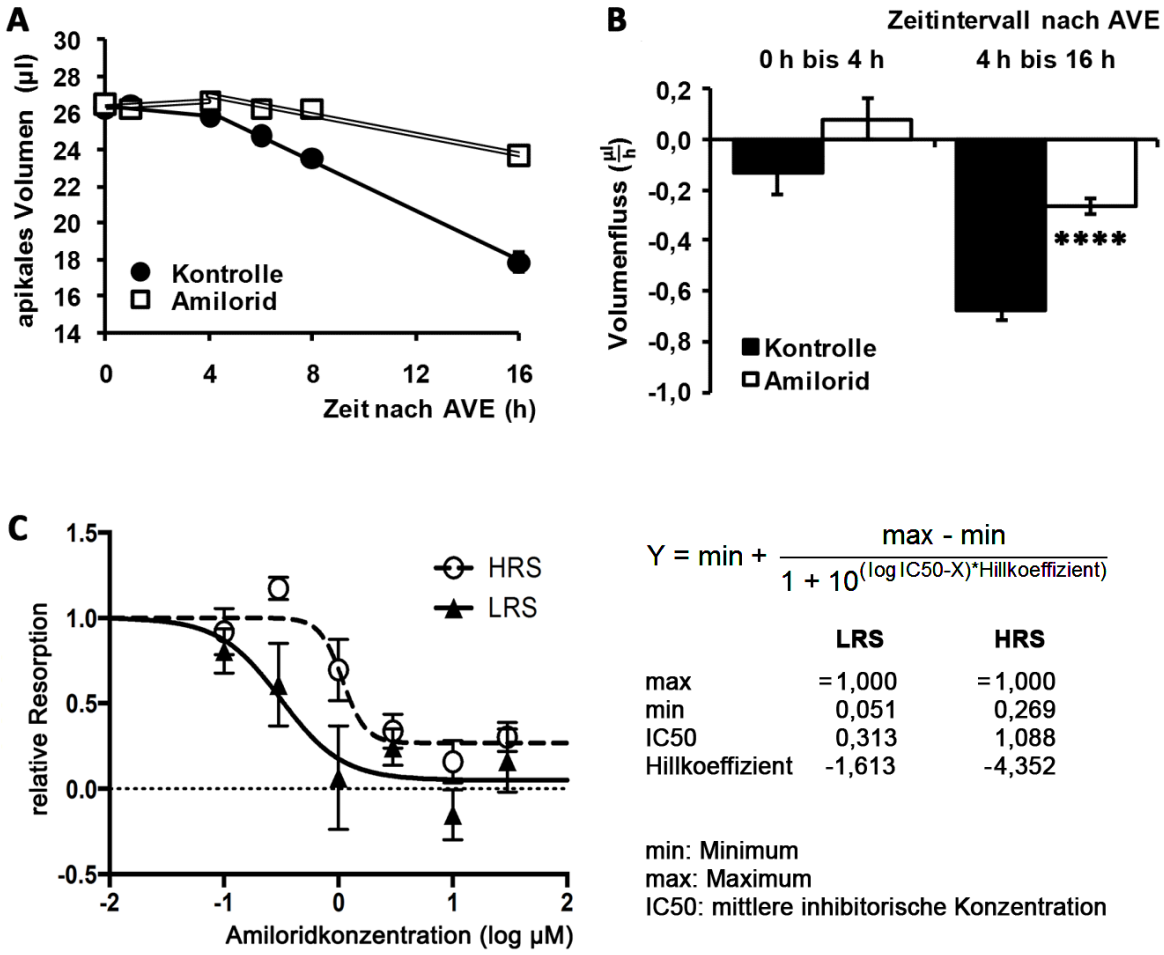

Abbildung 7 Amiloridsensitivität der Volumenresorption nach AVE (apikale Volumenexpansion) in NCI-H441-Epithelien. Auf die apikale Oberfläche der Epithelien wurden 25 µl isotoner NaCl-Lösung zugegeben und das apikale Volumen im Zeitverlauf mittels D_2O-Dilutionsmethode gemessen. **A+B:** Messung der Volumenresorption ± Amilorid 30 µM apikal und basolateral. Der Volumenfluss (**B**) entspricht der Steigung der Regressiongeraden im entsprechenden Zeitintervall aus **A** ± Standardfehler der Steigung. **C:** Volumenresorption in Abhängigkeit der Amiloridkonzentration relativ zur Volumenresorption ohne Amilorid. Der Volumenfluss wurde im LRS (low resorptive state = Phase niedriger Resorptionsrate) zwischen 0 h und 4 h nach AVE und im HRS (high resorptive state = Phase hoher Resorptionsrate) zwischen 8 h und 16 h nach AVE gemessen und mittels Hill-Gleichung eine Dosis-Wirkungs-Beziehung berechnet. F-Test: $p < 0{,}0001$ (****).

Eine wichtige Determinante der Volumenresorption in Lungenepithelien ist die Natriumresorption durch den epithelialen Natriumkanal (ENaC). Um zu untersuchen, ob die ENaC-Modulation im Sinne einer proteolytischen Aktivierung des Kanals den Übergang zum HRS beeinflusst, wurde die Resorption nach AVE in H441-Zellen in der Gegenwart von Amilorid sowie eines Proteaseinhibitorcocktails gemessen.

Die Inhibition der Natriumresorption via ENaC mit Amilorid (Abbildung 7) führte sowohl im LRS als auch im HRS zu einer Reduktion des Volumenflusses. Dabei kam es im LRS bis 4 h nach AVE zu einer geringfügigen Reduktion der Resorption auf 0,08 ± 0,08 $\frac{\mu l}{h}$ (Kontrolle: -0,13 ± 0,08 $\frac{\mu l}{h}$). Im HRS zwischen 4 h und 16 h nach AVE war die Resorptionsrate mit -0,26 ± 0,03 $\frac{\mu l}{h}$) signifikant vermindert (Kontrolle: -0,67 ± 0,04 $\frac{\mu l}{h}$). Um zu überprüfen, ob eine AVE die Amilorid Sensitivität der Resorption beeinflusst, wurde die Resorption während des LRS und HRS mit steigenden Amiloridkonzentrationen gemessen (Abbildung 6 C). Unter Verwendung der Hill-Gleichung wurde eine Näherungskurve für einen Dosis-Wirkungszusammenhang berechnet. Dabei zeigte sich, dass die mittlere inhibitorische Amiloridkonzentration (IC50) während des HRS (1,088 µM) im Vergleich zum LRS (0,313 µM) erhöht war. Die Resorption war im LRS durch Amilorid vollständig inhibierbar, während im HRS auch ein Amilorid insensitiver Anteil an der Resorption beobachtet wurde.

Um den Einfluss der proteolytischen ENaC-Aktivierung als Folge der AVE durch extrazelluläre Proteasen zu untersuchen, wurde die Volumenresorption in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren gemessen (Abbildung 8). Hierbei konnte im LRS eine Reduktion der Resorptionsrate auf 0,12 ± 0,08 $\frac{\mu l}{h}$ (Kontrolle: -0,18 ± 0,06 $\frac{\mu l}{h}$) beobachtet werden. Der Volumenfluss im HRS wurde durch die Proteaseinhibitoren nicht beeinflusst. Dies weist darauf hin, dass die Resorption sowohl im LRS als auch im HRS ENaC-abhängig ist. Jedoch beeinflusst die Modulation von ENaC nicht den Übergang von LRS zu HRS.

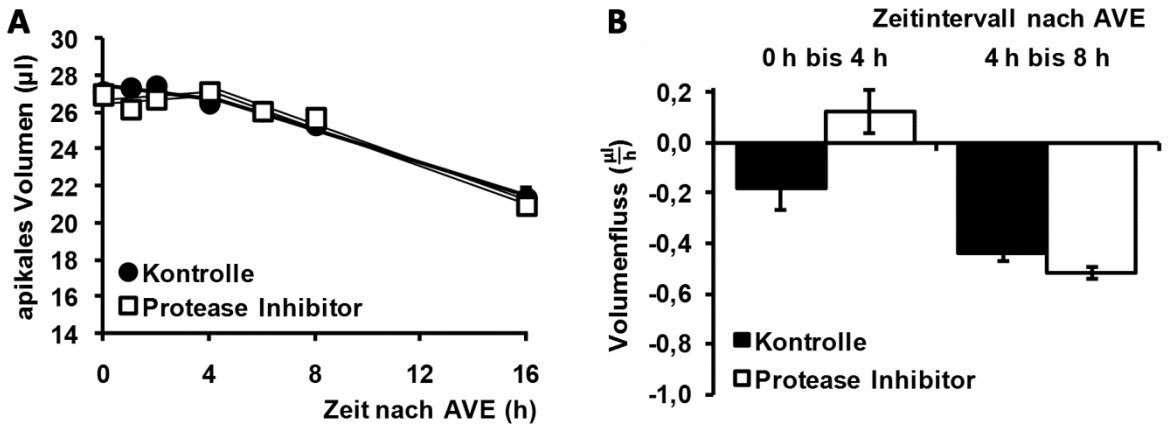

Abbildung 8 Einfluss der proteolytischen ENaC-Aktivierung auf die Volumenresorption nach AVE (apikale Volumenexpansion) in NCI-H441-Epithelien (n=17-18). Die Epithelien wurden mit 25 µl isotoner NaCl-Lösung auf der apikalen Oberfläche beladen und das apikale Volumen im Zeitverlauf mittels D_2O-Dilutionsmethode gemessen. Zur Inhibition der proteolytischen Aktivierung des ENaC (epithelial Na^+-channel = epithelialer Natriumkanal) wurde bei der Hälfte der Epithelien ein Proteaseinhibitorcocktail zugegeben. Der Volumenfluss (**B**) entspricht der Steigung der Regressiongeraden im entsprechenden Zeitintervall aus **A** ± Standardfehler der Steigung.

3.2. Modulation des aktiven Natriumtransportes infolge einer AVE

3.2.1. Eine AVE führt zu einer proteolytischen ENaC-Aktivierung

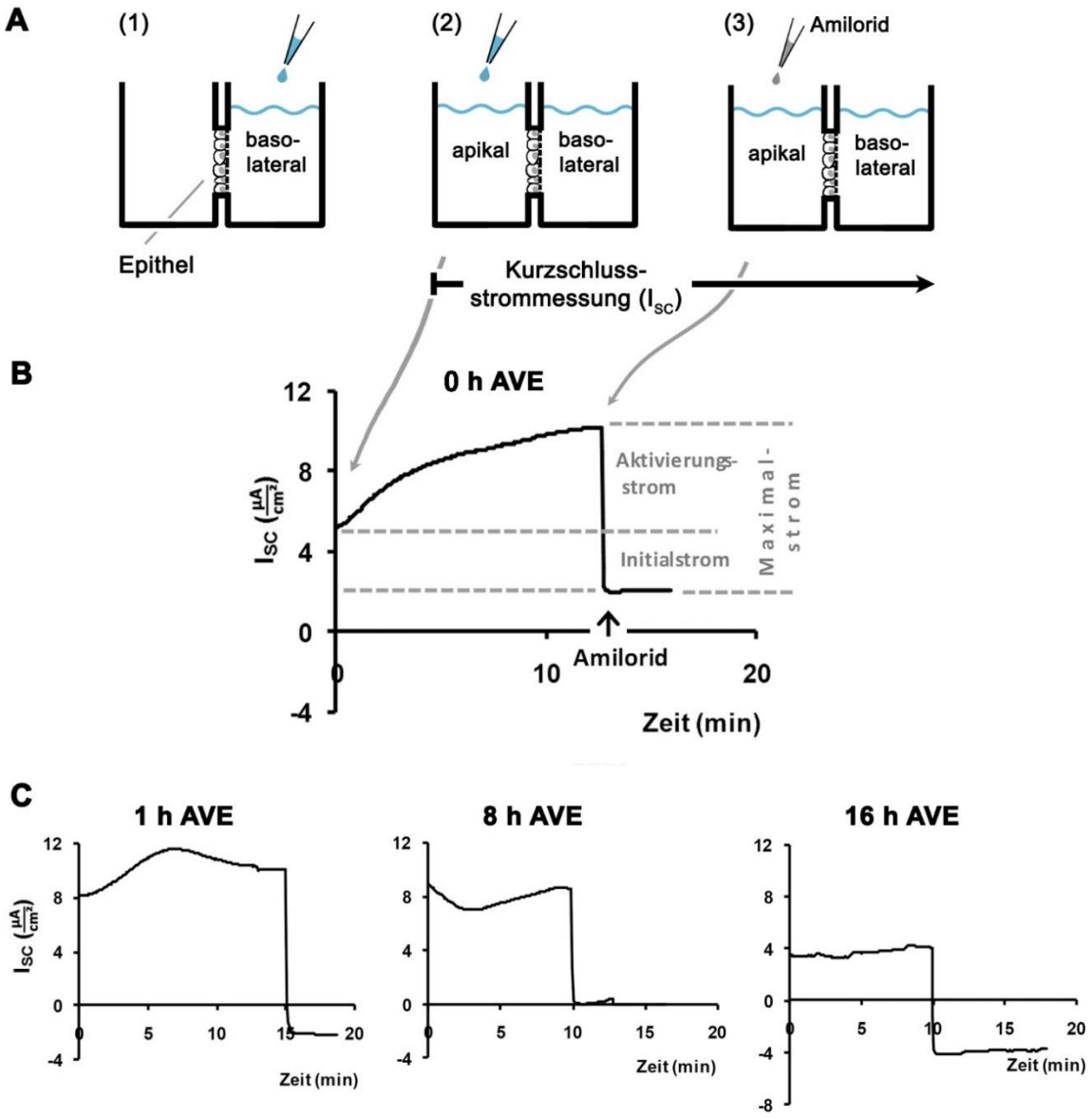

Abbildung 9 Kurzschlussstrom (I_{SC}) in NCI-H441-Epithelien nach AVE (apikale Volumenexpansion). Die apikale Oberfläche der Epithelien wurde mit 25 µl isotoner NaCl-Lösung beladen. Nach 0 h, 1 h, 8 h oder 16 h wurden die Epithelien in die Ussing-Kammer eingesetzt und zunächst die basolaterale, dann die apikale Kammer mit HEPES-Ringer-Lösung (s. Tabelle 3) befüllt (HEPES: Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure). Das Befüllen der apikalen Kammer entspricht einer massiven AVE. Nach Erreichen eines Plateaus wurde der ENaC-Inhibitor (ENaC: epithelial Na^+-channel = epithelialer Natriumkanal) Amilorid (30 µM) in die apikale Kammer zugegeben (**A**). Dargestellt sind exemplarische Messungen von Epithelien, die nach 0 h AVE (**B**) bzw. nach 1 h, 8 h oder 16 h AVE (**C**) in die Ussing-Kammer eingesetzt wurden.

Zur Untersuchung der proteolytische ENaC-Aktivierung als Folge einer AVE wurden H441-Epithelien für 0 h, 1 h, 8 h oder 16 h mit 25 µl AVE inkubiert und anschließed der Kurzschlussstrom (I_{SC}) in der Ussing-Kammer gemessen. Die Befüllung des apikalen Kompartiments der Ussing-Kammer stellt eine massive AVE dar (Abbildung 9 A), deren Auswirkung auf den Ionentransport sich als Veränderung des messen lässt.

Nach 0 h AVE mit 25 µl (Abbildung 9 B) zeigte sich unmittelbar nach Befüllung des apikalen Kompartiments ein Anstieg des I_{SC}, der nach 10 bis 15 min ein stabiles Niveau erreichte. Dieser I_{SC}-Anstieg wurde als Aktivierungsstrom bezeichnet. Durch Zugabe von Amilorid (30 µM) konnte der I_{SC} durch spezifische Inhibition von ENaC reduziert werden. Der Amilorid sensitive I_{SC} (Maximalstrom) entspricht dem Anteil des I_{SC}, der durch ENaC vermittelt wird. Die Differenz zwischen dem I_{SC} zu Beginn der Messung und dem Residualstrom nach Amiloridgabe enspricht dem Initialstrom. Dieser Initialstrom repräsentiert die ENaC, die vor der Befüllung des apikalen Kompartiments bereits aktiviert sind.

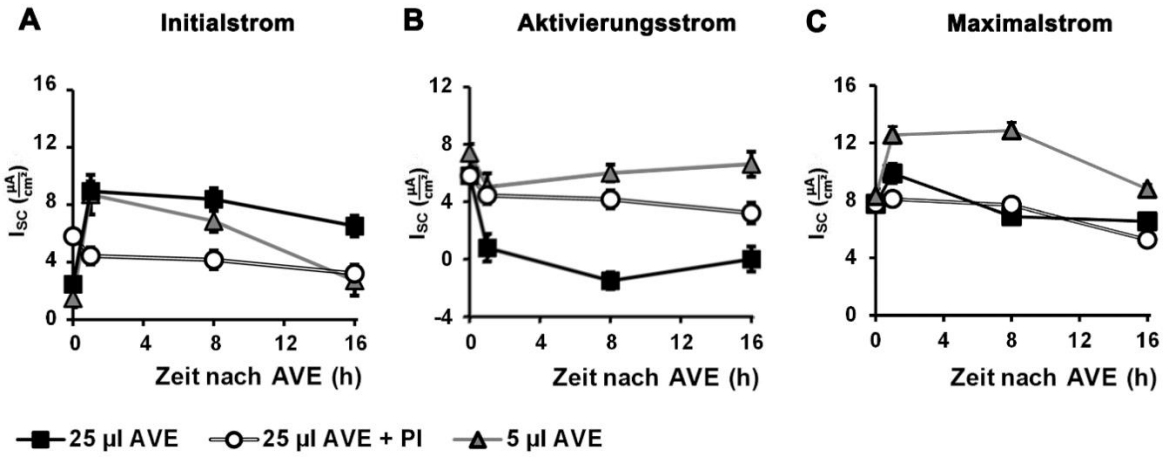

Abbildung 10 Kurzschlussstrom (I_{SC}) in NCI-H441-Epithelien nach AVE (apikale Volumenexpansion). Die apikale Oberfläche der Epithelien wurde mit 5 µl oder 25 µl isotoner NaCl-Lösung beladen. Nach 0 h, 1 h, 8 h oder 16 h wurden die Epithelien in die Ussing-Kammer eingesetzt und der I_{SC} gemessen. Initialstrom (**A**), Aktivierungsstrom (**B**) und Maximalstrom (**C**) wurden entsprechend Abbildung 8 B berechnet. PI (Proteaseinhibitorcocktail) wurde zur Inhibition der proteolytischen ENaC-Aktivierung (ENaC: epithelial Na^+-channel = epithelialer Natriumkanal) der apikalen Lösung während der AVE zugegeben. n = 10 - 22.

Epithelien wiesen nach 0 h AVE einen geringen Initialstrom (Abbildung 10 A) und einen hohen Aktivierungsstrom (Abbildung 10 B) auf. Nach 1 h AVE konnte fast kein Aktivierungsstrom mehr beobachtet werden, der Initialstrom war erhöht und entsprach dem Maximalstrom. Nach 8 h oder 16 h AVE kam es zu keiner weiteren Änderung der ENaC-Aktivität. Der Maximalstrom wurde durch die AVE nicht maßgeblich beeinflusst (Abbildung 10 C). Um zu überprüfen, ob der Aktivierungsstrom auf eine proteolytische ENaC-Aktivierung zurückzuführen ist, wurden die Experimente mit einem Proteaseinhibitorcocktail (PI) in der apikalen Lösung während der AVE durchgeführt. Hierbei kam es nach 1 h, 8 h und 16 h AVE zu keinem Anstieg des Initialstroms und es wurde weiterhin ein Aktivierungsstrom in der Ussing-Kammer beobachtet.

In Abschnitt 3.1.2. konnte die Reversibilität des HRS in Abhängigkeit des apikalen Volumens gezeigt werden, da bei einer Reduktion des ASL-Volumens auf 2,88 ± 0,27 µl nach 8 h AVE eine Abnahme der Resorptionsrate stattfand. Diese verminderte Resorption könnte durch eine Modulation der ENaC-Aktivität bedingt sein. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die in Abschnitt 3.2.1. beschriebenen Ussing-Kammer Experimente mit einer AVE mit 5 µl Volumen durchgeführt. Bei Epithelien mit 5 µl AVE war die initiale ENaC-Aktivität nach 16 h im Mittel um 3,82 $\frac{\mu A}{cm^2}$ gegenüber Epithelien mit 25 µl AVE vermindert (Abbildung 10 A). Dies korreliert mit der Abnahme der Resorptionsrate zwischen 8 h und 16 h (Vgl. Abschnitt 3.1.2.). Der Vergleich der Aktivierungsströme (Abbildung 10 B) zeigt, dass bei AVE mit 5 µl im Gegensatz zur AVE mit 25 µl auch nach 1 h, 8 h, und 16 h AVE in der Ussing-Kammer eine ENaC-Aktiverung stattfand. Zudem war der Maximalstrom bei Epithelien mit 5 µl AVE nach 1 h, 8 h, und 16 h AVE gegenüber Epithelien mit 25 µl AVE erhöht.

Die Ussing-Kammer Messungen zeigten, dass eine AVE in H441-Epithelien innerhalb von 10 bis 15 min zu einer proteolytischen ENaC-Aktivierung führt. Eine AVE von 1 h, 8 h oder 16 h führte zu keiner weiteren ENaC-Aktivierung oder Zunahme des maximalen ENaC-Stromes. Da die ENaC-Aktivierung nicht mit dem Beginn des HRS korreliert, kann eine AVE abhängige Modulation des Amilorid sensitiven Kurzschlussstromes als Ursache des HRS ausgeschlossen werden. Die Rückführung des Epithels vom HRS zum LRS 8 h nach AVE mit 5 µl lässt sich nach den Ergebnissen der Ussing-Kammer Experimente auf die Reversibilität der AVE induzierten Erhöhung des ENaC-vermittelten Initialstromes zurückführen.

3.2.2. Effekt auf die Na^+/K^+-ATPase-Aktivität

Die Triebkraft für die apikale Natriumresorption via ENaC wird durch den primär aktiven Transport der Na^+/K^+-ATPase bereitgestellt, die überwiegend an der lateralen Membran lokalisiert ist. Hierdurch gelangt das intrazelluläre Natrium in das basolaterale Kompartiment. Somit könnte die Na^+/K^+-ATPase-Aktivität im LRS einen limitierenden Faktor für die transepitheliale Resorption darstellen.

Die Na^+/K^+-ATPase-Aktivität von H441-Epithelien wurde in Ussing-Kammer Experimenten untersucht. Hierzu wurden die Zellen nach 0 h, 1 h und 8 h AVE mit 25 µl in die Ussing-Kammer eingesetzt. Zur Messung der Na^+/K^+-ATPase-Aktivität wurde entsprechend Abbildung 11 A der ENaC abhängige Ionentransport mit Amilorid inhibiert, anschließend die apikale Membran mit Amphotericin B permeabilisiert und die Na^+/K^+-ATPase mit Ouabain inhibiert. Eine AVE führte zu keiner Veränderung der Na^+/K^+-ATPase-Aktivität.

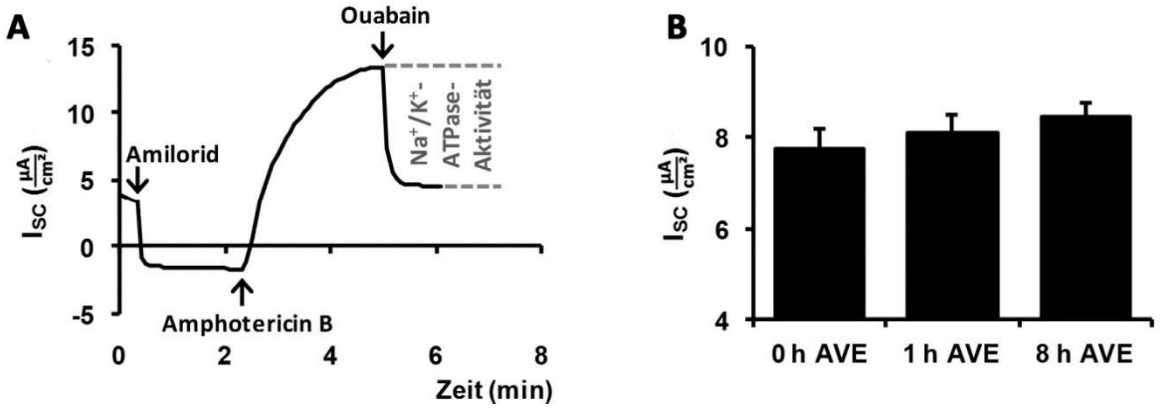

Abbildung 11 Messung der Na+/K+-ATPase-Aktivität (ATPase: Adenosintriphosphatase) nach AVE (apikale Volumenexpansion) in der Ussing-Kammer in NCI-H441-Epithelien. Die apikale Oberfläche der Epithelien wurde mit 25 µl isotoner NaCl-Lösung beladen. Nach 0 h, 1 h, oder 8 h wurden die Epithelien in die Ussing-Kammer eingesetzt und der Kurzschlussstrom (I_{SC}) gemessen. **A** zeigt eine exemplarische Messung. Zur Inhibition von ENaC (epithelial Na^+-channel = epithelialer Natriumkanal) wurde apikal Amilorid (30 µM) zugegeben, mittels Amphotericin B (20 µM) wurde die apikale Membran permeabilisiert und durch basolaterale Zugabe von Ouabain (1 mM) die Na^+/K^+-ATPase inhibiert. **B** zeigt die Na^+/K^+-ATPase-Aktivität nach 0 h, 1 h oder 8 h AVE. n = 4.

3.3. Einfluss der AVE auf den parazellulären Transport

Neben dem transzellulären Ionentransport bieten die parazellulären Zellkontakte einen Transportweg für Ionen und Makromoleküle. Hierbei wirken die Tight Junction-Komplexe limitierend auf den parazellulären Transport und könnten somit zur Modulation des transepithelialen Wassertransportes beitragen. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob der Wechsel zwischen dem LRS zum HRS mit Veränderungen von parazellulären Parametern korreliert ist.

3.3.1. Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER)

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) ist ein Maß für die transepitheliale Ionenpermeabilität und wird vor allem durch den parazellulären Widerstand bestimmt.

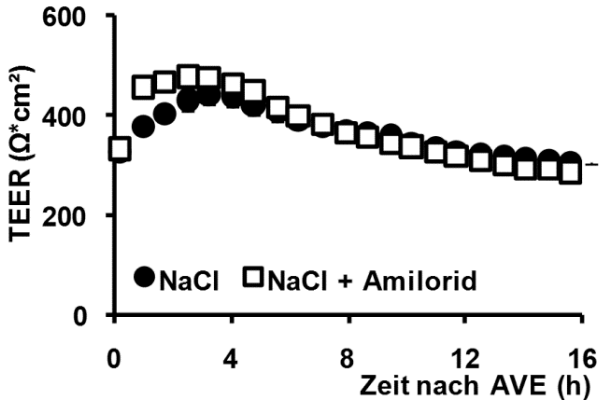

Abbildung 12 TEER (transepithelial electrical resistance = transepithelialer elektrischer Widerstand) während AVE (apikale Volumenexpansion). NCI-H441-Epithelien wurden apikal mit 150 µl isotoner NaCl-Lösung beladen und der TEER mittels Impedanzspektroskopie gemessen. Zur Inhibition des transzellulären Ionentransportes wurde ENaC (epithelial Na^+ channel = epithelialer Natriumkanal) mittels Amilorid (30 µM) gehemmt. n = 8.

Abbildung 12 zeigt den TEER-Verlauf nach AVE. Der TEER war in den ersten 4 bis 6 h nach AVE erhöht und fiel dann allmählich auf Werte unterhalb des Ausgangsniveaus ab. Die Inhibition des aktiven Ionentransports durch Amilorid führte zu keiner wesentlichen Veränderung des TEER-Verlaufs.

3.3.2. Parazelluläre Größenselektivität

Die transepitheliale Permeabilität für Moleküle verschiedener Molekulargewichte als Maß für die parazelluläre Größenselektivität wurde mittels eines Fluoreszenzassays für Fluorescein (0,43 kDa) und FITC gekoppelte Dextrane (4 kDa und 20 kDa) gemessen (Abbildung 13). Hierbei zeigte sich nach 16 h AVE ein diskreter Anstieg der Permeabilität für die getesteten Marker, wobei der apparente Permeabilitätskoeffizient für die makromolekularen Dextrane weiterhin auf niedrigem Niveau blieb. Dies spricht dafür, dass die beobachteten funktionellen Veränderungen des parazellulären Transportweges infolge einer AVE nicht zum Verlust der epithelialen Integrität führen.

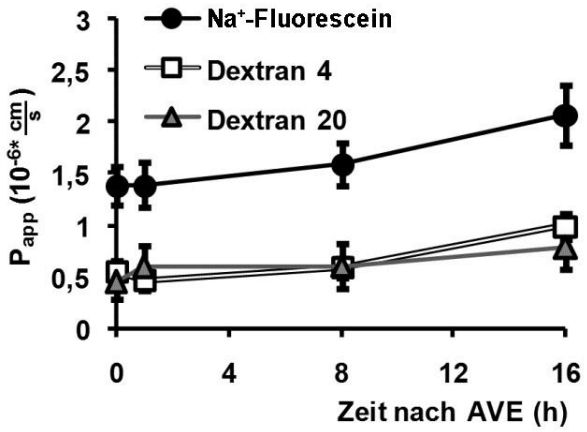

Abbildung 13 Permeabilität von NCI-H441-Epithelien nach AVE (apikale Volumenexpansion) Die apikale Oberfläche der Epithelien wurde mit 25 µl isotoner NaCl-Lösung beladen und nach 0 h, 1 h, 8 h und 16 h der apparente Permeabiltätskoeffizient (P_{app}) für die Marker Na^+-Fluorescein, 4 kDa Dextran (Dextran 4) und 20 kDa Dextran (Dextran 20) bestimmt. n = 8.

3.3.3. Parazelluläre Ladungsselektivität

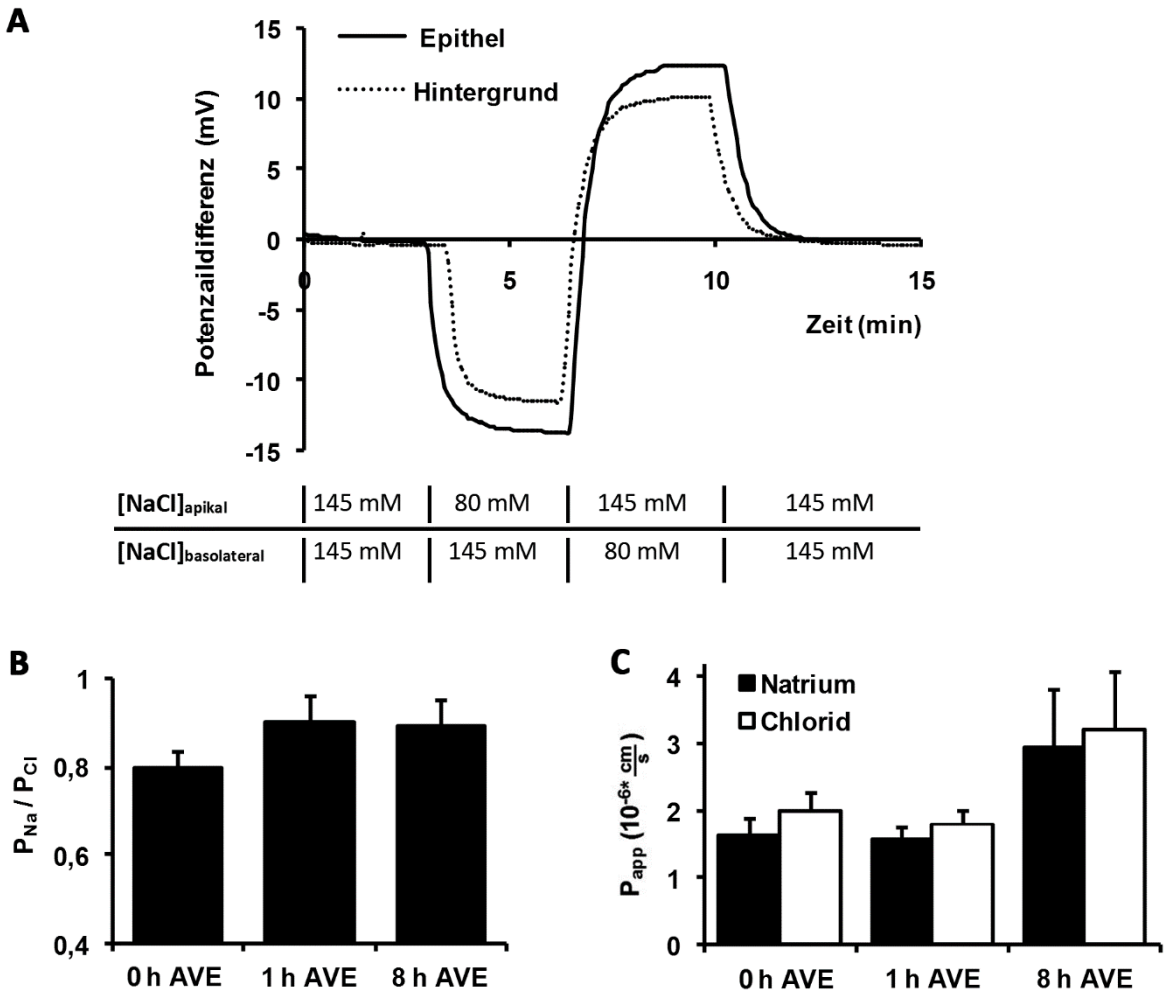

Abbildung 14 Parazelluläre Ladungsselektivität nach AVE (apikale Volumenexpansion). Die apikale Oberfläche von NCI-H441-Epithelien wurde mit 25 µl einer isotonen NaCl-Lösung beladen und nach 0 h, 1 h und 8 h das Dilutionspotential in Ussing-Kammer Experimenten gemessen. **A**: Exemplarische Dilutionspotentialmessung nach 0 h AVE. Zwischen der apikalen und basolateralen Kammer wurden entsprechend der Tabelle Gradienten für NaCl eingestellt und die Potenzialdifferenz gemessen. NaCl wurde isoosmolar durch Sucrose ersetzt. Der Hintergrund wurde mit einem Filter ohne Epithel aufgezeichnet und subtrahiert. **B**: Verhältnis der Natriumpermeabilität (P_{Na}) gegenüber der Chloridpermeabilität (P_{Cl}). **C:** Apparenter Permeabilitätskoeffizient (P_{app}) für Natrium und Chlorid. n = 11 - 12.

Die parazelluläre Ladungsselektivität bezeichnet eine relativ größere Permeabilität der tight junctions für Anionen gegenüber Kationen bzw. umgekehrt und kann sich damit auf den parazellulären Ionentransport auswirken. Es wurde untersucht, ob eine AVE mit Veränderungen der Ladungsselektivität der parazellulären Kontakte der Epithelzellen einhergeht.

Die Ladungsselektivität wurde als Dilutionspotenzial in Ussing-Kammer Experimenten gemessen (Abbildung 14 A). Der aktive Ionentransport wurde durch Amilorid inhibiert. Nach 0 h AVE zeigten die Epithelien eine Selektivität für Chloridionen, wobei 1 hund 8 h AVE zu einer geringen Abnahme dieser Selektivität führten, die im statistischen Test keine Signifikanz erreichte (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0{,}36$). Nach 8 h AVE kam es zu keiner weiteren Veränderung der Ladungsselektivität. Damit besteht keine Korrelation zwischen dem Beginn des HRS und der parazellulären Ladungsselektivität. Die absolute Permeabilität war für Natrium- und Chloridionen nach 8 h AVE jeweils erhöht. Dies korreliert mit den in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Veränderungen des TEER.

3.3.4. Effekt einer AVE auf die Zusammensetzung der tight junctions

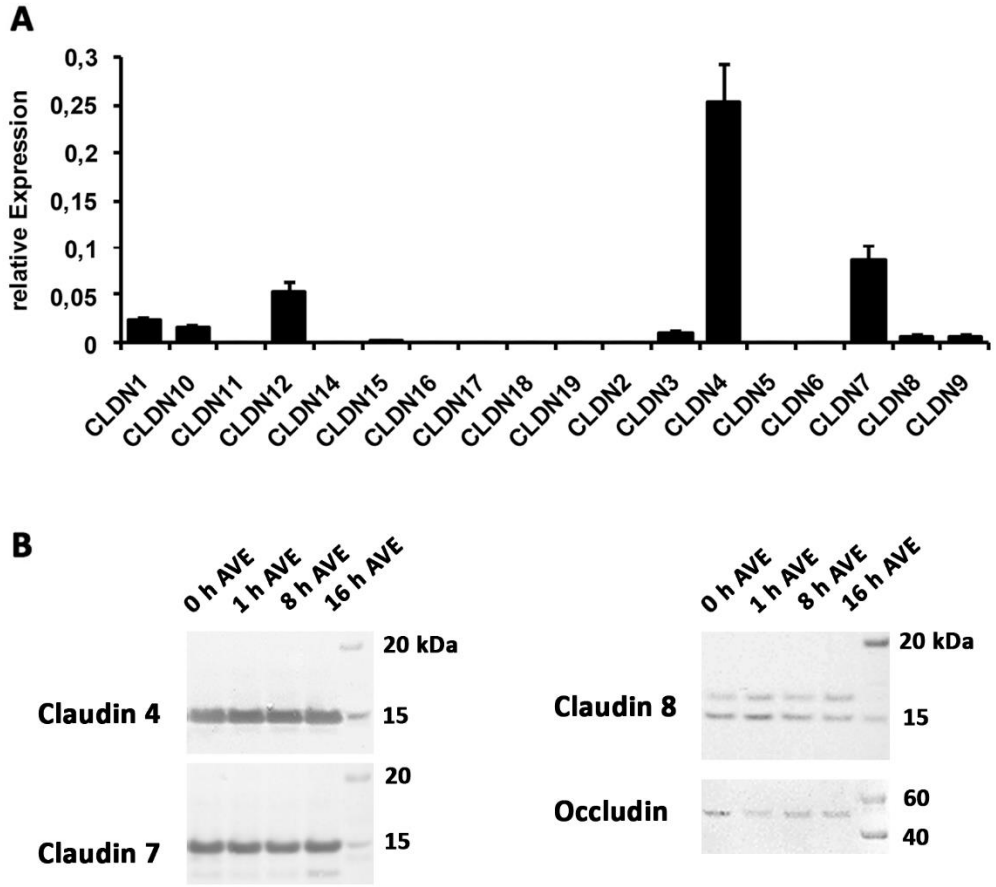

Abbildung 15 Tight junction Proteine in NCI-H441-Epithelien. **A:** Expression der Claudine (CLDN). In RT-PCR (real time polymerase chain reaction = Echtzeitpolymerasekettenreaktion) Experimenten wurde die Expression relativ zum Haushaltsgen HMBS (Hydroxymethylbilansynthase) ermittelt (n = 6 - 9). **B**: Tight junction Proteine nach AVE (apikale Volumenexpansion). Die apikale Oberfläche der Epithelien wurde mit 25 µl einer isotonen NaCl-Lösung beladen und nach 0 h, 1 h, 8 h und 16 h die tight junction Proteine Claudin 4, 7, 8 und Occludin in Western Blot Experimenten dargestellt.

Es sollte nun überpüft werden, ob die beobachteten diskreten Effekte einer AVE auf den TEER (siehe 3.3.1) und die parazelluläre Permeabilität (siehe 3.3.2) mit einer Veränderung der Proteinzusammensetzung der parazellulären Kontakte einhergehen. Hierzu wurde die Expression der Claudin in H441-Zellen mittels RT-PCR ermittelt (Abbildung 15 A) und die am stärksten exprimierten Claudine 4 und 7 sowie Claudin 8 als Interaktionspartner von

Claudin 4 und Occludin in Western Blot Experimenten untersucht (Abbildung 15 B). Eine AVE führte zu keiner Veränderung der Proteinlevel der untersuchten Claudine.

Somit zeigte sich bei der Untersuchung des parazellulären Transportweges, dass eine AVE zu diskreten Veränderungen von parazellulären Parametern führt, die jedoch nicht mit dem Beginn des HRS korreliert sind. Auf Proteinebene kam es zu keiner Veränderung der tight junction Proteine. Daher kann festgestellt werden, dass die Modulation des parazellulären Transportweges nicht der maßgebliche Mechanismus für den Beginn der gesteigerten Volumenresorption im HRS ist.

3.4. Modulation der epithelialen Wasserpermeabilität nach AVE

3.4.1. Eine AVE führt zu einem Anstieg der Osmopermeabilität

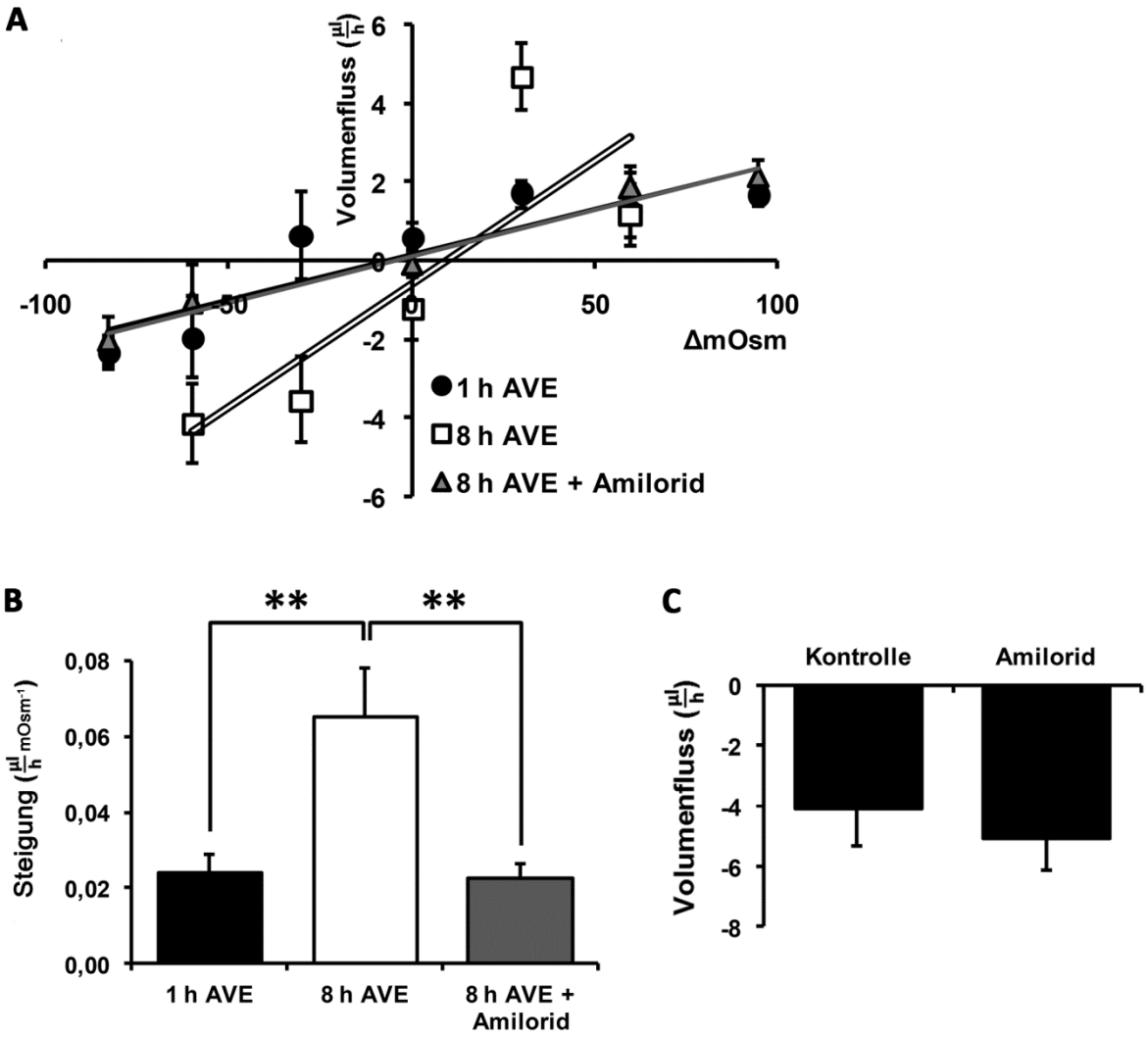

Abbildung 16 Osmopermeabilität in NCI-H441-Epithelien nach AVE (apikale Volumenexpansion). Die apikale Oberfläche der Epithelien wurde mit 25 µl einer isotonen NaCl-Lösung beladen und die Osmopermeabilität nach 1 h und 8 h gemessen. Durch Amilorid (30 µM) wurde während der AVE der ENaC (epithelial Na^+-channel = epithelialer Natriumkanal) abhängige Ionentransport inhibiert. **A**: Mittels Sucrose in der apikalen oder basolateralen Lösung wurden osmotische Gradienten angelegt und der daraus resultierende Volumenfluss gemessen (n = 6 - 12). **B**: Die Steigung der Regressionsgeraden aus **A** ± Standardfehler der Regression ist ein Maß für die Osmopermeabilität. **C**: Osmotische induzierter Volumenfluss (Gradient: 60 mOsm) nach 8 h AVE. Amilorid (30 µM) wurde erst bei Anlegen des osmotischen Gradienten zugegeben (n=6). Kruskal-Wallis-Test mit zweiseitiger Dunns Prozedur und Bonferroni-Korrektur des Signifikanzniveaus: p* < 0,005 (**).

Um zu überprüfen, ob sich die transepitheliale Wasserpermeabilität durch eine AVE verändert, wurde der durch einen osmotischen Gradienten induzierte Volumenfluss gemessen. Die Steigung einer Geraden durch die Messpunkte wurde mittels linearer Regression ermittelt und stellt ein direktes Maß für die osmotische Permeabilität dar.
H441-Epithelien hatten nach 8 h AVE eine höhere osmotische Permeabilität als nach 1 h AVE (Abbildung 16 B). Wurde die ENaC abhängige aktive Ionentransport während der AVE durch Amilorid inhibiert, war kein Anstieg der osmotischen Permeabilität zu sehen. Auch wenn Amilorid als selektiver ENaC-Inhibitor anerkannt ist, lässt sich eine Sensitivität der Osmopermeabilität gegenüber Amilorid nicht per se ausschließen. Um den Effekt von Amilorid auf die osmotische Permeabilität während des HRS zu untersuchen, wurden Epithelien einer AVE von 8 h ausgesetzt. Anschließend wurden 30 µM Amilorid zugegeben, ein resorptiver osmotischer Gradient eingestellt und der osmotisch induzierte Volumenfluss gemessen (Abbildung 16 C). Es zeigte sich, dass die Osmopermeabilität während des HRS Amilorid insensitiv ist.

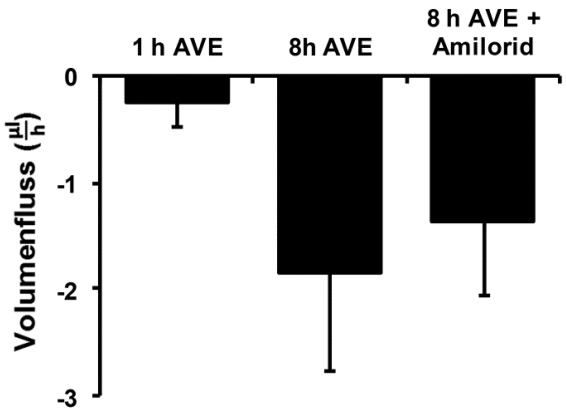

Abbildung 17 Osmotisch induzierter Volumenfluss in hTEpC (human tracheal epithelial cells = humane Trachealepithelzellen) nach AVE (apikale Volumenexpansion). Die apikale Oberfläche der Epithelien wurde mit 25 µl einer isotonen NaCl-Lösung beladen und nach 1 h und 8 h ein osmotischer Gradient angelegt (60 mOsm) und der daraus resultierende Volumenfluss gemessen. Durch Amilorid (30 µM) wurde während der AVE die Natriumresorption via ENaC (epithelial Na^+-channel = epithelialer Natriumkanal) inhibiert. (n = 5).

In hTEpC-Epithelien konnte ein vergleichbarer Effekt der AVE auf die osmotische Permeabilität gezeigt werden (Abbildung 17), wobei der Anstieg der Wasserpermeabilität im statistischen Test keine Signifikanz erreichte (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0{,}15$). Die Inhibition des ENaC abhängigen aktiven Ionentransportes mit Amilorid während der AVE verhinderte hier nur partiell den Anstieg der osmotischen Permeabilität nach 8 h AVE.

3.4.2. Cu^{2+}-Sensitivität der Osmopermeabilität

Aquaporine (AQP) können als Wasserporen in der Zellmembran den Anstieg der Wasserpermeabilität vermitteln. Um die Hypothese zu testen, dass AQP an der Zunahme der Osmopermeabilität nach AVE beteiligt sind, wurde der Einfluss des AQP-Inhibitors Cu^{2+} auf die Wasserpermeabilität nach AVE gestestet (Abbildung 18). Hierbei führte Cu^{2+} zu einer signifikanten Reduktion des Anstiegs der osmotischen Permeabilität nach 8 h AVE. Diese Ergebnisse zeigen, dass Cu^{2+} sensitive AQP an der Zunahme der osmotischen Permeabilität im HRS beteiligt sind.

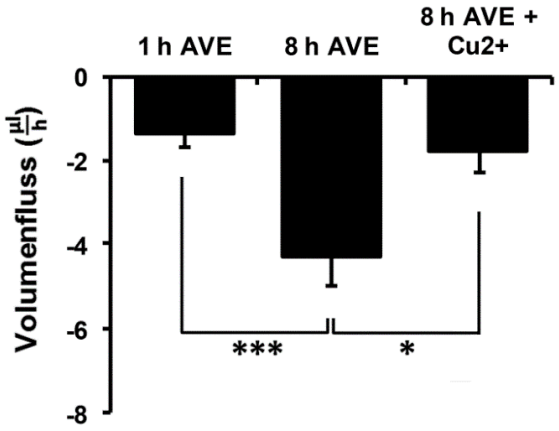

Abbildung 18 Osmotisch induzierter Volumenfluss in NCI-H441-Epithelien nach AVE (apikale Volumenexpansion). Die apikale Oberfläche der Epithelien wurde mit 25 µl einer isotonen NaCl-Lösung beladen und nach 1 h und 8 h ein osmotischer Gradient angelegt (60 mOsm) und der daraus resultierende Volumenfluss gemessen. Der Aquaporin-Inhibitor Cu^{2+} (1 mM) wurde bei Anlegen des osmotischen Gradienten zugegeben. ($n = 6 – 17$). Kruskal-Wallis-Test mit zweiseitiger Dunns Prozedur und Bonferroni-Korrektur des Signifikanzniveaus: $p^* < 0{,}025$ (*) und $p^* < 0{,}0005$ (***).

3.4.3. Aquaporine in H441- und hTEpC-Epithelien

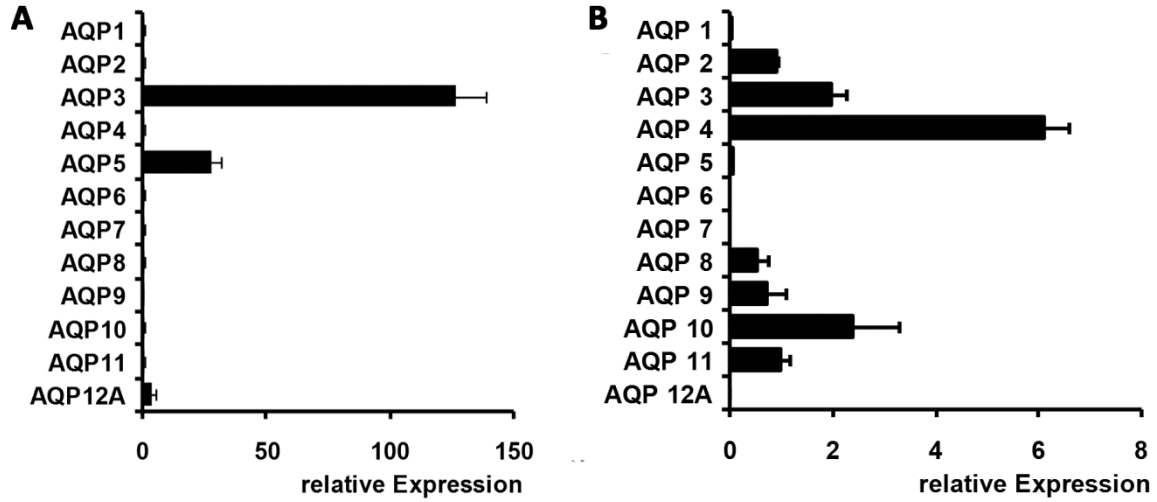

Abbildung 19 Expression der Aquaporine (AQP) in NCI-H441-Epithelien (**A**) und hTEpC (human tracheal epithelial cells = humane Trachealepithelzellen) (**B**). Mittels RT-PCR (real time polymerase chain reaction = Echtzeitpolymerasekettenreaktion) Experimenten wurde die Expression relativ zum Haushaltsgen HMBS (Hydroxymethylbilansynthase) ermittelt (n = 6 - 9).

IN RT-PCR Experimenten wurde die AQP-Expression (Abbildung 198 A und B) in H441-Epithelien und hTEpC-Epithelien untersucht. Hierbei zeigten sich in hTEpC-Epithelien die höchsten Expressionslevel für AQP 3 und 5, in H441-Epithelien für AQP 3, 4 und 10. Zum Nachweis der AQP auf Proteinebene wurden APQ 3 und AQP 5 in hTEpC-Epithelien immunzytochemisch dargestellt (Abbildung 20 A und B). AQP 3 war vorwiegend an der lateralen Membran lokalisiert, AQP 5 vor allem in den apikalen Membrananteilen.

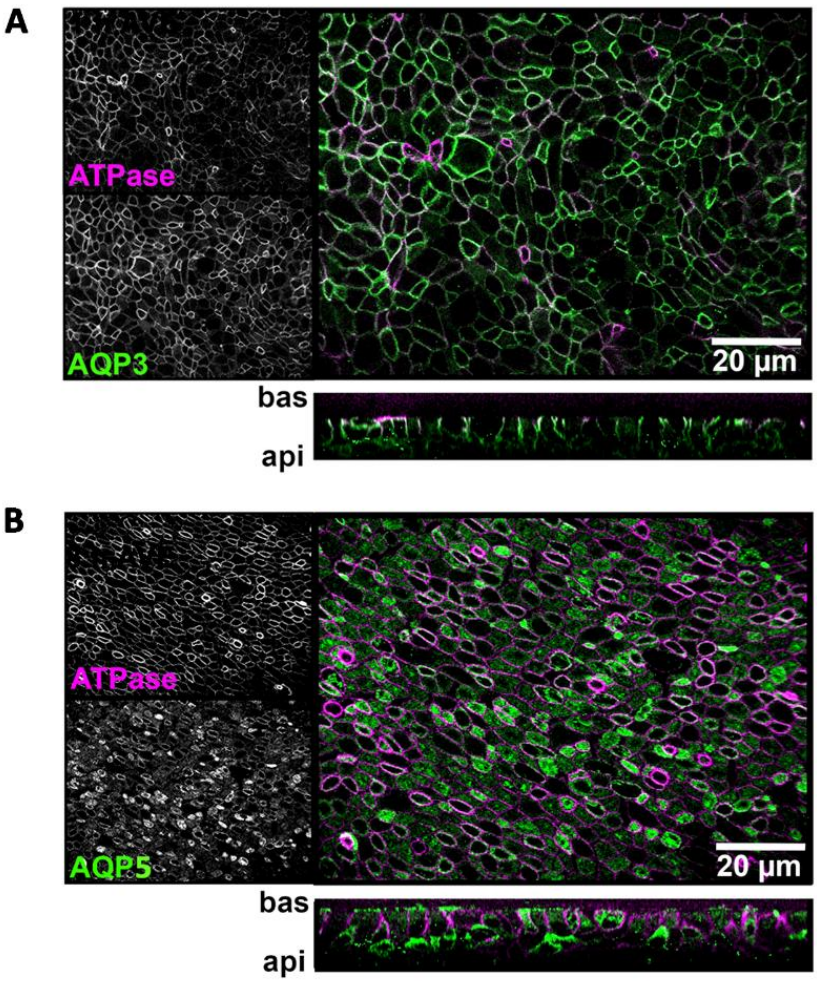

Abbildung 20 Aquaporine (AQP) in hTEpC (human tracheal epithelial cells = humane Trachealepithelzellen). Epithelien wurden mit Methanol fixiert und AQP 3 (**A**) und AQP 5 (**B**) sowie die Na^+/K^+-ATPase (ATPase: Adenosintriphosphatase) (magenta) immunzytochemisch dargestellt. Die Aufnahmen wurden mit einem iMIC Digital Microscope mit strukturierter Beleuchtung erstellt.

3.4.4. Akkumulation von AQP 3 an der lateralen Membran

Von den in H441- und hTEpC-Epithelien überwiegend exprimierten AQP gilt nur AQP 3 als Cu^{2+} sensitiv. Da der Anstieg der osmotischen Permeabilität im HRS Cu^{2+} sensitiv war, wurde in RT-PCR Experimenten untersucht, ob sich die AQP 3 Expression in H441-Epithelien im Zeitverlauf nach AVE verändert (Abbildung 21). Nach AVE konnte eine transiente Zunahme der AQP 3-Expression mit einem Maximum nach 6 h beobachtet werden. Die Inhibition des ENaC abhängingen aktiven Ionentransportes während der AVE durch Amilorid verhinderte diese Expressionszunahme teilweise.

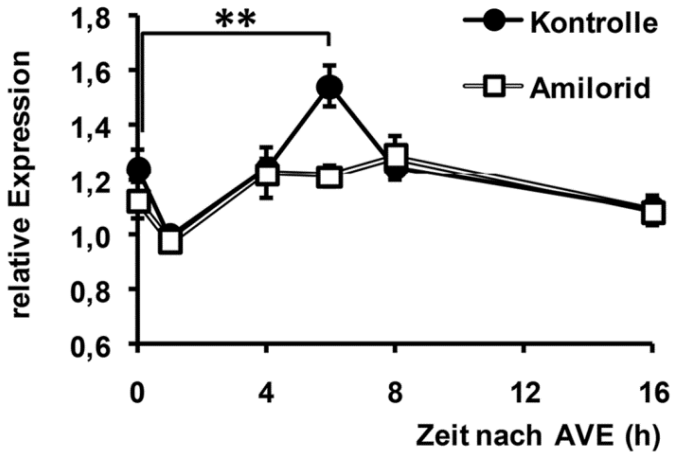

Abbildung 21 Aquaporin 3 Expression nach apikaler Volumenexpansion (AVE). Die apikale Oberfläche von NCI-H441 Epithelien wurde mit 25 µl isotoner NaCl-Lösung beladen. Nach den gegebenen Zeitpunkten wurde mittels RT-PCR (real time polymerase chain reaction = Echtzeitpolymerasekettenreaktion) Experimenten die relative Expression zum Haushaltsgen HMBS (Hydroxymethylbilansynthase) ermittelt (n = 8 - 12). Kruskal-Wallis-Test mit zweiseitiger Dunns Prozedur und Bonferroni-Korrektur des Signifikanzniveaus: p* < 0,002 (**) und p* < 0,00002 (****).

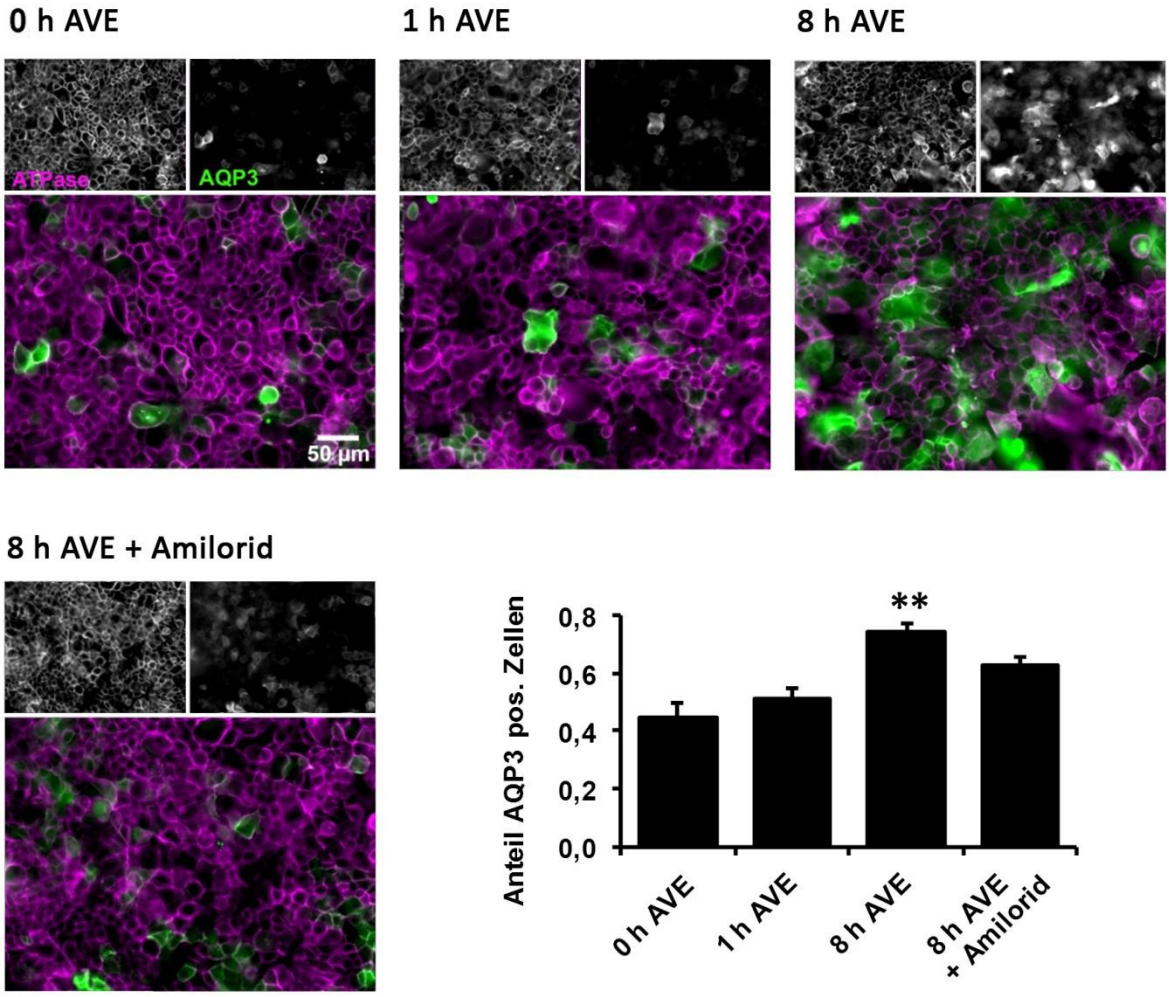

Abbildung 22 AQP 3 (Aquaporin 3) nach AVE (apikale Volumenexpansion) in NCI-H441-Epithelien. Die apikale Oberfläche der Epithelien wurde mit 25 µl isotoner NaCl-Lösung beladen. Bei einem Teil der Epithelien wurde hierbei mit Amilorid der ENaC (epithelial Na^+-channel = epithelialer Natriumkanal) abhängige Ionentransport inhibiert. Nach 0 h, 1 h oder 8 h wurden die Zellen mit Methanol fixiert und AQP 3 sowie die Na^+/K^+-ATPase (ATPase: Adenosintriphosphatase) immunzytochemisch dargestellt. Die Aufnahmen wurden mit einem iMIC Digital Microscope erstellt und der Anteil der AQP3 positiven Zellen ausgezählt (n = 4-6). Kruskal-Wallis-Test mit zweiseitiger Dunns Prozedur und Bonferroni-Korrektur des Signifikanzniveaus: p* < 0,003 (**).

Um zu untersuchen, ob eine AVE mit einer Änderung von AQP 3 auf Proteinebene einhergeht, wurde AQP3 in H441-Epithelien nach 0 h, 1 h und 8 h AVE immunzytochemisch dargestellt (Abbildung 22). Die relative Häufigkeit von AQP 3 positiven Zellen betrug in ALI-Epithelien 0,45 ± 0,05 und blieb nach 1 h AVE unverändert. 8 h AVE führte zu in einem signifikanten Anstieg der AQP 3 positiven Zellen. Die Inhibition des ENaC abhängigen

Ionentransportes mit Amilorid reduzierte den AVE induzierten Anstieg AQP 3 positiver Zellen. Die Lokalisation von AQP3 war sowohl nach 1 h AVE als auch nach 8 h AVE an der lateralen Zellmembran (Abbildung 23 A und B).

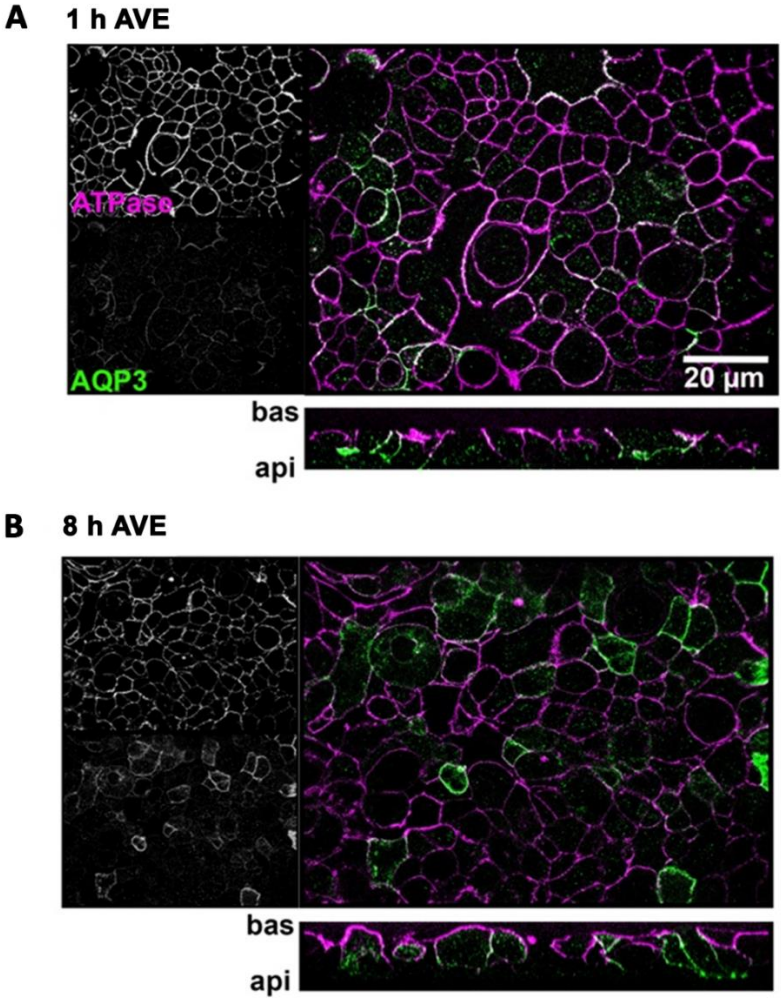

Abbildung 23 Lokalisation von AQP 3 (Aquaporin 3) nach AVE (apikale Volumenexpansion) in NCI-H441-Epithelien. Die apikale Oberfläche der Epithelien wurde mit 25 µl isotoner NaCl-Lösung beladen. Nach 1 h (**A**) oder 8 h (**B**) wurden die Zellen mit Methanol fixiert und AQP 3 sowie die Na^+/K^+-ATPase (ATPase: Adenosintriphosphatase) immunzytochemisch dargestellt. Die Aufnahmen wurden mit einem iMIC Digital Microscope mit strukturierter Beleuchtung erstellt. bas: basolateral; api: apikal.

Um eine mögliche Veränderung von AQP 5, das sich in hTEpC-Epithelien überwiegend in der apikalen Membran zeigte (Vgl. Abbildung 20), auf Proteinebene darzustellen, wurde AQP 5 in H441-Epithelien immunzytochemisch 0 h, 1 h, und 8 h nach AVE dargestellt (Abbildung 23). Nach 0 h AVE war im überwiegenden Anteil der Zellen AQP 5 in der Membran zu sehen. Nach 1 h und 8 h AVE zeigten sich keine Veränderungen.

Die immunzytochemischen Experimente zeigten, dass der Anstieg der osmotischen Permeabilität nach 8 h AVE mit einer Akkumulation von AQP 3 an der lateralen Zellmembran einhergeht. Dies korreliert zeitlich mit dem Übergang der resorptiven Stadien des Epithels in das HRS (Vgl. Abschnitt 3.1.1.).

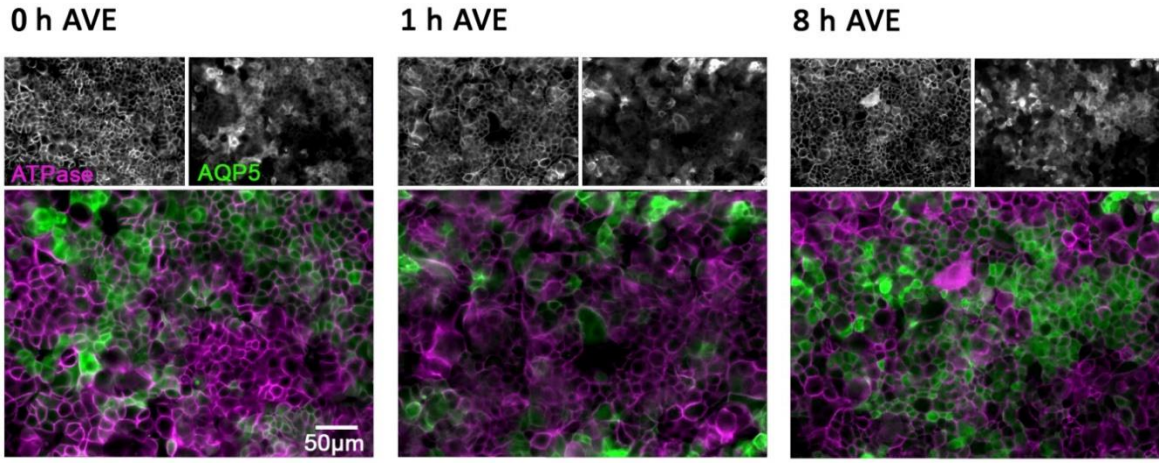

Abbildung 24 AQP 5 (Aquaporin 5) nach AVE (apikale Volumenexpansion) in NCI-H441-Epithelien. Die apikale Oberfläche der Epithelien wurde mit 25 µl isotoner NaCl-Lösung beladen. Nach 0 h, 1 h oder 8 h wurden die Zellen mit Methanol fixiert und AQP 5 sowie die Na^+/K^+-ATPase (ATPase: Adenosintriphosphatase) immunzytochemisch dargestellt. Die Aufnahmen wurden mit einem iMIC Digital Microscope erstellt.

3.5. Knockdown von Aquaporin 3 führt zu einer Verzögerung des HRS

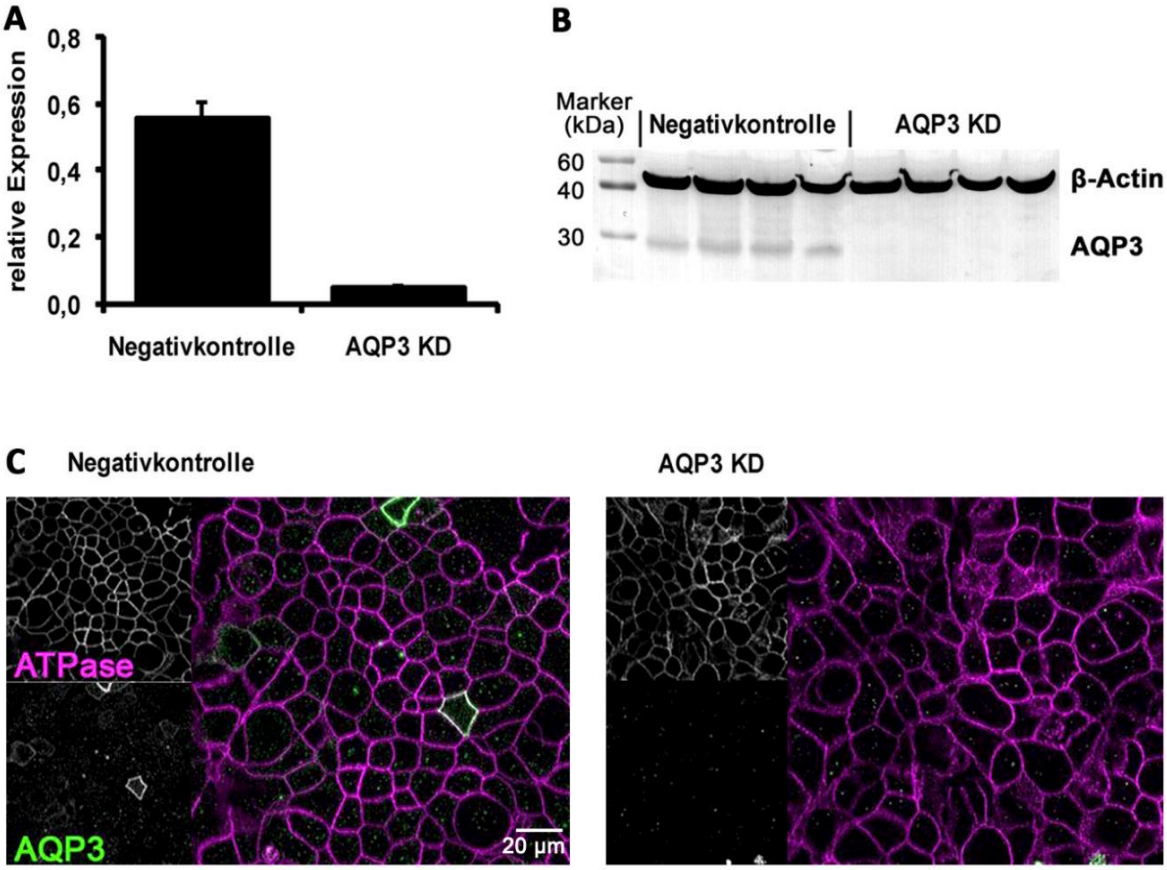

Abbildung 25 AQP 3 KD (Aquaporin 3 Knockdown) in NCI-H441-Epithelien. Mittels lentiviraler Vektoren, die AQP 3 unterdrückende shRNA (short hairpin ribonucleic acid = kurze Haarnadel-Ribonukleinsäure) exprimierten, wurden stabil transfizierte AQP 3 KD-Zellliniinen generiert. Die Negativkontrolle bezeichnet mit nicht kodierender shRNA transfizierte Epithelien. Zur Überprüfung des Knockdowns wurden RT-PCR (real time polymerase chain reaction = Echtzeitpolymerasekettenreaktion) Experimente für AQP 3-Transkripte (**A**) durchgeführt und AQP 3-Protein mittels Western Blots (**B**) dargestellt. **C:** Epithelien wurden mit Methanol fixiert und AQP 3 sowie die Na^+/K^+-ATPase (ATPase: Adenosintriphosphatase) immunzytochemisch dargestellt. Die Aufnahmen wurden mit einem iMic Digital Microscope erstellt.

Um die kausale Beteiligung von AQP 3 am Übergang von LRS zu HRS zu überprüfen, wurde eine H441-Zelllinie etabliert, die stabil mit einer shRNA transfiziert wurde, die spezifisch die AQP 3 Expression unterdrückte. Als Negativkontrolle diente eine H441-Zelllinie, die mit einer nicht hemmenden shRNA transfiziert wurde. Der Supprimierung der AQP 3

Expression in den Knockdownepithelien wurde mittels RT-PCR Experimenten bestätigt (Abbildung 25 A). Ebenso war im Western Blot (Abbildung 25 B) und in der Immunzytochemie (Abbildung 25 C) AQP 3 bei den Knockdown-Epithelien auf Proteinebene nicht mehr nachzuweisen.

Um sicherzustellen, dass mögliche Effekte des AQP 3-Knockdowns auf die Volumenresorption nicht durch eine Modulation des ENaC bedingt sind, wurde die Expression der ENaC-Untereinheiten mittels RT-PCR untersucht (Abbildung 26). Die ENaC-Expression wurde durch den AQP3 Knockdown nicht verändert.

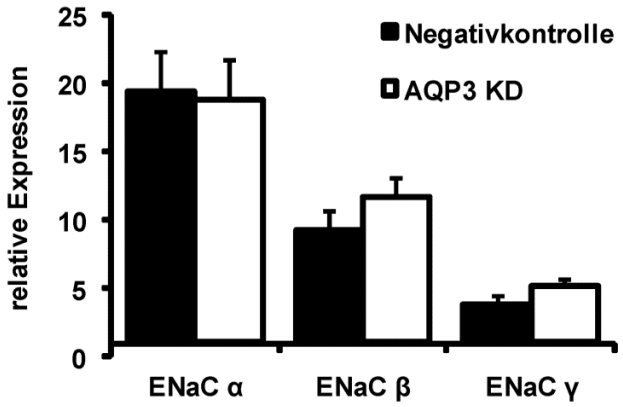

Abbildung 26 ENaC-Expression (ENaC: epithelial Na^+-channel = epithelialer Natriumkanal) in transfizierten NCI-H441 Epithelien. Mittels lentiviraler Vektoren, die AQP3 unterdrückende shRNA (short hairpin ribonucleic acid = kurze Haarnadel-Ribonukleinsäure) exprimierten, wurden stabil transfizierte AQP 3 KD-Zellininen (AQP 3 KD: Aquaporin 3 Knockdown) generiert. Die Negativkontrolle bezeichnet mit nicht kodierender shRNA transfizierte Epithelien. Die Expression der α-, β- und γ-ENaC-Untereinheiten wurde mittels RT-PCR (real time polymerase chain reaction = Echtzeitpolymerasekettenreaktion) untersucht. Gezeigt ist die Expression relativ zum Haushaltsgen HMBS (Hydroxymethylbilansynthase). n = 4.

Die Volumenresorption infolge einer AVE mit 25 µl NaCl in AQP 3 Knockdownepithelien ist in Abbildung 26 gezeigt. Die Resorption im LRS zwischen 0 h und 4 h nach AVE unterschied sich nicht wesentlich von der Negativkontrolle. Jedoch blieb die Resorptionsrate in den AQP 3 Knockdownepithelien zwischen 4 h und 8 h nach AVE niedrig, während hier in der Negativkontrolle ein Anstieg des Volumenflusses zu sehen war. Zwischen 8 h und 16 h nach AVE kam es auch in den AQP 3 Knockdownepithelien zu einem Anstieg des Volumenflusses.

Somit beeinflusste der AQP3 Knockdown die maximale Transportrate nicht, führte jedoch zu einem verzögerten Beginn des HRS.

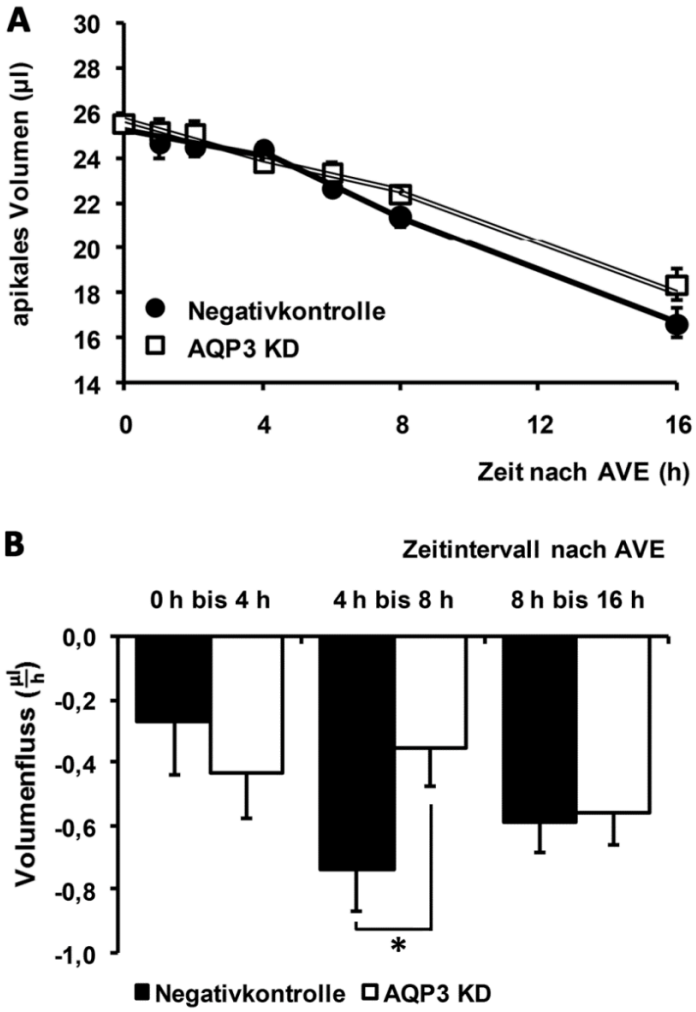

Abbildung 27 Volumenresorption nach AVE (apikale Volumenexpansion) in transfizierten NCI-H441 Epithelien. Mittels lentiviraler Vektoren, die AQP 3 unterdrückende shRNA (short hairpin ribonucleic acid = kurze Haarnadel-Ribonukleinsäure) exprimierten, wurden stabil transfizierte AQP 3 KD-Zellliniinen (AQP 3 KD: Aquaporin 3 Knockdown) generiert. Die Negativkontrolle bezeichnet mit nicht kodierender shRNA transfizierte Epithelien. Die apikale Oberfläche des Epithels wurde mit 25 µl isotoner NaCl-Lösung beladen und das apikale Volumen im Zeitverlauf mittels D_2O-Dilutionsmethode gemessen. Der Volumenfluss (**B**) entspricht der Steigung der Regressiongeraden im entsprechenden Zeitintervall aus **A** ± Standardfehler der Steigung. F-Test: $p < 0,05$ (*). n = 8.

4. Diskussion

4.1. Methodische Ansätze zur Messung der Volumenresorption

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen eine langfristige AVE auf Atemwegsepithelien hat. Es wurden hierzu zwei Zellmodelle verwendet, bei denen vergleichbare Veränderungen als Reaktion auf eine AVE beobachtet werden konnten. In beiden Zellmodellen setzte nach einer AVE zunächst eine Phase mit niedriger Resorptionsrate (LRS) ein, auf die eine Phase mit hoher Resorptionsrate (HRS) folgte. Die NCI-H441 Zelllinie gilt als Modell für das humane distale Lungenepithel (Salomon et al. 2014) und war aufgrund der geringen Variabilität zwischen den Zellpassagen vor allem für die Untersuchung der verschiedenen Mechanismen der Resorption gut geeignet. Um die Relevanz der gewonnenen Erkenntnisse zu bekräftigen, wurden die Beobachtungen an primären humanen Trachealepithelzellen (hTEpC) bestätigt. Diese bilden unter Kultivierung als ALI, mit dem organtypische Kulturbedingungen nachgestellt werden können, ein differenziertes proximales Atemwegsepithel mit Zilien und Mukusproduktion aus (Fulcher et Randell 2013, Fulcher et al. 2005, Lechner et LaVeck 1985). Die Mukusakkumulation mit zunehmender Differenzierung der Zellen machte jedoch ein regelmäßiges Waschen der apikalen Oberfläche der Zellen erforderlich, welches funktionell eine AVE darstellt. Hierdurch kann bereits eine langfristige Adaptation der hTEpC-Epithelien an erhöhte apikale Volumina während der Kultivierung stattfinden. Diese Adaptation könnte dafür verantwortlich sein, dass in hTEpC-Epithelien im Vergleich zu H441-Epithelien im LRS bereits eine höhere Resorption beobachtet wurde und der Anstieg der osmotischen Permeabilität im HRS geringer ausgeprägt war.

Die meist angewendeten Methoden zur Erfassung der Flüssigkeitsresorption über Epithelien ist die Messung der ASL-Höhe mittels mikroskopischer Techniken (Choi et al. 2015, Al-Alawi et al. 2014, Chambers et al. 2007) oder die Abschätzung des ASL-Volumens mittels der Konzentration von Markersubstanzen im ASL (Wang et al. 2013, Solymosi et al. 2013). Jedoch wurde gezeigt, dass die ASL-Höhe nur unzureichend mit dem ASL-Volumen korreliert (Harvey et al. 2011) und sich bei Messung der ASL-Höhe an verschiedenen Stellen

des Epithels eine große Variabilität zeigt (Neubauer et al. 2013). Bei der Verwendung von hochmolekularen Markersubstanzen, für die die Zellmembran impermeabel ist, wurde eine inhomogene Verteilung im ASL beschrieben, da insbesondere die Diffusion in die periziliäre Flüssigkeitsschicht für diese Substanzen limitiert ist (Stonebraker et al.2004). Zudem kann die Fluoreszenz der Marker durch pH-Änderungen (Geisow 1984) oder Interaktion mit sezernierten Metaboliten der Zellen (Torimura et al. 2001) beeinflusst werden. Zur Vermeidung dieser methodischen Schwierigkeiten wurde in der vorliegenden Arbeit die neue D_2O-Dilutionsmethode (Neubauer et al. 2013) zur Messung der Volumenresorption verwendet. Diese Methode ermöglicht die Quantifizierung des ASL-Volumens in großer Genauigkeit. Weitere Vorteile dieser Messmethode sind die Unabhängigkeit der Messung von ASL-Inhomogenitäten über die Fläche des Epithels sowie der Verzicht auf Markersubstanzen im ASL, die die Epithelfunktion beeinflussen oder Messartefakte erzeugen können.

Das Beladen der Zellen mit apikaler Flüssigkeit geht mit mechanischem Stress für das Epithel einher und könnte daher zu einer Beeinträchtigung der epithelialen Funktion führen. Es wurde gezeigt, dass mechanische Faktoren wie Scherkräfte und hydrostatischer Druck, die auf das Epithel wirken, die Aktivität von Ionenkanälen wie CFTR (Button et al. 2007, Tarran et al. 2006), ENaC (Shi et al. 2013, Wang et al. 2003) und anderen Kanälen (Bogdan et al. 2008) modulieren können. Auch die hier gezeigten Messungen könnten mit solchen Effekten interferrieren. Der hydrostatische Druck, der in der vorliegenden Arbeit durch die AVE erzeugt wurde, lag im Mittel unter 1 mmH_2O, während die Effekte auf Ionenkanäle bei 10 bis 20fach höheren hydrostatischen Drücken beobachtet wurden (Wang et al. 2003, Bogdan et al. 2008). Daher kann davon ausgegangen werden, dass AVE-induzierte hydrostatische Druckunterschiede höchstens geringfügige Effekte auf die Volumenresorption haben.

4.2. ENaC abhängige Mechanismen der Volumenresorption

ENaC gilt als die entscheidende Triebkraft für die Flüssigkeitsresorption in proximalen und distalen Lungenepithelien (Blouquit et al. 2002, Johnson et al. 2002). Der genetische Knockout der α-ENaC-Untereinheit in Mäusen ist aufgrund der beeinträchtigten pulmonalen Flüssigkeitsresorption bereits im frühen postnatalen Stadium letal (Hummler et al. 1996). Die bislang bekannten Mechanismen, die eine gesteigerte Flüssigkeitsresorption über das Lungenepithel bewirken, beispielsweise β-adrenerge Stimulation (Agné et al. 2015, Planès et al. 2002, Minakata et al. 1998) oder Steroidhormone (Itani et al. 2002, Dagenais et al. 2001), führen typischerweise zu einer Steigerung der ENaC-Aktivität. Verschiedene Autoren zeigten, dass auch CFTR und andere apikale Chloridkanäle an der Flüssigkeitsresorption am Atemwegsepithel beteiligt sind, wobei die apikale Chloridpermeabilität die apikale Natriumresorption via ENaC limitieren kann (Korbmacher et al. 2014, Li et al. 2012, Fang et al. 2006, Jiang et al. 1998). Vergleichbare Effekte zeigten sich für apikale Kaliumkanäle (Greenwood et al. 2009). Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Zunahme der Resorptionsrate mit Beginn des HRS nicht mit einer Änderung des Amilorid sensitiven Kurzschlussstromes einhergeht, konnte eine bedeutende Rolle der diskutierten ENaC abhängigen Mechanismen für die Erhöhung der Resorptionsrate im HRS ausgeschlossen werden.

Die proteolytische ENaC-Aktivierung durch expandierte ASL-Volumina wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht (Garcia-Caballero et al. 2009, Diakov et al. 2008, Caldwell et al. 2004). Sie wird als regulatorischer Mechanimus zur Steigerung der Volumenresorption und der Aufrechterhaltung der ASL-Volumenhomöostase angesehen. Auch in der vorliegenden Arbeit führte eine AVE in H441-Epithelien zu einer proteolytischen ENaC-Aktivierung innerhalb von 10 bis 15 min. Diese Beobachtung stimmt mit einer früheren Ussing-Kammer Studie an H441-Epithelien überein (Tan et al. 2011). Eine weitere Arbeit (Myerburg et al. 2006) zeigt ebenfalls eine unmittelbare ENaC-Aktivierung infolge einer AVE. Jedoch führte hier die Langzeitexposition der Epithelien gegenüber der AVE zu einer zunehmenden Abnahme des Amilorid sensitiven Kurzschlussstroms. Eine geringe Abnahme des

maximalen ENaC-Stromes konnte auch in der vorliegenden Arbeit nach 16 h AVE beobachtet werden. Diese Abnahme könnte mit einer Veränderung des Proteinturnovers im Sinne einer verstärkten Internalisierung von ENaC zusammenhängen (Butterworth et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit war das HRS in H441-Epithelien reversibel, wenn der überwiegende Anteil des hinzugefügten apikalen Volumens reabsorbiert war. Die Rückführung des Epithels war von einer Reduktion des ENaC-Stromes auf ALI-Niveau sowie einer erneuten proteolytischen Aktivierbarkeit von ENaC begleitet. Dies unterstützt die Annahme, dass die proteolyische ENaC-Aktivierung von der Konzentration löslicher Proteaseinhibitoren (Tarran et al. 2006, Garcia-Caballero et al. 2009) abhängt, die bei einer AVE verdünnt werden. Die Inhibition der proteolytischen ENaC-Aktivierung bewirkte in der vorliegenden Arbeit jedoch lediglich eine Reduktion der Resorptionsrate im LRS, während der Volumenfluss im HRS unverändert blieb. Die weist darauf hin, dass die proteolytische ENaC-Aktivierung einen kurzfristigen Adaptationsmechanismus an eine apikale Volumenexpansion darstellt, jedoch nicht der entscheidende Mechanismus für die langfristige kompensatorische Volumenresorption ist.

Zusammenfassend kann aufgrund dieser Arbeit festgestellt werden, dass ENaC durch eine AVE unmittelbar aktiviert wird. Für den dominierenden kompensatorischen Wassertransport nach AVE spielt der Übergang des Epithels in das HRS eine wesentliche Rolle. Sowohl im LRS als auch im HRS war die beobachtete Resorption ENaC-abhängig, jedoch war der Beginn des HRS nicht mit einer gesteigerten ENaC-Aktivität korreliert. Während des HRS wirken daher auch ENaC unabhängige Mechanismen limitierend auf den Volumentransport.

4.3. Modulation von parazellulären Parametern

Der parazelluläre Transport von Ionen wird durch die Barriere der interzellulären Kontakte limitiert. Im Kontext der Resorption stellen diese nicht nur eine Barriere für die Diffusion von Ionen zwischen apikal und basolateral dar, sondern verhindern auch die Rückdiffusion von transzellulär resorbierten Soluten nach apikal. Die Untersuchung der parazellulären Kontakte ergab in dieser Arbeit, dass eine AVE in H441-Epithelien langfristig zu einer diskreten Reduktion des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER = transepithelial electrical resistance) führt. Diese Beobachtung ging mit einer geringfügigen Erhöhung der Permeabilität für kleine (FIuorescein) und größere Moleküle (4 kDa und 20 kDa Dextrane) einher. Derartige funktionelle Veränderungen der tight junctions können durch eine Modulation ihrer Claudinzusammensetzung begründet sein, welche sich auf die Flüssigkeitsresorption auswirken kann. In Modellen der akuten Lungenschädigung wurde vermehrt Claudin 4 in den tight junctions gefunden (Wray et al. 2009), das in mehreren Studien mit einer Verbesserung der alveolären Flüssigkeitsresorption assoziiert ist (Rokkam et al. 2011). In Übereinstimmung dazu weisen Claudin 4 Knockoutmäuse eine beeinträchtigte Volumenresorption auf (Kage et al. 2014).
Nebend der Permeabilität kann auch die Ladungsselektivität der tight junctions die Transporteigenschaften von Epithelien beeinflussen. In Kolonepithelzellen scheint eine Claudin 8 vermittelte parazelluläre Anionenselektivität zur Ausbildung eines resorptiven Phänotypes beizutragen, indem es die Rückdiffusion von resorbiertem Natrium nach apikal verhindert und die parazelluläre Resorption von Chlorid begünstigt (Amasheh et al. 2008). Die H441-Epithelien zeigten in der vorliegenden Arbeit unter ALI-Bedingungen ebenfalls eine Anionenselektivität, die nach 1 h und 8 h AVE eine geringfügige, nicht signifikante Abnahme zeigte. Jedoch bestand keine zeitliche Korrelation mit den Veränderungen des Volumenflusses nach AVE.
Die Proteinlevel der hauptsächlich exprimierten Claudine 4 und 7 sowie Claudin 8 als Interaktionspartner von Claudin 4 und dem tight junction Marker Occludin wurden in dieser Arbeit nicht durch eine AVE verändert. Dies spricht dafür, dass im Rahmen der AVE die epitheliale Integrität erhalten bleibt und keine wesentlichen strukturellen Veränderungen des parazellulären Transportweges stattfinden. Die beobachteten diskreten funktionellen

Veränderungen könnten Ausdruck einer Aufdehnung der bestehenden interzellulären Kontakte sein, die mit einer Aufweitung des lateralen interzellulären Spalts einhergeht. Durch die Vergrößerung der Diffusionsfläche für Ionen könnte ein solcher Mechanismus zu einer moderaten Reduktion des TEER führen.

4.4. Die Wasserpermeabilität als flusslimitierender Faktor

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine AVE in Atemwegsepithelien zu einer Erhöhung der Wasserpermeabilität führt, die zeitlich mit einem Anstieg des Volumenflusses korreliert ist. Dieser Anstieg war durch Cu^{2+} blockierbar, was die Beteiligung von Cu^{2+} sensitiven Wasserporen zeigt. Von den in H441- und hTEpC-Epithelien überwiegend exprimierten Wasserkanälen AQP 3, 4 und 5 ist nur AQP 3 Cu^{2+} sensitiv (Zelenina et al. 2004). Die Beobachtung der immunzytochemischen Experimente, dass AQP 3 nach 8 h AVE in die laterale Membran eingebaut wird, unterstützt die Hypothese, dass AQP 3 an der Erhöhung der Wasserpermeabilität als langfristige Folge einer AVE beteiligt ist. Im Western Blot wurden verschiedene Antikörper gegen AQP 3 getestet, jedoch konnte nur eine schwache Bande dargestellt warden. Aufgrund der methodischen Schwierigkeiten war keine quantitative Analyse der Proteinmenge nach AVE möglich. Für AQP 3 mRNA Transkripte zeigte sich ein transienter Anstieg mit einem Maximum 6 h nach AVE. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass AQP 3 überwiegend aus einem intrazellulären Pool in die Membran eingebaut wird. Der transiente Transkriptionsanstieg von AQP 3 könnte einen kompensatorischen Mechanismus im Rahmen eines erhöhten Proteinumsatzes darstellen. Eine transiente Transkriptionssteigerung von AQP 3 wurde auch von Sato et al. einige Stunden nach Induktion eines Lungenödems an Ratten am Epithel der Bronchiolen beobachtet (Sato et al. 2004).

Die Expression von AQP 3, 4 und 5 in den verwendeten Zellmodellen ist in Übereinstimmung mit Daten, die an humanem Lungengewebe gewonnen wurden (Kreda et al. 2001). Im Gehirn gilt AQP 4 als bedeutende Komponente der Regulation des Wassertransportes im Rahmen der Enstehung und Reabsorption von Hirnödemen (Papadopoulos et al. 2004, Ribeiro Mde et al. 2006, Fu et al. 2007). Hingegen wird die Bedeutung der AQP für die Volumenregulation am Atemwegsepithel kontrovers diskutiert. Während frühe Untersuchungen Evidenz für die Beteiligung von AQP am Flüssigkeitstransport über die Lunge bieten (Folkesson et al. 1994, Folkesson et al. 1996), wurden in Knockoutmäusen für AQP 1 bis 5 nur marginale Effekte auf den Volumentransport und die ASL-Homöostase festgestellt (Song et al. 2000, Song und Verkman 2001), obwohl die osmotische Wasserpermeabilität abhängig von der AQP

Expression war (Bai et al. 1999, Ma et al. 2000). Auf der anderen Seite gibt es mehrere Studien, die eine Modulation der AQP Expression im Zusammenhang mit verschiedenen pathophysiologischen Situationen zeigen. So wurde in Mausmodellen bei einem Asthmamodell (Krane et al. 2009) und bei adenovirale Infektionen (Towne et al. 2000) eine verminderte Expression von AQP 1 und 5 beobachtet, die mit einer Dysregulation der ASL-Volumenhomöostase einherging.

Eine mögliche Erklärung dieser scheinbar kontroversen Daten könnte die Tatsache sein, in den Knockoutstudien stets die Resorption in den ersten Minuten nach Expansion des ASL-Volumens gemessen wurde. Dies entspricht dem LRS in dieser Arbeit, wobei die Abhängigkeit der Resorption von der Wasserpermeabilität erst im HRS beobachtet wurde. Dies legt nahe, dass die Modulation der Wasserpermeabilität einen langfristigen adaptiven Mechanismus für die kompensatorische Volumenresorption am Lungenepithel darstellt. Hingegen ist der unmittelbare Effekt einer AVE auf das Lungenepithel, der in den diskutierten Knockoutstudien untersucht wurde, weitgehend unabhängig von der Wasserpermeabilität.

Auch eine Veränderung der parazellulären Wasserpermeabilität könnte mit den Messungen dieser Arbeit interferieren. Claudin 2 gilt als das einzige Claudin, das eine spezifische Wasserpermeabilität der tight junctions vermittelt (Rosenthal et al. 2010) und war in den hier untersuchten Epithelien nicht exprimiert. Um zwischen para- und transzellulärer Wasserpermeabilität zu differenzieren, wurde der AQP 3 Inhibitor Cu^{2+} eingesetzt, der den Anstieg der osmotischen Permeabilität im HRS inhibierte. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der Wasserpermeabilität im HRS maßgeblich durch die transzelluläre Permeabilität vermittelt wird, an der AQP 3 beteiligt ist.

Die Erhöhung der Wasserpermeabilität nach AVE sowie der Einbau von AQP 3 in die laterale Membran waren vermindert, wenn ENaC während der AVE mit Amilorid inhibiert wurde. Diese Beobachtung bietet Evidenz dafür, dass ENaC an der Modulation der Wasserpermeabilität beteiligt ist. Der Einfluss von Ionenkanälen auf AQP 3 wurde in Einzelzellexperimenten für den CFTR gezeigt (Schreiber et al. 1999, Jourdain et al. 2013). Die Beobachtung, dass die langfristige Inhalation mit hypertoner Kochsalzlösung bei Patienten mit Zystischer Fibrose eine verbesserte Hydrierung der Atemwege bewirkt,

dieser Effekt jedoch durch eine Vorbehandlung mit Amilorid vermindert wird, führte zunächst zu der Annahme, dass Amilorid eine Blockade von Wasserporen bewirkt (Donaldson et al., 2006). Jedoch konnte eine spätere Arbeit zeigen, dass Amilorid keinen direkten inhibitorischen Effekt auf Aquaporine hat (Levin et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, dass Amilorid keine direkte Blockade der Wasserpermeabilität bewirkt. Die langfristige Inhibition des ENaC vermittelten Ionentransportes hingegen, scheint zumindet teilweise ursächlich für die regulatorische Erhöhung der Wasserpermeabilität im HRS zu sein. Die Abhängigkeit der AQP vermittelten Wasserpermeabilität von der Ionentransportaktivität könnte eine Erklärung für die Diskrepanz der oben diskutierten Literatur darstellen. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Natriumaufnahme via ENaC einen Mechanismus zur Registrierung einer AVE darstellen könnte, der an der Modulation der Wasserpermeabilität beteiligt ist und hierdurch die hauptsächliche kompensatorische Resorption im HRS ermöglicht.

Um die Rolle von AQP 3 am HRS zu bestätigen, wurde in der vorliegennden Arbeit eine AQP 3 Knockdownzelllinie etabliert. An Mäusen wurde gezeigt, dass der genetische Knockdown von AQP 3 und 4 die Resorption von Flüssigkeit innerhalb der ersten Minuten nach einer AVE nicht beeinflusst (Song et al. 2001). In Übereinstimmung hierzu hatte in der vorliegenden Arbeit der Knockdown von AQP 3 in H441-Epithelien keinen Effekt auf das LRS als erste Phase der Resorption. Jedoch führte der AQP 3 Knockdown zu einem verzögerten Einsetzen des HRS um mehrere Stunden. Dies unterstützt die Hypothese, dass die AQP 3 vermittelte Zunahme der Wasserpermeabilität kausal an dem erhöhten Volumenfluss im HRS beteiligt ist. Allerdings wurde das HRS nicht vollständig inhibiert, da sich zwischen 8 h und 16 h nach AVE trotzdem ein HRS mit hoher Resorptionsrate einstellte. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass andere AQP oder eine erhöhte parazelluläre Wasserpermeabilität in den Knockdownzelllinien die Funktion von AQP 3 teilweise kompensieren können.

4.5. Modell für die Volumenresorption in LRS und HRS

Wie bereits ausgeführt, wird die Bedeutung der AQP für den Flüssigkeitstransport an Epithelien bislang kontrovers diskutiert. Ein Erklärungsmodell für die kontroverse Datenlage basiert auf der Hypothese, dass AQP vor allem dann wichtig für die Resorption sind, wenn hohe Volumenflüsse beobachtet werden wie beispielsweise im proximalen Tubulus (Schnermann et al. 1998) und den Speicheldrüsen (Ma et al. 1999). Dass der basale Volumenfluss in den Alveolen etwa 100-fach geringer ist als im proximalen Tubulus, sieht Verkman als Erklärung dafür, dass dieser basale Volumenfluss in AQP Knockoutmäusen nicht beinträchtigt ist (Verkman 2011). Ein derartiger Mechanismus könnte auch in der vorliegenden Arbeit eine Rolle spielen, da der Volumenfluss nur im HRS, nicht jedoch im LRS abhängig von AQP 3 war. Ein hoher Wasserfluss kann auch dann beobachtet werden, wenn hohe osmotische Gradienten zwischen zwei Kompartimenten anliegen, wie dies unter den artifiziellen Bedingungen der Messung der osmotischen Permeabilität der Fall ist (Verkman 2000). Dies könnte erklären, weshalb bei Mäusen mit genetischem Knockout von AQP1-5 zwar eine geringere osmotische Permeabilität gemessen wird, unter die basale Resorption jedoch unbeeinträchtigt ist (Song et al. 2001, Song et al. 2000).

In der Theorie einfacher Modelle für den isoosmotischen epithelialen Transport wie dem basic compartment model (Maclaren et al. 2013) findet die Kopplung von Ionen- und Wassertransport im basolateralen Kompartiment statt. In diesem sogenannten Kopplungskompartiment werden durch den aktiven Ionentransport nur minimale osmotische Gradienten erreicht. Andere biophysikalischen Modelle hingegen unterscheiden zusätzlich das Kompartiment des lateralen interzellulären Spaltes (lis), das die Funktion des Kopplungskompartiments einnehmen kann (Larsen et al. 2000). Mathematische Modellrechnungen lassen im lis eine Hyperosmolalität von 5 bis 10 mOsm gegenüber dem apikalen und basolateralen Kompartiment vermuten (Larsen und Møbjerg 2006, Larsen et al. 2002,).

Unter Berücksichtigung des lis als Kopplungskompartiment würde in dem Szenario der vorliegenden Arbeit die ENaC abhängige aktive Ionenresorption, die durch die AVE innerhalb der ersten Stunde aktiviert wird, zu einer Akkumulation von Natrium im lis führen. Dies wäre in Übereinstimmung mit der oben diskutierten vermuteten

Hyperosmolalität im lis, die mit einer erhöhten Natriumkonzentration im lis gegenüber dem apikalen Kompartiment einhergehen würde. Entsprechend der biophysikalischen Modelle für den isoosmotischen epithelialen Transport von Larsen et al. diffundiert Natrium, das durch den aktiven Transport bei der Resorption im lis akkumuliert, hierbei teils in das basolaterale Kompartiment, jedoch auch zum Teil zurück nach apikal (Larsen und Møbjerg 2006). Nach diesem Model bestimmt der Anteil dieses Natriumrückstromes reziprok die Wasserresorption. Dieser Mechanismus der Natriumrezirkulation könnte in der vorliegenden Arbeit eine Erklärung für den niedrigen Volumenfluss im LRS darstellen. Ausgehend von den experimentellen Daten der vorliegenden Arbeit und den Erkenntnissen der diskutierten biophysikalischen Modelle, wurde ein neuartiges Modell für die Volumenresorption nach einer AVE am Atemwegsepithel entwickelt (Abbildung 28):

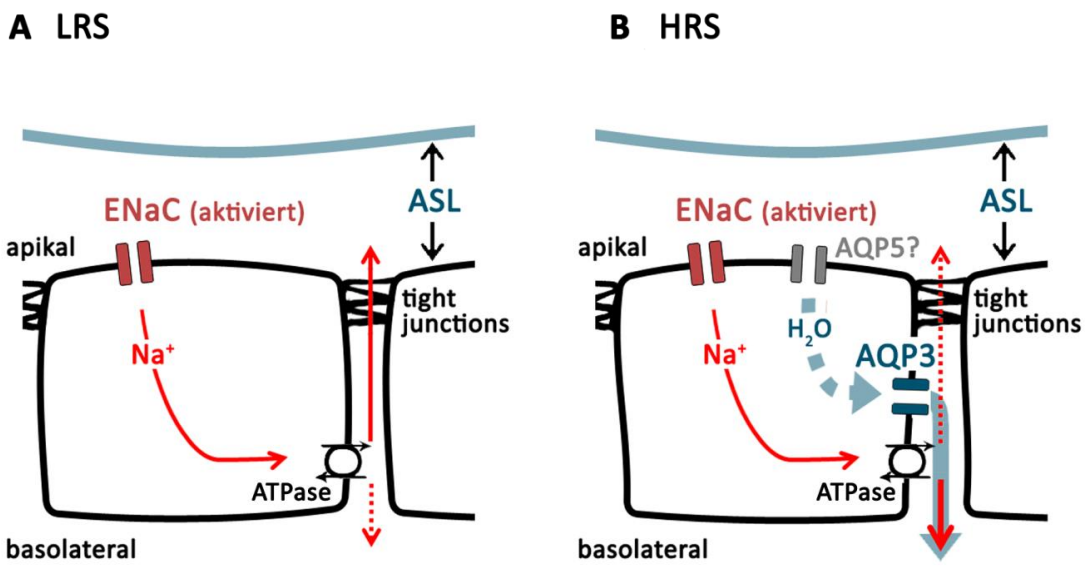

Abbildung 28 Modell für die Volumenresorption nach AVE (apikale Volumenexpansion) im LRS (low resorptive state = Phase niedriger Resorptionsrate) (**A**) und HRS (high resorptive state = Phase hoher Resorptionsrate) (**B**). ASL: apical surface liquid = apikale Oberflächenflüssigkeit des Atemwegepithels, AQP: Aquaporin, ATPase: Na^+/K^+-Adenosintriphosphatase, ENaC: epithelial Na^+-channel = epithelialer Natriumkanal.

Unmittelbar nach einer AVE findet innerhalb von 10 bis 15 min eine proteolytische ENaC-Aktivierung statt, die die Natriumaufnahme nach intrazellulär begünstigt. Mittels des

primär aktiven Transports der Na^+/K^+-ATPase kommt es zur Natriumakkumulation im lis. Hierdurch stellt sich im lis eine erhöhte Natriumkonzentration gegenüber apikal ein. Weiterhin baut sich ein transepitheliales Potenzial auf, das apikal negativ gegenüber basolateral ist. Beide genannten Faktoren begünstigen die partielle Rückdiffusion von Natrium über die tight junctions nach apikal. Das hierbei rezirkulierende Natrium würde somit den Nettoionentransport über das Epithel reduzieren und zu der niedrigen Resorptionsrate im LRS beitragen. Der mit mehreren Stunden Latenz einsetzende Einbau von AQP 3 in die laterale Membran ermöglicht im HRS den Wassereinstrom von intrazellulär in den lis. Der Wassereinstrom würde durch die Verdünnung der Solute zu einer Reduktion der Osmolalität im lis führen. Dieser Verdünnungseffekt von Natrium im lis würde der Natriumrezirkulation entgegenwirken und zur Erhöhung es Volumenflusses beitragen. Die apikale Aufnahme von Wasser in die Zelle ist möglicherweise durch ander AQP wie z.B. AQP 5 vermittelt, das in den untersuchten Epithelien in der apikalen Membran identifiziert wurde.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wird somit ein translateraler Transportweg für Wasser am Atemwegsepithel postuliert, der durch den Einbau von AQP 3 in die laterale Membran aktiviert werden kann und eine Voraussetzung für die Volumenresorption mit hoher Flussrate darstellt. Der hier erstmals evidente ENaC-unabhängige flusslimitierende Faktor für die Volumenresorption am Atemwegsepithel könnte die Grundlage für die Modulation von AQP 3 als neues therapeutisches Prinzip darstellen. Hiermit könnte bei respiratorischen Krankheiten wie Asthma, COPD und ARDS, die mit einer Dysregulation der Volumenresorption einhergehen, die ASL-Volumenhomöostase positiv beeinflusst werden. Wenngleich in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf dem resorptiven Volumentransport liegt, könnten darüberhinaus AQP 3 oder andere AQP auch für den sekretorischen Volumenfluss und damit in Krankheiten wie der zystischen Fibrose einen neuen Forschungs- und Therapieansatz darstellen.

5. Zusammenfassung

Das Atemwegsepithel grenzt das gasgefüllte Kompartiment der Atemwege vom wässrigen Kompartiment des Organsimus ab und bildet damit einen sogennante Luft-Flüssigkeits Übergang (ALI = Air-Liquid Interface). Die apikale Oberfläche ist dem gasgefüllten Kompartiment ausgesetzt und wird durch einen dünnen Flüssigkeitsfilm (ASL = airway surface liquid) überlagert. Für die Lungenfunktion ist die Volumenhomöostase des ASL von besonderer Bedeutung. Die Dysregulation des ASL-Volumens trägt wesentlich zur Pathogenese von Lungenerkrankungen wie COPD (chronic obstructive pulmonary disease = chronisch obstruktive Lungenkrankheit), Asthma und ARDS (acute respiratory distress syndrom = akutes Atemnotsyndrom) bei. Bisher ging man davon aus, dass das ASL-Volumen in erster Linie durch Regulation des transepithelialen Ionentransports eingestellt wird. Hingegen wurde der Einfluss der epithelialen Wasserpermeabilität auf die ASL-Volumenhomöostase wenig untersucht.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer langfristigen apikalen Volumenexpansion (AVE) auf den transepithelialen Wasser- und Ionentransport untersucht.

Als Zellmodelle wurden primäre ausdifferenzierte humane Trachealepithelzellen und NCI-H441 Lungenepithelzellen als ALI-Kulturen verwendet. Eine AVE wurde durch Zugabe eines definierten Volumens isotoner NaCl-Lösung auf die apikale Oberfläche herbeigeführt.

Eine AVE induzierte eine unmittelbare Aktivierung der Natriumresorption durch eine proteolytische Aktivierung des ENaC (epithelial Na^+-channel = epithelialer Natriumkanal). Für die Wasserresorption konnten eine Phase mit geringer Transportrate (LRS = low resorptive state) und eine Phase mit hoher Transportrate (HRS = high resorptive state) identifiziert werden. Dabei erfolgte die hauptsächliche Kompensation der AVE während des HRS. Der Übergang zwischen beiden resorptiven Zuständen war reversibel und korrelierte nicht mit der Aktivierung des Ionentransportes, sondern mit einer Erhöhung der Wasserpermeabilität der Epithelien, die durch den Inhibitor Cu^{2+} des Wasserkanals Aquaporin 3 (AQP 3) blockiert werden konnte. Expressionsstudien zeigten, dass das HRS mit einer transienten Erhöhung der AQP 3 Expression und dessen Einbau in die laterale Membran der Epithelzellen einherging. Die Unterdrückung der AQP 3 Expression mittels

stabil überexprimierter shRNA (short-hairpin ribonucleic acid = kleine Haarnadelribonukleinsäure) verzögerte das Einsetzen des HRS um mehrere Stunden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein neues Funktionsmodell zur Kompensation einer AVE in Lungenepithelien ableiten: Eine AVE aktiviert die transzelluläre epitheliale Natriumresorption durch proteolytische Aktivierung des ENaC. Diese Aktivierung kann einen Mechanismus zur Registrierung einer AVE darstellen, ist aber nicht für die hauptsächliche kompensatorische Resorption verantwortlich. Die eigentliche Kompensation der AVE erfolgt während des HRS durch eine erhöhte Wasserpermeabilität, an der auch AQP 3 beteiligt ist. Dabei folgt die Wasserresorption einem Weg über die apikale Zellmembran in das Zytoplasma und von dort über Aquaporine in den lateralen interstitiellen Spalt zwischen benachbarten Epithelzellen, von welchem es als Resorbat in das basolaterale Kompartiment übergeht. Dieser translaterale Transportweg wird durch den Na^+/K^+-ATPase (ATPase: Adeonsintriphosphatase) vermittelten Ionentransport angetrieben.

6. Literaturverzeichnis

1. Agné AM, Baldin JP, Benjamin AR, Orogo-Wenn MC, Wichmann L, Olson KR, Walters DV, Althaus M. "Hydrogen sulfide decreases β-adrenergic agonist-stimulated lung liquid clearance by inhibiting ENaC-mediated transepithelial sodium absorption." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 308: R636-R649* (2015)
2. Al-Alawi M, Buchanan P, Verriere V, Higgins G, McCabe O, Costello RW, McNally P, Urbach V, Harvey BJ. "Physiological levels of lipoxin A4 inhibit ENaC and restore airway surface liquid height in cystic fibrosis bronchial epithelium." *Physiol Rep 2: e12093* (2014)
3. Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Bergs M, Amasheh M, Schulzke JD, Fromm M. "Na+ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation." *Biochem Biophys Res Commun 378: 45-50* (2008)
4. Azizi F, Arredouani A, Mohammad RM. "Airway surface liquid volume expansion induces rapid changes in amiloride-sensitive Na+ transport across upper airway epithelium - Implications concerning the resolution of pulmonary edema." *Physiol Rep 3: e12453* (2015)
5. Azzam ZS, Sznajder JI. "Lung edema clearance: Relevance to patients with lung injury." *Rambam Maimonides Med J 6: e0025* (2015)
6. Bai C, Fukuda N, Song Y, Ma T, Matthay MA, Verkman AS. "Lung fluid transport in aquaporin-1 and aquaporin-4 knockout mice." *J Clin Invest 103: 555-561* (1999)
7. Berger G, Guetta J, Klorin G, Badarneh R, Braun E, Brod V, Saleh NA, Katz A, Bitterman H, Azzam ZS. "Sepsis impairs alveolar epithelial function by downregulating Na-K-ATPase pump." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 301: L23-L30* (2011)
8. Birket SE, Chu KK, Houser GH, Diephuis BJ, Wilsterman EJ, Dierksen G, Gazur M, Shastry S, Li Y, Watson JD, Smith AT, Schuster BS, Hanes J, Grizzle WE, Sorscher EJ, Tearney GJ, Rowe SM. "A functional anatomic defect of the cystic fibrosis airway." *Am J Respir Crit Care Med 190: 421-432* (2014)

9. Blouquit S, Morel H, Hinnrasky J, Naline E, Puchelle E, Chinet T. "Characterization of ion and fluid transport in human bronchioles." *Am J Respir Cell Mol Biol 27: 503-510* (2002)
10. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FBJM. "Number and Proliferation of Clara Cells in Normal Human Airway Epithelium." *Am J Respir Crit Care Med 159: 1585-1591* (1999)
11. Bogdan R, Veith C, Clauss W, Fronius M. "Impact of mechanical stress on ion transport in native lung epithelium (Xenopus laevis): short-term activation of Na+, Cl (-) and K+ channels." *Pflugers Arch 456: 1109-1120* (2008)
12. Borovac J, Barker RS, Rievaj J, Rasmussen A, Pan W, Wevrick R, Alexander RT. "Claudin-4 forms a paracellular barrier, revealing the interdependence of claudin expression in the loose epithelial cell culture model opossum kidney cells." *Am J Physiol Cell Physiol 303: C1278-C1291* (2012)
13. Boucher RC, Stutts JM, Knowles MR, Cantley L, Gatzy JT. "Na+ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation." *J Clin Invest 78: 1245-1252* (1986)
14. Butterworth MB, Edinger RS, Frizzell RA, Johnson JP. "Regulation of the epithelial sodium channel by membrane trafficking." *Am J Physiol Renal Physiol 296: F10-F24* (2008)
15. Button B, Picher M, Boucher RC. "Differential effects of cyclic and constant stress on ATP release and mucociliary transport by human airway epithelia." *J Physiol 580: 577-592* (2007)
16. Caldwell RA, Boucher RC, Stutts MJ. "Serine protease activation of near-silent epithelial Na+ channels." *Am J Physiol Cell Physiol 268: C190-C194* (2004)
17. Chambers LA, Rollins BM, Tarran R. "Liquid movement across the surface epithelium of large airways." *Respir Physiol Neurobiol 195: 256-270* (2007)
18. Chen SP, Zhou B, Willis BC, Sandoval AJ, Liebler JM, Kim KJ, Ann DK, Crandall ED, Borok Z. "Effects of transdifferentiation and EGF on claudin isoform expression in alveolar epithelial cells." *J Appl Physiol 98: 322-328* (2004)

19. Choi HC, Kim CS, Tarran R. "Automated acquisition and analysis of airway surface liquid height by confocal microscopy." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 309: L109-L118* (2015)
20. Colegio OR, Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. "Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture." *Am J Cell Physiol 284: C1346-C1354* (2003)
21. Corcoran TE, Thomas KM, Brown S, Myerburg MM, Locke LW, Pilewski JM. "Liquid hyper-absorption as a cause of increased DTPA clearance in the cystic fibrosis airway." *EJNMMI Res 3*: 14 (2013)
22. Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG. "Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 285: L1166-L1178* (2003)
23. Dagenais A, Denis C, Vives MF, Girouard S, Massé C, Nguyen T, Yamagata T, Grygorczyk C, Kothary R, Berthiaume Y. "Modulation of alpha-ENaC and alpha1-Na+-K+-ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281: L217-L230* (2001)
24. Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA. "Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer." *Nature 507: 190-194* (2013)
25. Diakov A, Bera K, Mokrushina M, Krueger B, Korbmacher C. "Cleavage in the gamma-subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) plays an important role in the proteolytic activation of near-silent channels." *J Physiol 568: 4587-4608* (2008)
26. Donaldson SH, Bennet WD, Zeman KL, Knowles MR, Tarran R, Boucher RC. “Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline.” *N Engl J Med 354: 241-250 (*2006*)*
27. Elias N, Rafii B, Rahman M, Otulakowski G, Cutz E, O'Brodovich H. "The role of alpha, beta-, and gamma-ENaC subunits in distal lung epithelial fluid absorption induced by pulmonary edema fluid." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 293: L537-L545* (2007)
28. Fang C, Song Y, Hirsch J, Galietta LJ, Pedemonte N, Zemans RL, Dolganov G, Verkman AS, Matthay MA. “Contribution of CFTR to apical fluid transport in cultured human

alveolar epithelial type II cells.” *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290: L242-L249 (2006)*

29. Folkesson HG, Matthay MA, Frigeri A, Verkman AS. "Transepithelial water permeability in microperfused distal airways. Evidence for channel-mediated water transport." *J Clin Invest 97: 664-671* (1996)
30. Folkesson HG, Matthay MA, Hasegawa H, Kheradmand F, Verkman AS. "Transcellular water transport in lung alveolar epithelium through mercury-sensitive water channels." *Proc Natl Acad Sci USA 24: 4970-4974 (*1994)
31. Fronius M, Clauss WG, Althaus M. "Why do we have to move fluid to be able to breathe?" *Front Physiol eCollection 3: 146* (2012)
32. Fu X, Li Q, Feng Z, Mu D. "The roles of aquaporin-4 in brain edema following neonatal hypoxia ischemia and reoxygenation in a cultured rat astrocyte model." *Glia 55: 935-941* (2007)
33. Fulcher ML, Gabriel S, Burns KA, Yankaskas JR, Randell SH. “Well-differentiated human airway epithelial cell cultures.” *Methods Mol Med 107: 183-206* (2005)
34. Fulcher ML, Randell SH. “Human nasal and tracheo-bronchial respiratory cell culture.” *Methods Mol Biol 945: 109-121* (2013)
35. Gaillard EA, Kota P, Gentzsch M, Dokholyan NV, Stutts MJ, Tarran R. "Regulation of the epithelial Na+ channel and airway surface liquid volume by serine proteases." *Pflugers Arch 460: 1-17* (2010)
36. García-Caballero A, Dang Y, He H, Stutts MJ. "ENaC proteolytic regulation by channel-activating protease 2." *J Gen Physiol 132: 521-535* (2008)
37. Garcia-Caballero A, Rasmussen JE, Gaillard E, Watson MJ, Olsen JC, Donaldson SH, Stutts MJ, Tarran R. "SPLUNC1 regulates airway surface liquid volume by protecting ENaC from proteolytic cleavage." *Proc Natl Acad Sci USA 106: 11412-11427* (2009)
38. Geisow MJ. “Fluorescein conjugate as indicators if subcellular pH. A critical evaluation.” *Exp Cel Res 150: 29-35* (1984)
39. Greenwood IA, Yeung SY, Hettiarachi S, Andersson M, Baines DL. "KCNQ-encoded channels regulate Na+ transport across H441 lung epithelial cells." *Pflugers Arch 457: 785-794* (2009)

40. Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, Amselem S, Clement A. "Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis." *Int J Biochem Cell Biol 45: 2568-2573* (2013)
41. Harvey PR, Tarran R, Garoff S, Myerburg MM. "Measurement of the airway surface liquid volume with simple light refraction microscopy." *Am J Respir Cell Mol Biol 45: 592-599* (2011)
42. Hoenig MP, Zeidel ML. "Homeostasis, the milieu intérieur, and the wisdom of the nephron." *Clin J Am Soc Nephrol 9: 1272-1281* (2014)
43. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliot MW, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. "The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *N Engl J Med 350: 2645-2653* (2004)
44. Hou J, Paul DL, Goodenough DA. "Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions." *J Cell Sci 118: 5109-5118* (2005)
45. Hughey RP, Bruns JB, Kinlough CL, Harkleroad KL, Tong Q, Carattino MD, Johnson JP, Stockand JD, Kleyman TR. "Epithelial sodium channels are activated by furin-dependent proteolysis." *J Biol Chem 279: 18111-18114* (2004)
46. Hummler E, Barker P, Gatzy J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, Boucher R, Rossier BC. "Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice." *Nat Genet 12: 325-328* (1996)
47. Hyde DM, Hamid Q, Irvin CG. "Anatomy, pathology and physiology of the tracheobronchial tree: Emphasis on the distal airways." *J Allergy Clin Immunol 124: S72-S77* (2009)
48. Itani OA, Auerbach SD, Husted RF, Volk KA, Ageloff S, Knepper MA, Stokes JB, Thomas CP. "Glucocorticoid-stimulated lung epithelial Na(+) transport is associated with regulated ENaC and sgk1 expression." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 282: L631-L641* (2002)
49. Jiang X, Ingbar DH, O'Grady SM. "Adrenergic stimulation of Na+ transport across alveolar epithelial cells involves activation of apical Cl- channels." *Am J Physiol 275: C1610-C1620* (1998)

50. Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L, Barbry P, Dobbs LG. "Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis." *Proc Natl Acad Sci USA 99: 1966-1971* (2002)
51. Jourdain P, Becq F, Lengacher S, Boinot C, Magistretti PJ, Marquet P. "The human CFTR protein expressed in CHO cells activates aquaporin-3 in a cAMP-dependent pathway: study by digital holographic microscopy." *J Cell Sci 127: 546-556* (2013)
52. Kage H, Flodby P, Gao D, Kim YH, Marconett CN, DeMaio L, Kim KJ, Crandall ED, Borok Z. "Claudin 4 knockout mice: normal physiological phenotype with increased susceptibility to lung injury." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 307: L524-L536* (2014)
53. Kimizuka H, Koketsu K. "Ion transport through cell membrane." *J Theor Biol 6: 290-305* (1964)
54. Knowles M, Murray G, Shallal J, Askin F, Ranga V, Gatzy J, Boucher RC. "Bioelectric properties and ion flow across excised human bronchi." *J Appl Physiol 56: 868-877* (1984)
55. Korbmacher JP, Michel C, Neubauer D, Thompson K, Mizaikoff B, Frick M, Dietl P, Wittekindt OH. "Amiloride-sensitive fluid resorption in NCI-H441 lung epithelia depends on an apical Cl- conductance." *Physiol Rep 16: e00201* (2014)
56. Krane CM, Deng B, Mutyam V, McDonald CA, Pazdziorko S, Mason L, Goldman S, Kasaian M, Chaudhary D, Williams C, Ho MW. "Bronchiolar expression of aquaporin-3 (AQP3) in rat lung and its dynamics in pulmonary oedema." *Cytokine 46: 111-118* (2009)
57. Kreda SM, Gynn MC, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE. "Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung." *Am J Respir Cell Mol Biol 24: 224-234* (2001)
58. Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. "Tight junction, selective permeability, and related diseases." *Semin Cell Dev Biol 36: 166-176* (2014)
59. Larsen EH, Møbjerg N. "Na+ recirculation and isosmotic transport." *J Membr Biol 212: 1-15* (2007)

60. Larsen EH, Møbjerg N, Sørensen JN. "Fluid transport and ion fluxes in mammalian kidney proximal tubule: a model analysis of isotonic transport." *Acta Physiol (Oxf) 187: 177-189* (2006)
61. Larsen EH, Sørensen JB, Sørensen JN. "Analysis of the sodium recirculation theory of solute-coupled water transport in small intestine." *J Physiol 542: 33-50* (2002)
62. Larsen EH, Sørensen JB, Sørensen JN. "A mathematical model of solute coupled water transport in toad intestine incorporating recirculation of the actively transported solute." *J Gen Physiol 116: 101-124* (2000)
63. Larsen, EH, and N Møbjerg. "Na+ recirculation and isosmotic transport." *J Membr Biol 212: 1-15* (2006)
64. Lechner JF, LaVeck MA. “A serum-free method for culturing nomal human bronchial epithelial cells at clonal density. *J Tissue Culture Meth 9: 43-48* (1985)
65. Levin MH, Sullivan S, Nielson D, Yang B, Finkbeiner WE, Verkman AS. “Hypertonic saline therapy in cystic fibrosis: Evidence against the proposed mechnism involving aquaporins.” *J Biol Chem 281: 25803-15812* (2006)
66. Li X, Comellas AP, Karp PH, Ernst SE, Moninger TO, Gansemer ND, Taft PJ, Pezzulo AA, Rector MV, Rossen N, Stoltz DA, McCray PB Jr, Welsh MJ, Zabner J. "CFTR is required for maximal transepithelial liquid transport in pig alveolar epithelia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 303: L152-L160* (2012)
67. Lindert J, Perlman CE, Parthasarathi K, Bhattacharya J. "Chloride-dependent secretion of alveolar wall liquid determined by optical-sectioning microscopy." *Am J Respir Cell Mol Biol 36: 688-696* (2008)
68. Ma T, Fukuda N, Song Y, Matthay MA, Verkman AS. "Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice." *J Clin Invest 105: 93-100* (2000)
69. Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. "Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels." *J Biol Chem 274: 20071-20074* (1999)
70. Maclaren OJ, Sneyd J, Crampin EJ. "What do aquaporin knockout studies tell us about fluid transport in epithelia?" *J Membr Biol 246: 297-305* (2013)

71. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. "Increased airway epithelial Na-absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice." *Nat Med 10: 487-493* (2004)
72. Mall M, Wissner A, Gonska T, Calenborn D, Kuehr J, Brandis M, Kunzelmann K. "Inhibition of amiloride-sensitive epithelial Na(+) absorption by extracellular nucleotides in human normal and cystic fibrosis airways." *Am J Respir Cell Mol Biol 23: 755-761* (2000)
73. Matalon S, Barteszowski R, Collawn JF. "Role of Epithelial Sodium Channels (ENaC) In the Regulation of Lung Fluid Homeostasis." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 309: L1229-L1238 (*2015)
74. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzy JT, Davis WC, Boucher RC. "Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease." *Cell 95: 1005-1015* (1998)
75. Minakata Y, Suzuki S, Grygorczyk C, Dagenais A, Berthiaume Y. "Impact of beta-adrenergic agonist on Na+ channel and Na+-K+-ATPase expression in alveolar type II cells." *Am J Physiol 275: L414-L422* (1998)
76. Myerburg MM, Butterworth MB, McKenna EE, Peters KW, Frizzell RA, Kleyman TR, Pilewski JM. "Airway surface liquid volume regulates ENaC by altering the serine protease-protease inhibitor balance: a mechanism for sodium hyperabsorption in cystic fibrosis." *J Biol Chem 281: 27942-27949* (2006)
77. Myerburg MM, McKenna EE, Luke CJ, Frizzell RA, Kleyman TR, Pilewski JM. "Prostasin expression is regulated by airway surface liquid volume and is increased in cystic fibrosis." *Am J Physiol Lung Cell Physiol 294: L932-L941* (2008)
78. Neubauer D, Korbmacher J, Frick M, Kiss J, Timmler M, Dietl P, Wittekindt OH, Mizaikoff B. "Deuterium oxide dilution: a novel method to study apical water layers and transepithelial water transport." *Anal Chem 85: 4247-4250* (2013)
79. O'Brodovich H, Yang P, Gandhi S, Otulakowski G. "Amiloride-insensitive Na+ and fluid absorption in the mammalian distal lung." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 294:* L401-L408 (2008)

80. Overgaard CE, Mitchell LA, Koval M. “Roles for claudins in alveolar epithelial barrier function.” Ann N Y Acad Sci 1257: 167-174 (2012)
81. Papadopoulos MC, Bennett JL, Verkman AS. "Treatment of neuromyelitis optica: state-of-the-art and emerging therapies." Nat Rev Neurol 10: 493-506 (2014)
82. Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS. "Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema." *FASEB J 18: 1291-1293* (2004)
83. Pearce D, Soundararajan R, Trimpert C, Kashlan OB, Deen PM, Kohan DE. "Collecting duct principal cell transport processes and their regulation." *Clin J Am Soc Nephrol 10: 135-146* (2014)
84. Planès C, Blot-Chabaud M, Matthay MA, Couette S, Uchida T, Clerici C. "Hypoxia and beta 2-agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells." *J Biol Chem 277: 47318-47324* (2002)
85. Randell SH, Boucher RC. "Effective Mucus Clearance Is Essential for Respiratory Health." *Am J Resp Cell Mol Biol 35: 20-28* (2006)
86. Regnier A, Dannhoffer L, Blouquit-Laye S, Bakari M, Naline E, Chinet T. "Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the human distal lung." *Hum Pathol 39: 368-376* (2008)
87. Reynolds SD, Malkinson AM. "Clara Cell: Progenitor for the Bronchial Epithelium." *Int J Biochem 42: 1-4* (2010)
88. Ribeiro Mde C, Hirt L, Bogousslavsky J, Regli L, Badaut J. "Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice." *J Neurosci Res 83: 1231-1240* (2006)
89. Rittirsch D, Flierl MA, Day DE, Nadeau BA, McGuire SR, Hoesel LM, Ipaktchi K, Zetoune FS, Sarma JV, Leng L, Huber-Lang MS, Neff TA, Bucala R, Ward PA. "Acute lung injury induced by Lipopolysaccharide is independent of complement activation." *J Immunol 180: 7664-7672* (2008)
90. Rock JR, Randell SH, Hogan BLM. "Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling." *Disease Models & Mechanisms 3: 545-556* (2010)

91. Rokkam D, Lafemina MJ, Lee JW, Matthay MA, Frank JA. "Claudin-4 levels are associated with intact alveolar fluid clearance in human lungs." *Am J Pathol 179: 1081-1087* (2011)
92. Ronchi CF, Ferreira AL, Campos FJ, Kurokawa CS, Carpi MF, Moraes MA, Bonatto RC, Yeum KJ, Fioretto JR. "Interactive effects of mechanical ventilation, inhaled nitric oxide and oxidative stress in acute lung injury." *Respir Physiol Neurobiol 190: 118-123* (2014)
93. Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Günzel D, Fromm M. "Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel." *J Cell Sci 123: 1913-1921* (2010)
94. Sahin-Yilmaz A, Naclerio RM. "Anatomy and Physiology of the upper Airway." *Proc Am Thorac Soc 8: 31-39* (2011)
95. Sakuma T, Okaniwa G, Nakada T, Nishimura T, Fujimura S, Matthay MA. "Alveolar fluid clearance in the resected human lung." *Am J Respir Crit Care Med 150: 305-310* (1994)
96. Salomon JJ, Muchitsch VE, Gausterer JC, Schwagerus E, Huwer H, Daum N, Lehr CM, Ehrhardt C. "The cell line NCl-H441 is a useful in vitro model for transport studies of human distal lung epithelial barrier." *Mol Pharm 11: 995-1006* (2014)
97. Sasaki H, Matsui C, Furuse K, Mimori-Kiyosue Y, Furuse M, Tsukita S. "Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes." *Proc Natl Acad Sci USA 100: 3971-3976* (2003)
98. Sato K, Kobayashi K, Aida S, Tamai S. "Bronchiolar expression of aquaporin-3 (AQP3) in rat lung and its dynamics in pulmonary oedema." *Pflugers Arch 449: 106-114* (2004)
99. Schlingmann B, Molina SA, Koval M. "Claudins: Gatekeepers of lung epithelial function." *Semin Cell Dev Biol 42: 47-57* (2015)
100. Schnermann J, Chou CL, Ma T, Traynor T, Knepper MA, Verkman AS. "Defective proximal tubular fluid reabsorption in transgenic aquaporin-1 null mice." *Proc Natl Acad Sci USA 95: 9660-9664* (1998)

101. Schreiber R, Nitschke R, Greger R, Kunzelmann K. "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells." *J Biol Chem 274: 11811-11816* (1999)
102. Shamsuddin AK, Quinton PM. "Surface fluid absorption and secretion in small airways." *J Physiol 590: 3561-3574* (2012)
103. Sheng S, Carattino MD, Bruns JB, Hughey RP, Kleyman TR. "Furin cleavage activates the epithelial Na+ channel by relieving Na+ self-inhibition." *Am J Physiol Renal Physiol 290: F1488-F1496* (2006)
104. Shi S, Carattino MD, Hughey RP, Kleyman TR. "ENaC regulation by proteases and shear stress." *Curr Mol Pharmacol 6: 28-34* (2013)
105. Solymosi EA, Kaestle-Gembhardt SM, Vadasz I, Wang L, Neye N, Chupin CJA, Rozowsky S, Ruehl R, Tabuchi A, Schulz H, Kapus A, Morty RE, Kuebler WM. "Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema." *Proc Natl Acad Sci USA 110: E2308-E2316* (2013)
106. Song Y, Fukuda N, Bai C, Ma T, Matthay MA, Verkman AS. "Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice." *J Physiol 525: 771-779* (2000)
107. Song Y, Jayaraman S, Yang B, Matthay MA, Verkman AS. "Role of aquaporin water channels in airway fluid transport, humidification, and surface liquid hydration." *J Gen Physiol 117: 573-582* (2001)
108. Song Y, Namkung W, Nielson DW, Lee JW, Finkbeiner WE, Verkman AS. "Airway surface liquid depth measured in ex vivo fragments of pig and human trachea: dependence on Na+ and Cl- channel function." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 297: L1131-L1140* (2009)
109. Song Y, Verkman AS. "Aquaporin-5 dependent fluid secretion in airway submucosal glands." *J Biol Chem 276: 41288-41292* (2001)
110. Steimer A, Franke H, Haltner-Ukomado E, Laue M, Ehrhardt C, Lehr CM. "Monolayers of porcine alveolar epithelial cells in primary cultureas an in vitro model for drug absorption studies." *Eur J Pharm Biopharm 66: 372-382* (2007)

111. Stonebraker JR, Wagner D, Lefensty RW, Burns K, Gendler SJ, Bergelson JM, Boucher RC, O'Neal WK, Pickles RJ. “Glycocalyx restricts adenoviral vector access to apical receptors expressed on respiratory epithelium in vitro and in vivo: role for tethered mucins as barriers to lumenal infection.“ *J Virol 78: 13755-13768* (2004)
112. Tan CD, Selvanathar IA, Baines DL. "Cleavage of endogenous γENaC and elevated abundance of αENaC are associated with increased Na^+ transport in response to apical fluid volume expansion in human H441 airway epithelial cells." *Pflugers Arch 462: 431-441* (2011)
113. Tarran R, Button B, Boucher RC. "Regulation of normal and cystic fibrosis airway surface liquid volume by phasic shear stress." *Annu Rev Physiol 68: 543-561* (2006)
114. Tarran R, Trout L, Donaldson SH, Boucher RC. "Soluble Mediators, Not Cilia, Determine Airway Surface Liquid Volume in Normal and Cystic Fibrosis Superficial Airway Epithelia." *J Gen Physiol 127: 591-604* (2006)
115. Torimura M, Kurata S, Yamada K, Yokumaku T, Kamagata Y, Kanagawa T, Kurane R. “Fluorerescence-quenching phenomenon by photoinduced electron transfer between a fluorescent dye and a nucleotide base.” *Anal Sci 17: 155-160* (2001)
116. Towne JE, Harrod KS, Krane CM, Menon AG. "Decreased expression of aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection." *Am J Respir Cell Mol Biol 22: 34-44* (2000)
117. Tsukita S, Katsuno T, Yamazaki Y, Umeda K, Tamura A, Tsukita S. "Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier functio." *Ann N Y Acad Sci 1165: 44-52* (2009)
118. Van Itallie CM, Anderson JM. "Architecture of tight junctions and principles of molecular composition." *Semin Cell Dev Biol 36: 157-165* (2014)
119. Verkman AS, Yang B, Song Y, Manley GT, Ma T. "Role of water channels in fluid transport studied by phenotype analysis of aquaporin knockout mice." *Exp Physiol 85: 233S-241S* (2000)
120. Verkman, AS. "Aquaporins at a glance." *J Cell Sci 124: 2107-2112* (2011)
121. Verkman, AS. "Water Permeability Measurement in Living Cells and Complex Tissues." *J Membrane Biol 173: 73–87* (2000)

122. Wang EC, Lee JM, Johnson JP, Kleyman TR, Bridges R, Apodaca G. "Hydrostatic pressure-regulated ion transport in bladder uroepithelium." *Am J Physiol Renal Physiol 285: F651-F663* (2003)
123. Wang F, Daugherty B, Keise LL, Wei Z, Foley JP, Savani RC, Koval M. "Heterogeneity of claudin expression by." *Am J Respir Cell Moll Biol 29: 62-70* (2003)
124. Wang Q, Lian QQ, Li R, Ying BY, He Q, Chen F, Zheng X, Yang Y, Wu DR, Zheng SX, Huang CJ, Smith FG, Jin SW. "Lipoxin A(4) activates alveolar epithelial sodium channel, Na,K-ATPase, and increases alveolar fluid clearance." *Am J Respir Cell Mol Biol 48: 610-618* (2013)
125. Wang Y, Tajkhorshid E. "Molecular mechanisms of conduction and selectivity in aquaporin water channels." *J Nutr 137: 1509S-1515S* (2007)
126. Ward HE, Nicholas TE. "Alveolar Type I and Type II cells." *Aust NZ J Med 14: 731-734* (1984)
127. Ware LB, Matthay MA. "Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome." *Am J Respir Crit Care Med 63: 1376-1383* (2001)
128. Wray C, Mao Y, Pan J, Chandrasena A, Piasta F, Frank JA. "Claudin-4 augments alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 297: L219-L227* (2009)
129. Yaghi A, Zaman A, Cox G, Dolovich MB. "Ciliary beating is depressed in nasal cilia form chronic obstructive pulmonary disease subjects." *Respir Med 106: 1139-1147* (2012)
130. Zelenina M, Tritto S, Bondar AA, Zelenin S, Aperia A. "Copper inhibits the water and glycerol permeability of aquaporin-3." *J Biol Chem 279: 51939-51943* (2004)
131. Zhang YW, Bi LT, Hou SP, Zhao XL, Song YL, Ma TH. "Reduced lung water transport rate associated with downregulation of aquaporin-1 and aquaporin-5 in aged mice." *Clin Exp Pharmacol Physiol 36: 734-738* (2009)

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.