Universität Ulm

Institut für allgemeine Physiologie

Direktor: Prof. Dr. P. Dietl

Effekt von Aquaporin 3 auf interzelluläre Kontakte in Atemwegsepithelien

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Magdalena Alexandra Holzer

Stockerau

2025

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. O. Wittekindt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Bode

Tag der Promotion: 16. April 2026

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis III
Abkürzungsverzeichnis V
1. Einleitung 1
1.1 Aufbau des Atemweges 1
1.2 Aufbau des Atemwegsepithels 1
1.3 Was sind Aquaporine und Rolle von Aquaporin 3 im Atemwegsepithel 3
1.4 Aquaporin 3 im Colonepithel 4
2. Material 5
2.1 Geräte und Software 5
2.2 Materialien und Kits 7
2.3 Zellkultur 8
2.4 Lösungen 9
2.5 Antikörper 10
2.6 Primer 11
2.7 Medien/ Pufferlösungen 12
3. Methoden 14
3.1 Zellkultur 14
3.2 Filter 14
3.3 TEER 15
3.4 Permeabilitätsmessung 15
3.5 Deuteriumoxid-Delutionsmethode 17
3.6 qRT-PCR 19
3.6.1 RNA-Isolierung 19
3.6.2 cDNA-Synthese 20
3.6.3 qRT-PCR 21

3.7 Western Blot ... 22
3.7.1 Zellhomogenisat ... 22
3.7.2 BCA (Bicinchoninsäuretest) ... 22
3.7.3 Western Blot ... 22
3.8 Statistik ... 24
4. Ergebnisse ... 25
4.1 Einfluss des Aquaporin 3 Silencing auf das Epithel an Tag 7 nach ALI ... 25
4.1.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand ... 26
4.1.2 Permeabilitätsmessungen ... 27
4.1.3 Wassermessungen ... 30
4.1.4 Messung der Expression der Tight junction Gene ... 30
4.2 Zeitverläufe ... 32
4.2.1 Zeitverlauf TEER ... 32
4.2.2 Zeitverlauf der Expression von Tight junction Genen ... 34
4.3 Western Blots Claudin 1, 3 und 4 ... 37
5. Diskussion ... 41
5.1 Einfluss von AQP3 auf das Atemwegsepithel ... 41
5.2 Das ASL entsteht transzellulär ... 43
5.3 AQP3 beeinflusst die Tight junctions (TJ) ... 45
5.4 Claudine im Schlussleistenkomplex ... 47
5.5 Einfluss von AQP3 auf die Ausbildung der Claudine in den TJ ... 49
5.6 Einfluss von AQP3 auf die Proteinmenge der Claudine in den TJ ... 51
6. Zusammenfassung ... 54
7. Literaturverzeichnis ... 55
8. Danksagung ... 60
9. Lebenslauf ... 61

Abkürzungsverzeichnis

ALI	air-liquid-interface (Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche)
AQP	Aquaporin
ASL	apical surface liquid (apikale Oberflächenflüssigkeit) airway surface liquid (Oberflächenflächenflüssigkeit der Atemwege)
BCA	Bicinchoninic acid assay (Bicinchoninsäure-Test)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Deoxyribonukleinsäure)
CLDN	Claudin
csFBS	charcoal-stripped fetal bovine serum (Holzkohle-gereinigtes fetales Rinderserum)
DNase	Deoxyribonuklease
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HMBS	Hydroxymethylbilansynthase
IgG	Immunglobulin G
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NCI-H441	
P_{app}	apparenter Permeabilitätskoeffizient
PBS	phosphat-buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	real-time quantitative polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion)
RAU	relative arbitrary unit (willkürliche Einheit)
RIPA-Puffer	Radio-Immunoprecipitation-Assay-Puffer
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
shRNA	short-hairpin ribonucleic acid (kleine Haarnadel Ribonukleinsäure)
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)

TEER	Transepithelial electrical restistance (transepithelialer elektrischer Widerstand)
TJ	Tight junctions (Zonula occludens, Schlussleistenkomplex)
TJP	Tight junction Protein
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZO	Zonula occludens

1. Einleitung

1.1 Aufbau des Atemweges

Der Atemweg besteht aus einem luftleitenden (konduktiven) und einem respiratorischen Teil. Der konduktive Teil besteht aus Nasenhöhle, Pharynx, Larynx, Trachea, Hauptbronchien und dem Bronchialbaum bis zur 16. Teilung. Dieser Teil sorgt für eine Erwärmung und Anfeuchtung eingeatmeter Luft. Zudem werden hier Husten- und Niesreflexe ausgelöst und es findet die mukoziliäre Clearance statt.
Der respiratorische Teil beginnt ab der 17. Teilung des Bronchialbaums, da ab dieser Stelle Alveolen ausgebildet werden. Insgesamt besteht der Bronchialbaum aus 23 Teilungen. Im respiratorischen Teil findet der Gasaustausch statt (Wittekindt, 2017; Schmidt, 2016).

1.2 Aufbau des Atemwegsepithels

Die Oberfläche des Atemweges wird durch eine Epithelzellschicht ausgebildet. Diese Epithelzellschicht bildet eine Barriere zwischen dem luftgefüllten Teil des Atemweges und dem flüssigkeitsgefüllten interstitiellen Kompartiment (Wittekindt, 2017, Yuksel et al., 2017).

Das respiratorische Epithel besteht hauptsächlich aus Flimmerzellen, Basalzellen und mucusbildende Becherzellen. Es ist mehrreihig und wird in den kleinen Bronchien zunehmend einreihig. Die Anzahl der Flimmer- und Becherzellen nimmt nach distal hin ab, während anstelle der Becherzellen zunehmend Keulenzellen (Club Zellen) auftreten, deren Anzahl nach distal weiter zunimmt. Keulenzellen produzieren Proteine für die natürliche Immunabwehr (Yuksel et al., 2017; Wittekindt, 2017).

Die Epithelzellschicht bildet eine erste Abwehr gegen Krankheitserreger und Schadstoffe. Durch mucusbildende Zellen und Flimmerzellen können Partikel, die in die Lunge gelangt sind, immobilisiert und abtransportiert werden. Dieser Abwehrmechanismus nennt sich mukoziliäre Clearance (Wittekindt, 2017; Yuksel et al., 2017).

Auf der Epithelzellschicht befindet sich eine Flüssigkeitsschicht, die man auch airway surface liquid (ASL) nennt. Diese ist wichtig für die mukoziliäre Clearance und bewahrt die Epithelzellschicht vor Schädigung durch unmittelbaren Kontakt mit der Luft und vor der Austrocknung (Wittekindt et al., 2019; Boucher, 2002).

Die Barrierefunktion des Atemwegepithels hängt vom Schlussleistenkomplex, oder auch tight junctions (TJ), ab (Wittekindt, 2017; Koval, 2012).

Der Schlussleistenkomplex besteht aus Multiproteinkomplexen, die sich in unterschiedlichen, parallel angeordneten Strängen lokalisieren. Die Hauptbarrierefunktion hängt zum einen von der Anzahl der Stränge ab, und zum anderen von der Zusammensetzung und Dynamik des Schlussleistenkomplexes. Die Hauptbestandteile des Schlussleistenkomplexes sind Transmembranproteine aus der Familie der Claudine. Diese stabilisieren den Schlussleistenkomplex, bilden eine Barriere und beeinflussen somit unmittelbar die Durchlässigkeit des Schlussleistenkomplexes. Es gibt unterschiedliche Arten von Claudinen. Während eine Art den extrazellulären Raum zwischen den Zellen verschließen, besteht eine weitere Art aus Poren-bildenden Claudinen, die die Durchlässigkeit der TJ gezielt erhöhen und auch einen parazellulären Flüssigkeitsfluss ermöglichen. Die Claudine sind Transmembranproteine mit einer Größe von 22 bis 27 kDa. Sie bestehen aus vier Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Regionen. Die beiden extrazellulären Domänen sind essentiell für die Ausbildung eines Schlussleistenkomplexes. Die erste, mehr N-terminal gelegene Domäne ist entscheidend für die selektive Permeabilität des Schlussleistenkomplexes. Die zweite, mehr C-terminal gelegene Domäne hat strukturelle Funktionen (Koval, 2012).

Neben Claudinen sind Occludin, Marvel D3 und Tricellulin regulierende Bestandteile des Schlussleistenkomplexes. Der Schlussleistenkomplex wird über

die Proteine Zonula occludens 1 und 2 (ZO1 und ZO2) mit dem Actincytoskelett verknüpft (Koval, 2012).

1.3 Was sind Aquaporine und Rolle von Aquaporin 3 im Atemwegsepithel

Damit der Gasaustausch und die mukoziliäre Clearance funktionieren, muss das Volumen des ASL in einem bestimmten Bereich gehalten werden. Das ASL bildet und stabilisiert sich durch Sekretion und Resorption von Flüssigkeit, die durch aktiven Ionentransport angetrieben und limitiert wird. Durch Regulierung des resorptiven und sekretorischen Flüssigkeitstransports wird die Homöostase des ASL aufrechterhalten (Schmidt et al., 2017; Wittekindt et al., 2019).

Aquaporine bilden Wasserkanäle. Sie sind wichtig für den transzellulären Transport von Wasser über Epithelien. Es gibt 13 homologe Varianten von Aquaporinen. Diese bestehen aus 6 transmembranübergreifenden Segmenten mit zytosolischen N- und C-Endstücken. Die selektive Permeabilität hängt von der Faltung des Aquaporinkanals ab. Jede monomere Untereinheit des Aquaporins bildet seinen eigenen Wasserkanal, jedoch sind die Monomere in der Plasmamembran als Tetramere angeordnet (Wittekindt et al., 2019).

Die Aktivität der Aquaporine in den Zellen wird durch Schließen oder Öffnen des Aquaporinkanals oder durch Steuerung der Dichte oder Anzahl der Aquaporinkanäle stark reguliert. Dies geschieht durch Entfernen der Aquaporine aus der Plasmamembran, Einschluss der Aquaporine in die Plasmamembran oder durch Veränderung der Aquaporinexpression (Wittekindt et al., 2019).

In den Lungenepithelzellen befinden sich die Aquaporine 1, 3, 4 und 5. (Wittekindt et al., 2019).

In den NCI-H441 Epithelzellen haben RT-PCR-Experimente an NCI-H441 Epithelzellen zeigten vor allem hohe Expressionslevels für Aquaporin 3, 4 und 10 vorkommen (Schmidt et al., 2017).

Aquaporin 3 befindet sich in der lateralen Membran in Epithelzellen des Nasenraumes, der Trachea, Bronchien und Bronchiolen. Zudem besitzen auch

Typ 2 Pneumozyten Aquaporin 3 Kanäle (Wittekindt et al., 2019; Schmidt et al., 2017).

1.4 Aquaporin 3 im Colonepithel

Darmepithelien weisen eine hohe funktionelle Ähnlichkeit mit Atemwegsepithelien auf. Auch das Colonepithel bildet eine Barriere gegen Krankheitserreger. Außerdem sorgt das Colonepithel für eine ausgeglichene Absorption und Sekretion von Wasser und Elektrolyten. AQP3 scheint daher im Colonepithel eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Flüssigkeitstransportes zu haben. Außerdem spielt AQP3 eine wichtige Rolle für die Barrierefunktion des Darmepithels (Yde et al., 2021).

Die Inhibierung der AQP3-Expression führt in kultivierten Colonepithelzellen zu einer Modulation der Schlussleistenkomplexproteine Claudin 1 und Occludin. Dies konnte in Caco-2 Epithelien gezeigt werden. Caco-2 Epithelien sind ein sehr gut etabliertes in-vitro Model des Colonepithels. In diesem Epithelmodel führte die Inhibition der AQP3-Expression mit Hilfe von sh-RNA zu einer erhöhten Permeabilität des Epithels für Ionen, Makromoleküle und Bakterienzellen des Stammes *E. coli* C25 (Zhang et al., 2011).

Ich habe daher angenommen, dass AQP3 im Atemwegsepithel ebenfalls die funktionellen und strukturellen Eigenschaften der TJ und des Schlussleistenkomplexes beeinflusst.

Das Ziel meiner Arbeit soll daher sein, den Einfluss von AQP3 auf die funktionellen Eigenschaften des Lungenepithels aufzuklären. Die Arbeiten sollen an einem *in-vitro* Zellmodell auf der Basis von NCI-H441 Zellen durchgeführt werden. Dieses *in-vitro* Modell ist ein gut etabliertes Modell und weist funktionelle Eigenschaften auf, die denen des distalen Atemwegsepithels entsprechen. Dabei hat es den Vorteil, dass es auch molekularbiologische Modifikationen ermöglicht.

2. Material

2.1 Geräte und Software

Tabelle 1 Geräte und Software

Odyssey Fc	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg vor der Höhe)
realplex^2 Mastercycler epgradient S	Eppendorf AG (Hamburg)
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	peQlab/ VWR International GmbH (Darmstadt)
peQSTAR 2X	peQlab/ VWR International GmbH (Darmstadt)
iBlot™	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
PowerPAC 300	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen)
Alpha II Eco ATR	Bruker Corporation (Billerica, MA, USA)
infinite M200	Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim)
Mini Gel Tank	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Mini Star silverline Zentrifuge	VWR International GmbH (Darmstadt)
Heidolph TopMix 94323	BioBlock Scientific
Agitateur Toop-Mix 11118	BioBlock Scientific
PerfectSpin P	peQlab/ VWR International GmbH (Darmstadt)
MC 6 Centrifuge	Sarstedt AG & Co.KG (Nürnbrecht)

Thermomixer compact	Eppendorf AG (Hamburg)
Zentrifuge 5427R Rotor: FA-45-30-11	Eppendorf AG (Hamburg)
Biometra OV3 Schüttler	Biometra GmbH (Göttingen)
s@feflow 1.2 Sicherheitswerkbank	Euroclone S.p.A. (Siziano, Italien)
HERA safe Sicherheitswerkbank	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
HERA cell 150 Inkubator	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Mini Vac eco Absaugpumpe	Axon Lab AG (Reichenbach/Stuttgart)
Heraeus Megafuge 8 Centrifuge; TX-150 Rotor	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Fuego pro Gasbrenner	WLD-TEC GmbH (Arenshausen)
gasprofi 1 SCS Gasbrenner	WLD-TEC GmbH (Arenshausen)
Sonoplus	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG
Axiovert 40 CFL inverses Mikroskop	Carl Zeiss AG (Oberkochen)
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg)
Neubauer Improved Zellkammer	OPTIK-Labor (Görlitz)
Pipetus® Pipetierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt)
IKA® KS 3000i control	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (Staufen)
cellZskope®	nanoAnalytics GmbH (Münster)
Image Studio Lite	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg vor der Höhe)
Microsoft Office Excel 2019	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)

Microsoft Office Word	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
NanoDrop 2000	PeqLab/ VWR International GmbH (Darmstadt)
realplex 2.2	Eppendorf AG (Hamburg)
Opus 8.2.28	Bruker optics (Ettlingen)
i-control™ 2.0.	Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim)
Prism 9	GraphPad Software Inc. (San Diego, CA, USA)

2.2 Materialien und Kits

Tabelle 2 Materialien und Kits (TBS = Tri-Buffered Saline; FITC = Fluoresceinisothiocyanat)

Cover Slips, Durchmesser 16mm	VWR International GmbH (Darmstadt)
Superfrost™ Plus Adhesion Microscope Slides	epredia/ Microm International GmbH (Dreieich)
twin.tec real-time PCR Plate 96, skirted	Eppendorf AG (Hamburg)
Biosphere® SafeSeal Tube 1,5ml	Sarstedt AG & Co.KG (Nürnbrecht)
PCR tube 0,2ml, attached flat	nerbe plus (Winsen/Luhe)
10 Surgical Disposable Scalpels	B. Braun SE (Melsungen)
TC- Inserts 24-well, PET 0,4µm, TP	Sarstedt AG & Co.KG (Nürnbrecht)
Costar® Stripette® 5ml, 10ml, 25ml	Corning Inc. (Kaiserslautern)
Pipettenspitzen 1000µl, Filter Tip	Greiner AG (Kremsmünster, Österreich)
Biosphere® Filter Tips 10-100µl, 20-300µl, 0,1-20µl	Sarstedt AG & Co.KG (Nürnbrecht)

CELLSTAR® 24-well Kulturplatte	Greiner AG (Kremsmünster, Österreich)
Tube 15ml, 50ml	Sarstedt AG & Co.KG (Nürnbrecht)
TC-Flasche T25, stand, Bel. Kap.	Sarstedt AG & Co.KG (Nürnbrecht)
Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf AG (Hamburg)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
my-Budget 5x EvaGreen (R) QPCR-Mix II/ (Volumen) 5 x	Bio-Budget Technologies GmbH (Krefeld)
SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
10x SuperScript™ Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
5x VILO™ Reaction Mix	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
my-Budget RNA Mini Kit	Bio-Budget Technologies GmbH (Krefeld)
RNAse-Free DNAse Set	Quiagen GmbH (Hilden)
Fluorescein	Merck KGaA (Darmstadt)
FITC 4kDa Dextran	Merck KGaA (Darmstadt)
FITC 20kDa Dextran	Merck KGaA (Darmstadt)

2.3 Zellkultur

Tabelle 3 Zellen und Materialien der Zellkultur

NCI-H441	American Type Culture Collection (Manassas, USA)

NCI-H441 V2LHS62430	
NCI-H441 RHS4348	
Puromycin-dihydrochlorid aus Streptomyces alboniger	Merck KGaA (Darmstadt)
Dexamethason	Merck KGaA (Darmstadt)
Insulin-Transferin-Selenium	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
fötales Kälberserum, charcoal stripped	Merck KGaA (Darmstadt)
Natrium-Pyruvat	Merck KGaA (Darmstadt)
TrypLE™ Express	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
RPMI-1640 Medium	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)

Die Zellinien NCI-H441 V2LHS62430 und NCI-H441 RHS4348 waren an dem Institut für Allgemeine Physiologie der Universität Ulm bereits vorhanden und wurden in dieser Arbeit verwendet.

2.4 Lösungen

Tabelle 4 Lösungen

Methanol	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethanol	Merck KGaA (Darmstadt)
isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun SE (Melsungen)
Lysis Solution RL, Guadinium Thiocaynate	Bio-Budget Technologies GmbH (Krefeld)

Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
70% Isopropanol	Apotheke des Universitätsklinikums Ulm
Bacillol	Apotheke des Universitätsklinikums Ulm
Deuteriumoxid 99,95 Atom%D	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Wasser, steril (Art.Nummer T143.4)	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe)

2.5 Antikörper

Tabelle 5 Antikörper

Anti-Claudin 1 IgG, rabbit (ab15098)	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Claudin 3 IgG, rabbit (ab15102)	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Claudin 4 IgG, rabbit (ab53156)	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Claudin 8 IgG, rabbit (402600)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Anti-Claudin 10 IgG, rabbit (ab52234)	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Claudin 12 IgG, rabbit (38-8200)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Anti-Claudin 15 IgG, rabbit (38-9200)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Anti-Occludin mouse IgG (MAB7074)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Anti-ZO-1 rabbit IgG (ab221547)	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Aquaporin 3 IgG, rabbit (ab125219)	Abcam (Cambridge, UK)

Anti-Marveld2/Tricellulin IgG, rabbit (ab80421)	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-b-Actin mouse IgG (A1978)	Merck KGaA (Darmstadt)
IRDye 680RD donkey anti-rabbit IgG (926-68073)	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg vor der Höhe)
IRDye 800CW donkey anti-mouse IgG (926-32212)	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg vor der Höhe)
Alexa Fluor 488 Donkey anti-rabbit IgG (H+L), (A21206)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Alexa Fluor 647 Donkey anti-mouse IgG (H+L), (A31571)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Alexa Fluor 568 Donkey anti-rabbit IgG (H+L), (A10042)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
HOECHST 33342	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)

2.6 Primer

Tabelle 6 Primer (TJP1/ZO1 = Tight junction Protein 1/ Zonula occludens Protein 1; HMBS = Hydroxymethylbilansynthase)

Claudin 1, human	QT00225764	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 2, human	QT00089481	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 3, human	QT00201376	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 4, human	QT00241073	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 5, human	QT00232197	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 6, human	QT00235193	Quiagen GmbH (Hilden)

Claudin 7, human	QT00236061	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 8, human	QT00212268	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 9, human	QT00209482	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 10, human	QT00031101	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 11, human	QT00008085	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 12, human	QT01012186	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 14, human	QT00234731	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 15, human	QT00202048	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 16, human	QT00039655	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 17, human	QT00209923	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 18, human	QT00039550	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 19, human	QT00083475	Quiagen GmbH (Hilden)
Claudin 20, human	QT00218057	Quiagen GmbH (Hilden)
Occludin, human	QT00081844	Quiagen GmbH (Hilden)
TJP1/ZO-1, human	QT00077308	Quiagen GmbH (Hilden)
Marveld2/Tricellulin, human	QT02398851	Quiagen GmbH (Hilden)
HMBS, human	QT00014462	Quiagen GmbH (Hilden)
Aquaporin 3, human	QT00212996	Quiagen GmbH (Hilden)

2.7 Medien/ Pufferlösungen

Tabelle 7 Medien und Pufferlösungen (ALI-Medium = Air-liquid-interface Medium; TBS = Tris-buffered Saline; PBS = Phosphat-buffered saline; FBS = fetal bovine serum)

0,9 % NaCl-Lösung	0,9 % isotone Kochsalzlösung 0,9 % weight/volume in Wasser

Kulturmedium	RPMI 1640 + 10% charcoal stripped FBS + 1% Natriumpyruvat
Kulturmedium für NCI H441 V2LHS62430 und NCI H441 RHS 4348	Kulturmedium + 4µg/ml Puromycin
ALI-Medium	Kulturmedium + 1% Insulin Transferin Selen (ITS) + 30nmol/l Dexamethason
TBS Puffer	TBS Trockensubstanz in Tablettenform Konzentration: 1 Tablette auf 500ml
TBS plus 0,2% Tween	
Blockierpuffer Färbeprotokoll	PBS +10% FBS +1% Triton™ X-100
Antikörperlösung Färbeprotokoll	PBS +1%FBS +0,1% Triton™ X-100

3. Methoden

3.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden NCI-H441 Wildtyp, NCI-H441 V2LHS62430 und NCI-H441 RHS4348 Zellen verwendet. Die NCI-H441 V2LHS62430 und NCI-H441 RHS4348 Zellen waren in dem Institut für allgemeine Physiologie der Universität Ulm bereits vorhanden und wurden in dieser Arbeit verwendet.

NCI-H441 Wildtyp, NCI-H441 V2LHS62430 und NCI-H441 RHS4348 Zellen wurden 7 Tage in 25 cm^2 Zellkulturflaschen mit 10 ml Kulturmedium kultiviert und anschließend bei einer Konfluenz von 80-90% passagiert.

Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann für 2 Minuten mit Trypsin-LE bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Nachdem das Ablösen der Zellen beobachtet wurde, wurden 6,5 ml Kulturmedium in die Flasche dazugegeben, um die Trypsin-LE Reaktion zu beenden. Die Zellen wurden in einem Falcontube bei 800 rpm 2 Minuten lang mit einer Hereaus Megafuge 8 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das überständige Medium abgesaugt und das verbliebene Pellet in 5 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerkammer bestimmt. Danach wurden 250 000 bis 300 000 Zellen in eine neue Kulturflasche ausgesät.

3.2 Filter

Für die Versuche wurden die Zellen auf Transwellfilter mit einer Fläche von 0,33 cm^2 in 24-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Dafür wurden jeweils 10 000 Zellen suspendiert in 200 µl Kulturmedium auf jeweils einen Filter gegeben. In den basolateralen Teil der Zellkulturplatte wurden 500 µl Kulturmedium gegeben.

Die Etablierung einer Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (air liquid interface, ALI) erfolgte nach 4 Tagen, indem das apikale Medium entfernt wurde und das

basolaterale Kulturmedium gegen ALI-Medium ausgetauscht wurde. Ein stabiles ALI war nach 2 bis 3 Tagen vorhanden, bis dahin wurde die überschüssige Flüssigkeit apikal jeden zweiten Tag abgesaugt.

3.3 TEER

Der transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) ist ein Maß für die Permeabilität des Epithels. Der TEER wurde mit Hilfe der Impedanzspektroskopie mit dem cellZskope bestimmt. Hierfür wurden in die basolateralen Kavitäten des Zellmoduls je 500 µl Kulturmedium und auf die apikale Seite des Filters 200 µl Kulturmedium gegeben. Zur Messung des TEER wurde ein Wechseldipol zwischen basolateraler und apikaler Elektrode angelegt, der Impedanzstrom gemessen und frequenzabhängig aufgetragen. Über die cellZskope-Software wurde der Epithelwiderstand unter Berücksichtigung des Eigenwiderstandes der Filter, der Elektroden und des Mediums berechnet.

3.4 Permeabilitätsmessung

Zur Messung der Durchlässigkeit des Epithels wurden Permeabilitätsmessungen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen unter ALI-Bedingungen kultiviert. Die parazelluläre Permeabilität wurde als der apparente Permeabilitätskoeffizient (P_{app}), in Anlehnung an frühere Studien gemessen (Steimer et al, 2007).

Zur Messung wurden von jedem Zelltyp Filter mit Zellen, die 7 Tage lang unter ALI-Bedingungen kultiviert wurden, in eine neue 24-well Platte überführt. In die basolateralen Vertiefungen der Kulturplatten wurden 500 µl ALI-Medium mit 150 µM Na-Fluoreszeins oder 500 µl ALI-Medium mit 2 mg/ml 4 kDa FITC-Dextran bzw. 2 mg/ml 20 kDa FITC-Dextran gegeben.

Für die Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe Na-Fluoreszein, 4 kDa FITC-Dextran und 20 kDa FITC-Dextran in 0,9 % NaCL-Lösung vorbereitet. Die eingestellten Konzentrationen waren:

Tabelle 8 Verdünnungsreihe Na-Fluorescein in µM in 0,9 % Kochsalzlösung

Na-Fluorescein in µM in 0,9 % NaCl											
0	0,25	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	10

Tabelle 9 Verdünnungsreihe Dextran in µg/ml in 0,9 % Kochsalzlösung

Dextran in µg/ml in 0,9 % NaCl											
0	0,1	0,5	1	2	4	6	8	10	12	14	16

Jeweils 50 µl jeder Kalibierlösungen wurden in eine 96-Wellplatte überführt, mit Hilfe eines Platereaders Tecan Infinite M200 mit iControl Software (Tecan) wurde dann die Fluoreszeinkonzentration der apikalen Lösung (Exzitationswellenlänge 480 nm, Emissionswellenlänge 510 nm) gemessen und gegen die Konzentration von Na-Fluoreszein, 4 kDa FITC-Dextran bzw. 20 kDa FITC-Dextran aufgetragen. Durch die Messpunkte wurde eine Kalibrierungsgerade als lineare Regression nach folgender Formel berechnet:

$$F_{AU} = m \cdot [Fluo] + a$$

F_{AU}…gemessene Fluoreszenzintensität in beliebigen Einheiten (arbitrary unit)
m … Steigung der Geraden
[Fluo]…Konzentration von Na-Fluoreszein, 4 kDa- oder 20 kDa FITC-Dextran
a ... y-Achsenschnittpunkt

Formel 1

Für die Bestimmung des P_{app} wurden apikal auf alle Filter 100 µl 0,9% NaCl-Lösung gegeben. Anschließend wurden die Platten bei 37,5 °C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit lichtgeschützt für 30 Minuten inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden apikal 50 µl der Flüssigkeit abgenommen und in eine 96-Wellplatte überführt und die Fluoreszeinintensität wie beschrieben im Platereader bestimmt. Daraus wurde die Konzentration des Na-Fluoreszein, 4 kDa bzw. 20 kDa FITC-Dextran nach folgender Formel berechnet:

$$c_{ap} = \frac{(F_{AU} - a)}{m}$$

c_{ap} … Konzentration von Na-Fluoreszein, 4 bzw. 20 kDa FITC-Dextran in der apikalen Lösung

F_{AU} … Fluoreszeinintensität in beliebigen Einheiten

a … Achsenschnittpunkt der Kalibrierungsgeraden

m ... Steigung der Kalibrierungsgeraden

Formel 2

Der P_{app} wurde mit folgender Formel berechnet:

$$P_{app} = \frac{(c_{ap} \cdot V_{ap})}{(c_0 \cdot t \cdot A)}$$

c_{ap} ... Na^+-Fluoreszein Konzentration im apikalen Kompartiment nach Inkubation

V_{ap} … Volumen der 0,9% Kochsalzlösung apikal

c_0 … Na^+-Fluoreszeinkonzentration basolateral zum Zeitpunkt t=0

t ... Inkubationszeit

A ... Epitheloberfläche

Formel 3

3.5 Deuteriumoxid-Delutionsmethode

Um die Stabilität des ALI zu überprüfen, wurden Wassermessungen durchgeführt, um die Menge der apikalen Oberflächenflüssigkeit (airway surface liquid, ASL) zu untersuchen. Für diese Messungen wurde die Deuteriumoxid-Dilutionsmethode nach Neubauer et al verwendet (Neubauer et al., 2013). Dafür wurden 4 Filter von jeweils WT-Zellen, non-targeting shRNA und AQP3 shRNA nach 7-tägigen ALI-Bedingungen verwendet.

Für die Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe von 0,9 % Kochsalzlösung in Wasser in Deuteriumoxid in einer Konzentration von 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, und 25 % hergestellt. Von jeder Verdünnung wurden 10 µl auf den Messkristall der Alpha II Eco ATR Messzelle gegeben und das Absorptionspektrum für den Wellenzahlbereich von 4000 bis 400 cm^{-1} gemessen. Die Integrale für die H-O Valenzschwingung (3810,6 bis 2805 cm^{-1}) D-O-D Deformationsschwingung (1306 bis 1112 cm^{-1}) und die D-O Valenzschwingung (2774 bis 2070 cm^{-1}) wurden bestimmt. Die ermittelten Werte wurden gegen die Wasserkonzentration aufgetragen und eine Kalibrierungsgrade nach der Gleichung

$$I = m \cdot [H_2O] + a$$

mittels linearer Regression (R^2 größer gleich 0,992) berechnet.

I … Integral

m … Steigung der Geraden

$[H_2O]$ … Wasserkonzentration in Prozent

a ... Y-Achsenabschnitt

Formel 4

Für die Bestimmung des ASL-Volumens wurde eine 0,9% (w/v) NaCl-Lösung in D_2O hergestellt und pro Filter 25 µl dieser Lösung auf die apikale Epitheloberfläche gegeben und die D_2O Lösung wurde durch Pipettieren mit dem ASL durchmischt. 10 µl dieser Mischung wurden auf den Kristall der Messzelle aufgebracht und wie oben beschrieben das Absorptionsspektrum gemessen. Zur Bestimmung des wässrigen ASL-Anteils wurden die Integrale für die H-O und D-O Valenzschwingung, sowie für die D-O-D Deformationsschwingung bestimmt. Der Wasseranteil in Prozent wurde berechnet nach der Formel

$$[H_2O] = \frac{(I_{ASL} - a)}{m}$$

$[H_2O]$ ... Wasserkonzentration in Prozent

I_{ASL} … Integral der ASL-D_2O Mischung, gemessen jeweils für D-O und H-O Valenzschwingung und D-O-D Deformationsschwingung

a … Y-Achsenabschnitt der Kalibrierungsgrade

m ... Steigung der Kalibrierungsgrade

Formel 5

Das ASL-Volumen berechnete sich aus der Wasserkonzentration entsprechend der Formel:

$$V_{ASL} = \frac{[H_2O] \cdot V_{D_2O}}{100 - [H_2O]}$$

V_{ASL} … ASL Volumen

V_{D_2O} … Volumen Deuteriumoxid, hier 25 µl

$[H_2O]$ ... Wasserkonzentration der gemessenen ASL-Deuteriumoxidmischung

Formel 6

3.6 qRT-PCR

Die RNA-Expression von verschiedenen Claudinen, Tricellulin, Occludin, ZO-1 wurden mittels semi-quantitativer RT-PCR bestimmt.

Auf die apikale Seite des Filters 200 µL Lysis Solution RL gegeben und nach 2-minütiger Inkubationszeit das Zelllysat in Eppendorfcups überführt und bei -80°C eingefroren.

3.6.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels myBudget RNA Mini Kit. Zunächst wurde die Probe nach dem Auftauen auf eine Homogenisierungssäule pipettiert und für 2 Minuten bei 12000 rpm mit der Zentrifuge 5427R zentrifugiert. Die RNA befand sich nun im Homogenisat. Danach wurden 200 µL 70% Ethanol zu dem

Homogenisat dazugegeben. Anschließend wurde die Mischung auf eine Bindungssäule pipettiert und für 2 Minuten bei 12000 rpm mit der Zentrifuge 5427R zentrifugiert. Die RNA war nun auf der Säule gebunden.
Als nächster Schritt wurde die gebundene RNA mit 250 µL HS-Puffer gewaschen und für 30 Sekunden bei 12000 rpm mit der Zentrifuge 5427R zentrifugiert.
Danach wurden 40 µL DNAse Lösung, bestehend aus 5 µL DNAse 1-Stammlösung und 35 µL RDD-Puffer pro Probe, dazugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
Anschließend wurden 250 µL HS-Puffer dazugegeben und nach 5-minütiger Inkubation für 30 Sekunden bei 12000 rpm mit der Zentrifuge 5427R zentrifugiert.
Als nächsten Waschschritt wurden 500 µL LS-Puffer dazugegeben und dann für 1 Minute bei 12000 rpm mit der Zentrifuge 5427R zentrifugiert. Um Pufferreste zu entfernen, wurden die Proben erneut bei 12000 rpm für 2 Minuten mit der Zentrifuge 5427R zentrifugiert.
Um die RNA zu eluieren wurden die Säulen auf RNAse-freie 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben und nach Zugabe von 30 µL RNAse-freies H_2O für 1 Minute bei 8000 rpm mit der Zentrifuge 5427R zentrifugiert.
Der RNA-Gehalt der Probe wurde anschließend mittels NanoDrop 2000c Spektrometer bestimmt.

3.6.2 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde durch reverse Transkription mit dem SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit generiert.
Dafür wurde für jede Probe in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß
2 µl 10x Superscript™ Enzyme Mix
4 µl 5x VILO™ Reaction Mix
800 ng RNA verwendet. Um auf ein Probenvolumen von insgesamt 20 µl zu kommen wurde der Rest mit Wasser aufgefüllt.
Im Anschluss wurden die Ansätze in einen Thermocycler Peqstar 2X eingesetzt.
Im Thermocycler ist folgendes Temperaturprotokoll ausgeführt worden:

1. Erhitzen auf 110°C
2. Temperatur 25°C für 10 Minuten
3. Temperatur 42°C für 1 Stunde
4. Temperatur 85°C für 5 Minuten

5. Abkühlen und Inkubation bei 4°C

3.6.3 qRT-PCR

Das Reaktionsvolumen betrug 15 µL, davon waren
3 µl EVAGREEN Supermix
1 µl cDNA, die 1:2 mit Wasser verdünnt wurde
0,75 µl Primerlösung (100 mM in 0,1X TE-Puffer) und
10,25 µl H_2O.

Folgendes Temperaturprotokoll wurde ausgeführt:

1) 95°C, 15 min: Initiale Denaturierung und Aktivierung der Polymerase

40 Zyklen mit jeweils

2) 95°C 20 sek: Denaturierung
3) 60°C 20 sek: Primerbindung
4) 72°C 20 sek: Primerextension und Messung der Fluoreszeinintensität

Abschließend

5) 95°C 15 sek: Denaturierung
6) 60°C 20 sek: Renaturierung der PCR-Produkte
7) Temperaturrampe 60°C – 95°C, Dauer der Rampe 20 min:Bestimmung der Schmelzkurve

Für die Datenaquirierung und Analyse wurde die Software realplex 2.2 verwendet. Der C_t wurde mit Hilfe der in der Software implementierten Calcplex Methode bestimmt. Die Genexpression wurde relativ zu dem internen Kalibrator HMBS nach folgender Formel bestimmt:

$$E_{relativ} = 2^{C_t - C_{t,cal}}$$

$E_{relativ}$ … relative Expression

C_t …Threshold Cycle des zu bestimmenden Gens

$C_{t,\,cal}$ … Threshold Cycle des internen Kalibratorgens
(hier HMBS) unter Annahme einer PCR-Effizienz von 100 %

Formel 7

3.7 Western Blot

3.7.1 Zellhomogenisat

Um die Proteine für den Western Blot zu isolieren, wurden die Zellen nach ALI-Etablierung mit 50 µl RIPA-Puffer lysiert, das Lysat in Eppendorfgefäße pipettiert und dann bei -80°C eingefroren.

3.7.2 BCA (Bicinchoninsäuretest)

Die Proteinkonzentration wurde mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher) bestimmt. Es wurden bei den WT-Zellen 2501 (1325 – 5083) ng/µl, bei den non-targeting shRNA Zellen 3661 (1220 – 4142) ng/µl und bei den AQP3 Silencing shRNa Zellen 2127 (1061 – 3419) ng/µl gemessen (n=3).

3.7.3 Western Blot

Für den Western Blot wurden die Lysate zunächst aufgetaut, Zelltrümmer durch Zentrifugation pelletiert und anschließend durch Sonifikation für 10 Sekunden homogenisiert. Zu 12µl eines jeden Lysats, das entspricht einer Proteinmenge von 30012 ng bei WT-Zellen, 43932 ng bei non-targeting shRNA und 25 524 ng bei AQP3 Silencing shRNA, wurden 16 µl 4X Probenpuffer und 6,5 µl NuPAGE™ Reduktionsreagenz hinzugefügt und dann für 10 Minuten bei 70°C und 300 rpm geschüttelt.

Zur Vorbereitung der Elektrophoresekammern wurde 1X Running Puffer angesetzt, bestehend aus 950 ml H_2O und 50 ml 10X NuPage™ MES SDS Running Buffer. In die Aodenkammer wurden vom 1X Running Puffer 400 ml gemischt mit 1 ml NuPAGE™ Antioxidant gegeben. Dann wurde Bolt™ 4 bis 12%, Bis-Tris, 1,0 mm, Mini-Protein-Gel in die Kammern gesetzt und die Kathodenkammern im Anschluss mit dem 1X Running Puffer aufgefüllt. Die Gel-Kammern wurden einmal mit Pufferlösung durchgespült, um Luftblasen zu vermeiden.

Die Geltaschen wurden mit 7 µl von dem Marker Chameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder und 12 µl der Proben befüllt. Nach Befüllung ein elektrisches Feld mit 200 Volt angelegt.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulosemembran mit dem iBlot™ Transfer Stack transferiert. Dazu wurde auf dem Kathodenstack das Gel aufgelegt und auf das Gel der Anodenstack mit der Nitrocellulosemembran gemäß der Herstellerangaben aufgebracht. Der Transfer erfolgte in der iBlot™ Transferkammer bei einem elektrischen Feld von 20 Volt für 8 Minuten bei Raumtemperatur.

Der Proteintransfer wurde mit Hilfe einer Ponceau S Färbung überprüft. Dazu wurde das Gel mit Ponceau S überschichtet. Überschüssiges Ponceau S wurde durch mehrmaliges Waschen mit deionisiertem Wasser entfernt. Nach Verifikation des vollständigen Proteintransfers auf die Membran wurden unspezifische Proteinbindungsstellen durch Inkubation mit Intercept® (TBS) Blocking Buffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend wurde der Blocking Buffer entfernt. Für die Immundetektion wurden die Primärantikörper in TBS mit 0,2% Tween 1:500 verdünnt. Der Blocking Buffer wurde anschließend durch die Primärantikörperlösung ersetzt und die Membran in dieser Lösung bei Raumtemperatur unter Schütteln 1 Stunde inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit wurde der Western Blot 4-mal gewaschen, indem er 5 min bei Raumtemperatur in TBS mit 0,1% Tween unter Schütteln inkubiert wurde. Zwischen den Waschschritten fand ein vollständiger Austausch des TBS mit 0,1% Tween statt.

Die Sekundärantikörper wurden in der Lösung aus TBS plus 0,2% Tween 1:20000 aufgelöst. Der Waschpuffer wurde durch die Sekundärantikörperlösung ausgetauscht und die Membran für 45 Minuten im Schüttler inkubiert.

Der Western Blot wurde nach dieser Inkubationszeit wie oben beschrieben 4-mal mit TBS plus 0,1% Tween gewaschen. Abschließend noch 2-mal mit TBS gewaschen, um die Tween-Rückstände zu entfernen.

Der Western Blot wurde schließlich mit dem LI-COR Odyssey Fc und der Software is-Image Studio Version 5.2 ausgewertet.

3.8 Statistik

Die Ergebnisse wurden, sofern nicht anders beschrieben, als Median (Minimum – Maximum) angegeben. Der Stichprobenumfang n bezieht sich jeweils auf die Anzahl der Filter. Alle Experimente wurden auf mindestens 3 unterschiedlichen Passagen durchgeführt. Als statistische Tests wurde der nicht-parametrische Rangsummentest Kruskal-Wallis Test durchgeführt, da es sich um nicht-normalverteilte, unabhängige Stichproben handelt. Da mehr als zwei Stichproben miteinander verglichen wurden, wurde eine Dunn`s Korrektur (Dunn-Bonferroni-Test) für multiple Vergleiche durchgeführt. Bei Experimenten für den Zeitverlauf des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) (Abbildung 5) wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse two-way ANOVA durchgeführt. Als Post-hoc Test wurden hier multiple t-Tests mit Bonferroniekorrektur durchgeführt. Das Signifikanzniveau beträgt $p \leq 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss des Aquaporin 3 Silencing auf das Epithel an Tag 7 nach ALI

Das in-vitro Zellmodell auf Basis von Wildtyp (WT) NCI-H441 Zellen bildete zwischen Tag 5 und Tag 9 nach Etablierung einer Luft-Flüssigkeits-Grenze (air liquid interface, ALI) eine stabile Barrierefunktion und eine stabile apikale Oberflächenflüssigkeit (airway surface liquid, ASL) aus. In dieser Arbeit wurden WT-Zellen mit AQP3 Silencing shRNA Zellen und non-targeting shRNA Zellen verglichen.

Um zu überprüfen, ob das Silencing von AQP3 in den AQP3 Silencing shRNA Zellen erfolgreich war, wurden semiquantitative RT-PCR Experimente über den Zeitraum von Tag 0 bis Tag 9 nach ALI-Etablierung durchgeführt. Die Experimente fanden dabei jeweils an Tag 0, 3, 5, 7 und 9 nach ALI-Etablierung statt (n=3). Untersucht wurde die Expression von AQP3 in AQP3 Silencing shRNA Zellen im Vergleich zu WT und non-targeting shRNA Zellen. Die Expressionen wurden als Expression relativ zur Expression von HMBS quantifiziert.

Wie in Abbildung 1 dargestellt, zeigte sich, dass das Silencing von Aquaporin 3 in den AQP3 Silencing shRNA Zellen im gesamten beobachteten Zeitraum von Tag 0 bis 9 bestanden hat. Besonders zwischen Tag 5 und Tag 9 nach ALI-Etablierung konnte eine Reduktion von AQP3 um mehr als 90 % gezeigt werden.

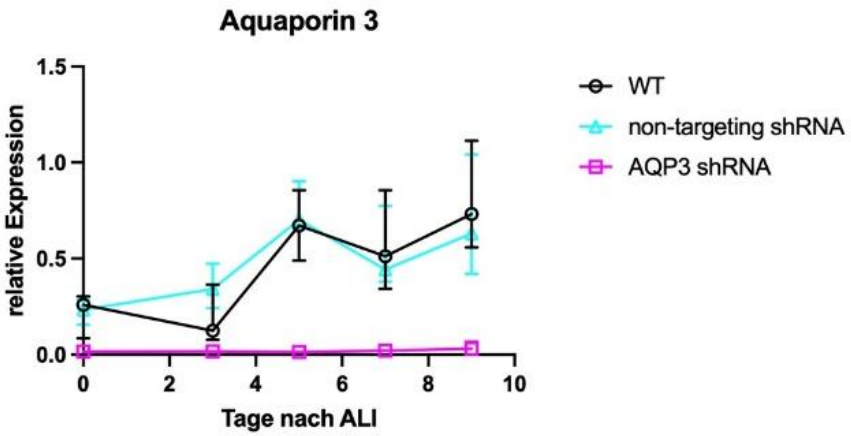


Abbildung 1 Zeitverlauf der Genexpression von Aquaporin 3 (AQP3). Die Expression von AQP3 wurde durch semiquantitative RT-PCR an Tag 0, 3, 5, 7 und 9 nach ALI (air-liquid interface) -Etablierung in Wildtyp (WT), non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA Zellen gemessen. Die Genexpressionen wurden relativ zur Expression von HMBS (Hydroxymethylbilansäure) quantifiziert (n=3). Die Ergebnisse sind als Median (Minimum – Maximum) angegeben.

Wir können davon ausgehen, dass das AQP3 Silencing erfolgreich war. Daher habe ich, soweit nicht anders erwähnt, die folgenden Messungen an Tag 7 nach ALI-Etablierung durchgeführt.

4.1.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) ist ein Maß für die Dichtheit des Epithels. Um herauszufinden, ob ein Aquaporin 3-Silencing einen Einfluss auf die transepitheliale Ionenpermeabilität hat, wurde an Tag 7 nach ALI-Etablierung der Widerstand gemessen. Die Ergebnisse sind als Median (Minimum – Maximum) angegeben.

Hierbei hat sich gezeigt, wie in Abbildung 2 dargestellt, dass bei den WT-Zellen der Widerstand 395,995 Ω•cm^2 (353,33 Ω•cm^2 - 465,23 Ω•cm^2) betrug und bei den non-targeting shRNA Zellen 378,25 Ω•cm^2 (326,24 Ω•cm^2 - 454,38 Ω•cm^2). Bei den AQP3 Silencing shRNA Zellen hingegen betrug der TEER 109,605 Ω•cm^2 (90,99 Ω•cm^2 -135,73 Ω•cm^2).

Dabei wurde ein signifikanter Unterschied zwischen WT und AQP3 Silencing shRNA Zellen ($p<0,0001$) und zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing

shRNA Zellen (p=0,0002) deutlich (Kruskal-Wallis Test mit Dunn`s Korrrektur; n=12). Der Unterschied zwischen WT und non-targeting shRNA war nicht signifikant.

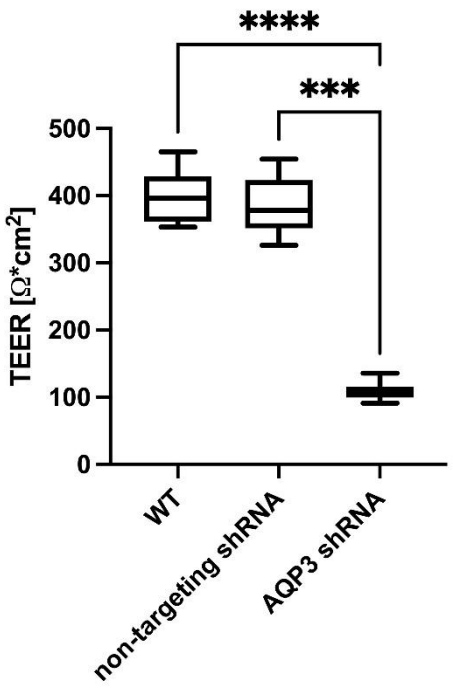


Abbildung 2 Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER) gemessen an Tag 7 nach ALI-Etablierung (air-liquid interface) (n = 12). Die Ergebnisse sind als Median (Minimum – Maximum) angegeben. Dabei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen WT (Wildtyp) und AQP3 shRNA Zellen ($p < 0,0001$) und zwischen non-targeting shRNA und AQP3 shRNA ($p = 0,0002$) (Kruskal-Wallis Test mit Dunn`s Korrektur; $p < 0,05 = ^{*}$, $p < 0,01 = ^{**}$, $p < 0,001 = ^{***}$ und $p < 0,0001 = ^{****}$).

4.1.2 Permeabilitätsmessungen

Permeabilitätsmessungen an Tag 7 nach ALI-Etablierung wurden durchgeführt, um herauszufinden, ob es durch das Silencing von Aquaporin 3 zu einer veränderten Permeabilität für FITC, FITC 4 kDa-Dextran und FITC 20 kDa-Dextran gegenüber WT und non-targeting shRNA Zellen kommt. Veränderungen des apparenten Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) weisen auf eine veränderte Permeabilität der parazellulären Diffusionsbarriere hin. Die Ergebnisse sind als Median (Minimum - Maximum) angegeben.

Der Permeabilitätskoeffizient P_{app} war für FITC $4{,}185 \cdot 10^{-7}$ cm/s ($2{,}19 \cdot 10^{-7}$ cm/s - $9{,}104 \cdot 10^{-7}$ cm/s) bei WT-Zellen, $2{,}92 \cdot 10^{-7}$ cm/s ($6{,}58 \cdot 10^{-8}$ cm/s - $4{,}83 \cdot 10^{-7}$ cm/s) bei non-targeting shRNA Zellen und $2{,}41 \cdot 10^{-6}$ cm/s ($1{,}34 \cdot 10^{-6}$ cm/s - $5{,}36 \cdot 10^{-6}$ cm/s) bei AQP3 Silencing shRNA Zellen. Dabei war eine signifikant erhöhte parazelluläre Permeabilität von AQP3 Silencing shRNA Zellen im Vergleich zu WT-Zellen ($p=0{,}0007$) und verglichen mit non-targeting shRNA Zellen ($p<0{,}0001$) zu sehen. Der Unterschied zwischen non-targeting shRNA und WT-Zellen war nicht signifikant. (Kruskal-Wallis Test mit Dunn`s Korrektur für Mehrfachtestung; n=16).

Bei FITC 4 kDa-Dextran zeigte der P_{app} eine Permeabilität von $3{,}891 \cdot 10^{-7}$ cm/s ($1{,}147 \cdot 10^{-7}$ cm/s - $9{,}354 \cdot 10^{-7}$ cm/s) für WT-Zellen, $3{,}095 \cdot 10^{-7}$ cm/s ($1{,}04 \cdot 10^{-7}$ cm/s - $2{,}082 \cdot 10^{-6}$ cm/s) für non-targeting shRNA und $1{,}774 \cdot 10^{-6}$ cm/s ($8{,}35 \cdot 10^{-7}$ cm/s - $4{,}45 \cdot 10^{-6}$ cm/s) für AQP3 Silencing shRNA Zellen. Auch hier bestand ein signifikanter Unterschied in der Permeabilität zwischen WT und AQP3 Silencing shRNA Zellen ($p<0{,}0001$) und zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA Zellen ($p<0{,}0001$) während der Unterschied zwischen WT und non-targeting shRNA Zellen nicht signifikant war (Kruskal-Wallis Test mit Dunn`s Korrektur; n=16).

Der P_{app} bei 20 kDa-Dextran betrug bei WT-Zellen $8{,}545 \cdot 10^{-8}$ cm/s ($2{,}165 \cdot 10^{-8}$ cm/s - $3{,}643 \cdot 10^{-6}$ cm/s), bei non targeting shRNA Zellen $1{,}313 \cdot 10^{-7}$ cm/s ($2{,}989 \cdot 10^{-8}$ cm/s - $3{,}16 \cdot 10^{-6}$ cm/s) und bei AQP3 Silencing shRNA Zellen $5{,}535 \cdot 10^{-7}$ cm/s ($1{,}674 \cdot 10^{-7}$ cm/s - $7{,}05 \cdot 10^{-6}$ cm/s). Hier war ein signifikanter Unterschied nur zwischen WT und AQP3 Silencing shRNA Zellen ($p=0{,}0010$) zu sehen, während zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA und zwischen WT und non-targeting shRNA kein signifikanter Unterschied bestand (Kruskal-Wallis Test mit Dunn`s Korrektur; n=16)

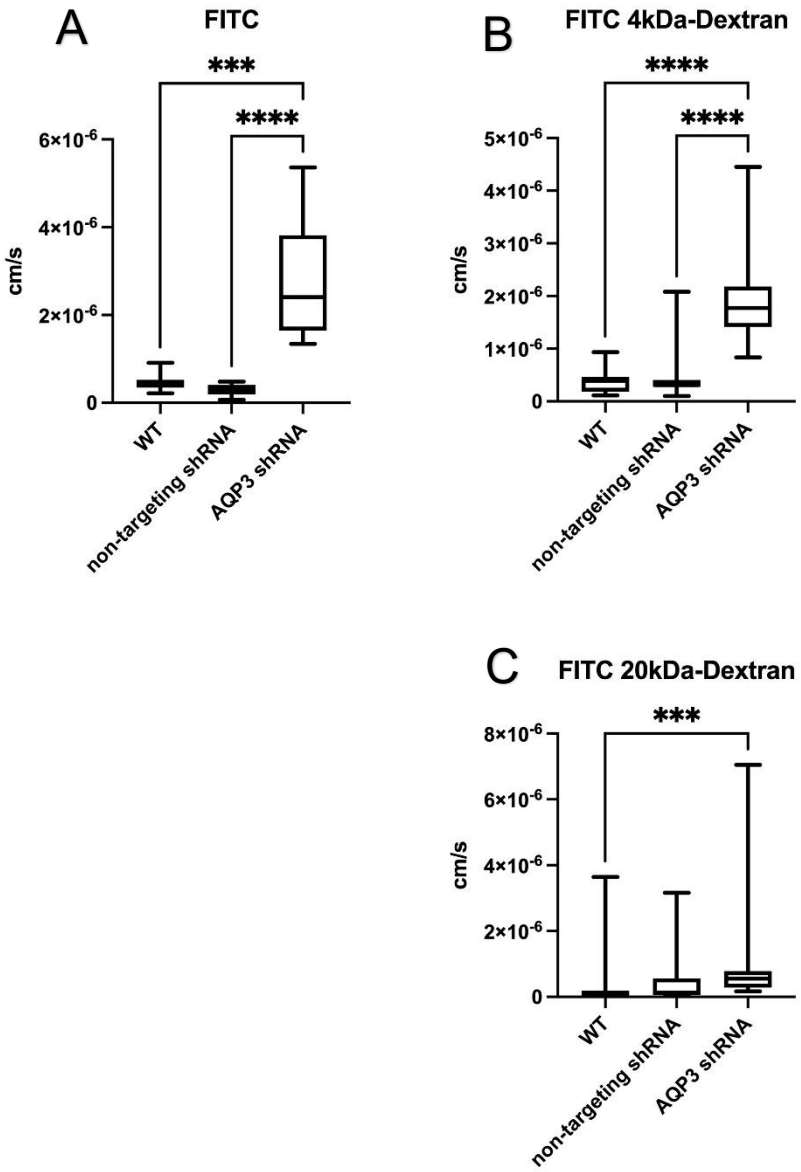


Abbildung 3 Messungen des apparenten Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) an Tag 7 nach ALI-Etablierung (air-liquid interface). Die Messungen zeigen die Unterschiede in der parazellulären Permeabilität für FITC, FITC 4 kDa-Dextran und FITC 20 kDa-Dextran zwischen den untersuchten Zelltypen (Kruskall-Wallis-Test mit Dunn`s Korrektur; n=16, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$ und $p < 0,0001 = ****$). Die Ergebnisse sind als Median (Minimum – Maximum) angegeben. **A:** P_{app} für FITC zeigte eine signifikant erhöhte parazelluläre Permeabilität bei AQP3 Silencing shRNA im Vergleich zu WT (Wildtyp) Zellen (p=0,0007) und im Vergleich zu non-targeting shRNA ($p < 0,0001$). Der Unterschied zwischen non-targeting shRNA und WT war nicht signifikant. **B:** P_{app} für FITC 4 kDa-Dextran zeigte einen signifikanten Unterschied in der parazellulären Permeabilität zwischen AQP3 Silencing shRNA und WT ($p<0,0001$) und AQP3 Silencing shRNA und non-targeting shRNA ($p<0,0001$), jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen WT-Zellen und non-targeting shRNA. **C:** P_{app} für FITC 20 kDa-Dextran zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen AQP3 Silencing shRNA und WT ($p<0,001$). Der Unterschied zwischen AQP3 Silencing shRNA und non-targeting shRNA und zwischen non-targeting shRNA und WT war nicht signifikant.

4.1.3 Wassermessungen

An Tag 7 nach ALI-Etablierung wurde das Volumen der apikalen Oberflächenflüssigkeit (ASL, airway surface liquid) gemessen, um zu überprüfen, inwieweit die Epithelien ein ALI aufrechterhalten. Hierfür wurde die Deuteriumoxid Dilutionsmethode verwendet. Die WT-Zellen hatten dabei ein ASL von 0,8874 µl/0,33cm^2 (0,4652 µl/0,33cm^2 - 1,137 µl/0,33cm^2), die AQP3 Silencing shRNA Zellen von 0,839 µl/0,33cm^2 (0,4384 µl/0,33cm^2 - 1,004 µl/0,33cm^2) und die non-targeting shRNA Zellen hatten ein ASL von 0,7766 µl/0,33cm^2 (0,2715 µl/0,33cm^2 - 1,273 µl/0,33cm^2) (n=12). Die Ergebnisse sind als Median (Minimum – Maximum) angegeben. In der Wassermessung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT, AQP3 Silencing shRNA und non-targeting shRNA Zellen.

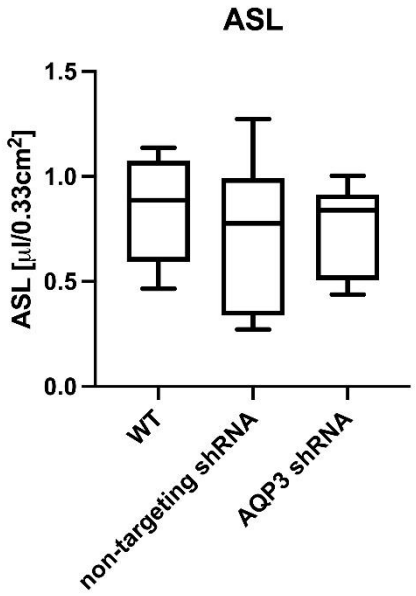


Abbildung 4 Messung der ASL (airway surface liquid, apikale Oberflächenflüssigkeit) mitttels Deuteriumoxid Dilutionsmethode an Tag 7 nach ALI-Etablierung (air liquid interface). Mit dieser Methode konnte die Aufrechterhaltung des ALI durch die Epithelien untersucht werden (n=12). Die Ergebnisse sind als Median (Minimum – Maximum) angegeben. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT (Wildtyp), AQP3 Silencing shRNA und non-targeting shRNA.

4.1.4 Messung der Expression der Tight junction Gene

Um die Expression der Gene, die für Claudin 1 bis 12, Claudin 14 bis 20, Occludin, Zonula occludens Protein 1 (ZO-1/TJP-1) und Tricellulin/Marveld2

kodieren, zu ermitteln, wurde die mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR an Tag 7 nach ALI quantifiziert (n=12). Die Ergebnisse sind als Median (Minimum – Maximum) angegeben.

Die Genexpression wurde relativ zur Expression der Hydroxymethylbilansäure (HMBS) als internen Kalibrator bestimmt.

Die relative Expression der oben genannten Gene wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen WT, AQP3 Silencing shRNA und non-targeting shRNA Zellen auf.Die höchste Genexpression zeigte Claudin 4, während Claudin 2, 17, 18 und 19 nur sehr gering exprimiert wurden, weswegen sie in der Abbildung 4 nicht dargestellt sind.

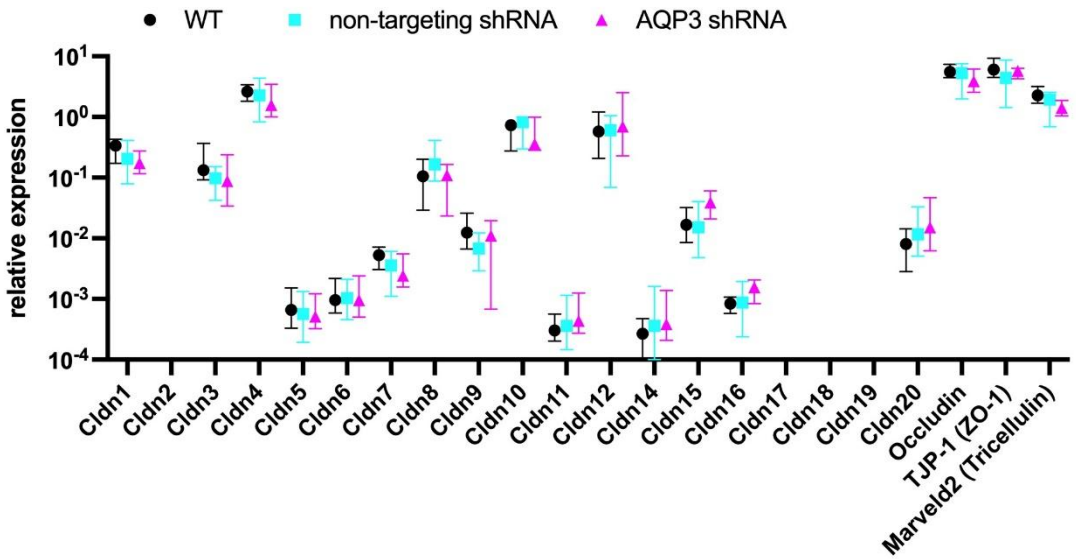


Abbildung 5 Genexpression der Claudine (CLDN) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19 und 20, sowie von Occludin, Zonula occludens Protein 1 (ZO-1) / tight junction Protein 1 (TJP-1) und Tricellulin/Marveld2. Die Genexpression wurde mittels semiquantitativer RT-PCR an Tag 7 nach ALI-Etablierung (air liquid interface) quantifiziert (n=12). Die Ergebnisse sind als Median (Minimum – Maximum) angegeben. Die Genexpression wurde relativ zur Expression der Hydroxymethylbilansäure (HMBS) als interner Kalkulator bestimmt. Die relative Expression der oben erwähnten Gene erwiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen WT (Wildtyp), AQP3 Silencing shRNA und non-targeting shRNA auf. Die stärkste Expression hatte Claudin 4. Die Genexpression der Claudine 2, 17, 18 und 19 war sehr gering, weswegen sie in der Abbildung nicht dargestellt werden.

4.2 Zeitverläufe

Um die Auswirkungen des Silencing von Aquaporin 3 auf das Epithel über die Zeit herauszufinden, wurden TEER-Messungen und semiquantitative RT-PCRs im Zeitverlauf an Tag 0, 3, 5, 7, und 9 nach ALI-Etablierung durchgeführt.

4.2.1 Zeitverlauf TEER

Um die Dichtheit des Epithels im Zeitverlauf zu beobachten, wurde der TEER an Tag 0, 3, 5, 7 und 9 nach ALI-Etablierung gemessen (n=20). Wie die Abbildung 5 veranschaulicht, wurde an Tag 0 bei allen Zelltypen noch kein signifikanter Widerstand gemessen. Der Widerstand zum ersten Messzeitpunkt entsprach bei den WT-Zellen 12,025 Ω•cm^2 (6,950 Ω•cm^2 - 15,07 Ω•cm^2), bei den AQP3 Silencing shRNA Zellen 16,66 Ω•cm^2 (10,05 Ω•cm^2 - 26,03 Ω•cm^2) und bei den non-targeting shRNA Zellen 16,865 Ω•cm^2 (11,560 Ω•cm^2 - 32,960 Ω•cm^2).

Bei den WT-Zellen stieg der TEER bis Tag 3 auf 70,625 Ω•cm^2 (44,7 Ω•cm^2 - 104,45 Ω•cm^2) und bis Tag 5 auf 431,560 Ω•cm^2 (91,02 Ω•cm^2 - 548,52 Ω•cm^2) an und erreichte danach ein Plateau, wobei am 7. Tag nach ALI 406,740 Ω•cm^2 (186,12 Ω•cm^2 - 585,57 Ω•cm^2) und am 9.Tag 376,590 Ω•cm^2 (271,960 Ω•cm^2 - 613,870 Ω•cm^2) gemessen wurde.

Die non-targeting shRNA Zellen hatten einen den WT-Zellen ähnlichen Zeitverlauf mit einem Anstieg des TEER bis Tag 3 auf 73,885 Ω•cm^2 (47,97 Ω•cm^2 - 327,55 Ω•cm^2) und bis Tag 5 auf 433,04 Ω•cm^2 (273,24 Ω•cm^2 - 1140,27 Ω•cm^2). Danach bildete sich ebenfalls ein Plateau mit Werten von 570,560 Ω•cm^2 (287,13 Ω•cm^2 - 665,39 Ω•cm^2) an Tag 7 und 487,690 Ω•cm^2 (296,64 Ω•cm^2 - 744,84 Ω•cm^2) an Tag 9.

Bei den AQP3 Silencing shRNA Zellen hingegen wurde kein Plateau gebildet und der TEER stieg verzögert an, mit Werten von 44,225 Ω•cm^2 (32,47 Ω•cm^2 - 58,61 Ω•cm^2) an Tag 3, 133,815 Ω•cm^2 (43,28 Ω•cm^2 - 241,62 Ω•cm^2) an Tag 5 und 233,975 Ω•cm^2 (52,13 Ω•cm^2 - 302,44 Ω•cm^2) an Tag 7. Bis Tag 9 wird dann das Niveau der WT und non-targeting shRNA Zellen erreicht mit einem Widerstand von 329,735 Ω•cm^2 (33,21 Ω•cm^2 - 757,85 Ω•cm^2).

Ein signifikanter Unterschied bestand dabei an Tag 5 zwischen WT und AQP3 Silencing shRNA Zellen ($p<0,0001$) und zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA ($p<0,0001$). An Tag 5 war kein Unterschied zwischen WT und non-targeting shRNA Zellen zu sehen. Des Weiteren bestand ein signifikanter Unterschied des TEER bei der Messung an Tag 7 zwischen WT und AQP3 Silencing shRNA Zellen ($p= 0,0005$) und zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA Zellen ($p<0,0001$) und zwischen WT und non-targeting shRNA Zellen ($p= 0,0131$). An Tag 9 bestand zwischen WT und non-targeting shRNA ($p=0,0132$) und zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA ($p=0,0028$) ein Unterschied, während es keinen signifikanten Unterschied zwischen WT und AQP3 Silencing shRNA Zellen gab (two-way ANOVA mit Bonferroniekorrektur; n=20). Die Ergebnisse sind als Median (Minimum – Maximum) angegeben.

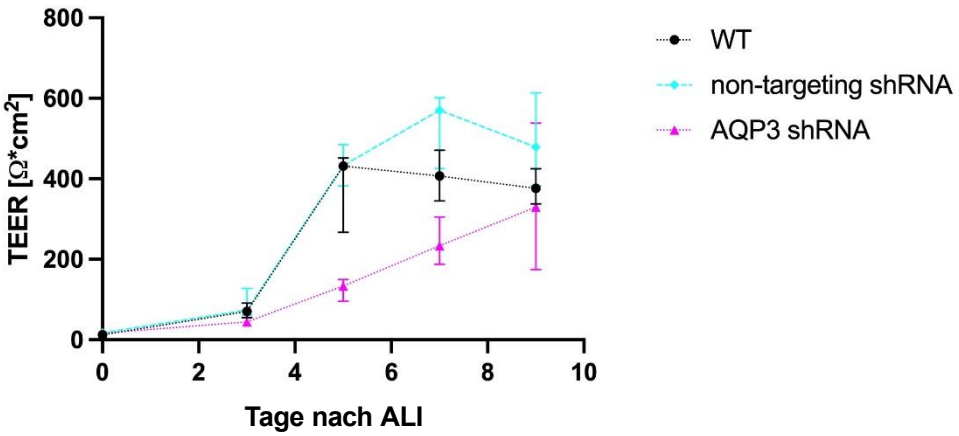


Abbildung 6 Messung des TEER (transepithelialer elektrischer Widerstand) an Tag 0, 3, 5, 7 und 9 nach ALI-Etablierung (air liquid interface). Der TEER wurde gemessen, um die Dichtheit des Epithels über die Zeit zu untersuchen. An Tag 0 nach ALI wurde kein wesentlicher Widerstand gemessen. Ein signifikanter Unterschied wurde an Tag 5 nach ALI zwischen WT (Wildtyp) und AQP3 Silencing shRNA ($p<0,0001$) und zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA ($p<0,0001$) gemessen. Zwischen WT und non-targeting shRNA bestand kein signifikanter Unterschied. An Tag 7 nach ALI bestand ein signifikanter Unterschied des TEERs zwischen WT und AQP3 Silencing shRNA ($p=0,0005$) und zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA ($p<0,0001$) und zwischen WT und non-targeting shRNA ($p=0,0131$). An Tag 9 nach ALI bestand ein signifikanter Unterschied zwischen WT und non-targeting shRNA ($p=0,0132$) und zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA ($p=0,0028$), während kein signifikanter Unterschied zwischen WT und AQP3 Silencing shRNA bestand (two-way ANOVA mit Bonferroniekorrektur; n=20). Die Ergebnisse sind als Median (Minimum – Maximum) angegeben.

4.2.2 Zeitverlauf der Expression von Tight junction Genen

Die Genexpression der Tight junction Proteine Claudin 1, Claudin 3, Claudin 4, Claudin 8, Claudin 10, Claudin 12, Claudin 15, Occludin, ZO-1/TJP-1 und Tricellulin/Marveld2 wurden in einem Zeitverlauf beobachtet, da diese Tight junction Proteine in semiquantitativen RT-PCR Experimenten von Tag 7 nach ALI stark exprimiert waren und sich außerdem bei einigen Hinweise auf eine unterschiedlich starke relative Expression zwischen WT, AQP3 Silencing shRNA und non-targeting shRNA Zellen gezeigt haben. Für den Zeitverlauf wurden die Messungen an Tag 0, 3, 5, 7 und 9 nach ALI-Etablierung durchgeführt (n=3). Die Expressionen wurden als Expression relativ zur Expression von HMBS quantifiziert.

Bei dem Zeitverlauf von Claudin 1 ist zu erkennen, dass die Genexpression sich bis Tag 3 zwischen den drei Zelltypen noch nicht wesentlich unterscheidet. Die Messungen an Tag 5, 7 und 9 haben jedoch gezeigt, dass Claudin 1 bei den AQP3 Silencing shRNA Zellen eine geringere relative Expression aufgewiesen hat als bei WT und non-targeting shRNA Zellen.

Die Genexpression von Claudin 3 wies ein ähnliches Bild auf. Bei den Messungen an Tag 0 und 3 waren die relativen Expressionen noch ähnlich, wohingegen bei den Messungen an Tag 5, 7 und 9 ein größerer Unterschied zwischen den verschiedenen Zelltypen bestand, da sich Hinweise auf eine geringere relative Expression von Claudin 3 in den AQP3 Silencing shRNA Zellen gezeigt haben als bei WT und non-targeting shRNA Zellen.

Claudin 4, das im qRT-PCR Screening am stärksten exprimiert wurde, hat im Zeitverlauf keine Anzeichen für eine unterschiedliche relative Genexpression über die Zeit zwischen AQP3 Silencing shRNA Zellen gegenüber WT und non-targeting shRNA Zellen.

Im Zeitverlauf von Claudin 8 hat sich gezeigt, dass das Gen an Tag 0 noch kaum exprimiert wurde. Die relative Expression ist bis Tag 3 angestiegen und hat dann bei Tag 5 bis 9 ein Plateau gebildet. Dabei zeigten sich keine Hinweise auf einen unterschiedlichen Verlauf zwischen WT, AQP3 Silencing shRNA und non-targeting shRNA Zellen.

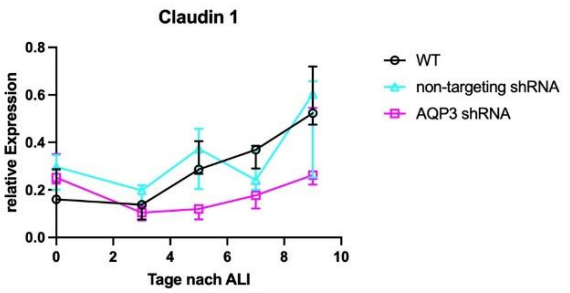
Claudin 10 hat im Zeitverlauf einen Anstieg der relativen Expression über die Zeitspanne von Tag 0 bis 9 gezeigt. Dabei sind WT, AQP3 Silencing shRNA und non-targeting shRNA Zellen ungefähr gleich stark angestiegen.

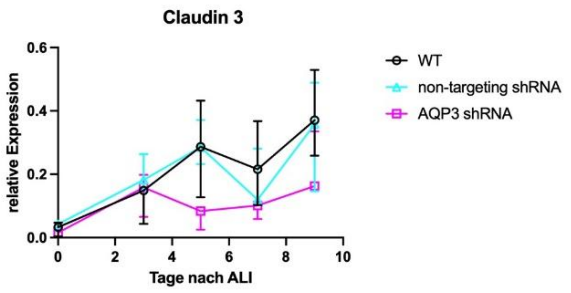
Die relative Expression von Claudin 12 im Zeitverlauf, zeigt dass die Genexpression dieses Proteins bei den AQP3 Silencing shRNA Zellen über die Zeit höher ist als bei den WT und non-targeting shRNA Zellen. Ebenso wie bei dem Zeitverlauf von Claudin 15. In den beiden Zeitverläufen lässt sich kein deutlicher Anstieg verzeichnen bei WT, AQP3 Silencing shRNA und non-targeting shRNA Zellen.

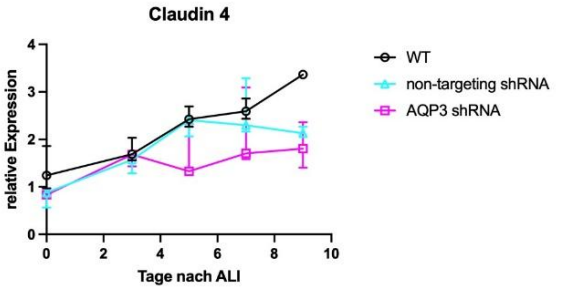
Occludin hat von Tag 0 bis 9 einen Anstieg der relativen Expression gezeigt, wobei an Tag 0 die Expression der AQP3 Silencing shRNA Zellen am höchsten war. Ab Tag 3 hat sich kein Unterschied zwischen WT, AQP3 Silencing shRNA und non-targeting shRNA Zellen gezeigt.

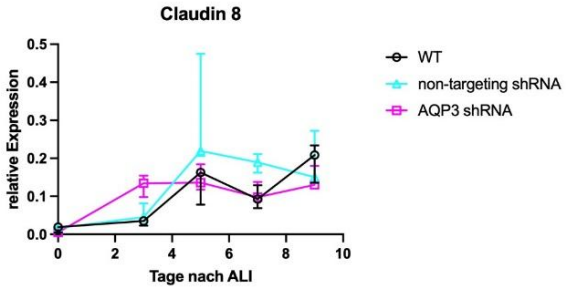
Im Zeitverlauf für Tricellulin/Marveld2 zeigt sich ein Anstieg der relativen Expression bis Tag 7 in allen Zelltypen und einen leichten Abfall der Expression bis Tag 9.

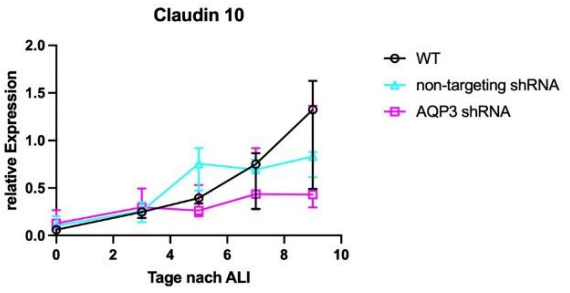
ZO-1/TJP-1 wurde im Zeitverlauf über den gesamten Zeitraum von Tag 0 bis 9 ungefähr gleich exprimiert. Dabei hat sich auch zwischen WT, AQP3 Silencing shRNA und non-targeting shRNA Zellen kein wesentlicher Unterschied gezeigt.

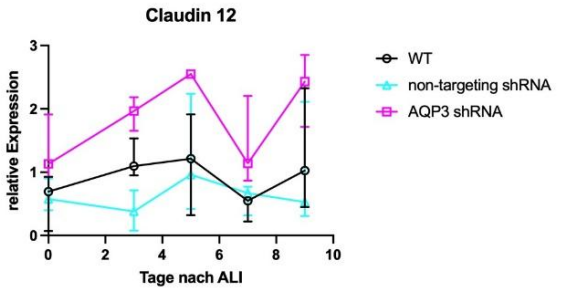

Claudin 1
relative Expression
Tage nach ALI
WT
non-targeting shRNA
AQP3 shRNA

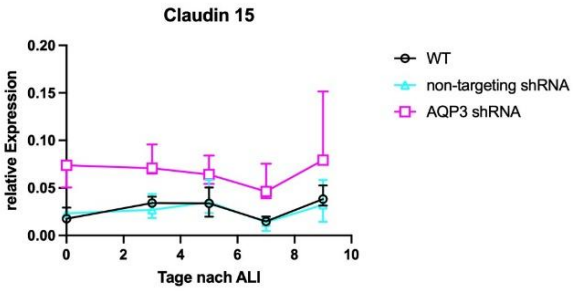

Claudin 3
relative Expression
Tage nach ALI
WT
non-targeting shRNA
AQP3 shRNA

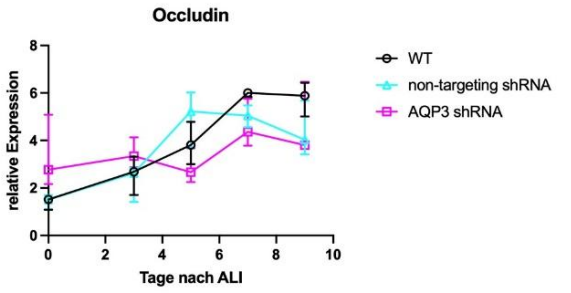

Claudin 4
relative Expression
Tage nach ALI
WT
non-targeting shRNA
AQP3 shRNA


Claudin 8
relative Expression
Tage nach ALI
WT
non-targeting shRNA
AQP3 shRNA


Claudin 10
relative Expression
Tage nach ALI
WT
non-targeting shRNA
AQP3 shRNA


Claudin 12
relative Expression
Tage nach ALI
WT
non-targeting shRNA
AQP3 shRNA


Claudin 15
relative Expression
Tage nach ALI
WT
non-targeting shRNA
AQP3 shRNA


Occludin
relative Expression
Tage nach ALI
WT
non-targeting shRNA
AQP3 shRNA

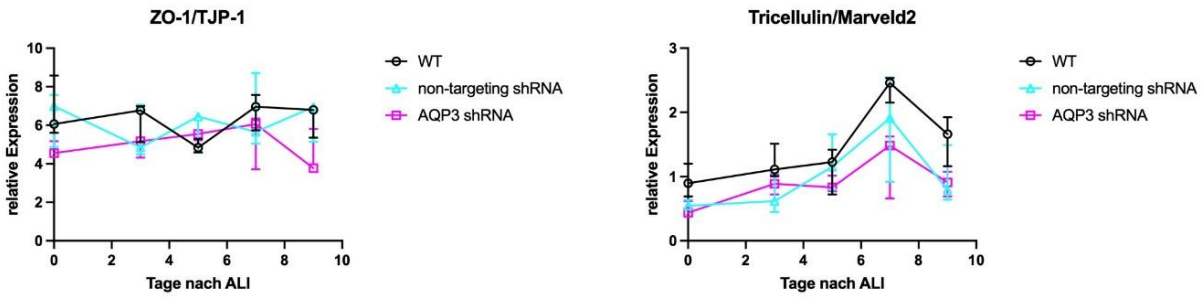


Abbildung 7 Zeitverlauf der Genexpression der Tight-Junction Proteine Claudin 1, 3. 4, 8, 10, 12, 15, Occludin, ZO-1 (Zonula occludens Protein 1)/TJP-1 (tight junction Protein-1) und Tricellulin/Marveld2 gemessen durch semiquantitative RT-PCR an Tag 0, 3, 5, 7 und 9 nach ALI (air liquid interface)-Etablierung in Wildtyp (WT), non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA Zellen. Die Genexpressionen wurden relativ zur Expression von HMBS (Hydroxymethylbilansäure) quantifiziert (n=3). Die Ergebnisse sind als Median (Minimum – Maximum) angegeben.

4.3 Western Blots Claudin 1, 3 und 4

Da die Claudine 1 und 3 im qRT-PCR Zeitverlauf Hinweise auf eine unterschiedliche Genexpression über die Zeit zwischen AQP3 Silencing shRNA gegenüber von WT und non-targeting shRNA Zellen gezeigt haben, wurden Western Blots von diesen Tight Junction Proteinen angefertigt. Zudem wurden Western Blots auch von Claudin 4 gemacht, da Claudin 4 im semiquantitativen qRT-PCR Screening am stärksten exprimiert war.

Die Western Blots für Claudin 1, 3 und 4 wurden angefertigt, um die Proteinmenge der tight junction Proteine zwischen WT, AQP3 Silencing shRNA und non-targeting shRNA Zellen an Tag 7 nach ALI zu vergleichen. Die Ergebnisse wurden auf die Werte des jeweiligen WT normiert.

Für die Werte von Claudin 3 zeigte sich beim WT 0,9717 (0,7896-1,267), für die non-targeting shRNA Zellen 1,035 (0,5315-1,213) und für die AQP3 Silencing shRNA Zellen 0,6540 (0,4122-0,8941). Signifikant waren hierbei der Unterschied zwischen WT und non-targeting shRNA (p=0,0013) und zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA (p=0,0006). Der Unterschied zwischen WT

und AQP3 Silencing shRNA war nicht signifikant (Kruskal-Wallis Test mit Dunn`s Korrrektur; n=12).

Bei Claudin 1 zeigte sich beim WT eine Relative Arbitrary Unit (RAU) von 1,036 (0,7539-1,221), bei den non-targeting shRNA Zellen 0,6141 (0,3723-1,396) und bei den AQP3 Silencing shRNA Zellen 0,7365 (0,1656-1,452). Dabei war der Unterschied der Proteinmenge zwischen WT und non-targeting shRNA Zellen signifikant (p=0,0158), während der Unterschied zwischen WT und AQP3 Silencing shRNA und zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA nicht signifikant war (Kruskal-Wallis Test mit Dunn`s Korrrektur; n=12).

Bei dem Western Blot für Claudin 4 waren die Werte für WT-Zellen 1,045 (0,7224-1,140), für non-targeting Zellen 0,6333 (0,5011-0,9656) und für AQP3 Silencing shRNA Zellen 0,4594 (0,2290-1,303). Bei den Claudin 4 Western Blots zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen WT und AQP3 Silencing shRNA Zellen (p=0,0362). Zwischen WT und non-targeting shRNA sowie zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis Test mit Dunn`s Korrrektur; n=8).

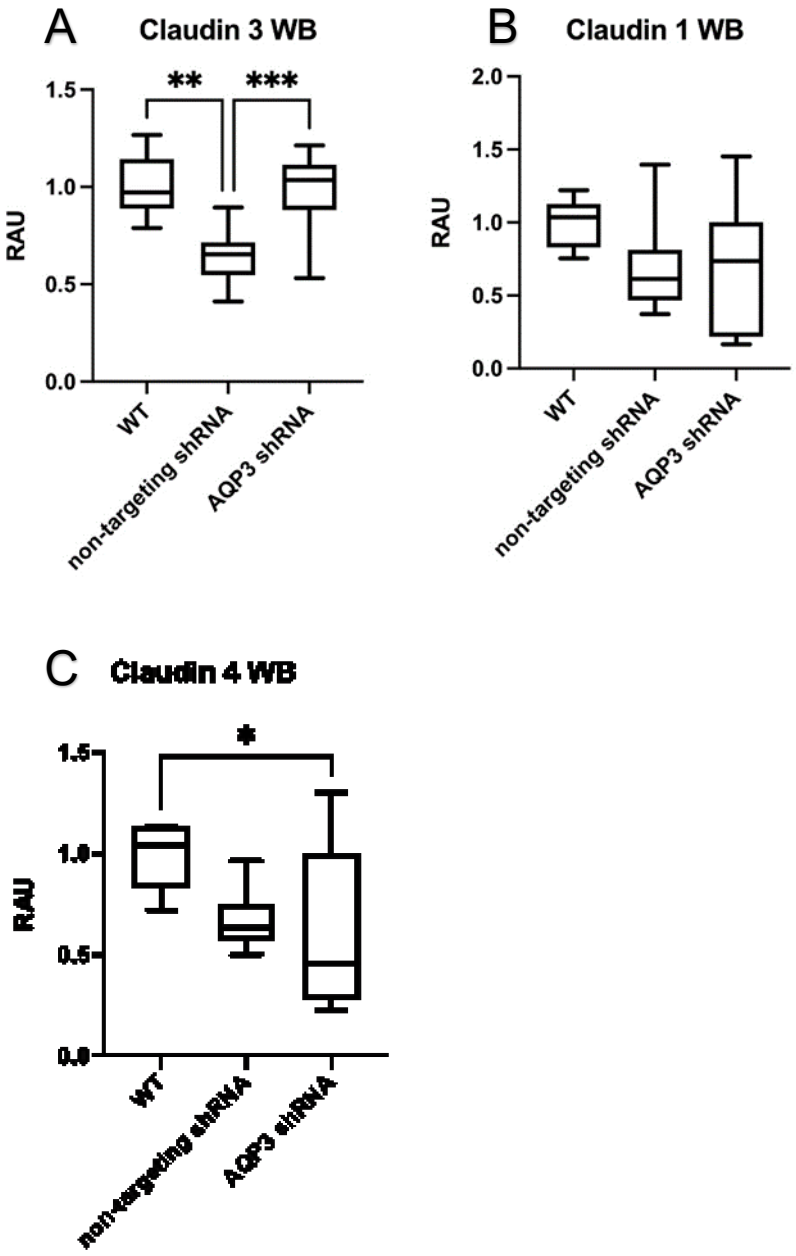


Abbildung 8: Bestimmung der Proteinmenge der TJ Proteine**.** Um die Proteinmenge der TJ-Proteine (Tight-junction Proteine) Claudin (Cldn) 1, 3 und 4 zwischen WT (Wildtyp), non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA (Aquaporin 3) Zellen zu vergleichen wurden an Tag 7 nach ALI-Etablierung (Air Liquid Interface) Western Blot (WB) Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Median (Minimum – Maximum) dargestellt und wurden auf die Werte des jeweiligen WT normiert und in RAU (Random Arbitrary Unit) angegeben. **A:** WB für Claudin 3 zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen WT und non-targeting shRNA (p=0,0013) und zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA (p=0,0006). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT und AQP3 Silencing shRNA. (Kruskal-Wallis Test mit Dunn`s Korrrektur; n=12) **B:** In WB für Claudin 1 zeigte sich ein signifikanter Unterschied nur zwischen WT und non-targeting shRNA (p=0,0158) (Kruskal-Wallis Test mit Dunn`s Korrektur, n=12) **C:** WB für Claudin 4 zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen WT und AQP3 Silencing shRNA (p=0,0362). Zwischen WT und non-targeting shRNA, sowie zwischen non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA bestand kein signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis Test mit Dunn`s Korrektur, n=8, $p < 0,05 = ^{*}$, $p < 0,01 = ^{**}$, $p < 0,001 = ^{***}$ und $p < 0,0001 = ^{****}$).

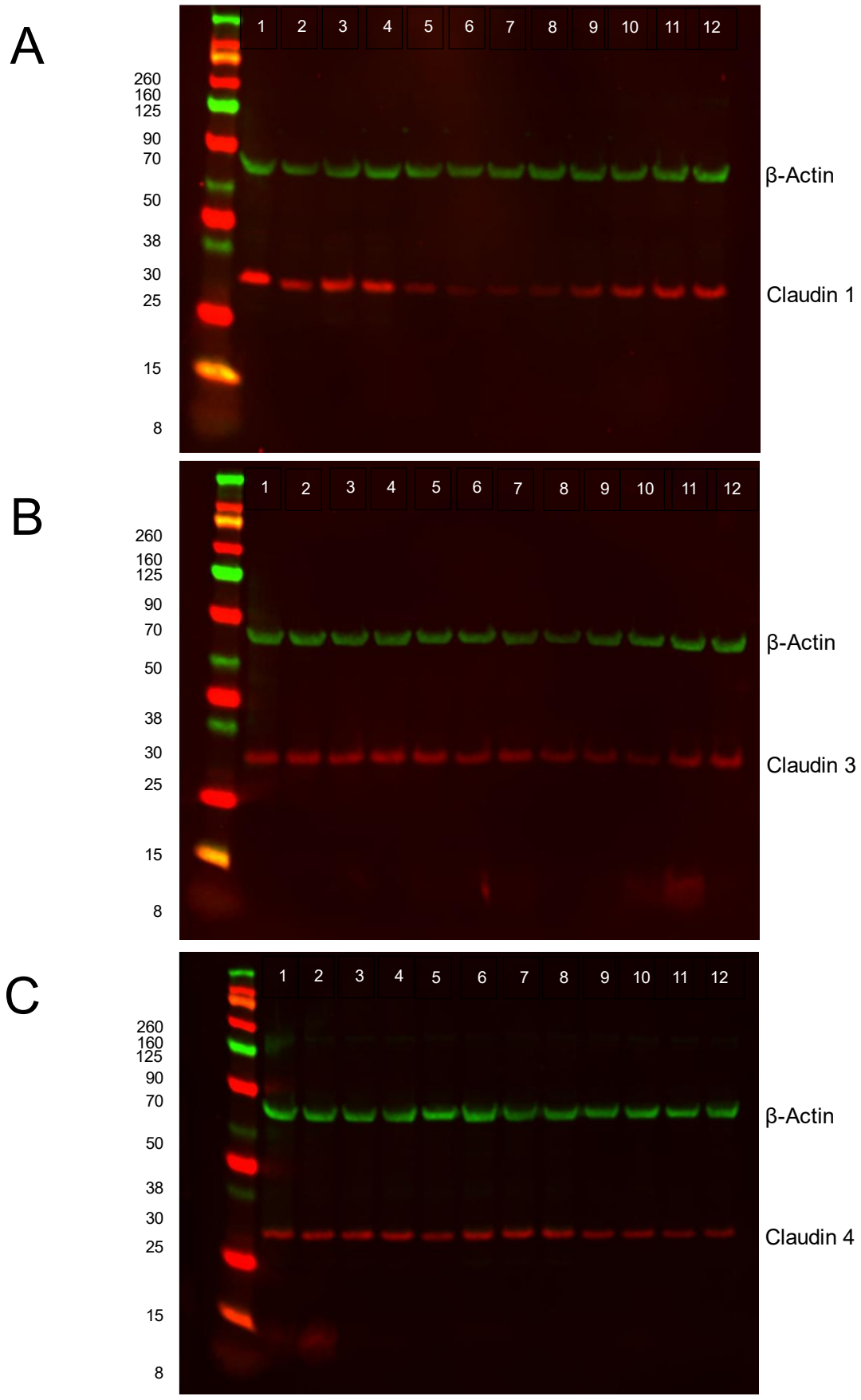


Abbildung 9: Western Blot (WB) Experimente an Tag 7 nach ALI-Etablierung (Air Liquid Interface). Die WB wurden durchgeführt um die Proteinmenge der TJ-Proteine (Tight-junction Proteine) Claudin 1 (A), Claudin 3 (B) und Claudin 4 (C) zwischen WT (Wildtyp), non-targeting shRNA und AQP3 Silencing shRNA (Aquaporin 3) Zellen zu vergleichen. Von links nach rechts sind die Spuren 1-4 sind dabei jeweils WT, 5-8 AQP3 Silencing shRNA und Spuren 9-12 non-targeting shRNA Zellen. Der Marker beta-Actin ist grün dargestellt. Die jeweils untersuchten Claudine sind rot dargestellt. Die Proteingrößen sind in kDa am linken Rand angegeben.

5. Diskussion

5.1 Einfluss von AQP3 auf das Atemwegsepithel

In meiner Arbeit untersuchte ich den Einfluss von Aquaporin 3 (AQP3) auf das Atemwegsepithel. Das in-vitro Zellmodell bildete zwischen Tag 5 und Tag 9 nach Air-liquid-interface (ALI)-Etablierung eine stabile Barrierefunktion und eine stabile Airway-surface-liquid (ASL) aus. Untersucht wurden dabei Zellen mit AQP3-Silencing, non-targeting shRNA und WT-Zellen. An Tag 7 nach ALI-Etablierung zeigte sich ein signifikant erniedrigter transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER) und eine erhöhte parazelluläre Permeabilität in Zellen mit AQP3-Silencing. Trotzdem bildeten Zellen mit AQP3-Silencing zu diesem Zeitpunkt ein stabiles ASL aus und es zeigte sich auch kein Unterschied in der Genexpression der Tight junction (TJ)-Proteine. In Untersuchungen des Zeitraumes von Tag 0 bis Tag 9 nach ALI-Etablierung ist ein verzögerter Anstieg des TEER in Zellen mit AQP3-Silencing zu sehen, der sich gegen Ende des beobachteten Zeitraumes an die anderen untersuchten Zellen angleicht. Bei Betrachtung der Genexpression über diesen Zeitraum lässt sich eine tendenziell niedrigere Expression der TJ-Proteine Claudin 1 und 3 erkennen, die zeitlich mit dem verzögerten Anstieg des TEERs korreliert. In Western Blot Experimenten wurde die Proteinmenge der Claudine 1, 3 und 4 bestimmt, die jedoch von AQP3 nicht beeinflusst wurde. Es zeigte sich, dass AQP3 einen großen Einfluss auf interzelluläre Kontakte im Atemwegsepithel hat, da es den zeitlichen Aufbau der Dichtigkeit der TJ beeinflusst und insbesondere einen Einfluss auf die Claudine in den TJ hat.

Die Experimente wurden an einem etablierten *in-vitro* Modell auf Basis der Zelllinie NCI-H441 durchgeführt, die eine hohe funktionelle Ähnlichkeit zu Atemwegsepithelien besitzt. Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen sich daher bedingt auch auf das native Atemwegsepithel übertragen. Zudem können die Aussagen der Ergebnisse der Experimente nur über den jeweils untersuchten Zeitraum getroffen werden. In semiquantitativen RT-PCR Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Silencing von AQP3 über den gesamten untersuchten

Zeitraum bestanden hat und die Ergebnisse nicht durch den Wiedereinbau von AQP3 in Zellen mit AQP3-Silencing verfälscht wurden.

Die Proteinfamilie der Aquaporine bilden Wasserkanäle und erleichtern den Wasserfluss über die Zellmembranen (Wittekindt et al., 2019; Verkman, 2009; Verkman, 2007). Aquaporine sind in vielen Geweben exprimiert und spielen eine Rolle für die Funktion zum Beispiel der Nierentubuli oder der Blut-Hirn-Schranke, kommen in der Haut und im Fettgewebe vor und sind an der Angiogenese beteiligt (Verkman, 2009).
In der Lunge spielen Aquaporinkanäle eine wichtige Rolle. Hier befinden sich Aquaporin 1, 3, 4, und 5 (Wittekindt et al., 2019; Verkman, 2007).
Es gibt Aquaporine, die ausschließlich selektiv für Wasser permeabel sind, und Aquaporine, die auch für kleine, ungeladene lösliche Stoffe wie Glycerol permeabel sind. Diese Aquaporine werden auch Aquaglyceroporine genannt (Wittekindt et al., 2019; Roche et al., 2017).
Aquaporin 3 zählt zu den Aquaglycerolporinen und befindet sich in den konduktiven und respiratorischen Atemwegen an Basalzellen und der lateralen Membran der Epithelzellen (Schmidt et al., 2017; Wittekindt et al., 2019).

Im Colon befindet sich AQP3 an der basolateralen Membran der Oberflächenepithelzellen (Yde et al., 2016). Hier beeinflusst die Inhibierung der AQP3 Expression die Barrierefunktion von Colonepithelzellen. Die gemessene Verringerung des transepithelialen Widerstands ist auf eine erhöhte parazelluläre Permeabilität zurückzuführen (Zhang et al., 2011).
Eine erniedrigte Expression von AQP3 im Colon ist mit Diarrhoen (Kon et al., 2014) und einer erhöhten Inflammationsrate im Colon assoziiert, und man nimmt an, dass AQP3 im Colon auch für Colitis eine wichtige Rolle spielt (Zhao et al., 2014).
In der Lunge sind Aquaporine wichtig für die Homöostase der oberflächlichen Flüssigkeitsschicht, die sich auf den Epithelien der Atemwege befindet. Sie passen die Permeabilität der Epithelien für Wasser an und können so Lungenödemen entgegenwirken. Insbesondere AQP3 spielt hier eine entscheidende Rolle (Schmidt et al., 2017).

Dies zeigen auch Experimente an Rattenlungen, die eine erhöhte Expression von AQP3 bei Lungenödemen nachweisen konnten (Sato et al., 2004). Außerdem konnte bewiesen werden, dass durch vermehrte Expression von Aquaporinen, von unter anderem auch AQP3, das Lungenödem bei akuter Lungenschädigung reduziert wird (Wang et al., 2023).
Aufgrund der hohen funktionellen Ähnlichkeit zwischen Darmepithelzellen und Atemwegsepithelzellen (Yde et al., 2021), stellte sich die Frage, ob AQP3 in Atemwegsepithelzellen einen ähnlichen Effekt auf die parazelluläre Permeabilität wie im Colonepithel hat.

5.2 Das ASL entsteht transzellulär

Der Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche der respiratorischen und konduktiven Atemwege nennt sich das ASL (airway surface liquid). Der Flüssigkeitstransport über zelluläre Barrieren erfolgt entweder durch Osmose oder durch hydrostatischen Druck. Unter physiologischen Bedingungen entsteht das ASL des respiratorischen Atemweges hauptsächlich durch transepithelialen Transport (Wittekindt et al., 2019; Verkman, 2007).
Die Flüssigkeit, die das ASL bildet, gelangt aus dem Interstitium auf die apikale Oberfläche des Epithels durch transepitheliale Transportprozesse. Dabei kann sie das Epithel auf transzellulärem oder parazellulärem Weg passieren. Bei dem transzellulären Weg muss die Flüssigkeit über Aquaporine in die Epithelzelle gelangen und diese wieder über Aquaporine verlassen. Bei dem parazellulären Weg ist ein Fluss des Lösungsmittels durch den lateralen Spalt zwischen benachbarten Zellen erforderlich. Dieser Fluss wird durch Tight junctions (TJ) limitiert. Im Fall des Lungenepithels geht man von TJ aus, die annähernd keine Wasserpermeabilität aufweisen. Daher wird der Hauptanteil des Wassertransports über den transzellulären Weg erfolgen (Wittekindt et al., 2019; Weiser et al., 2011; Kapus et al., 2006).
Aquaporine erleichtern den transepithelialen Wassertransport, indem sie die Wasserpermeabilität der zellulären Membran erhöhen. Angetrieben wird der Wassertransport durch den transepithelialen Elektrolyttransport (Verkman, 2007). Die meiste Flüssigkeit gelangt daher primär über AQP-abhängige transzelluläre Wege an die apikale Oberfläche des Lungenepithels. Der parazelluläre Weg über

TJ spielt nur eine untergeordnete Rolle (Wittekindt et al., 2019; King et al., 2002; Weiser et al., 2011; Matusi et al., 2000).
Die Permeabilität des Epithels ist von ihrer Position in den Atemwegen abhängig. In den luftleitenden Atemwegen schränkt das Epithel den transzellulären Wasserfluss ein (Wittekindt et al., 2019).

Obwohl Aquaporine eine wichtige Rolle für den transzellulären Flüssigkeitstransport spielen, führt die Inhibierung der Expression von AQP3 und 4 zu keiner Beeinträchtigung der Versorgung der Atemwege mit Flüssigkeit und der Flüssigkeitsabsorption. Zudem wird durch die Deletion auch die Etablierung des ASL nicht beeinträchtigt (Verkman, 2007).
Auch in von uns durchgeführten Messungen des ASL mittels Deuteriumoxid Dilutionsmethode (Neubauer et al., 2013) zeigte sich ein stabiles ASL in allen Vergleichsgruppen. Trotz Silencing von AQP3 bildete sich ein stabiles ASL aus. AQP3 scheint daher keine Rolle in der Ausbildung des ASL zu spielen.
Experimente von H. Schmidt et al. (2017) zeigen jedoch, dass bei einer Erhöhung des apikalen Flüssigkeitsvolumens über einen längeren Zeitraum, es zu einer Hochregulation der Aquaporinexpression kommt. In diesen Experimenten wurden ebenfalls an NCI-H441-Zellen ein stabiles ALI etabliert. Danach wurde eine isotone Flüssigkeit auf die apikale Oberfläche hinzugefügt. Hier zeigte sich zunächst ein Stadium der langsamen Rückresorption, gefolgt von einem Stadium der schnellen Rückresorption, in der die meiste hinzugefügte Flüssigkeit entfernt wurde, bis innerhalb von 24 Stunden das gesamte zusätzliche Volumen entfernt wurde und sich das ursprüngliche ASL-Volumen wieder einstellte. Es zeigte sich, dass dabei die Expression von AQP3 hochreguliert wird und die Hochregulation von AQP3 mit dem Einsetzen des schnellen Rückresorptionsstadiums korreliert (Schmidt et al, 2017; Schmidt, 2016). Die Hochregulation von AQP3 könnte daher für die Kompensation eines Lungenödems eine Rolle spielen. Auch bei Lungenödemen bei Ratten wurde eine erhöhte Expression von AQP3 entdeckt (Sato et al., 2004).
Obwohl AQP3 für die Ausbildung eines stabilen ASL keine Rolle zu spielen scheint, ist davon auszugehen, dass es für die Aufrechterhaltung der Homöstase des ASL eine wichtige Rolle spielt.

5.3 AQP3 beeinflusst die Tight junctions (TJ)

Epithelzellen sind an der lateralen Seite untereinander durch den Schlussleistenkomplex verbunden. Dieser besteht aus der Zonula occludens, auch Tight junctions (TJ) genannt, der Zonula adherens und Desmosomen (Zihni et al., 2016).
Die parazelluläre Permeabilität wird durch die TJ limitiert. Sie wirken als Diffusionsbarriere. Wichtig dabei ist, dass sie eine selektive Permeabilität besitzen. Aufgrund ihrer selektiven Permeabilität können bestimmte Teilchen leichter über die TJ diffundieren als andere. Diese selektive Permeabilität kann man unterteilen in eine Größenselektivität, eine Ladungsselektivität und eine Selektivität gegenüber dem Lösungsmittel Wasser (Zihni et al., 2016; Larre et al., 2014).
TJ spielen die Hauptrolle für Barrierefunktion des Schlussleistenkomplexes. Gleichzeitig müssen die TJ auch durchgängig für bestimmte Ionen und Anpassungsfähig für die Permeabilität bleiben (Weiser et al., 2011; Günzel et al., 2013).

Die Permeabilität der parazelluläre Diffusionsbarriere wurde von mir anhand von Messungen des apparenten Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) an Tag 7 nach ALI-Etablierung untersucht. In diesen Experimenten zeigte sich, dass in Zellen mit AQP3 Silencing im Vergleich zu WT-Zellen die parazelluläre Permeabilität signifikant erhöhrt war. Das bedeutet, dass durch das Silencing von AQP3 die Permeabilität der TJ bezüglich der gelösten Substanzen erhöht wird.

Der Aufbau und die Integrität der epithelialen TJ hängen von den Interaktionen der Bestandteile der TJ ab. TJ bestehen aus den Proteinen der Proteinfamilien Occludin, Tricellulin, Zonula occludens-Proteine, Claudine und TJ-associated MARVEL Proteine (TAMP) (Hou et al., 2010; Kuo et al., 2022).
Die Interaktionen zwischen diesen Proteinen wurden an Fibroblasten untersucht. Die Bindungen von Claudinsträngen sind hierbei sehr dynamisch. Claudinstränge brechen und verbinden sich unabhängig von ihrer Bindung zu anderen TJ-Proteinen immer wieder. Bei der erneuten Verbindung werden bevorzugt neu hergestellte Claudine in den neuen Strang eingebaut. Diese intermittierende Verbindung der Claudinstränge könnte die Anpassungsfähigkeit der parazellulären

Permeabilität erklären. Jedoch kann sich das Verhalten von Claudinsträngen in Fibroblasten, von dem in Epithelzellen unterscheiden (Van Itallie et al., 2017).

Aber auch zwischen Epithelzellen regulieren Claudinstränge durch das wiederholte Brechen und Verbinden der TJ-Stränge die parazelluläre Diffusion von löslichen Stoffen. Die Interaktionen zwischen den Claudinen im Epithel wurde durch Kraftspektroskopie von einzelnen Molekülen für Claudin 1 untersucht. Die Verbindungen zwischen den Claudin 1 Molekülen sind schwach und instabil. Die Interaktionen sind kurz und sehr dynamisch. Der Strangbruch basierte dabei in über 85 % der Fälle durch das Brechen einer einzigen Verbindung. Diese dynamischen Strangbrüche tragen zu der Fähigkeit von Claudinen bei, die parazelluläre Permeabilität für lösliche Stoffe zu beeinflussen (Lim et al., 2007).

Trotz des ständigen Brechens und Neuaufbauens der Claudinstränge bleibt die physiologische Barrierefunktion erhalten. Neue Claudinstränge werden bevorzugt an den Stellen der Strangbrüche und an freien Enden der Stränge angebaut, die sich zumeist am basalen Rand der Tight junctions befinden. Neue Claudine werden von der Basalseite in die Stränge eingebracht und ersetzen dann nach und nach die älteren Claudine in den Claudinsträngen (Van Itallie et al., 2019).

Eine Reduktion der Tight junction Stränge und Strangbrüche und eine veränderte Proteinzusammensetzung an den Tight junctions ist assoziiert mit Krankheiten wie Morbus Crohn und Colitis ulcerose, bei denen es zu Barrierestörungen des Darmepithels kommt. Die Strangbrüche sind hier wichtig für die Aufnahme bestimmter Moleküle und trotzdem Gewährleistung eines dichten Epithels (Schulzke et al., 2009; Mankertz et al., 2007).

Eine gut etablierte Methode, um quantitativ die Barrierefunktion des Epithels zu untersuchen, ist die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER). Durch Messung des Widerstands des Epithels zu einem bestimmten Zeitpunkt, lassen sich Rückschlüsse auf die Dichtigkeit der TJ ziehen (Srinivasan, 2015).

In Messungen des TEER an Tag 7 nach ALI zeigte sich, dass in Zellen mit AQP3 Silencing der TEER signifikant erniedrigt war. Das gibt einen Hinweis darauf, dass durch das Silencing von AQP3 die Dichtigkeit der TJ beeinflusst wird.

Durch Messung des TEERs während des Wachstums und der Differenzierung der Zellen erhält man Informationen über die Integrität der Zellbarriere über die Zeit (Srinivasan, 2015). Dies lässt Rückschlüsse auf die Ausbildung der TJ zu.
Der TEER steigt mit der Ausbildung von TJ an. Die Anzahl der TJ-Stränge korreliert mit dem transepithelialen Widerstand (Günzel et al., 2013).
Bei ausgebildetem Schlussleistenkomplex zeigte sich daher kein weiterer Anstieg des Widerstands, sondern es bildet sich ein Plateau. In Zeitverlaufsmessungen des TEER zeigte sich, dass in Zellen mit AQP3 Silencing dieses Plateau erst später erreicht wird als in WT-Zellen und der Negativkontrolle. Silencing von AQP3 verlangsamt also die Ausbildung der TJ.
Ursachen für einen erniedrigten TEER können noch nicht konfluent gewachsene Zellen zu Messbeginn sein oder ein noch unzureichend aufgebauter Schlussleistenkomplex (Günzel et al., 2013).

Hierdurch zeigt sich, dass AQP3 die Geschwindigkeit der Ausbildung der Dichtigkeit der TJ beeinflusst. Es ergeben sich Hinweise darauf, dass AQP3 eine wichtige Rolle im Aufbau des Schlussleistenkomplexes und Einfluss auf die dynamischen Strangbrüche in den TJ hat.

5.4 Claudine im Schlussleistenkomplex

Die Proteine der Proteinfamilien Occludin, Tricellulin, Zonula occludens-Proteine, Claudine und TJ-associated MARVEL Proteine (TAMP) bilden den Komplex der Zonula occludens (Tight junctions, Schlussleistenkomplex) (Hou et al., 2010; Kuo et al., 2022).
Ein wesentlicher Bestandteil der TJ sind dabei Claudine. Sie bestimmen die funktionellen Eigenschaften der TJ. Claudine sind integrale Membranproteine, die sowohl Poren als auch parazelluläre Barrieren bilden. Daher wird die parazelluläre Permeabilität über die TJ hauptsächlich von Claudinen bestimmt (Günzel et al.,

2013; Coyne et al., 2003; Kuo et al., 2022). Auch die selektive Permeabilität der TJ für Anionen und Kationen wird durch Claudine bestimmt (Hagen, 2017).

Innerhalb der TJ bilden die Claudine parallel die Zelle umlaufende Stränge und interagieren mit den Claudinen der Nachbarzellen. Die Barrierefunktion und Dichtigkeit der TJ sind abhängig von den Eigenschaften der exprimierten Claudine. Claudine sind primär für das Bilden einer Diffusionsbarriere zuständig, allerdings gibt es auch Claudine, die zusätzlich Poren bilden. Zu diesen Poren-bildenden Claudinen gehören Claudin 2, Claudin 6, Claudin 10, Claudin 15 und Claudin 17 (Capaldo et al., 2015; Günzel et al., 2013; Koval, 2013; Kielgast et al., 2015).

Claudin 1 und Claudin 3 zeigen bei Überexpression eine Verringerung der parazellulären Permeabilität, während die Überexpression von Claudin 5 die Erhöhung der parazellulären Permeabilität zur Folge hat (Coyne et al., 2003).

Den Einfluss von Claudinen auf die parazelluläre Permeabilität zeigen auch Experimente an embryonalem Lungenepithel von Hühnern. Hier konnte gezeigt werden, dass durch eine verringerte Claudin 3 Expression in den TJ die parazelluläre Permeabilität des Lungenepithels erhöht wird. Dies führte in der embryonalen Lunge zu einem kleineren Lumen der Atemwege und zu einer Verringerung des hydrostatischen Drucks (La Charité-Harbec et al., 2022).

Außerdem hängt die Dichtigkeit der TJ auch von der Zusammensetzung der verschiedenen Claudin-Isoformen ab. Claudin 4 zum Beispiel ist eigentlich ein verschließendes Membranprotein. In Kombination mit Claudin 8 bilden sie jedoch eine Pore, die für Chlorid durchlässig ist (Schmidt et al., 2019; Capaldo et al., 2015; Günzel et al., 2013; Hou et al., 2010).
Claudine werden in allen Epithelien exprimiert. Welche Claudin-Isoformen und Zusammensetzungen jedoch exprimiert werden, ist je nach Aufgabe, Funktion und Beanspruchung des Gewebes unterschiedlich (Günzel, 2017).
Im Schlussleistenkomplex des menschlichen Atemwegsepithel werden die Claudine 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 15 und 18 exprimiert. Die stärkste Expression in

den TJ des Atemwegsepithels haben die Claudine 3 und 4 (Wittekindt et al., 2017; Koval, 2012; Günzel et al., 2013).
Silencing von AQP3 zeigte keinen Einfluss auf die Expression der Claudine in semiquantitativen RT-PCRs an Tag 7 nach ALI. Da in den von uns durchgeführten Experimenten keine nativen Atemwegsepithelzellen verwendet wurden, sondern die Zelllinie NCI-H441 als Model für Atemwegsepithelien, könnte die Claudinexpression von der nativer Atemwegsepithelien abweichen. Am stärksten exprimiert wurde Claudin 4, während Claudin 2, 17, 18 und 19 kaum exprimiert wurden.
Auch die Expression von Occludin, Tricellulin/MarvelD2 und ZO-1 wurde zu diesem Zeitpunkt nicht durch ein Silencing von AQP3 beeinflusst.
Occludin, Tricellulin/MarvelD2 und ZO-1 sind nicht an der Barrierefunktion des Epithels beteiligt, sind allerdings für Proliferation und Apoptose und den Aufbau von speziellen Epithelstrukturen verantwortlich (Kuo et al., 2022).

5.5 Einfluss von AQP3 auf die Ausbildung der Claudine in den TJ

Für die physiologische Funktion eines Gewebes ist es sehr wichtig, dass die TJ anpassungsfähig sind. Die Claudinexpression und daher auch die Barrierefunktion der TJ verändern sich während der Differenzierung des Gewebes und unterliegen ständiger regulatorischer Modifizierung.
Außerdem befinden sich die TJ auch in ausdifferenziertem Gewebe in einem ständigen Umbau. So kann durch unterschiedliche Claudinzusammensetzung oder veränderte Expression von Claudinisoformen auf extrazelluläre Stimuli und Signale reagiert werden. Insgesamt kommt es somit also je nach Aufgaben und Ansprüchen an das Gewebe zu einer unterschiedlichen Claudinzusammensetzung und Claudinexpression (Capaldo et al., 2015; Cummins, 2012).
Die Ausbildung und Differenzierung der Claudine in den TJ über die Zeit wurde mittels semiquantitiver RT-PCRs untersucht. AQP3-Silencing beeinflusst die Expression von Claudinen in einer sehr spezifischen Weise, indem es selektiv die Expression von Claudin 1 und 3 sowie tendenziell auch von Claudin 4 und 8

verzögert. Dies korreliert in meinen Experimenten auch mit dem zeitlich verzögerten TEER-Anstieg.

Die verzögert sich erhöhende Claudinexpression könnte dadurch verursacht werden, dass die Zellen mit AQP3 Silencing wieder beginnen AQP3 zu exprimieren. Dies konnten wir mit unseren Experimenten in dem von uns untersuchten Zeitraum ausschließen. Der verzögerte Zeitverlauf der Claudinexpression ist also nicht auf einen plötzlichen Wiedereinbau von AQP3 in die Zellen mit AQP3 Silencing zurückzuführen.

Claudin 4 und Claudin 8 bilden in TJ gemeinsam einen parazellulären Chloridkanal und sind somit für den parazellulären Teilchenfluss von Bedeutung (Hou et al., 2010).

Claudin 1 und 3 verringern die TJ-Permeabilität für lösliche Stoffe in Atemwegsepithelien. Es gibt eine Korrelation zwischen der Expression dieser Claudine und der parazellulären Permeabilität des Atemwegsepithels. Die Koexpression von Claudin 1 und 3 führt zu einer erniedrigten parazellulären Permeabilität und zu einem erhöhten transepithelialen Widerstand, also zu einer dichteren Barriere (Coyne et al., 2003). Bei Inhibierung von AQP3 in Colonepithelzellen zeigte sich eine verringerte Expression von Claudin 1 bei Inhibierung von AQP3. Dies führte ebenfalls zu einem erniedrigten TEER und einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität (Zhang et al., 2011).
Dies würde auch den in dieser Arbeit beobachteten Effekt des AQP3-Silencings auf die parazelluläre Permeabilität in den untersuchten Epithelien erklären.

Occludin spielt für den Aufbau der TJ keine Rolle. Das beweisen Mäuse mit einem Knockdown für Occludin. Bei diesen Mäusen bildeten sich morphologisch unauffällige TJ aus, die eine normale Barrierefunktion des Epithels zeigten. Durch das Fehlen von Occludin wird die Lage der Claudine in den TJ nicht beeinflusst (Saitou et al., 2000).
Occludin hat allerdings im Schlussleistenkomplex wichtige Aufgaben bei der intrazellulären Zellkommunikation und sorgt mit Claudinen für eine Stabilisierung der TJ (Cummins, 2012).

Eine Überexpression von Occludin ist mit einer Erhöhung des transepithelialen Widerstands assoziiert (McCarthy et al., 1996) und zu einer erhöhten Differenzierung des TJ-Komplexes mit einer erhöhten Barrierefunktion (Saito et al., 2021).
Bei Silencing von AQP3 in Atemwegsepithelien zeigt sich eine erhöhte Expression von Occludin vor allem bei noch nicht konfluent gewachsenem Epithel. Nachdem das Gewebe konfluent gewachsen ist, normalisiert sich die Expression von Occludin. Die erhöhte Expression von Occludin könnte einen Mechanismus darstellen, der der reduzierten Claudinexpression entgegenwirkt. Dies lässt darauf schließen, dass AQP3 einen Einfluss auf die Ausbildung der TJ hat. Durch Silencing von AQP3 verändert sich der zeitliche Aufbau der TJ.
Es zeigt sich aber auch, dass der Aufbau der TJ gewebespezifisch ist, da eine Inhibierung von AQP3 in Colonepithelzellen zu einer Erniedrigung der Expression von Occludin führt (Zhang et al., 2011).

Durch eine verringerte Expression von AQP3 kommt es offenbar zu einem veränderten Aufbau der TJ. Das zeigt, dass AQP3 die zeitliche Ausbildung der TJ und die Organisation der Claudine beeinflusst, indem es die Expression der Claudine in den TJ beeinflusst. Vor allem an der Entwicklung von Claudin 1 und 3 innerhalb der TJ ist offenbar AQP3 beteiligt. Des Weiteren zeigt sich die Bedeutung von Claudin 1 und 3 für die Dichtigkeit des Epithels. Eine erniedrigte Expression von Claudin 1 und 3 führt zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität und zu einem erniedrigten TEER, die TJ sind also weniger dicht.

5.6 Einfluss von AQP3 auf die Proteinmenge der Claudine in den TJ

Genexpression ist definiert als die Produktion eines messbaren Phänotyps durch ein Gen. Meistens wird die Genexpression durch die Synthese eines Proteins sichtbar gemacht. Sie beinhaltet die Transkription und Translation von mRNA in ein Protein (Buccitelli et al., 2020).

Daher ist für die Auswirkungen von AQP3 auf die Expression der Claudine auch die daraus resultierende Proteinmenge wichtig.
Western Blots eignen sich, um spezifische Proteine und deren Molekulargewicht aus einem Proteingemisch zu identifizieren (Hnasko et al., 2015).

Für diese Arbeit wurden die Western Blots jeweils mit Zellen von Tag 7 nach ALI-Etablierung durchgeführt. Besonders die Claudine 1 und 3 wurden untersucht, da sich in den semiquantitativen qRT-PCR Zeitverläufen Hinweise auf einen Einfluss von AQP3 auf den Aufbau von Tight junctions ergeben haben. Deshalb sollte untersucht werden, ob auch die daraus resultierende Proteinmenge dieser Claudine beeinflusst wird. Western Blots von Claudin 4 wurden durchgeführt, da das Gen dieses Claudins in den semiquantitativen qRT-PCRs am stärksten exprimiert war.
Trotz geringerer Genexpression von Claudin 1 und 3 in Zellen mit AQP3 Silencing zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich mit Wildtypzellen und den Kontrollzellen. Die Proteinmenge unterscheidet sich trotz geringerer Expression nicht signifikant. Wir konnten daher keine eindeutige Korrelation zwischen der Transkripitionsmenge der Claudine 1, 3 und 4 und der Proteinmenge dieser Claudine finden.
Da sich daraus schließen lässt, dass genügend Proteine dieser Claudine vorhanden sind, hat vermutlich an Tag 7 nach ALI-Etablierung der Einbau der Proteine in die Tight junctions noch nicht korrekt stattgefunden. Da das Epithel sich noch im Aufbau befindet könnten die Proteine zwar vorhanden sein, jedoch sich noch an der falschen Stelle oder noch nicht in die Tight junctions eingebaut befinden. Sie könnten sich auch noch nicht in aktivierter Form befinden und somit für die Funktion der Tight junctions noch keine Rolle spielen. Dass genügend Protein vorhanden ist, gibt Hinweise darauf, dass AQP 3 an der Ausbildung der TJ beteiligt ist und eventuell einen Einfluss auf den zeitlichen Einbau der Claudine in die TJ hat. Dies müsste in zukünftigen Experimenten noch weiter erforscht werden.
Die aus der Proteinsynthese resultierende Proteinmenge ist zudem nicht nur von der mRNA-Expression abhängig, sondern auch von der Verfügbarkeit von Ressourcen für die Proteinsynthese (Liu et al., 2016).

Es könnte daher sein, dass außerhalb des von uns untersuchten Zeitraumes es zu einer unterschiedlichen Proteinmenge dieser Claudine kommt. Dies müsste in zukünftigen Untersuchungen noch erforscht werden.

6. Zusammenfassung

In meiner Arbeit untersuchte ich den Einfluss von Aquaporin 3 (AQP3) auf das Atemwegsepithel anhand des etablierten *in-vitro* Zellmodells auf Basis von Wildtyp (WT) NCI-H441 Zellen, die eine hohe funktionelle Ähnlichkeit zu Atemwegsepithelien haben. Das in-vitro Zellmodell bildete zwischen Tag 5 und Tag 9 nach Air-liquid-interface (ALI)-Etablierung eine stabile Barrierefunktion und eine stabile Airway-surface-liquid (ASL) aus. Untersucht wurden dabei Zellen mit AQP3-Silencing, non-targeting shRNA und WT-Zellen.

An Tag 7 nach ALI-Etablierung zeigte sich ein signifikant erniedrigter transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER) und eine signifikant erhöhte parazelluläre Permeabilität in Zellen mit AQP3-Silencing. Trotzdem bildeten Zellen mit AQP3-Silencing zu diesem Zeitpunkt ein stabiles ASL aus und es zeigte sich auch kein Unterschied in der Genexpression der Tight junction (TJ)-Proteine. In Untersuchungen des Zeitraumes von Tag 0 bis Tag 9 nach ALI-Etablierung ist ein verzögerter Anstieg des TEER in Zellen mit AQP3-Silencing zu sehen, der sich gegen Ende des beobachteten Zeitraumes an die anderen untersuchten Zellen angleicht. Bei Betrachtung der Genexpression über diesen Zeitraum lässt sich eine tendenziell niedrigere Expression der TJ-Proteine Claudin 1 und 3 erkennen, die zeitlich mit dem verzögerten Anstieg des TEERs korreliert. Die Proteinmenge, die in Western Blot Experimenten für die Claudine 1,3 und 4 bestimmt wurden, zeigte jedoch keine Veränderung durch AQP3-Silencing.

Es zeigt sich, dass AQP3 eine wichtige Rolle bei dem Aufbau der TJ spielt, da AQP3 die Geschwindigkeit der Ausbildung der Dichtigkeit der TJ beeinflusst. Insbesondere auf die Ausbildung der Claudine innerhalb der TJ scheint AQP3 einen Einfluss zu haben.

Wie genau AQP3 die Claudine innerhalb der TJ beeinflusst, ist jedoch noch Gegenstand weiterer Forschung.

7. Literaturverzeichnis

1) Boucher RC (2003). Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. Pflugers Arch. 445:495-498.
2) Buccitelli C, Selbach M (2020). mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. Nat Rev Genet. 21:630-644.
3) Capaldo CT, Nusrat A (2015). Claudin switching: Physiological plasticity of the Tight Junction. Semin Cell Dev Biol. 42:22-29.
4) Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG (2003). Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 285:L1166-1178.
5) Cummins PM (2012). Occludin: one protein, many forms. Mol Cell Biol. 32:242-250.
6) Günzel D, Yu AS (2023). Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiol Rev. 93:525-569.
7) Günzel D (2017). Claudins: vital partners in transcellular and paracellular transport coupling. Pflugers Arch. 469:35-44.
8) Hagen SJ (2017). Non-canonical functions of claudin proteins: Beyond the regulation of cell-cell adhesions. Tissue Barriers. 5:e1327839.
9) Hnasko TS, Hnasko RM (2015). The Western Blot. Methods Mol Biol. 1318:87-96.
10) Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S (2010). Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:18010-18015.
11) Kapus A, Szászi K (2006). Coupling between apical and paracellular transport processes. Biochem Cell Biol. 84:870-880.
12) Kielgast F, Schmidt H, Braubach P, Winkelmann VE, Thompson KE, Frick M, Dietl P, Wittekindt OH (2016). Glucocorticoids Regulate Tight Junction Permeability of Lung Epithelia by Modulating Claudin 8. Am J Respir Cell Mol Biol. 54:707-717.
13) King LS, Nielsen S, Agre P, Brown RH (2002). Decreased pulmonary vascular permeability in aquaporin-1-null humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 99:1059-1063.

14) Kon R, Ikarashi N, Nagoya C, Takayama T, Kusunoki Y, Ishii M, Ueda H, Ochiai W, Machida Y, Sugita K, Sugiyama K (2014). Rheinanthrone, a metabolite of sennoside A, triggers macrophage activation to decrease aquaporin-3 expression in the colon, causing the laxative effect of rhubarb extract. J Ethnopharmacol. 152:190-200.
15) Koval M (2013). Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions. Annu Rev Physiol. 75:551-567.
16) Kuo WT, Odenwald MA, Turner JR, Zuo L (2022). Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival. Ann N Y Acad Sci. 1514:21-33.
17) La Charité-Harbec S, Lachance JB, Ryan AK, Gupta IR (2022). Claudin-3 regulates luminal fluid accumulation in the developing chick lung. Differentiation. 124:52-59.
18) Larre I, Ponce A, Franco M, Cereijido M (2014). The emergence of the concept of tight junctions and physiological regulation by ouabain. Semin Cell Dev Biol. 36:149-156.
19) Lim TS, Vedula SR, Kausalya PJ, Hunziker W, Lim CT (2008). Single-molecular-level study of claudin-1-mediated adhesion. Langmuir. 24:490-495.
20) Liu Y, Beyer A, Aebersold R (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. Cell. 165:535-550.
21) Mankertz J, Schulzke JD (2007). Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. Curr Opin Gastroenterol. 23:379-383.
22) Matsui H, Davis CW, Tarran R, Boucher RC (2000). Osmotic water permeabilities of cultured, well-differentiated normal and cystic fibrosis airway epithelia. J Clin Invest. 105:1419-1427.
23) McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. J Cell Sci. 109:2287-2298.
24) Neubauer D, Korbmacher J, Frick M, Kiss J, Timmler M, Dietl P, Wittekindt OH, Mizaikoff B (2013). Deuterium oxide dilution: a novel method to study apical water layers and transepithelial water transport. Anal Chem. 85: 4247-4250.

25) Roche JV, Törnroth-Horsefield S (2017). Aquaporin Protein-Protein Interactions. Int J Mol Sci. 18:2255.
26) Saito AC, Higashi T, Fukazawa Y, Otani T, Tauchi M, Higashi AY, Furuse M, Chiba H (2021). Occludin and tricellulin facilitate formation of anastomosing tight-junction strand network to improve barrier function. Mol Biol Cell. 32:722-738.
27) Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. Mol Biol Cell. 11:4131-4142.
28) Sato K, Kobayashi K, Aida S, Tamai S (2004). Bronchiolar expression of aquaporin-3 (AQP3) in rat lung and its dynamics in pulmonary oedema. Pflugers Arch. 449:106-114.
29) Sato K, Kobayashi K, Aida S, Tamai S (2004). Bronchiolar expression of aquaporin-3 (AQP3) in rat lung and its dynamics in pulmonary oedema. Pflugers Arch. 449:106-114.
30) Schmidt H, Braubach P, Schilpp C, Lochbaum R, Neuland K, Thompson K, Jonigk D, Frick M, Dietl P, Wittekindt OH (2019). IL-13 Impairs Tight Junctions in Airway Epithelia. Int J Mol Sci. 20:3222.
31) Schmidt H, Michel C, Braubach P, Fauler M, Neubauer D, Thompson KE, Frick M, Mizaikoff B, Dietl P, Wittekindt OH (2017). Water Permeability Adjusts Resorption in Lung Epithelia to Increased Apical Surface Liquid Volumes. Am J Respir Cell Mol Biol. 56:372-382.
32) Schmidt H (2016), Effekt einer apikalen Volumenexpansion auf den Wassertransport in Atemwegsepithelien
33) Schulzke JD, Ploeger S, Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, Troeger H, Richter J, Bojarski C, Schumann M, Fromm M (2009). Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. Ann N Y Acad Sci. 1165:294-300.
34) Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. J Lab Autom. 20:107-126.
35) Steimer A, Franke H, Haltner-Ukomado E, Laue M, Ehrhardt C, Lehr CM (2007). Monolayers of porcine alveolar epithelial cells in primary cultureas an in vitro model for drug absorption studies. Eur J Pharm Biopharm 66: 372-382.

36) Van Itallie CM, Lidman KF, Tietgens AJ, Anderson JM (2019). Newly synthesized claudins but not occludin are added to the basal side of the tight junction. Mol Biol Cell. 30:1406-1424.
37) Van Itallie CM, Tietgens AJ, Anderson JM (2017). Visualizing the dynamic coupling of claudin strands to the actin cytoskeleton through ZO-1. Mol Biol Cell. 28:524-534.
38) Verkman A.S. (2007). Role of aquaporins in lung liquid physiology. Respiratory Physiology & Neurobiology. 159:324-330
39) Verkman AS (2009). Knock-out models reveal new aquaporin functions. Handb Exp Pharmacol. 359-381.
40) Wang Y, Wang Y, Ma J, Li Y, Cao L, Zhu T, Hu H, Liu H (2023). YuPingFengSan ameliorates LPS-induced acute lung injury and gut barrier dysfunction in mice. J Ethnopharmacol. 312:116452.
41) Weiser N, Molenda N, Urbanova K, Bähler M, Pieper U, Oberleithner H, Schillers H (2011). Paracellular permeability of bronchial epithelium is controlled by CFTR. Cell Physiol Biochem. 28:289-296.
42) Wittekindt OH, Dietl P (2019). Aquaporins in the lung. Pflugers Arch. 471:519-532.
43) Wittekindt OH (2017). Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation. Pflugers Arch. 469:135-147.
44) Yde J, Keely S, Wu Q, Borg JF, Lajczak N, O'Dwyer A, Dalsgaard P, Fenton RA, Moeller HB (2016). Characterization of AQPs in Mouse, Rat, and Human Colon and Their Selective Regulation by Bile Acids. Front Nutr. 3:46.
45) Yde J, Keely SJ, Moeller HB (2021). Expression, regulation and function of Aquaporin-3 in colonic epithelial cells. Biochim Biophys Acta Biomembr. 1863:183619.
46) Yuksel H, Turkeli A (2017). Airway epithelial barrier dysfunction in the pathogenesis and prognosis of respiratory tract diseases in childhood and adulthood. Tissue Barriers. 5:e1367458.
47) Zhang W, Xu Y, Chen Z, Xu Z, Xu H (2011). Knockdown of aquaporin 3 is involved in intestinal barrier integrity impairment. FEBS Lett. 585:3113-3119.

48) Zhao G, Li J, Wang J, Shen X, Sun J (2014). Aquaporin 3 and 8 are down-regulated in TNBS-induced rat colitis. Biochem Biophys Res Commun. 443:161-166.
49) Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. Nat Rev Mol Cell Biol. 17:564-580.

8. Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt