Universität Ulm
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

Der Effekt von Benzimidazolonen auf den epithelialen Natriumtransport der Lunge

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Sandra Kimpel
Stuttgart
2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Thome
2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Dietl
Tag der Promotion: 4.7.2013

Inhalt

1 Einleitung 1
1.1 Allgemeines 1
1.2 Lungenepithel und alveolärer Ionentransport 1
1.2.1 Amilorid-sensitiver epithelialer Natriumkanal (ENaC) 5
1.2.2 Natrium, Kalium-Adenosintriphosphatase (Na^+, K^+-ATPase) 6
1.2.3 Kaliumkanäle 7
1.3 Regulation der alveolären Flüssigkeits-Clearance 10
1.4 Pathophysiologie 11
1.5 Fragestellungen 12
2 Material und Methoden 14
2.1 Material 14
2.1.1 Versuchstiere 14
2.1.2 A549-Zellen 14
2.1.3 Verbrauchsmaterial und Geräte 14
2.1.4 Medien und Lösungen zur Primärkultur von AT II-Zellen 15
2.1.5 Medien und Lösungen zur Zellkultur von A549-Zellen 16
2.1.6 Lösungen für Ussing-Kammer- und Patch-clamp-Messungen 16
2.1.7 Verwendete Substanzen 18
2.2 Methoden zur Zellkultur 20
2.2.1 Isolierung und Primärkultur von Alveolarzellen 20
2.2.2 Zellkultur A549 23
2.2.3 Kryokonservierung von A549-Zellen 24
2.2.4 Vorbereitung der Ringe für Patch-clamp-Messungen 24
2.3 Ussing-Kammer 25
2.3.1 Aufbau 25
2.3.2 Elektrische Messanordnung und Messprinzip 26
2.3.3 Elektroden und Pipetten 28
2.3.4 Versuchsablauf 29
2.4 Patch-clamp-Technik 31
2.4.1 Aufbau des Messstandes 31
2.4.2 Elektrische Messanordnung und Messprinzip 32
2.4.3 Badelektrode, Patch-Elektrode und Pipetten 34

2.4.4 Versuchsablauf 35
2.5 Auswertung 37
2.5.1 Auswertung der Ussing-Kammer-Messungen 37
2.5.2 Auswertung der Patch-clamp-Messungen 38
2.6 Statistik 39
2.6.1 Statistik Ussing-Kammer-Messungen 40
2.6.2 Statistik Patch-clamp-Messungen 40
3 Ergebnisse 41
3.1 Messung transepithelialer Ströme von Monolayern mit der Ussing-Kammer 41
3.1.1 Wirkung der Benzimidazolone auf den I_{SC} 41
3.1.2 Wirkung von Tram34 auf den I_{SC} 47
3.1.3 Messung mit K^+-Gradient 48
3.1.4 Messung der apikalen Na^+-Permeabilität 50
3.2 Messungen mit der Patch-clamp-Technik 53
3.2.1 Whole-cell-Messungen 53
3.2.2 Single-channel-Messungen 56
4 Diskussion 60
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse 60
4.2 Untersuchungsmaterial 62
4.3 Verwendete Substanzen und Lösungen 63
4.4 Messmethodik und Versuchsdurchführung 66
4.5 Vergleich der Wirkung der getesteten Benzimidazolone 67
4.6 Schlussfolgerung 68
5 Zusammenfassung 70
6 Literaturverzeichnis 72
Danksagung 83
Lebenslauf 84

Abkürzungsverzeichnis

$[Ion]_a$	extrazelluläre Ionen-Konzentration
$[Ion]_i$	intrazelluläre Ionen-Konzentration
1-EBIO	1-Ethyl-2-benzimidazolinon
A	Ampere
A549	humane Lungenepithelzelllinie
Abb	Abbildung
AFC	Alveoläre Flüssigkeits-Clearance
AgCl	Silberchlorid
amil	ermittelter I_{SC} nach Amilorid-Gabe
ap	apikal
AQP	Aquaporin
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom des Erwachsenen
AT I-Zelle	Alveolarepithelzelle Typ I, Typ I Pneumozyt
AT II-Zelle	Alveolarepithelzelle Typ II, Typ II Pneumozyt
ATP	Adenosintriphosphat
base	ermittelter I_{SC} zu Beginn der Messung
BK	kalziumabhängiger Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit
bl	basolateral
c	Konzentration
Ca^{2+}	Kalzium-Ion
Calu-3	humane Lungenepithelzelllinie
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CF	zystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, Chloridkanal
Cl^-	Chlorid-Ion
CLZ	Chlorzoxazon
C_m	Kondensatoreigenschaft der Zellmembran
CO_2	Kohlendioxid
COOH	Carboxygruppe
d	Tag
DC-EBIO	5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DV	Differentialverstärker
E	Effekt
EC_{50}	Konzentration des halbmaximalen Effektes
E_{max}	maximaler Effekt
ENaC	epithelialer Natriumkanal
F	Faraday Konstante
FBS	fetal bovine serum, fetales Kälberserum
FDLE-Zellen	Fetale distale Lungenepithelzellen
g	Erdschwerebeschleunigung, Mittelwert g = 9,81 m/s^2
G	Leitfähigkeit
G_{ges}	Gesamtzellleitfähigkeit
G_{rel}	relative Leitfähigkeit
G_s	Einzelkanalleitfähigkeit
G_{te}	spezifische Gewebeleitfähigkeit des Epithels
h	Hill-Koeffizient
H441	humane Lungenepithelzelllinie
HBSS	Hank‘s Salzlösung
HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
i	Anzahl gleichzeitig geöffneter Kanäle
I	Strom
I_{amil}	Amilorid-sensitiver Kurzschlussstrom
I_{ampho}	Amphotericin B-induzierter Kurzschlussstrom
IK	kalziumabhängiger Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit
I_m	Strom über der Zellmembran
I_{ouab}	Ouabain-sensitiver Kurzschlussstrom
I_{SC}	Kurzschlussstrom (short-circuit current)
I_{tram}	Tram34-sensitiver Kurzschlussstrom
K^+	Kalium-Ion
K_2P	Kaliumkanalklasse mit 2 Porenregionen
K_{Ca}	Kalziumabhängiger Kaliumkanal

KCl	Kaliumchlorid
Hz	Hertz
K_{ir}	Kaliumkanalklasse der einwärts rektifizierenden K^+-Kanäle
KOH	Kaliumhydroxid/ Kalilauge
K_v	spannungsgesteuerter Kaliumkanal
l	Liter
Lsg	Lösung
M	Mol
max I_{SC}	ermittelter I_{SC} nach maximaler Dosis
MEM	Eagle`s minimum essential medium
mRNA	Boten- Ribonukleinsäure
N	Anzahl an Kanälen in einem Patch
n	Anzahl der Messwerte
Na^+	Natrium-Ion
Na^+, K^+-ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
NaOH	Natriumhydroxid/ Natronlauge
NH_2	Aminogruppe
n.s.	nicht signifikant
NKCC	Na^+-K^+-$2Cl^-$-Kotransporter
NP_o	Offenwahrscheinlichkeit im Patch
O_2	Sauerstoff
O	Oberfläche
OPV	Operationsverstärker
ouab	ermittelter I_{SC} nach Ouabain-Gabe
P	Kanalpore, Porenregion der Kaliumkanäle
P	Permeabilität
p	Passage
PKA	Protein Kinase A
P_o	Offenwahrscheinlichkeit
R	allgemeine Gaskonstante
RDS	Respiratory Distress Syndrom, Atemnotsyndrom
R_f	Rückkopplungswiderstand
RLZ	Riluzol

R_m	Widerstand der Zellmembran
R_p	Widerstand der Patchelektrode
R_{te}	spezifischer transepithelialer Widerstand
S	Siemens, SI-Einheit des elektrischen Leitwertes
s	Sekunde
SD	standard deviation, Standardabweichung
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes
SK	kalziumabhängiger Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit
Std	Stunde
T	Gesamtmessdauer
T	Temperatur in Kelvin
Tab	Tabelle
t_i	Gesamtdauer während der i Kanäle offen sind
TMD	Transmembrandomäne
U	Unit, Enzymeinheit
V	Potential, Spannung
V_{aus}	Ausgangspotential
V_{Ion}	Gleichgewichtspotential eines Ions
V_m	Membranpotential
Vol	Volumen
V_{soll}	Kommandopotential
V_{te}	Potentialdifferenz
$\bar{x}$	Mittelwert der Messwerte
x	Messwert
z	Anzahl der gezählten Zellen
z	Ladung eines Ions
Z_{ges}	Gesamtzahl der Zellen
Ω	Ohm, Einheit des Widerstandes

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Aktiver Natriumtransport (Na^+-Transport) über das respiratorische Epithel der distalen Lungenabschnitte, insbesondere die Bronchioli respiratorii, bis zu den Alveolen selbst ist entscheidend für die Resorption der intrapulmonalen Flüssigkeit. Dabei folgt Wasser dem osmotischen Gradienten, der durch den Ionentransport durch verschiedene Kanäle und Pumpen entsteht (Zemans und Matthay 2004). Zahlreiche Arbeiten haben gezeigt, dass die Überlebenswahrscheinlichkeit von Früh- und Neugeborenen sowie von Erwachsenen mit pathologischer pulmonaler Flüssigkeitsansammlung von diesem vektoriellen aktiven Na^+-Transport abhängt (Matalon und O'Brodovich 1999, Matthay et al. 2002). Bereits bei Geburt muss die fetale Lungenflüssigkeit möglichst schnell resorbiert werden, um den für die Atmung wichtigen Gasaustausch zu ermöglichen. Auch im späteren Leben müssen die Alveolarzellen die in geringem Maße nachsickernde oder bei Erkrankungen und Lungenschädigungen sich ansammelnde Lungenflüssigkeit resorbieren. In diesen Fällen muss die alveoläre Flüssigkeits-Clearance (AFC) erhöht werden. Hierfür stehen endogene Mechanismen bereit, die aber oftmals nicht ausreichend oder defekt sind. Deshalb ist es von großem Interesse, therapeutische Mittel und Wege zu finden, die AFC über die bekannten epithelialen Transportwege zu beeinflussen (Zemans und Matthay 2004).

1.2 Lungenepithel und alveolärer Ionentransport

Pränatal ist die fetale Lunge mit Flüssigkeit gefüllt, die sie selbst sezerniert, und damit eine wichtige Voraussetzung für Wachstum und Differenzierung des Organs schafft (Folkesson et al. 1998, Wauer et al. 2004). Der über intermittierenden Schluss der Stimmritze gesteigerte intrathorakale Druck hilft, die sich entwickelnden Lungenstrukturen offen zu halten (Helve et al. 2009, Vilos und Liggins 1982). Eine gesunde Lungenentwicklung des Feten ist somit auch abhängig von der Menge der Lungenflüssigkeit (Helve et al. 2009). Aus dem entodermalen Keimblatt entwickelt sich das einschichtige, das Lumen der Lunge auskleidende Epithel. Diese Epithelzellen haben eine äußere, apikale, dem Lumen zugewandte Seite und eine basale bzw. basolaterale, dem Interstitium zugewandte Seite (vgl. Abb 1). Die Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase (Na^+, K^+-ATPase) in der basolateralen Zellmembran der fetalen Lungenepithelzelle pumpt

unter Energieverbrauch Natriumionen aus und Kaliumionen in die Zelle. Durch den entstehenden elektrochemischen Na^+-Gradienten wird Chlorid (Cl^-) über den ebenfalls basolateral gelegenen Na^+-K^+-$2Cl^-$-Kotransporter (NKCC) in die Zelle transportiert. Über basolaterale K^+-Kanäle und die Na^+, K^+-ATPase verlassen K^+- und Na^+-Ionen die Zelle in Richtung Interstitium (Wauer et al. 2004). Dadurch kommt es intrazellulär zu einem Überschuss an negativen Ladungen, sodass Cl^- die Zelle über verschiedene apikale Chloridkanäle lumenwärts verlässt. Passiv folgen Na^+ und H_2O in das Lumen der fetalen Lunge (Krochmal et al. 1989, McCray, Jr. et al. 1992). Demnach ist die Flüssigkeitssekretion in die fetale Lunge abhängig von aktivem Chloridionentransport (McCray, Jr. et al. 1992, Wilson et al. 2007). Die Zusammensetzung der fetalen Lungenflüssigkeit unterscheidet sich deshalb von der des Fruchtwassers oder des Plasmas durch eine höhere Chloridkonzentration, niedrigere Eiweißkonzentration und niedrigeren pH-Wert (Helve et al. 2009, Nelson 1976, Wauer et al. 2004).

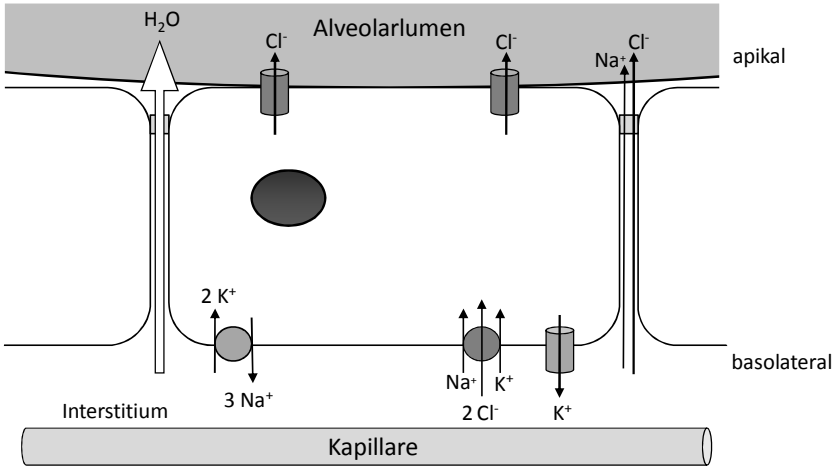

Abb 1 Schema der pränatalen Flüssigkeitssekretion einer fetalen Lungenepithelzelle.
Die Na^+, K^+-ATPase in der basolateralen Zellmembran pumpt Na^+ aus und K^+ in die Zelle. Cl^- wird über den Na^+-K^+-$2Cl^-$-Kotransporter (NKCC) in die Zelle transportiert. Über basolaterale K^+ -Kanäle verlassen K^+ und über die Na^+, K^+-ATPase verlassen Na^+ die Zelle in Richtung Interstitium. Dadurch kommt es intrazellulär zu einem Überschuss an negativen Ladungen, sodass Cl^- die Zelle über verschiedene apikale Chloridkanäle lumenwärts verlässt. Passiv folgen Na^+ und H_2O in das Lumen der fetalen Lunge. (Na^+: Natriumion, K^+: Kaliumion, Cl^-: Chloridion, H_2O: Wasser) (Wauer et al. 2004)

Perinatal bereiten das Surfactantsystem und die Resorption der Lungenflüssigkeit die Umstellung auf den pulmonalen Gasaustausch vor (O'Brodovich 1996). Bei reifen Neugeborenen kommt es außerdem noch vor Geburt zu einer deutlich reduzierten Flüssigkeitssekretion in die Lunge (Helve et al. 2009, Pfister et al. 2001). Des Weiteren lassen sich sonographisch in utero bereits fetale Atembewegungen nachweisen. Ab der

36. Schwangerschaftswoche zeigen sich dann veränderte Atembewegungen, die zusätzlich einen Abfall der Lungenflüssigkeitsmenge bewirken (Kalache 2000, Kalache et al. 2002). Auch die Epithelzellen der Lunge differenzieren sich noch während der fetalen Entwicklung zu Alveolarepithel Typ I- und Typ II-Zellen (AT I- und AT II-Zellen), auch Pneumozyten Typ I / II genannt. AT II-Zellen haben dabei die entscheidende Aufgabe der pulmonalen Flüssigkeitsresorption.

Kurz vor dem errechneten Entbindungstermin steigt in den AT II-Zellen die Expression der apikalen epithelialen Natriumkanäle (ENaC) und der basolateralen Na^+, K^+-ATPase an (Smith et al. 2000). Fetale Katecholaminausschüttung unter der Geburt aktiviert über $ß_2$-Adrenozeptoren die ENaC und die Na^+, K^+-ATPase, wodurch das reife Alveolarepithel von Cl^--Sekretion auf nunmehr Na^+-Resorption umstellen kann (Folkesson et al. 1998, O'Brodovich 1996). Dadurch werden die osmotischen Gradienten umgekehrt und Flüssigkeit fortan vom Alveolarraum in das Interstitium transportiert.

In der reifen Lunge wird das Alveolarepithel von dünnen, plattenartigen AT I- und kubischen AT II- Zellen gebildet (Albertine und Staub 1988, Crandall und Matthay 2001). Diese sind über tight junctions im apikalen Bereich nahezu dicht miteinander verbunden, wodurch die Polarität der Epithelzellen erhalten bleibt. Tight junctions regulieren zusätzlich die parazelluläre Permeabilität und sind ein wichtiger Bestandteil der alveolären Epithelbarriere (Koval 2009, Schneeberger und Lynch 2004). Alveolarepithel und Kapillarendothel werden nur durch einen dünnen interstitiellen Spalt getrennt. Dies begünstigt den Gasaustausch, verhindert aber gleichzeitig ein Eintreten von Flüssigkeit und Proteinen in den Alveolarraum. Die dünnen AT I-Zellen ermöglichen besonders den Gasaustausch, ihnen wird aber immer mehr ein Mitwirken am aktiven Flüssigkeitstransport zugesprochen (Borok et al. 2002, Dobbs et al. 1998, Herzog et al. 2008, Johnson et al. 2002). Zusätzlich sind auch in geringem Maße Epithelzellen der distalen Atemwege an der Na^+- und Wasserresorption in der Lunge beteiligt (Bardou et al. 2009, Matthay et al. 2002, Van Scott et al. 1989). Allerdings muss in den distalen Atemwegen eine Balance zwischen Na^+-Absorption und Cl^--Sekretion gegeben sein. Ein entsprechendes periziliäres Flüssigkeitsvolumen und eine Mukusschicht sind unerlässlich für eine Zilien- und Abwehrfunktion (Bardou et al. 2009, Boucher 2003, Chilvers und O'Callaghan 2000). In sekretorischen Zellen wird Chlorid über basolaterale NKCC oder K^+-Cl^--Kotransporter in die Zelle transportiert und gelangt apikal über Cl^--Kanäle, wie den Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), ins Lumen (Bardou et al. 2009). Mehr

als 99% der zum Gasaustausch und Flüssigkeitsresorption fähigen Lungenoberfläche wird von den alveolären AT I- und AT II-Zellen ausgekleidet, allerdings nur 5% der Oberfläche von AT II-Zellen (Herzog et al. 2008, Johnson et al. 2002). Aufgaben der AT II-Zellen sind die Surfactantproduktion zur Reduzierung der Oberflächenspannung in den Alveolen, immunologische Funktionen und Proliferation bei Zellschäden, um die ausdifferenzierten AT I-Zellen zu ersetzen (Andreeva et al. 2007, Bardou et al. 2009, Crandall und Matthay 2001, Herzog et al. 2008). Ihre Hauptaufgabe liegt aber im aktiven Na^+-Transport entlang des Alveolarepithels, worüber die AFC geregelt wird (Matthay et al. 2002).

Postnatal kommt es nun zu einer raschen Resorption der verbliebenen alveolären Flüssigkeit durch das Alveolarepithel. Na^+-Ionen gelangen passiv, zum größten Teil über apikale ENaC, in die Zelle (vgl. Abb 2). Die Na^+, K^+-ATPase transportiert die Na^+-Ionen aktiv über die basolaterale Membran aus der Zelle (Bardou et al. 2009). Aufgrund dieser Transportvorgänge von Ionen kommt es zu einer transepithelialen, lumennegativen Potentialdifferenz. Wasser und Cl^- folgen dem osmotischen und elektrischen Gradienten vom Alveolarlumen parazellulär ins Interstitium und werden über Blut- und Lymphgefäße abtransportiert (Matalon und O'Brodovich 1999, Matthay et al. 2002).

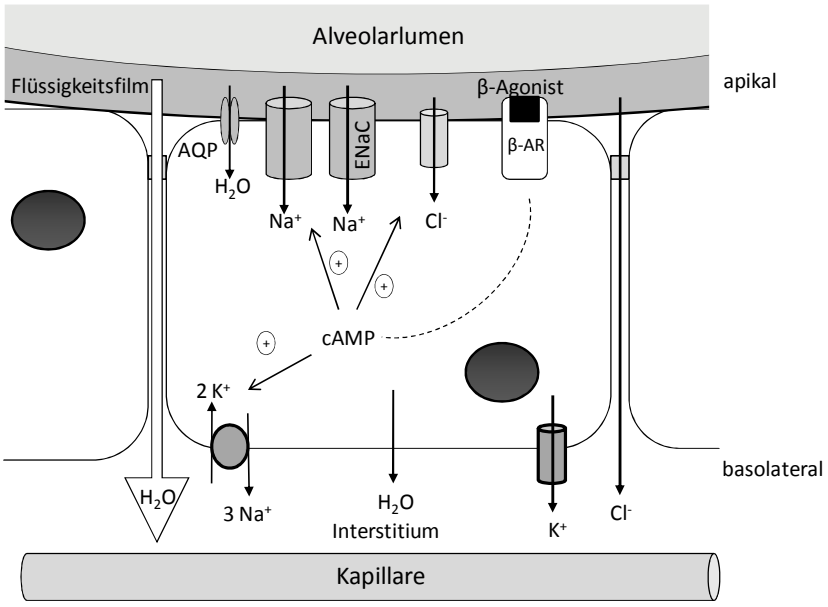

Abb 2 Schema der postnatalen Flüssigkeitsresorption einer Alveolarepithelzelle Typ II.

Die Na^+, K^+-ATPase in der basolateralen Zellmembran pumpt Na^+ aus und K^+ in die Zelle. Über apikale Na^+-Kanäle (hauptsächlich Amilorid-sensitive epitheliale Na^+-Kanäle) gelangt Na^+ in die Zelle. Wasser folgt parazellulär und über Aquaporine vom Alveolarlumen in Richtung Interstitium. Stimulierung von beta-Adrenozeptoren durch Katecholamine (β-Agonist) führt über den cAMP–Signalweg zu einer Cl^--Resorption apikal.

(Na^+: Natriumion, K^+: Kaliumion, Cl^-: Chloridion, H_2O: Wasser; AQP: Aquaporin; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; ENaC: Amilorid-sensitiver epithelialer Na^+-Kanal; β-AR: β-Adrenozeptor) (Wauer et al. 2004; Bardou et al. 2009)

Der Wassertransport wird zusätzlich über Aquaporine (AQP) erleichtert, diese sind aber für eine maximale AFC bei Neugeborenen von untergeordneter Bedeutung (Crandall und Matthay 2001, Matthay et al. 2002, Sartori und Matthay 2002, Song et al. 2000, Zemans und Matthay 2004). Die AFC wird folglich hauptsächlich von einem Na^+-Gradienten angetrieben. Um das über die Na^+, K^+-ATPase in die Zelle transportierte K^+ zu recyceln, gelangt es durch basolateral gelegene K^+-Kanäle wieder ins Interstitium. Damit wird eine intrazelluläre Anreicherung von K^+ verhindert. Es kommen verschiedene Kaliumkanäle im Alveolarepithel vor. Ihre Hauptfunktion jedoch besteht in der Kontrolle des Membranpotentials, um einen elektrochemischen Gradienten für den Ion- und Flüssigkeitstransport aufrechtzuerhalten (Bardou et al. 2009, Wilson et al. 2006). Zusätzlich zu dem von Na^+-Ionen angetriebenen Flüssigkeitstransport, spielt auch die Cl^--Resorption über CFTR und andere Cl^--Kanäle unter bestimmten Voraussetzungen eine Rolle (Zemans und Matthay 2004). Dazu gehört die durch β-Rezeptoren über cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) vermittelte Stimulierung der CFTR, des ENaC und der Na^+, K^+-ATPase (Matthay et al. 2002, Mutlu et al. 2004). Allerdings ist die Cl^--Resorption für die basale AFC nicht ausschlaggebend, da weder bei CFTR-knockout-Mäusen noch bei Neugeborenen mit zystischer Fibrose (CF) eine postnatale Atemstörung auftritt (Fang et al. 2002, Jiang et al. 1998, Matthay et al. 2002, Wauer et al. 2004).

1.2.1 Amilorid-sensitiver epithelialer Natriumkanal (ENaC)

Apikale Natriumkanäle finden sich in Epithelien verschiedener Organe. Der ENaC ist vor allem für Na^+-Ionen durchlässig und kann mit Amilorid, ein Diuretikum, blockiert werden (O'Brodovich et al. 1990a). In den Atemwegen ist er in Zusammenarbeit mit der Na^+, K^+-ATPase ein wichtiger Transportweg für Na^+-Ionen durch die Epithelzellen und ein bedeutender Angriffspunkt für regulative Einflüsse. In Alveolarzellen konnte mRNA der drei homologen α-, β- und γ-Untereinheiten nachgewiesen werden, wobei für maximale Kanalaktivität alle drei als Einheit nötig sind (Bhalla und Hallows 2008, Helve et al. 2009, Matalon und O'Brodovich 1999, Smith et al. 2000). Hummler et al. untersuchten Mäuse mit fehlender essentieller α-Untereinheit (α-ENaC-Knockout-mice). Sie beobachteten, dass die Tiere postpartal innerhalb von 40 Std. an respiratorischer Insuffizienz starben, da sie die fetale Lungenflüssigkeit nicht resorbieren konnten. Fehlt dagegen eine der beiden anderen Untereinheiten, ist die Flüssigkeitsresorption lediglich verlangsamt im Vergleich zu gesunden Mäusen (Wildtyp). Jene Mäuse starben allerdings später aufgrund anormaler

renaler Elektrolytresorption (Hummler et al. 1996). In Studien konnte in Epithelzellen mRNA von allen drei Untereinheiten nachgewiesen werden, allgemein mit stärkerer Expression der α- als der β- und γ-Untereinheit (Crandall und Matthay 2001, Folkesson und Matthay 2006). Bei reifen Neugeborenen zeigt sich ein Anstieg der AFC in den ersten zwei Lebenstagen. Noch vor dem Geburtstermin kommt es zu verstärkter ENaC Expression. Allerdings nimmt innerhalb der ersten Stunden postpartal die Expression der β- und γ-ENaC-Untereinheit ab. Es lässt also vermuten, dass auch andere Transportmechanismen für Na^+-Ionen außer über ENaC in der reifen Lunge zur AFC beitragen (Helve et al. 2006). Dies ist auch vereinbar mit der Beobachtung bei Patienten mit α-ENaC Mutationen, die zum Pseudohypoaldosteronismus führen. Hier zeigten sich erst einige Wochen nach der Geburt respiratorische Anpassungsstörungen (Klemme 2009, Smith et al. 2000). In humanen Alveolarepithelzellen hemmt Amilorid höchstens 50% der basalen AFC, vergleichbar mit den Versuchen an Rattenepithelzellen. Verschiedene andere Kationenkanäle konnten nachgewiesen werden, wobei auch ein nicht-selektiver Kationenkanal durch Amilorid hemmbar ist (Matalon und O'Brodovich 1999, Sartori und Matthay 2002). Matalon et al. konnten in fetalen distalen Lungenepithelzellen (FDLE) Na^+-Kanäle mit starker und schwacher Affinität zu Amilorid nachweisen (Matalon et al. 1993). Es gibt folglich verschiedene Amilorid-sensitive, Na^+ durchgängige Kanäle, die zur Familie der ENaC gezählt werden. Wenigstens ein Teil der Unterschiede der Na^+-Kanäle beruht auf verschiedenen Kombinationen der α-, β- und γ-Untereinheiten, wodurch Kanäle mit unterschiedlichen biophysiologischen Eigenschaften und Regulations-mechanismen entstehen. Ein reiner α-ENaC-Kanal zeigt sich als nicht-selektiver Kationenkanal mit einer annähernd identischen Selektivität für Na^+- und K^+-Ionen und einer Leitfähigkeit von 21-28 pS. Ist der ENaC jedoch aus allen drei Untereinheiten zusammengesetzt, hat er eine Leitfähigkeit von 4-6 pS und ist hochselektiv für Na^+ gegenüber K^+ mit einem Wert > 40. Die Na^+/ K^+-Selektivität ergibt sich aus dem Quotienten von Na^+- zu K^+-Permeabilität (P_{Na+}/ P_{K+}) bestimmt aus dem Umkehrpotential von Einzelkanalströmen (Eaton et al. 2004).

1.2.2 Natrium, Kalium-Adenosintriphosphatase (Na^+, K^+-ATPase)

Die Na^+, K^+-ATPase ist ein ubiquitär in Zellmembranen vorkommender Ionentransporter. Entgegen dem Konzentrationsgradienten transportiert sie unter ATP-Verbrauch je drei Na^+-Ionen aus der Zelle und zwei K^+-Ionen in die Zelle, wodurch ein

hyperpolarisierender Strom entsteht. Durch selektive Expression in der basolateralen Membran entsteht der gerichtete Na^+-Transport als Grundlage der AFC. In AT II–Zellen wird die heterodimere Form dieses Enzyms von einer α_1- und β_1-Untereinheit gebildet, wobei beide für die Funktion der Na^+, K^+-ATPase notwendig sind. An der α–Untereinheit wird ATP unter Energieabgabe gespalten, die β–Untereinheit ist kleiner und sichert die Anordnung und Lage des Proteins in der Membran (Mutlu und Sznajder 2005). Ein spezifischer Inhibitor der Na^+, K^+-ATPase ist Ouabain (g-Strophanthin). Auch ein K^+-freies Medium auf der basolateralen Seite der Zellen hemmt die Na^+, K^+-ATPase aufgrund des Substratmangels.

1.2.3 Kaliumkanäle

K^+-Kanäle werden in fast allen Zellen exprimiert, weshalb es nicht verwundert, dass sie essentiell für viele Zellfunktionen sind (Kurachi et al. 1999). Im Vergleich aber zu anderen Ionenkanalfamilien zeigen die K^+-Kanäle eine hohe Vielfältigkeit, und jede Zellart weist eine eigene Kanalzusammensetzung auf. Kaliumkanäle übernehmen die Aufgabe, das Membranpotential und damit zusammen mit der Na^+, K^+-ATPase den elektrochemischen Gradienten für den gerichteten Ionentransport aufrecht zu erhalten (Bardou et al. 2009). In elektrisch erregbaren Zellen beispielsweise führt der Kaliumausstrom während des Aktionspotentials zur Repolarisation der Membran und legt die Zeit zwischen den Aktionspotentialen fest. Sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen können K^+-Kanäle z.B. durch Spannung, Kalzium, G-Protein, ATP oder sogar mechanisch aktiviert werden (Hille 2001).

Allgemein werden Kaliumkanäle anhand ihrer porenbildenden α-Untereinheiten und der jeweiligen Anzahl an Transmembrandomänen (TMD) in drei Hauptklassen eingeteilt (vgl. Abb 3). Bisher wurden über 30 verschiedene K^+-Kanäle im respiratorischen Epithel der Lunge nachgewiesen (Bardou et al. 2009), auf die Beschreibung anderer K^+-Kanäle soll hier verzichtet werden.

- Die erste Klasse bildet die K^+-Kanal-Superfamilie der spannungs- (K_v) und Ca^{2+}-gesteuerten (K_{Ca}) – Kaliumkanäle.

  K_v–Kanäle bilden eine große K^+-Kanal–Familie, wovon einige in Lungenepithelzellen nachgewiesen werden konnten. Sie übernehmen Aufgaben der epithelialen Reaktion auf Hypoxie und der Epithelregeneration. Der basolaterale

K_v7.1 (K_vLQT1) ist an der Kontrolle des alveolären Cl^-- und Na^+-Transportes und somit an der Kontrolle von Volumen und Zusammensetzung der alveolären und die Atemwegsoberfläche bedeckenden Flüssigkeit beteiligt (Bardou et al. 2009). Auf die K_{Ca} wird weiter unten genauer eingegangen. K_v und K_{Ca} haben einen ähnlichen Aufbau der α-Untereinheit mit sechs Transmembran-Helices (S1-S6) mit zytoplasmatischen NH_2- und COOH–Termini. Der K^+-Kanal als Tetramer setzt sich aus vier α-Untereinheiten zusammen. Die Kanalpore (*P*) wird von den TMD S5 und S6 mit einer dazwischenliegenden „*P*-Schleife" gebildet. Diese sog. *P*-Domäne bestimmt auch die hohe Selektivität des Kanals für K^+-Ionen (Bildl 2003, Ledoux et al. 2006, Yellen 2002).

- In der zweiten Klasse haben die K^+-Kanäle vier TMD und zwei Poren (K_2P). In den humanen Lungenepithelzelllinien H441 und Calu-3 wurden einige Kanäle dieser Familie apikal nachgewiesen. Man vermutet, dass sie bei der epithelialen Reaktion auf Hypoxie beteiligt sind (Bardou et al. 2009).
- Die dritte Klasse bilden die einwärts rektifizierenden K^+-Kanäle (K_{ir}) mit 2 TMD. Hier wurden ATP–sensitive K^+-Kanäle (K_{ATP}) in der basolateralen Membran des Lungenepithels nachgewiesen (Bardou et al. 2009). Sakuma et al. und Leroy et al. konnten zeigen, dass eine Aktivierung von K_{ATP} die AFC erhöht (Leroy et al. 2004, Sakuma et al. 1998).

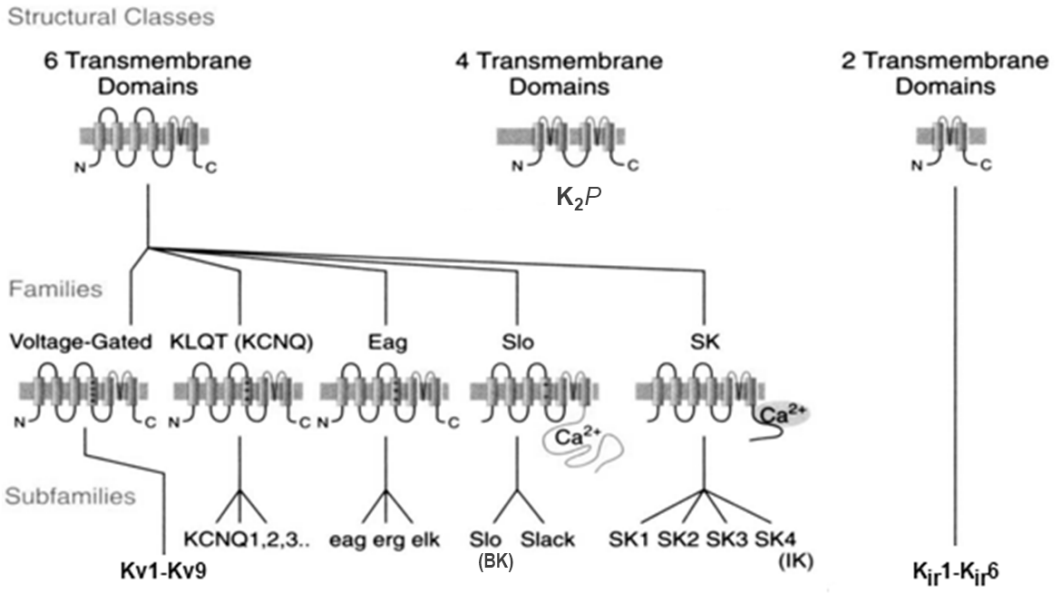

Abb 3 Einteilung der Kaliumkanäle (K^+-Kanäle) in Klassen, Familien und Unterfamilien (modifiziert nach Gottschalk 2010)
K^+-Kanäle werden anhand der Anzahl ihrer Transmembrandomänen (TMD) in drei Hauptklassen eingeteilt. Wichtig ist die Aufteilung der Klasse mit 6 TMD in weitere Familien, insbesondere die der SK-Kanäle.
SK/ IK: Kalziumabhängiger K^+-Kanal mit geringer/ mittlerer Leitfähigkeit.

K_{Ca} sind K^+-Kanäle, die durch Veränderung der zytosolischen Ca^{2+}-Konzentration aktiviert werden. Sie werden anhand ihrer Einzelkanalleitfähigkeit weiter in SK-, IK- und BK- Kanäle eingeteilt. BK-Kanäle (large conductance, MaxiK oder slo Kanäle) haben eine hohe Einzelkanalleitfähigkeit > 100 pS, sind spannungsabhängig und benötigen eine höhere Ca^{2+}-Konzentration, um bei Hyperpolarisation der Zelle aktiviert zu werden. Sie werden auch zur Unterfamilie der spannungsabhängigen Ionenkanäle gerechnet.

SK/IK-Kanäle (small conductance/ intermediate conductance Kanäle) bilden eine eigene spannungsunabhängige K^+-Kanal-Unterfamilie. Sie kommen sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen vor (Wallner et al. 1999, Wei et al. 2005). Durch ihre hohe Ca^{2+}-Sensitivität öffnen sie bei submikromolaren intrazellulären Ca^{2+}-Konzentrationen $[Ca^{2+}]_i$ < 1,0 µM (Bildl 2003, Hirschberg et al. 1998, Vergara et al. 1998, Wei et al. 2005). Allerdings ist kein Ca^{2+}-Bindungsmotiv in der α-Untereinheit zu finden. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass Calmodulin (CaM), ein Ca^{2+}-Bindungsprotein, konstitutiv am COOH–Terminus der α-Untereinheit gebunden ist. Bindet Ca^{2+} an CaM, führt dies zu einer Konformationsänderung im Kanal und nachfolgend zur Öffnung der Kanalpore. CaM dient somit als Ca^{2+}-Sensor. Durch diesen CaM abhängigen Aktivierungsmechanismus erhält der Kanal die eigentliche hohe Sensitivität gegenüber $[Ca^{2+}]_i$ (Bildl 2003, Joiner et al. 2001, Ledoux et al. 2006, Wei et al. 2005). Small conductance Ca^{2+}-aktivierte K^+-Kanäle zeigen eine niedrige Einzelkanalleitfähigkeit < 20 pS. Dazu gehören die mittels Klonierung identifizierten SK1, SK2 und SK3 (Bildl 2003, Kohler et al. 1996). Weitere verwendete Namen sind $SK_{Ca}1$, $SK_{Ca}2$ und $SK_{Ca}3$, sowie nach der Nomenklatur der „International Union of Pharmacology“ werden diese auch $K_{Ca}2.1$, $K_{Ca}2.2$ und $K_{Ca}2.3$ benannt (Wei et al. 2005). (s. Tab1). Diese drei SK Kanäle lassen sich konzentrationsabhängig mit Apamin blocken, wodurch sie untereinander aber auch von anderen K^+-Kanälen unterschieden werden können (Grunnet et al. 2001, Wei et al. 2005). IK-Kanäle mit einer mittleren Einzelkanalleitfähigkeit von ca. 20-50 pS (Bildl 2003) werden auch als $IK_{Ca}1$, SK4, Gardos Kanal oder $K_{Ca}3.1$ bezeichnet (Gutman et al. 2011, Ledoux et al. 2006, Wei et al. 2005). Sie sind in der basolateralen Membran der Zellen lokalisiert. Im Gegensatz zu den SK Kanälen sind sie nicht durch das Bienengift Apamin blockierbar. Von den BK Kanälen unterscheiden sie sich durch ihre Insensitivität gegenüber dem Blocker Iberiotoxin, sind aber durch Clotrimazol blockierbar (Ledoux et al. 2006). Eine Übersicht über Aktivatoren und Blocker der SK- und IK- Kanäle gibt Tab 1.

Tab 1 Eigenschaften der kalziumabhängigen Kaliumkanäle
SK: kalziumabhängiger Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit; IK: kalziumabhängiger Kaliumkanal mit mittlerer Leitfähigkeit, Ca: Kalzium 1-EBIO: 1-Ethyl-2-benzimidazolinone; DC-EBIO: 5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one; TEA+: Tetraethylammonium-Ion; TRAM34: 1-[(2-chlorophenyl)dipenylmethyl]-1H-pyrazol; HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee. (Ledoux et al. 2006; Wei et al. 2005)

	SK1-3	**IK**
Weitere Namen	SKCa1, SKCa2, SKCa3 KCa2.1, KCa2.2, KCa2.3	IKCa1, SK4, KCa3.1
Untereinheiten (Anzahl)	Porenbildend (4) Calmodulin-bindend (4)	Porenbildend (4) Calmodulin-bindend (4)
Gene (HGNC Bezeichnung)	KCNN1 (SK1), KCNN2 (SK2), KCNN3 (SK3)	KCNN4
Kalzium-sensitiv	Ja	Ja
Spannungsabhängig	Nein	Nein
Aktivatoren	Riluzol 1-EBIO/ DC-EBIO NS309 Chlorzoxazon	Riluzol 1-EBIO/ DC-EBIO NS309 Chlorzoxazon
Blocker	Apamin UCL 1684 Scyllatoxin TEA+	Charybdotoxin Tram34 Clotrimazol TEA+

In der Lunge haben die Epithelzellen die wichtige Funktion die Verteilung der Ionen und der Flüssigkeitsmenge an der Oberfläche der Luftwege und Alveolen zu kontrollieren (Bardou et al. 2009). Basolaterale Kaliumkanäle übernehmen die Aufgabe, das Membranpotential entgegen der depolarisierenden Wirkung des Na^+-Einstromes oder Cl^--Ausstromes zu stabilisieren (Wilson et al. 2006). Dadurch kontrollieren sie die Kraft, die den apikalen Na^+-Einstrom in die Zelle antreibt. Diese Aussage wird durch Studien gestützt, in denen gezeigt werden konnte, dass in umgekehrter Weise K^+-Kanal-Blocker die Na^+-Resorption (Leroy et al. 2004) und die Cl^--Sekretion (Devor et al. 1997) über die apikale Membran vermindern. Eine K^+-Kanal-Aktivierung durch Aktivatoren der SK-und IK-Kanäle konnte die Cl^--Sekretion über CFTR und/ oder Ca^{2+}-aktivierte Cl^--Kanäle in nicht CF-Zellen erhöhen (Bardou et al. 2009, Singh et al. 2000, Singh et al. 2001).

1.3 Regulation der alveolären Flüssigkeits-Clearance

Die Regulation der AFC wird zu einem Teil von Katecholaminen bestimmt. Katecholamine führen bereits bei Geburt zu einer verstärkten Expression des ENaC und der Na^+, K^+-ATPase, was eine möglichst schnelle Resorption der fetalen Lungenflüssigkeit unterstützt. Es erklärt aber auch, dass die Wirkung von β–Mimetika bei Frühgeborenen geringer als bei zum Termin entbundenen Kindern ist (Wauer et al. 2004).

β_1- und β_2-Rezeptoren konnten auch in vivo in Alveolarepithelzellen nachgewiesen werden (Folkesson und Matthay 2006, Mutlu und Sznajder 2005). Sowohl endogene, körpereigene, als auch exogene, von außen zugeführte, Katecholamine stimulieren die AFC über Aktivierung von β–Rezeptoren. Durch die β–Rezeptor-Aktivierung kommt es über cAMP zu einer verstärkten Regulierung von ENaC, Cl^--Kanal und Na^+, K^+-ATPase. Allerdings wurde beobachtet, dass bei längerer Therapie mit β-Mimetika der Na^+-Transport beeinträchtigt war oder es sogar zu einer Abnahme der β–Rezeptoren kam (Mutlu und Sznajder 2005). Neben einer Therapie mit β-Mimetika (Perkins et al. 2006) gibt es jedoch bisher keine Möglichkeit, den gerichteten epithelialen Na^+-Transport medikamentös zu beeinflussen.

Verschiedene Katecholamin-unabhängige Regulationsmechanismen der AFC sind bekannt, wie Wachstumsfaktoren und Dopamin (Folkesson und Matthay 2006, Mutlu und Sznajder 2005). Glukokortikoide und Schilddrüsenhormone führen perinatal ebenfalls zu erhöhter Expression des ENaC und der Na^+, K^+-ATPase in AT II -Zellen (Wauer et al. 2004).

Negative Auswirkungen auf die AFC hat neben dem atrialen natriuretischen Peptid und verschiedenen Anästhetika ein verminderter Sauerstoffgehalt der Lunge. Bei Hypoxie (0-3% O_2) kann eine Verminderung des Amilorid-sensitiven Na^+-Stromes und der Aktivität der Na^+, K^+-ATPase beobachtet werden (Matthay et al. 2002, Planes et al. 1996).

Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass Änderungen des hydrostatischen oder des osmotischen Drucks keine deutliche Zunahme der Flüssigkeitsresorption über Lungenepithelzellen bewirken (Matthay et al. 1996).

1.4 Pathophysiologie

Bisher konnte vielfach gezeigt werden, dass bei verschiedenen schweren Lungenerkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter die Überlebenswahrscheinlichkeit vom epithelialen Na^+-Transport abhängt. Dabei spielt die Aktivität des ENaC eine wichtige Rolle (Hummler und Planes 2010).

Bei Frühgeborenen führt eine geringere Expression oder Aktivität der ENaC und der Na^+, K^+-ATPase zu verzögerter Flüssigkeitsresorption aus der Lunge (Barker et al. 1997, Helve et al. 2004). Folglich wird der Gasaustausch durch die größere sich noch in den Alveolen befindende Flüssigkeitsmenge erschwert, da Sauerstoff und Kohlendioxid über eine größere Strecke diffundieren müssen (Winkler 2006). Dies führt, zusammen mit dem

gleichzeitig bestehenden Surfactantmangel, zum Atemnotsyndrom des Neugeborenen (Respiratory Distress Syndrom, RDS) (Helve et al. 2009, Hummler et al. 1996, O'Brodovich 1996). Die ENaC Aktivität, klinisch auch messbar über die Nasenpotentialdifferenz, ist somit abhängig vom Gestationsalter (Barker et al. 1997, Helve et al. 2009). Bei reifen Neugeborenen mit transitorischer Tachypnoe lässt sich ebenfalls eine verminderte ENaC Aktivität nachweisen (O'Brodovich 1996).

Zur Vermeidung eines Lungenödems ist die alveoläre Flüssigkeitsresorption entscheidend, die hauptsächlich über den aktiven gerichteten Na^+-Transport reguliert wird (Hummler et al. 1996, Matthay et al. 2002, O'Brodovich 2005, Ware und Matthay 2001). Patienten, die unter dem akuten Atemnotsyndrom des Erwachsenen (ARDS) leiden, haben umso bessere Überlebenschancen, je höher ihre maximale alveoläre Flüssigkeitsresorption ist (Guidot et al. 2006, Ware und Matthay 2001).

1.5 Fragestellungen

Pathologische Flüssigkeitsansammlung und gleichzeitig verminderte Flüssigkeits-resorption aus dem alveolären Raum tragen bei verschiedenen Erkrankungen zum Krankheitsgeschehen bei. Außer der Therapie mit β–Mimetika gibt es bisher jedoch keine weiteren medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten, um die AFC zu steigern (Perkins et al. 2006).

Eine weitere Möglichkeit, die AFC zu beeinflussen, ist eine Aktivierung der beschriebenen basolateralen K_{Ca}-Kanäle. Dadurch würde es zu einer Hyperpolarisation des Zellinneren und somit konsekutiv zu einer Erhöhung des vektoriellen Na^+-Transportes und damit auch der AFC kommen.

In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die als SK- und IK-Aktivatoren bekannten Benzimidazolone 1-Ethyl-2-benzimidazolinone (1-EBIO), 5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one (DC-EBIO) und das Benzimidazolonderivat Chlorzoxazon die transepitheliale Na^+-Absorption in CF-Epithelien (Gao et al. 2001, Singh et al. 2001) und die Cl^--Sekretion in von Darmepithelien abgeleiteten T84 Tumorzellen (Singh et al. 2001) erhöhen. Über eine entsprechende Erhöhung der AFC in primär kultivierten fetalen Alveolarzellen (FDLE) liegen noch keine Daten vor. Unter der Arbeitshypothese, dass eine Aktivierung von K^+-Kanälen auch bei primär kultivierten FDLE den vektoriellen Na^+-Transport steigert, begannen die

Untersuchungen. Das Benzimidazolonderivat Riluzol, ebenfalls ein SK- und IK-Aktivator, wurde mit einbezogen (Cao et al. 2002).

In anfänglichen Kontrollexperimenten konnte entsprechend der Hypothese eine Erhöhung der AFC durch Benzimidazolone beobachtet werden. Allerdings zeigte sich bereits hier, dass diese Effekte unabhängig von einer K^+-Kanal-Aktivierung zustande gekommen waren.

Diese Behauptung wurde durch weitere Experimente gestützt, in denen untersucht wurde, ob an der Erhöhung der AFC hauptsächlich die basolaterale oder die apikale Membran der FDLE-Zellen beteiligt war. Dabei zeigte sich eine Erhöhung des apikalen Amilorid-sensitiven Natriumstromes durch Benzimidazolone. Weitere Experimente zur Untersuchung dieser überraschenden Beobachtung führten zu dem erstmaligen Nachweis einer direkten Stimulation des ENaC. Diese hochinteressante neue Wirkung wurde aufgrund ihrer großen potenziellen Bedeutung der Schwerpunkt dieser Arbeit.

Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde die Benzimidazolonwirkung direkt an apikalen ENaC von A549-Zellen in Patch-clamp-Messungen untersucht.

Die im Rahmen dieser Studie getesteten Substanzen 1-EBIO, DC-EBIO, Chlorzoxazon und Riluzol werden in dieser Arbeit unter dem international üblichen Begriff Benzimidazolone zusammengefasst.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die Ussing-Kammer Experimente wurden trächtige Sprague-Dawley-Ratten (Charles River) auf den 19. Gestationstag bestellt. Für die Entnahme der Feten zur Kultivierung von AT II-Zellen wurden die Ratten getötet. Diese Versuche sind anzeigepflichtig und eine entsprechende Meldung beim Regierungspräsidium Baden-Württemberg lag vor.

2.1.2 A549-Zellen

Für Patch-clamp Messungen wurden A549-Zellen verwendet. Die Zelllinie A549 stammt von einem humanen Adeno-Karzinom der Lunge. A549-Zellen weisen die meisten Eigenschaften der AT II-Zellen auf (Lieber et al. 1976). Im Gegensatz zur aufwendige Isolierung und Kultivierung von AT II-Zellen sind diese leichter zu kultivieren. Lazrak et al. konnten zeigen, dass A549-Zellen Amilorid-sensitive Na^+-Kanäle mit den gleichen biophysikalischen Eigenschaften wie AT II-Zellen aufweisen (Lazrak et al. 2000a).

Die Zellen wurden in Passage 81 von der American Type Culture Collection (ATCC, USA) bezogen, Zellkulturnummer CCL 185.

2.1.3 Verbrauchsmaterial und Geräte

- Steriles Präparierbesteck (Schere, Skalpell, Pinzetten)
- Sterile Petrischalen aus Glas und Kunststoff (Sarstedt), Ø 40 mm und Ø 100 mm
- Sterile Einwegkanülen und -spritzen
- Sicherheitswerkbank Klasse II (Heräus)
- Sterile Rasierklingen
- Elektrische Waage (Sartorius)
- Tischzentrifuge mit Kühlung (Eppendorf 5417R)
- Magnetrührer mit Heizplatte (Bibby), Wasserbad
- Rüttler (Heidolph, Bioblock Scientific)
- Sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen und Micro Tubes (Sarstedt)

- Sterile Pipetten (Costar), sterile Pasteurpipetten
- Pipettierhilfe (Eppendorf), elektrische Pipettierhilfe (Hirschmann)
- Zentrifuge Labofuge 400e (Heräus)
- Steriler Erlenmeyerkolben mit Magnetstab
- Vakuum Gaspumpe (VWR)
- Incubator shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc.)
- Steriler Nylonfilter 100µm (Millipore, No NY1H)
- Brutschrank/ CO_2 Inkubator (Heräus)
- Hämozytometer, Neubauer-Zählkammer
- Stereomikroskop (Zeiss)
- Zellkulturflaschen (Greiner bio-one)
- Sterile 6-Well-Zellkulturplatten mit abnehmbaren Einsätzen für Ussing-Kammern (Costar® 12mm Snapwell™ Insert, No 3407)
- EVOM Epithelial Voltohmmeter (World Precision Instruments Ltd)
- Sterile Zentrifugenröhrchen 50ml, Kryoröhrchen (Sarstedt)
- Mikroskop (Leitz)
- Zellkulturflaschen mit Filter-Schraubverschluss und 75 cm^2 Wachstumsfläche (Greiner bio-one)
- Zellschaber
- Ethanol 70 %
- Poly-L-Lysin (Sigma)
- Ringe aus Kunststoff
- Deckgläser aus Kunststoff
- Cryo-Einfriergerät
- Tiefkühlschrank (-80 °C)
- Behälter mit flüssigem Stickstoff (-176 °C)
- pH-Meter CG 822 (Schott Geräte)

2.1.4 Medien und Lösungen zur Primärkultur von AT II-Zellen

- Ketamin/ Xylazin: Mischung aus 0,9 ml Ketaminhydrochlorid und 0,1 ml Xylazin (Ketamin 10 %, WDT und Rompun 2 %, Bayer), zur Analgesie und Anästhesie
- HBSS-1: Hank‘s Salzlösung, ohne Ca^{2+} und Magnesium (Mg^{2+}) (Gibco/Invitrogen)

- Trypsin-Stock-Lsg: Trypsin 2,5 % (25095, Invitrogen) in 20 ml sterilem H_2O gelöst, anschließend steril filtriert und Aliquots zu 1,5 ml bei -20 °C gelagert.
- DNase-Stock-Lsg: 7 mg Desoxyribonuklease (DNase, 2350 U/ mg, D-5025 Sigma) in 3,5 ml sterilem H_2O gelöst, anschließend steril filtriert und Aliquots zu 400 µl bei -20 °C gelagert.
- Kollagenase-Stock-Lsg: 0,1 g Kollagenase (125 U/ mg, C-0130 Sigma) in 10 ml sterilem H_2O gelöst, steril filtriert und Aliquots zu 1,5 ml bei -20 °C gelagert.
- Trypsin/ DNase-Lösung: 1,5 ml der Trypsin-Stock-Lsg (0,125 % Trypsin)/ 200 µl der DNase-Stock-Lsg (940 U), das Gemisch mit HBSS-1 auf 30 ml aufgefüllt.
- Kollagenase/ DNase-Lösung : 0,1 % Kollagenase/ 0,2 mg DNase in 15 ml MEM-1.
- MEM-1: Eagle`s minimum essential medium (MEM, Gibco/Invitrogen) mit 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin, 1 % Streptomycin
- MEM-FBS: MEM-1, 10 % Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (FBS, Gibco/Invitrogen, ChargenNr.627 EE)

2.1.5 Medien und Lösungen zur Zellkultur von A549-Zellen

- PBS (Biochrome AG): Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, isotone Phosphat-gepufferte Salzlösung, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
- DMEM:F-12 (Gibco/Invitrogen): 1:1 Mischung der Medien DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) und Ham´s F12, mit 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin, 1 % Streptomycin und 10 % FBS (Gibco/ Invitrogen, Chargen Nr. A01123-195)
- DMSO: Dimethylsulfoxid, wird als Gefrierschutz für Zellen bei der Kryokonservierung verwendet.

2.1.6 Lösungen für Ussing-Kammer- und Patch-clamp-Messungen

Für die Ussing-Kammer Messungen wurden die Badlösungen modifizierte Ringer (m-Ringer), Na^+-Gradient und K^+-Gradient verwendet (s. Tab 2). Die Badlösungen wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt und mithilfe einer Vakuum Gaspumpe (VWR) steril filtriert. Mit einem pH-Meter CG 822 (Schott Geräte) erfolgte die pH-Wert Einstellung auf 7,4 durch Zugabe der Basen Kaliumhydroxid/ Kalilauge (KOH) oder Natriumhydroxid/ Natronlauge (NaOH) oder durch Zugabe von Salzsäure (HCl). Während der Messungen wurde der pH-Wert dann durch ständige Carbogen-Begasung konstant

gehalten. Um den Einfluss eines möglicherweise vorhandenen apikalen Na^+-Glukose-Kotransporters auf den Na^+-Transport auszuschließen, wurde in der apikalen m-Ringer-Lösung Mannitol anstatt Glukose verwendet (Clarke 2009, Icard und Saumon 1999).

Tab 2 Zusammensetzung der Badlösungen in Ussing- Kammer Messungen.
Aufgeführt sind die modifizierte Ringer (m-Ringer)-, Na^+-Gradient- und K^+-Gradient-Lösungen in ihrer Zusammensetzung für die apikale (ap) und basolaterale (bl) Seite der Ussing-Kammer. Die Konzentrationen sind in mM angegeben.
Na^+: Natrium-Ion; K^+: Kalium-Ion; Ca^{2+}: Kalzium-Ion ;Mg^{2+}: Magnesium-Ion ;Cl^- : Chlorid-Ion; HCO_3^- : Hydrogencarbonat-Ion; $H_2PO_4^-$: Hydrogenphosphat-Ion; HPO_4^{2-}: Phosphat-Ion; NMDG: N-Methyl-D-glucamin; $H_3CO_3^-$: Pyruvat; $C_6H_{11}O_7^-$: Glukonat; HEPES: Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure als Puffer

Lösung	**m-Ringer**		**Na^+-Gradient**		**K^+-Gradient**	
	ap [mM]	bl [mM]	ap [mM]	bl [mM]	ap [mM]	bl [mM]
Na^+	145	145	145	5	5	133
K^+	5	5	5	5	132	4
Ca^+	1,2	1,2	1,2	1,2	1	1
Mg^{2+}	1,2	1,2	1,2	1,2	1	1
Cl^-	125	125	125	125	4	8
HCO_3^-	25	25	25	25	-	-
$H_3CO_3^-$	-	-	-	-	5	5
$H_2PO_4^-$	3,3	3,3	3,3	3,3	-	-
HPO_4^{2-}	0,8	0,8	0,8	0,8	-	-
$C_6H_{11}O_7^-$	-	-	-	-	132	128
Glucose	-	10	-	10	-	5
Mannitol	10	-	10	-	5	-
HEPES	10	10	-	-	5	5
NMDG	-	-	-	116	-	-
Cholin	-	-	-	24	-	-
pH	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4

Für Whole-cell- und Einzelkanal-Messungen wurden unterschiedliche Badlösungen, für die Pipetten wurden unterschiedliche Pipettenlösungen verwendet (s. Tab 3). Alle Lösungen wurden vor Gebrauch steril filtriert. Dadurch wurden Kontaminationen der Pipettenspitze vermieden, die sonst das Erreichen eines Gigaseals behindert hätten.

Tab 3 Zusammensetzung der Badlösungen (Bad 1 und Bad 2) und der Pipettenlösungen (Pip 1 und Pip2) in Patch-clamp-Messungen Na^+: Natrium; K^+: Kalium-Ion; Ca^{2+}: Kalzium-Ion ;Mg^{2+}: Magnesium-Ion ;Cl^- : Chlorid-Ion; EGTA: Ethylendioxy-bis(ethylennitrilo)-tetraessigsäure, ein Ca^{2+} - Chelator; HEPES: Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure als Puffer; $C_6H_{11}O_7^-$: Glukonat

Lösung	**Bad 1 [mM]**	**Bad 2 [mM]**	**Pip 1 [mM]**	**Pip 2 [mM]**
Na^+	135	-	130	135
K^+	5	135	-	-
Ca^{2+}	1	-	0,506	-
Mg^+	4	5	2,741	5
Cl^-	10	10	6,494	10
EGTA	-	-	10	-
$C_6H_{11}O_7^-$	135	135	130	135
HEPES	10	10	10	10
Glucose	5	5	5	5
Mannitol	10	20	-	-
pH	7,4	7,4	7,4	7,4

2.1.7 Verwendete Substanzen

Die verwendeten Substanzen wurden in demineralisiertem Wasser, Ethanol oder DMSO gelöst.

- 1-EBIO (1-Ethyl-2-Benzimidazolinon), (SML0034, Sigma): beschrieben als Aktivator von epithelialen K_{Ca}-Kanälen (Gao et al. 2001, Hougaard et al. 2007, Syme et al. 2000), löslich in DMSO.
- DC-EBIO (5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2*H*-Benzimidazol-2-one), (1422, Tocris): beschrieben als Aktivator von SK2, SK3 und IK (Ledoux et al. 2006, Wei et al. 2005), löslich in DMSO.
- Chlorzoxazon (5-Chloro-2-hydroxybenzoxazol), (C-4397, Sigma): therapeutisch genutzt als Skelettmuskelrelaxans, beschrieben als IK-Aktivator (Cao et al. 2001, Gao et al. 2001, Syme et al. 2000), löslich in Ethanol.
- Riluzol (2-Amino-6-(trifluoromethoxy) benzothiazol), (R116, Sigma): neuro-protektiver Wirkstoff, verwendet zur Behandlung der Amyotrophen Lateralsklerose, Blocker von neuronalen spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen,

Aktivator von K^+-Kanälen mit 2 TMD, Aktivator von Ca^{2+}-abhängigen K^+-Kanälen vom SK- und IK-Typ (Cao et al. 2002, Sankaranarayanan et al. 2009), löslich in DMSO.

- Amilorid (A-7410, Sigma): Diuretikum, selektiver und reversibler Blocker des apikalen ENaC, löslich in Wasser.
- Ouabain (g-Strophantin), (O-3125, Sigma): Herzwirksames Glykosid, spezifischer Blocker der basolateralen Na^+, K^+-ATPase, löslich in Wasser.
- Tram34 (1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1*H*-pyrazole), (2946, Tocris): spezifischer Blocker des IK, löslich in DMSO.
- Amphotericin B (A-4888, Sigma): makrozyklisches Polyen-Antibiotikum, permeabilisiert die Zellmembran, löslich in DMSO.
- Scyllatoxin (Scorpiongift, Leiurotoxin I), (S 2321, Sigma): spezifischer Blocker der SK, löslich in Wasser.
- UCL1684 (6,12,19,20,25,26-Hexahydro-5,27:13,18:21,24-trietheno-11,7-metheno-7*H*-dibenzo [*b*,*n*] [1,5,12,16]tetraazacyclotricosine-5,13-diium dibromide), (1310, Tocris): spezifischer Blocker von SK, löslich in DMSO.

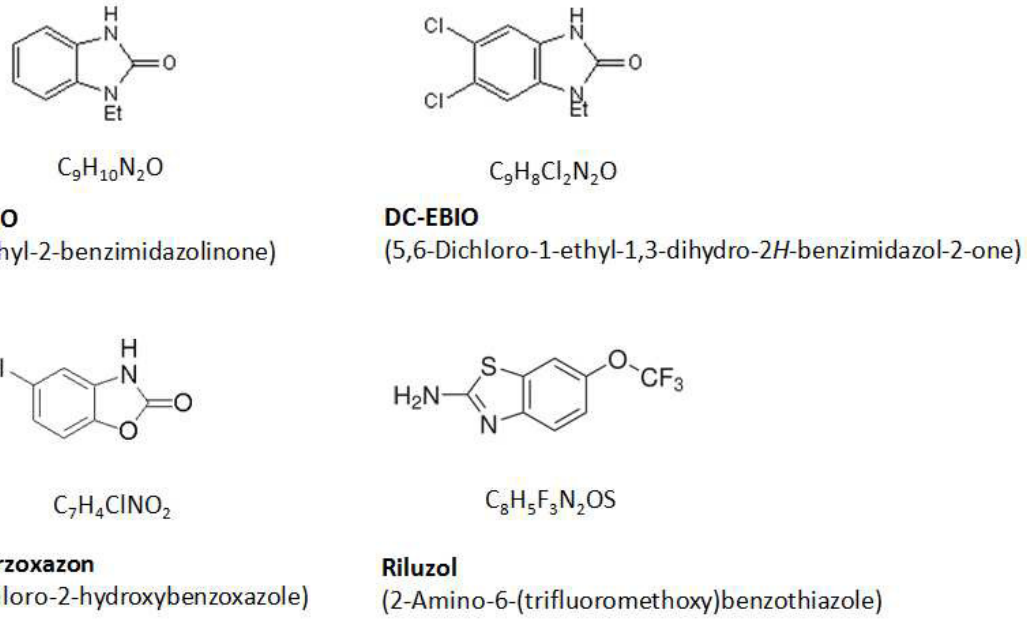

Abb 4 Strukturformeln und Summenformeln der getesteten Benzimidazolone 1-EBIO, DC-EBIO, Chlorzoxazon und Riluzol

2.2 Methoden zur Zellkultur

2.2.1 Isolierung und Primärkultur von Alveolarzellen

In Anlehnung an die Methode von Jassal et al. wurde die Zellisolierung und Zellkultivierung durchgeführt (Jassal et al. 1991). Beim Tierforschungszentrum wurden jeweils drei trächtige Sprague-Dawley Ratten auf den 19. Gestationstag bestellt. Die Ratten wurden bei einer kontrollierten Raumtemperatur von 22 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 55 % und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Ratten haben eine Tragezeit von 21-23 Tagen. Für die Primärkultur von Alveolarzellen eignen sich besonders fetale distale Lungenepithelzellen, die am 19. Gestationstag den Rattenfeten entnommen werden. Um eine möglichst aseptische Entnahme der Feten zu garantieren, war eine sorgfältige Vorbereitung des Arbeitsplatzes nötig. Dies beinhaltete das Vorbereiten einer sauberen Arbeitsfläche, Ethanol zur Desinfektion, steriles Präparierbesteck und eine Petrischale mit Eis. Die trächtigen Tiere wurden morgens aus dem Tierstall der Universität Ulm abgeholt und kurz darauf durch intraperitoneale Injektion von Ketamin/ Xylazin euthanasiert. Waren Zwischenzehen- und Kornealreflex erloschen, wurde das Abdomen gründlich mit Ethanol desinfiziert und anschließend mit einem Längsschnitt eröffnet. Vorsichtig wurde der Uterus eröffnet, die Feten nacheinander entnommen und in die Petrischale auf Eis gelegt. Um das Gewicht und damit das Gestationsalter der Feten zu kontrollieren, wurde jeweils ein Fetus pro Muttertier in einer geschlossenen Petrischale gewogen. Das korrekte Gestationsalter konnte anhand Tab 4 überprüft werden.

Tab 4 : Tabelle zur Bestimmung des korrekten Gestationsalters bei Rattenfeten
d: Tage; g: Gramm

Gestationsalter (d)	Gewicht (g)
18	1,4
19	2,4
20	3,4
21	4,4

Die weiteren Arbeitsschritte wurden von nun an steril unter einer Sicherheitswerkbank Klasse II durchgeführt. Nach der Entnahme der fetalen Lungen wurden diese direkt in gekühlte HBSS-1 gelegt. Im nächsten Arbeitsschritt wurden unter dem Stereomikroskop weiterhin die großen Gefäße, Luftröhre und Herz von den Lungen entfernt, um sie danach nochmals in HBSS-1 zu waschen. Anschließend wurden die Lungen in einer frischen

Petrischale mit einer Rasierklinge ca. 5 min lang gestückelt. Die homogene Gewebemasse wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 20 ml HBSS-1 wurde vorsichtig geschüttelt, um die Erythrozyten von den Gewebefragmenten zu trennen. Nach Absetzen der Gewebereste, einschließlich der AT II-Zellen, wurde der Überstand abgesaugt. Dieser Vorgang wurde noch zwei Mal wiederholt, bis der Überstand annähernd klar erschien. Als Nächstes folgte die enzymatische Verdauung mit Trypsin und DNase. Das Gemisch aus Gewebefragmenten und Trypsin/ DNase-Lösung wurde bei 37 °C für 10 min im Wasserbad inkubiert und mit einem sterilen Magnetstab auf einem Magnetrührer durchmischt. (Falls nach 10 min keine Lösung zu erkennen war, konnten noch weitere 100 µl DNase hinzugegeben werden.) Danach wurde die Reaktion sofort mit 20 ml MEM-FBS gestoppt. Die Kulturmedien MEM-1 und MEM-FBS waren zuvor in einem Incubator shaker gemischt und erwärmt worden. Die Suspension wurde nun steril durch einen 100 µm Nylonfilter gefiltert und 3 min bei 400 *g* und 22 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 35 ml MEM-1 resuspendiert, um dann bei 65 *g* zentrifugiert zu werden. Das so gewonnene Zellkonzentrat im Pellet wurde in 15 ml unmittelbar zuvor hergestellter Kollagenase/ DNase-Lösung resuspendiert und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur Neutralisation der Kollagenase- und DNase-Aktivität wurden 20 ml MEM-FBS zugegeben und die Suspension erneut bei 400 *g* und 22 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50 ml MEM-FBS resuspendiert. Durch den Zusatz von FBS im Kulturmedium erhielten die Zellen zahlreiche wachstumsfördernde Ingredienzien wie Wachstumsfaktoren und Hormone (Schmitz 2011). Durch die Hitzeinaktivierung bei 56 °C über 30 min wurden Mykoplasmen vollständig inaktiviert und die Infektiosität von Viren deutlich reduziert (Invitrogen GmbH 2004). Das in MEM-FBS enthaltene L-Glutamin stellte eine wichtige Energiequelle für das Wachstum der Zellen in der Kultur dar (Zielke et al. 1984).

Die Zellsuspension wurde nun gleichermaßen auf fünf 75 cm^2 Zellkulturflaschen verteilt und für 60 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2, Wasserdampf gesättigte Atmosphäre) inkubiert. Hier machte man sich die Eigenschaft der sich schnell anhaftenden Fibroblasten zu Nutze, wohingegen die AT II-Zellen nach 60 min noch im Kulturmedium schwammen. Nach dieser Zeit wurde das Kulturmedium aller Zellkulturflaschen abpipettiert und gesammelt, ohne dabei die am Boden haftenden Fibroblasten abzukratzen. Die Zellkulturflaschen wurden noch ein zweites Mal mit insgesamt 50 ml MEM-FBS gespült und wieder abpipettiert. Das gesammelte Gemisch wurde bei 400 *g* 3 min zentrifugiert. Die

daraus gewonnenen Pellets wurden in 50 ml MEM-FBS resuspendiert und noch ein zweites Mal, wie oben beschrieben, für 60 min inkubiert, abpipettiert und zentrifugiert. Um noch verbliebene Fibroblasten zu entfernen, wurde noch drei Mal bei 65 *g* 3 min zentrifugiert, der Überstand danach immer verworfen. Die Zellsuspension bestand nun zu über 95 % aus Epithelzellen.

Für die weitere Kultivierung der Zellen musste die Zellzahl bestimmt werden.

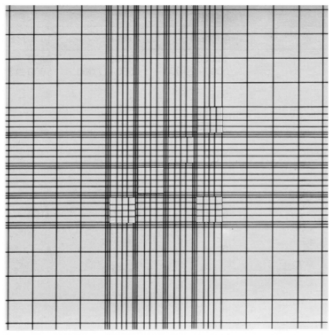

Abb 5 Neubauer Zählkammer
Es wird die Zellzahl in allen 4 großen Eckquadraten ausgezählt, wobei ein Quadrat eine Fläche von 1 mm^2 und eine Tiefe von 0,1 mm hat, woraus sich ein Volumen von 0,1 µl errechnet. (Goerlich 2006)

Dazu wurden die Zellen in 50 ml MEM-1 resuspendiert. Nach sorgfältigem Durchmischen wurde mit einer Mikroliterpipette eine Neubauer-Zählkammer (s. Abb 5) vom Rand her blasenfrei gefüllt. Unter einem Mikroskop mit 100er Objektiv wurden alle vier großen Eckquadrate ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet (Schmitz 2007):

$$\frac{Z}{4} \cdot 10^4 \cdot Vol = Z_{ges}$$

Z: Anzahl der gezählten Zellen
Z_{ges}: Gesamtzahl der Zellen
4: Anzahl der Quadrate der Neubauer-Kammer
10^4: Kammerfaktor, Volumen eines Quadrates der Neubauer-Kammer beträgt 0,1 µl
Vol: Volumen, in dem die Zellen resuspendiert wurden

Pro Ratte konnten im Durchschnitt 10-20 Millionen Epithelzellen isoliert werden, abhängig von Gestationstag, Größe und Anzahl der Feten. Die Zellsuspension wurde nochmals zentrifugiert (420 *g*, 3 min), um danach in der benötigten Menge an MEM-FBS resuspendiert zu werden. Für die Ussing-Kammer Messungen wurden die Zellen auf Costar Snapwell No.3407 (Corning Inc. Corning NY) ausgesät. Hierbei handelte es sich um abnehmbare Einsätze für 6-Well-Platten mit einer Polycarbonat Membran, einer Oberfläche von 1 cm^2 und einer Porengröße von 0,4 µm. Pro Well wurden 10^6 Zellen ausgesät, in MEM-FBS kultiviert und bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Nach 48 Std wurde das Kulturmedium abgesaugt, da Mediumbestandteile und Zusätze von den Zellen metabolisiert wurden oder bei 37 °C zerfallen waren (Lindl und Gstraunthaler 2008). Neues MEM-FBS wurde wieder zugegeben und die Zellen weiter inkubiert.

Ab dem 4. Zellkulturtag hatte sich eine konfluente einlagige Zellschicht (Monolayer) auf den Einsätzen gebildet. Um einer Dedifferenzierung der Zellen zuvor zu kommen, wurden die Ussing-Kammer Messungen am 4. Tag, und bei entsprechend hoher Zellzahl auch am 5.Tag durchgeführt.

2.2.2 Zellkultur A549

Die Zellkulturarbeiten mit A549-Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden mit DMEM:F-12 kultiviert und bei 37 C°, 5 % CO_2 und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre im Brutschrank gehalten. Sie wurden zweimal wöchentlich passagiert. Dazu wurden vom Boden der Zellkulturflasche (75 cm^2 Wachstumsfläche) vorsichtig mit einem Zellschaber die adhärent gewachsenen Epithelzellen abgeschabt. Die Zell-Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit DMEM:F-12 auf 30 ml aufgefüllt und bei 230 *g* für 5 min mit Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zuerst in 5 ml DMEM:F-12, danach in einem Gesamtvolumen von 50 ml resuspendiert.

Jeweils 15 ml dieser Zell-Suspension wurden erneut in eine Zellkulturflasche zur Weiterkultivierung ausgesät. Dadurch erhöhte sich die Anzahl der Passagen *p* auf *p* + 1.

Um die A549-Zellen für Patch-clamp-Messungen zu verwenden, wurde 1 ml der 50 ml-Zellsuspension entnommen. Dies wurde nochmals in 24 ml DMEM:F-12 resuspendiert. Davon wurden mit einer Pipettenspitze jeweils 3 bis 4 Tropfen auf einen Poly-L-Lysin beschichteten Ring gegeben. Die Ringe wurden steril in Petrischalen für 30 min in den

Brutschrank gelegt. Falls erforderlich wurde danach mit DMEM:F-12 bis zur Spiegelbildung aufgefüllt. Am zweiten oder dritten Tag zeigten die A549-Zellen eine ausreichende Adhäsion an der Oberfläche der Deckgläschen und konnten für Patch-clamp-Messung verwendet werden.

2.2.3 Kryokonservierung von A549-Zellen

Damit sich die Anzahl der Passagen der A549-Zellen nicht ständig erhöhte, wurden die Zellen in $p < 95$ von Zeit zu Zeit in flüssigem Stickstoff (N_2) eingefroren. Somit konnten ausschließlich Zellen aus p 85-95 für Patch-clamp Messungen verwendet werden. Außerdem wären bei einer eventuellen Kontamination einer Zellkultur frische Zellen vorhanden gewesen.

Dazu wurden A549-Zellen in der log-Phase verwendet. Diese Phase ist durch exponentielles Zellwachstum gekennzeichnet. Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, aus einer Zellkulturflasche gewonnen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in DMEM:F-12 in einem Kryoröhrchen resuspendiert. Zusätzlich wurden 10 % DMSO zugegeben und das Zellgemisch mit DMEM:F-12 aufgefüllt, um ein Gesamtvolumen von 1 ml zu erhalten. In einem mit 100 % Isopropanol gefüllten Cryo-Einfriergerät wurden die Zellen über Nacht in einen Tiefkühlschrank (-80°C) gestellt. Am nächsten Tag konnten die Zellen dann in einen mit flüssigem Stickstoff (-176°C) gefüllten Behälter zur dauerhaften Lagerung überführt werden.

2.2.4 Vorbereitung der Ringe für Patch-clamp-Messungen

Am Messtag wurden morgens die Ringe für die Patch-clamp-Messungen vorbereitet. Die auf kleine Deckgläser geklebten Ringe waren bereits autoklaviert und konnten für steriles Arbeiten verwendet werden. In jeden Ring wurden 3 Tropfen Poly-L-Lysin gegeben. Poly-L-Lysin ist ein synthetisches Protein, wodurch die Anheftung von Zellen auf einer Oberfläche verbessert werden kann. Die Ringe wurden in verschlossenen Petrischalen für 30 min in den Brutschrank (37 C°, 5 % CO_2) gestellt. Nach dieser Zeit wurde das Poly-L-Lysin abgesaugt. Die nun beschichtete Oberfläche musste noch zwei Mal steril mit PBS gewaschen werden, um danach die A549-Zellen in DMEM:F-12 darauf geben zu können.

2.3 Ussing-Kammer

In den 1950ern entwickelte H. Ussing eine elektrophysiologische Apparatur, um den vektoriellen Transport von Ionen durch die Froschhaut zu studieren. Inzwischen ist die Ussing-Kammer-Technik eine geschätzte Messmethode, um Messungen von Transport- und Barrierefunktionen an Epithelien, auch über mehrere Stunden, durchzuführen (Gitter 2007).

2.3.1 Aufbau

Es wurde eine Anordnung von insgesamt acht Ussing-Kammern der Firma Physiologic Instruments (USA) verwendet. In Abb 6 ist schematisch der Aufbau einer Ussing-Kammer-Einheit dargestellt. Jeweils ein Zellkultureinsatz mit dem darauf gewachsenen FDLE-Monolayer wurde passgenau in ein Slider eingesetzt, welcher wiederum zwischen zwei Plexiglashalbkammern gespannt wurde. Beide Kammern waren an den Innenseiten mit runden Bohrungen, entsprechend der Fläche der Monolayer, versehen und durch Gummiringe abgedichtet (Weber 1996). Die Kammern waren mit modifizierten Ringerlösungen (Badlösung) gefüllt, um die AT II-Zellen weiter in physiologischer Umgebung zu halten. Durch Änderung der Zusammensetzung der Badlösungen konnten unterschiedliche Versuchsbedingungen geschaffen werden. Dabei umspülte eine Kammer die apikale, die andere die basolaterale Seite der Monolayer. Ein Stoffaustausch zwischen beiden Kammern war somit nur über das einschichtige Epithel möglich. Die Kammern waren nach oben hin geöffnet. Hier konnten die Badlösungen und die verschiedenen Pharmaka zugegeben werden. Es wurde darauf geachtet, dass beide Kammern mit gleichen Volumina gefüllt waren, um einen einseitigen hydrostatischen Druck auf das Epithel zu vermeiden.

In der Vorderseite beider Kammern waren jeweils zwei Bohrungen eingelassen, in denen die Elektrodenspitzen montiert waren. Dem Gewebe mit ca. 2 mm am nächsten mündeten die Spannungselektroden.

In größtmöglichem Abstand zum Gewebe waren die Stromelektroden montiert. (Krahner 2008).

Strom und Spannung wurden über eine Mehrkanal Spannungs-/ Stromklemme (VCC MC8-8S, Physiologic Instruments, USA) gemessen und über einen Analog-Digital-Wandler mit dem Computer aufgezeichnet. Zur Steuerung und Datenerfassung wurde das

Programm Acquire & Analyze (Physiologic Instruments, USA) verwendet, mit dem Strom, Spannung, Gewebeleitfähigkeit und Widerstand der Epithelmonolayer in allen acht Ussing-Kammern aufgezeichnet werden konnten.

Seitlich waren in die Kammern Bohrungen eingelassen, worüber diese mit Carbogen (Gemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2) begast wurden. Zum einen wurden dadurch die Zellen mit ausreichend O_2 versorgt und der pH-Wert stabil bei 7,4 gehalten. Zum anderen konnte eine kontinuierliche Durchmischung der Badlösungen in den Halbkammern während der Messungen gewährleistet werden. Die Ionenkonzentration der Badlösungen war auf beiden Seiten gleich, außer bei den Messungen mit Konzentrationsgradienten. Ein den Kammern hinten anliegender Heizblock hielt die Temperatur konstant bei 37 °C. Somit wurden nach Möglichkeit alle Faktoren, die einen passiven, unerwünschten Ionentransport bewirken, ausgeschlossen.

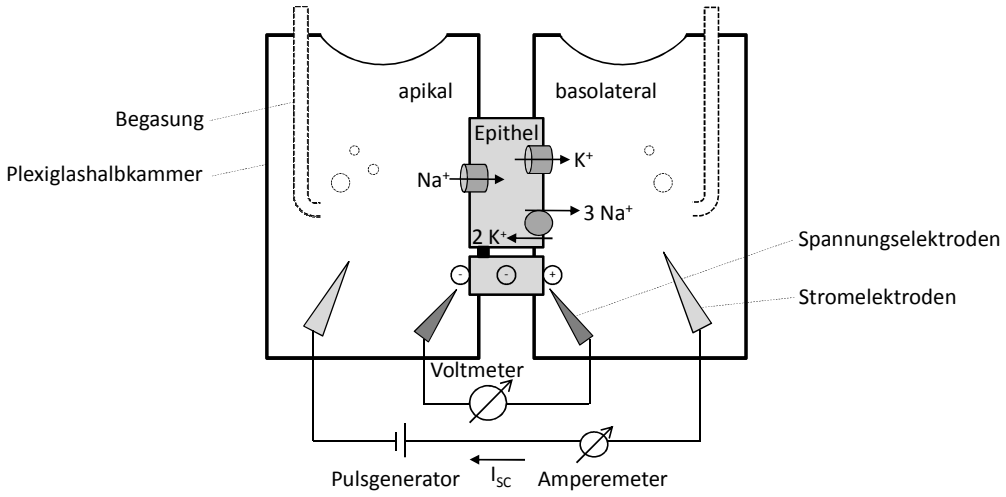

Abb 6 Schematische Darstellung der Ussing-Kammer
Dargestellt sind die beiden Halbkammern mit eingespanntem Epithelmonolayer und Begasung, Spannungselektroden zur Messung der transepithelialen Spannung, Stromelektroden zur Messung des Kurzschlussstromes I_{SC}. Na^+: Natrium; K^+: Kalium

2.3.2 Elektrische Messanordnung und Messprinzip

Zuerst einmal soll das in die Ussing-Kammer eingesetzte Epithel als elektrische Schaltung betrachtet werden. Ionenpumpen sind für den aktiven Transport von Ladungsträgern durch das Epithel verantwortlich, sodass ein Stromfluss entsprechend einer Gleichstromquelle messbar ist. Das Epithel stellt aber auch einen Widerstand dar. Da es nicht absolut dicht für Ionen ist, wird der gerichtete Stromfluss vermindert. Schließlich

wirkt das Epithel auch als Kondensator, ein dünner Isolator mit beidseitig leitfähigem Material. Stromquelle-, Widerstand- und Kondensatoreigenschaft des Epithels sind alle parallel geschaltet (The New Ussing Pulse Measurement Method. 2007).

Werden Ionen über das Epithel transportiert, kann mit den Spannungselektroden über das Voltmeter eine transepitheliale Potentialdifferenz (V_{te}) gemessen werden. Bei Spannungsklemmbetrieb wird der über die Stromelektroden abgegebene Strom so geregelt, dass V_{te} über dem Epithel null ist (V_{te} = 0 mV). Durch diesen Kurzschluss des transepithelialen Potentials ist der elektrische Gradient gleich null, so dass Leckströme durch das Epithel keine Rolle mehr spielen. Die gemessene Stromstärke entspricht dabei genau dem aktiven Transport des Monolayers.

Da sich zu beiden Seiten des Epithels Badlösungen mit der gleichen Ionenkonzentration befinden, ist somit auch der chemische Gradient beseitigt (Leclercq 1999). Mit dem Amperemeter wird in der klassischen Ussing-Kammer Messtechnik der Kurzschlussstrom I_{SC} (short-circuit current) gemessen, welcher dem aktiven transepithelialen Ionentransport entspricht (The New Ussing Pulse Measurement Method. 2007, Sievers 2008).

Allerdings müssen noch andere Widerstände, die die Messungen beeinflussen, bedacht werden. Zusätzlich zum Epithel stellen die Badlösung, die Elektroden und die Agarbrücken in Reihe geschaltete Widerstände dar. Eine Möglichkeit ist die Messung des Widerstandes ohne Epithel, um den Gesamtwiderstand anschließend bei Messung mit Epithel zu kompensieren. Nach dem Einsetzen des Epithels und Füllen der Kammern würden sich allerdings nicht die absolut identischen Bedingungen wieder herstellen lassen (Krahner 2008).

Zur Überwachung der Integrität des Epithels wurde dessen Widerstand durch Applikation eines 2 mV Rechteckimpulses alle 20 s gemessen.

Nach dem Ohm`schen Gesetz konnte der spezifische transepitheliale Widerstand (R_{te}) aus der spezifischen transepithelialen Potentialdifferenz (ΔV_{te}) über dem Epithel mit der Oberfläche (O) und der Stromstärke des Stromimpulses (ΔI) berechnet werden (Krahner 2008):

$$R_{te} = \frac{\Delta V_{te} \cdot O}{\Delta I} \; [\Omega \cdot cm^2]$$

Davon abgeleitet ließ sich auch die spezifische Gewebeleitfähigkeit (G_{te}) des Epithels als Reziprokwert von R_{te} errechnen.

$$G_{te} = \frac{1}{R_{te}} \; [mS/cm^2]$$

Alle 20 s wurde V_{te} mit der Spannungsklemme (VCC MC8-8S, Physiologic Instruments, USA) gemessen und über einen Analog/ Digital-Wandler auf dem Computer aufgezeichnet. I_{SC} wurde dann aus V_{te} vor dem Stromimpuls und dem über den Stromimpuls ermittelten R_{te} berechnet:

$$I_{SC} = \frac{V_{te}}{R_{te}} \; [\mu A/cm^2]$$

(Gitter 2007, Leclercq 1999, Li et al. 2004)

2.3.3 Elektroden und Pipetten

Spannungselektroden: Dafür wurden Pipettenspitzen vorne angeschrägt und hinten gekürzt. Danach wurden die Spitzen blasenfrei mit Agar, der physiologische Ringerlösung enthielt, gefüllt. Der Spitzenrest wurde mit Ringerlösung aufgefüllt. Auf das breitere Ende der Pipettenspitzen wurden nun die Elektroden aufgesetzt. Diese Spannungselektroden bestanden aus mit Silberchloridpellets (AgCl) überzogenen Silberdrähten, die in Nylonaufsätze eingelassen waren. Auf der anderen Seite dieser Aufsätze konnten dann die Messkabel angesteckt werden.

Stromelektroden: Die Pipettenspitzen wurden, wie oben beschrieben, hergestellt. Die Silberdrähte waren ebenfalls mit einer Silberchloridschicht überzogen.

Agar und Pipettenspitzen wurden im Kühlschrank gelagert. Die Elektroden wurden nach den Messungen trocken und korrosionsgeschützt aufbewahrt. Die Oberflächen der AgCl-beschichteten Spannungselektroden mussten nach einiger Zeit vorsichtig angeschmirgelt werden, um ihre volle Leitfähigkeit wieder zu gewährleisten. Um die Stromelektroden zu erneuern, wurde erst der Silberdraht angeschmirgelt. Danach wurde er in verdünnte Hypochloritlösung getaucht, bis die Oberfläche wieder hellgrau erschien (Physiologic Instruments Inc. 2009).

2.3.4 Versuchsablauf

Vor Beginn der eigentlichen Messungen wurden die Kammern mit Ringer-Lösung gefüllt und der Heizblock eingeschaltet.

Zwischenzeitlich wurde untersucht, ob die AT II-Zellen einen ausreichend dichten Monolayer gebildet hatten. Dazu wurde mit einem epithelialen Voltohmmeter steril der transepitheliale elektrische Widerstand gemessen, ohne dabei die Zellen aus dem Kulturmedium herausnehmen zu müssen. Nur Monolayer mit einem Widerstand $> 800\ \Omega \cdot cm^2$ waren für die Ussing-Kammer-Messungen geeignet. Andernfalls wurden die Monolayer bis zu den nächsten Messungen im Brutschrank belassen. Bei Nichterreichen des geforderten Widerstandes wurden die Zellen ganz verworfen.

Nach etwa einer Stunde wurden die Messverstärker sorgfältig auf Null kalibriert und die Badwiderstandskompensation abgestimmt. Die Ringer-Lösung wurde sodann abgesaugt und die konfluenten AT II-Monolayer, 72-96 h nach Beginn der Zellkultur, in die Ussing-Kammern eingesetzt. Nach Einfüllen der Badlösung wurde 10-30 min abgewartet, damit sich die Epithelien auf die neuen Bedingungen einstellen konnten. Erst wenn die Werte für Widerstand, Potentialdifferenz und den zunächst noch ansteigenden Kurzschlussstrom konstant blieben, wurde mit den Messungen begonnen. Ein Epithelwiderstand unter $400\ \Omega \cdot cm^2$ zu Beginn und unter $200\ \Omega \cdot cm^2$ gegen Ende der Messungen galt als Ausschlusskriterium für den jeweiligen Monolayer.

Die eingespannten Monolayer, jeweils aus derselben Zellkultur, wurden dann in eine Versuchs- und Kontrollgruppe eingeteilt. In der Versuchsgruppe wurden transepitheliale Ströme unter Zugabe der verschiedenen Testsubstanzen auf der apikalen und/ oder basolateralen Seite gemessen. Die Messungen der Kontrollgruppe wurden simultan mit gleichem Ablauf und gleicher Dauer durchgeführt.

- Die Ussing-Kammern waren mit der entsprechenden apikalen bzw. basolateralen m-Ringer-Lösung gefüllt. Nach Zugabe der Benzimidazolone in steigenden Konzentrationen wurde immer abgewartet, bis sich der I_{SC} wieder eingestellt hatte. Anschließend wurde 10 µM Amilorid in die apikale Kammer gegeben. Der danach beobachtete Rückgang des Stromes, genannt Amilorid-sensitiver I_{SC} (I_{amil}) wurde als Maß für die Aktivität des ENaC ermittelt.

- Als Letztes wurde 1 mM Ouabain in die basolaterale Kammer gegeben. Der Ouabain-sensitive I_{SC} (I_{ouab}) wurde als Maß für die Aktivität der Na^+, K^+-ATPase ermittelt.
- In einer weiteren Versuchsreihe mit m-Ringer-Lösung sollte nach Gabe von DC-EBIO dessen Wirkung auf die K_{Ca}-Kanäle untersucht werden. Um den Einfluss des IK auf den I_{SC} zu messen, wurde wieder Tram34 apikal und basolateral zugegeben. Um den Einfluss der SK auf den I_{SC} zu messen, wurde 100 nM UCL1684 apikal und basolateral zugegeben.
- Um gezielt die basolateralen Transportprozesse zu betrachten, wurden Versuche mit K^+-Gradient-Lösung durchgeführt. Auf der apikalen Epithelseite war die K^+-Konzentration erhöht, sodass ein K^+-Gradient zwischen der apikalen und basolateralen Membran von 132:4 mM vorlag. Nach Messung des I_{SC} wurde die apikale Membran der Zellen mit 10 µM Amphotericin B permeabilisiert. Dadurch sollte die basolaterale K^+-Permeabilität ohne Einfluss der apikalen Kanäle gemessen werden. Nach Benzimidazolon-Gabe wurde wieder das Erreichen des maximalen I_{SC} abgewartet. Dann wurden 10 µM Tram34 apikal und basolateral zugegeben, um den Einfluss des IK auf den I_{SC} zu ermitteln (Thome et al. 2003). Daraus wurde I_{tram} ermittelt. Weiterhin wurden 10 nM Scyllatoxin apikal und basolateral zugegeben, um den Einfluss von SK auf den I_{SC} zu ermitteln.
- Um die apikale Na^+-Permeabilität ohne Einfluss der basolateralen Na^+, K^+-ATPase und K^+-Kanäle zu erfassen, wurde ein Na^+-Gradient zwischen der apikalen und basolateralen Membran von 145:5 mM erzeugt. Hierfür betrug die Na^+-Konzentration in der basolateralen Na^+-Gradient-Lösung nur 5 mM. Um auf der basolateralen Seite weiterhin die gleiche Osmolarität wie apikal zu wahren, wurden 140 mM Na^+ durch die impermeablen Kationen N-Methyl-D-glucamin (NMDG, Sigma) und Cholin ersetzt. Nach Messung des basalen I_{SC} wurden die Benzimidazolone zugegeben. Sobald sich auch hier der I_{SC} nicht mehr änderte, wurde durch Zugabe von 100 µM Amphotericin B die basolaterale Membran permeabilisiert. Daraus konnte der Amphotericin B-induzierte Strom I_{ampho} ermittelt werden. Nun war kein aktiver Na^+-Transport über die Na^+, K^+-ATPase mehr möglich. Es fand ein Ausgleich zwischen intrazellulärer Na^+-Konzentration und der Konzentration von Na^+-Ionen in der basolateralen Kammer statt. Der nun folgende Anstieg des I_{SC} konnte nur durch den passiven Na^+-Fluss über die apikale Membran

zustande kommen, angetrieben von dem definierten apikal-basolateral gerichteten Konzentrationsgradienten (Guo et al. 1998, Thome et al. 2001, Thome et al. 2003). Sobald auch hier der I_{SC} nicht mehr anstieg, wurde unverzüglich 10 µM Amilorid apikal zugegeben, um den maximalen Amilorid-sensitiven Strom I_{amil} zu bestimmen.

2.4 Patch-clamp-Technik

Die im Jahre 1976 durch Sakmann und Neher entwickelte Patch-Clamp-Technik machte es erstmals möglich, einzelne Ionenkanäle und deren Kanalströme in Zellmembranen sichtbar zu machen (Hamill et al. 1981, Neher und Sakmann 1976). Im Gegensatz zu Ussing-Kammer-Messungen können hier außerdem mit einer einzigen Mikroelektrode Strom- und Spannungsmessungen vorgenommen werden. Eine sehr feine Glaspipette wird auf die Zellmembran einer Zelle aufgesetzt. Da die Ionenströme eines Kanals im Picoampere (pA)-Bereich liegen, muss das Hintergrundrauschen Werte < 1 pA erreichen. Dies wird besonders erreicht durch leichtes Ansaugen des Membranfleckes < 1 μm^2 (Patch). Zwischen Patch und Pipette bilden sich dabei starke Adhäsionskräfte, die für einen elektrischen Abdichtwiderstand gegenüber dem Extrazellulärmedium mit Werten > 1 GΩ sorgen. Man spricht daher von einem „Giga-Seal“. Dabei ist das Hintergrundrauschen umgekehrt proportional zum Abdichtwiderstand (Penner 1995).

2.4.1 Aufbau des Messstandes

Auf einem durch Druckluft schwingungsgedämpften Metalltisch standen die mechanisch empfindlichen Teile des Messstandes, die durch einen Faraday-Käfig vor elektromagnetischen Wellen abgeschirmt waren. Dazu gehörte ein inverses Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Deutschland), bei welchem die Objektive unterhalb des Objekttisches angebracht waren. Auf dem Objekttisch befand sich die Messkammer. Diese Messkammer bestand aus einer Platte mit Bohrung, in die die vorbereiteten Ringe mit Zellen eingesetzt wurden.

Damit diese kontinuierlich bespült werden konnte, waren seitlich mehrere 100 ml Spritzen erhöht angebracht. Von dort konnten die verschiedenen Badlösungen und Substanzen, regelbar über Ventile, über einen dünnen Kunststoffschlauch in die Messkammer fließen. Über einen gegenüberliegenden Schlauch wurde die Badlösung möglichst vibrationsarm abgesaugt. Durch ein oberflächliches Absaugen sollte ein

Verschmutzen der Patch-Pipette durch Staub beim Eintauchen verhindert werden. Eine Ag/AgCl-Elektrode war zur Erdung der Badlösung angebracht.

Die Patch-Pipette mit Elektrode war an dem Vorverstärker (headstage) befestigt. Zur Vermeidung von Scherbewegungen war dieser an einem Halter neben dem Mikroskop befestigt. Über einen 3D-Mikromanipulator (MP-285, Sutter Instruments, USA) konnte unter mikroskopischer Sicht die Patch-Pipette gesteuert werden.

Über einen Drei-Wege-Hahn war die Patch-Pipette mit einer Wassersäule verbunden. Bei Bedarf konnte darüber manuell ein Unter- oder Überdruck in der Patch-Pipette erzeugt werden.

Alle Geräte waren geerdet und wurden von dem Faraday-Käfig umgeben.

Daneben waren in einem Rack die elektrischen Komponenten untergebracht. Dazu zählte der Patch-Clamp-Verstärker EPC9 (HEKA elektronic GmbH, Deutschland), über den die Patch-Elektrode gesteuert wurde, und der PC für Steuerung und Datenaufzeichnung. An einem Oszilloskop konnte der zeitliche Verlauf der Messsignale während der Experimente verfolgt werden.

2.4.2 Elektrische Messanordnung und Messprinzip

Die Patch-clamp-Messungen basieren auf dem Prinzip der Spannungsklemme (voltage-clamp) von Zellmembranen (Hamill et al. 1981). Wird das Membranpotential auf eine definierte Spannung geklemmt, führt dies zu einer messbaren Stromänderung durch Ionenströme. Daraus kann eine Strom-Spannungskurve erstellt werden, anhand derer einzelne Ionenkanäle der Zellmembran charakterisiert werden können.

Die Zellmembran hat sowohl die Eigenschaften eines Widerstandes (R_m) als auch eines Kondensators (C_m). Über die Patch-Elektrode in Patch-clamp-Messungen kann man nicht nur isoliert das Potential eines Membranfleckens, sondern auch des Zellinneren betrachten. Die Patch-Elektrode stellt dabei einen in Serie geschalteten Widerstand (R_p) dar. Zur Applikation des Steuerungspotenzials und Messen der Ströme dient der EPC9, schematisch dargestellt in Abb 7. (Salonikidis 2007)

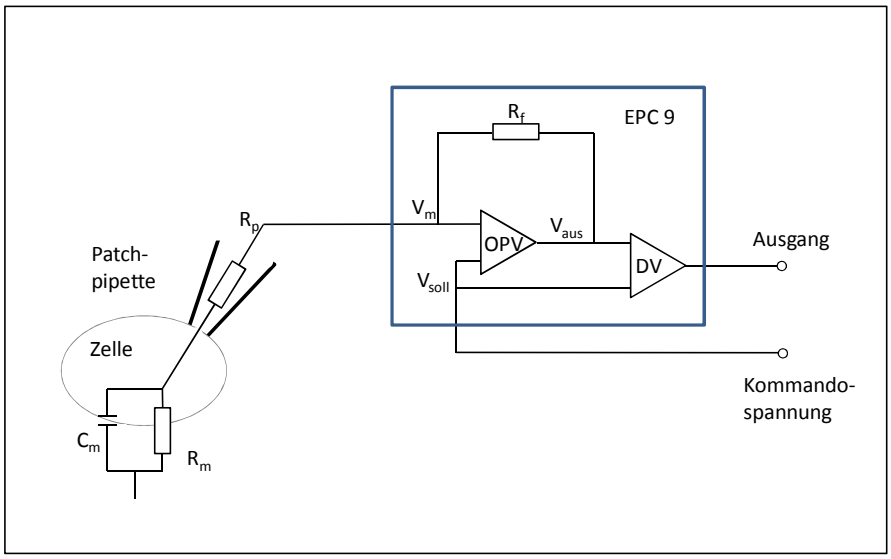

Abb 7 Schematische Darstellung der elektrischen Schaltkreise eines Patch-clamp-Messplatzes
Vereinfacht dargestellt ist eine Zelle mit aufgesetzter Patch-Pipette in der Whole-cell-Konfiguration. Die Zellmembran hat Eigenschaften eines Kondensators (C_m) und eines Widerstandes (R_m). Die Patch-Elektrode stellt einen in Serie geschalteten Widerstand R_p dar.
Der EPC 9-Verstärker besteht aus einem Rückkopplungswiderstand (R_f), einem Operationsverstärker (OPV) und einem Differenzverstärker (DV). Der zentrale OPV regelt das Membranpotential (V_m) auf die vorgegebene Spannung (V_{soll}). Über DV wird die Spannung und der bekannte R_f an den PC (Ausgang) gesendet, woraus anhand des Ohmschen Gesetzes der Strom (I_m) berechnet wird (Salonikidis 2007).

Wird an der Zellmembran ein bestimmtes Potential (V_m) angelegt, folgt darauf ein Strom I_m. Der Regelkreis des EPC 9 wird über den zentralen Operationsverstärker (OPV) geregelt. Das Spannungspotential V_m soll auf das Kommandopotential (V_{soll}) geregelt werden. Hierbei sendet der OPV ein Ausgangspotential (V_{aus}). Dies bewirkt einen Strom I_m über den bekannten Rückkopplungswiderstand R_f mit einer daraufhin folgenden Änderung von V_m. Durch diese Rückkopplung wird V_m auf V_{soll} geregelt mit einer entsprechenden Einstellung von I_m. Über den Differentialverstärker (DV) wird die Spannung an R_f abgegriffen und an Monitor und PC zur Verfügung gestellt. Über das Computerprogramm Pulse/Pulsefit 8.0 (HEKA) kann der Verstärker über einen Analog-Digital/ Digital-Analog-Wandler gesteuert und die Messdaten auf dem PC gespeichert werden. Mit Hilfe des bekannten R_f, der aufgezeichneten Spannung und den verschiedenen Verstärkungsfaktoren kann anhand des Ohm`schen Gesetzes der tatsächliche Strom I_m berechnet werden (Korbmacher et al. 2005, Salonikidis 2007).

Ein weiterer Schaltkreis des EPC 9 sorgt für Spannungsänderungen über den Regelkreis im µs-Bereich. Außerdem werden die kapazitiven Ströme von C_m von der Patch-Elektrode kompensiert.

2.4.3 Badelektrode, Patch-Elektrode und Pipetten

Als Badelektrode wurde eine Ag/AgCl-Elektrode verwendet, durch die die Badlösung elektrisch geerdet wurde. Der Silberdraht war hier in eine Agar und KCl-Lösung enthaltende Pipettenspitze getaucht. Bei nachlassender Leitfähigkeit musste die Badelektrode in verdünnter Hypochloritlösung wieder chloriert werden.

Mit Hilfe der Ag/AgCl-Patch-Elektrode sollte über den Membran-Patch ein elektrischer Zugang zur Zelle (whole-cell) oder eines einzelnen Kanals in der Zellmembran (single-channel) geschaffen werden. Um diesen Zugang gegenüber der geerdeten Badlösung zu isolieren, wurde eine Glaspipette mit Pipettenlösung vorne in den Elektrodenhalter gesteckt. Über eine seitliche Öffnung des Elektrodenhalters konnte der Druck der Pipette vorgegeben werden. Die Ag/AgCl-Elektrode war über den Elektrodenhalter mit dem Verstärker verbunden (Hamill et al. 1981, Salonikidis 2007).

Für die Whole-cell-Messungen wurden Pipetten aus Borosilikatglaskapillaren (Clark Electromedical Instruments, Großbritannien) mit einem Durchmesser von 1,5 mm hergestellt. Die Pipetten wurden mit einem Horizontalpuller (Zeitz Instruments GmbH, Deutschland) in drei Schritten mit unterschiedlicher Hitzeeinwirkung gezogen. Anschließend wurde unter mikroskopischer Sicht die Spitze mit einem erhitzten Draht feuerpoliert, um Kanten und Unreinheiten zu entfernen. Die Öffnung der Pipettenspitze betrug weniger als 1 μm^2, der Widerstand der gefüllten Pipette betrug zwischen 3 und 5 MΩ. Die Pipetten wurden vor dem Ansetzen an die Patch-Elektrode luftblasenfrei mit Pipettenlösung 1 (Pip 1) gefüllt.

Für die Single-channel-Messungen wurden Pipetten aus Quartzglaskapillaren (Sutter Instruments, USA) verwendet, wodurch das Hintergrundrauschen noch besser unterdrückt werden konnte (Levis und Rae 1993). Die Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,0 mm und einem Innendurchmesser von 0,7 mm wurden mit einem P-2000 Laserpuller (Sutter Instruments, USA) in zwei Schritten mit unterschiedlicher Hitzeeinwirkung gezogen. Der Widerstand der gefüllten Pipette betrug zwischen 5 und 10 MΩ. Die Pipetten wurden luftblasenfrei mit Pipettenlösung 2 (Pip 2) gefüllt.

Nach dem Eintauchen der Pipette in die Messkammer wurde geprüft, ob der gewünschte Pipettenwiderstand vorlag. Dazu wurde eine definierte Spannung angelegt und der daraus resultierende Strom gemessen. Nach dem Ohm`schen Gesetz wurde dann der Pipettenwiderstand berechnet.

$$R_p = \frac{V}{I} \ [\Omega]$$

R_p: Pipettenwiderstand
V: Spannung
I: Strom

Für jedes Experiment wurde eine neue Pipette benötigt. Die Pipetten wurden immer zu Beginn des Versuchstages hergestellt, um Verschmutzungen zu vermeiden.

2.4.4 Versuchsablauf

Die vorbereiteten Deckgläser mit A549-Zellen wurden in die Messkammer eingesetzt und die Badelektrode positioniert. Nach Anbringen von Zu- und Ablauf wurden die Zellen mit Badlösung 1 (Bad 1) perfundiert. Eine geeignete Zelle wurde unter mikroskopischer Sicht ausgesucht und mittig positioniert.

Für Whole-cell-Messungen (Ganzzellableitungen) wurden die Glaspipetten mit Pip 1 gefüllt und an der Pipetten-Halterung befestigt. Nach Anlegen eines leichten Überdruckes wurde die Pipette in Bad 1 eingetaucht. Der Pipettenwiderstand sollte zwischen 3 und 5 MΩ liegen, andernfalls wurde die Pipette durch eine neue ersetzt. Es folgte ein Potentialabgleich auf null. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Pipettenspitze neben der eingestellten Zelle positioniert. Langsam wurde die Spitze an die Zelloberfläche angenähert. Daraufhin wurde ein geringer Unterdruck in der Pipette erzeugt, wodurch die Zellmembran leicht in die Pipettenspitze gesaugt und abgedichtet wurde. Mit Erreichen des Giga-Seals befand man sich in der cell-attached-Konfiguration (Abb 8). Danach wurde durch erneuten leichten Sog die Zellmembran aufgebrochen, um einen Zugang zum Zellinneren herzustellen. Mit dieser Whole-cell-Konfiguration ließ sich der Strom der gesamten Zelle, d.h. die Aktivität aller Ionenkanäle, bei angelegten Membranpotentialen zwischen - 100 mV und + 60 mV in 20 mV-Schritten messen. Diese Pulsprotokolle wurden ohne, nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von DC-EBIO und nach Zugabe von 10 µM Amilorid durchlaufen. Es war eine Tiefpassfilterung von 2,5 kHz bei einer Abtastrate von 10 kHz eingestellt. Allerdings konnte es bei Whole-cell-Messungen zum Verlust von intrazellulären Faktoren und Austausch mit der Pipettenlösung kommen, sodass die Haltbarkeit der Zelle und die Verwertbarkeit der Messergebnisse auf eine kurze Zeit begrenzt waren (Penner 1995).

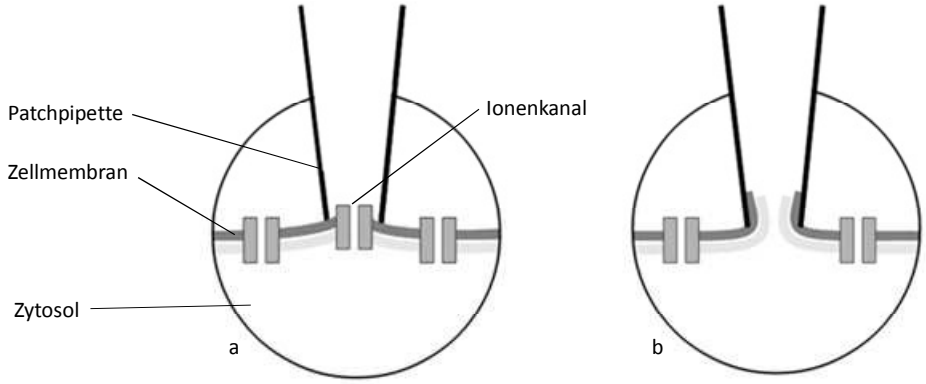

Abb 8 Schematische Darstellung der angewendeten Patch-clamp-Konfigurationen (modifiziert nach Korbmacher et al. 2005)
(a) stellt die cell-attached-Konfiguration dar. Durch leichten Unterdruck wird die Zellmembran angesaugt, der Membranfleck (patch) ist gegenüber der Badlösung elektrisch abgedichtet. Der durch einen oder mehrere Ionenkanäle im patch fließende Strom kann gemessen werden. (b) Durch erneuten leichten Sog wird die Zellmembran im patch aufgebrochen. In dieser Whole-cell-Konfiguration lässt sich der Strom der gesamten Zelle messen.

Für Einzelkanalmessungen (Single-channel-Messungen) wurden Quartzglaspipetten mit Pip 2 gefüllt, bei einem Pipettenwiderstand zwischen 5 und 10 MΩ. Nach Erreichen des Giga-Seals in der cell-attached-Konfiguration wurde Bad 1 gegen Badlösung 2 (Bad 2) ausgetauscht. Da das Membranpotential in der cell-attached-Konfiguration nicht messbar ist, wurden die Zellen durch die hohe extrazelluläre Konzentration von K^+-Ionen in Bad 2 auf ein Membranpotential von 0 mV depolarisiert (Lazrak et al. 2000a). Eine Beeinflussung der Aktivität der ENaC war nicht zu erwarten, da diese spannungsunabhängig sind. Bei einem Membranpotential von -100 mV wurden die Ströme einzelner Na^+-Kanäle ohne und nach Applikation der Benzimidazolone gemessen. Die Messungen wurden mit 2 kHz gefiltert, bei einer Abtastrate von 5 kHz.

Solange noch keine Substanzen zugegeben worden waren, konnten die A549-Zellen für ungefähr zwei Stunden für Patch-clamp-Versuche verwendet werden. Danach mussten sie durch neue ersetzt werden, da nach dieser Zeit nicht mehr die physiologischen Zelleigenschaften gewährleistet waren. Nach jeder Patch-clamp-Messung mit Substanzzugabe wurden die Zellen ausgetauscht und durch neue ersetzt.

Ebenso wurden die Schläuche, über die die Messsubstanzen appliziert wurden, nach jeder Messung gespült.

2.5 Auswertung

2.5.1 Auswertung der Ussing-Kammer-Messungen

Über das Programm Aquire & Analyze (Physiologic Instruments, USA) wurden die Messungen aufgezeichnet. Die Werte für Strom, Spannung, Gewebeleitfähigkeit und Widerstand konnten in Excel exportiert werden. Hierüber erfolgte die Erstellung von Abbildungen. I_{amil}, I_{ouab}, I_{tram} und I_{ampho} wurden nach der jeweiligen verwendeten Substanz (Amilorid, Ouabain, Tram34 oder Amphotericin B) allgemein wie folgt berechnet:

$$I_{Substanz} = \text{maximaler } I_{SC} \text{ - } (I_{SC} \text{ nach Substanz-Zugabe})$$

Abweichend hiervon wurde I_{max} berechnet mit:

$$I_{max} = \text{maximaler } I_{SC} \text{ - } I_{SC} \text{ (base)}$$

Ein positiv gemessener I_{SC} entspricht dabei einem Kationen-Nettostrom von apikal nach basolateral, bzw. einem Anionen-Nettostrom von basolateral nach apikal. Dieser lumennegative Einwärtsstrom wird in den Abbildungen als positiver Ausschlag nach oben dargestellt (Fronius 2003).

Für die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen wurde der relative Stromanstieg gegen die logarithmisch dargestellte Konzentration aufgetragen. Dabei wurde die Kurve unter Verwendung des Programmes Igor Pro (Wave Metrics, Inc, USA) mit der folgenden Hill-Gleichung erstellt:

$$E = 1 + \frac{E_{max} - 1}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{c}\right)^{h}}$$

E: Effekt
E_{max}: maximal erreichter Effekt
EC_{50}: Konzentration, bei der der halbmaximale Effekt erreicht wird
c: Konzentration
h: Hill Koeffizient

2.5.2 Auswertung der Patch-clamp-Messungen

Durch die unterschiedliche Ionenverteilung in Extra- und Intrazellulärraum entsteht ein elektrochemischer Gradient an der Zellmembran. Besteht ein Gleichgewicht zwischen chemischem und elektrischem Gradienten, ist über der Membran kein Stromfluss zu messen (Umkehrpotential).

Mit der Nernst-Gleichung kann das Gleichgewichtspotential für die wichtigsten Ionen bestimmt werden:

$$V_{Ion} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[Ion]_a}{[Ion]_i} \quad [mV]$$

V_{Ion}: Gleichgewichts-/ Nernst- Potential
R: Allgemeine Gaskonstante (~ 8,3 J K^{-1} mol^{-1})
T: Temperatur in Kelvin (310 K ≈ 37 C°)
z: Ladung des Ions
F: Faraday Konstante (~ 9,6 · 10^4 C mol^{-1})
$[Ion]_a$/$[Ion]_i$: Ionenkonzentration extrazellulär (a) und intrazellulär (i) in mmol.

Die Messungen in Whole-cell-Konfiguration wurden mit dem Programm Pulsefit (HEKA) ausgewertet. Aus den Messwerten der Pulsprotokolle wurden die Mittelwerte von I ± SEM ermittelt und als I/V-Kurven aufgetragen. In den I/V-Kurven stellte sich das Umkehrpotential als Schnittpunkt der Kurven mit der x-Achse dar. Rechnerisch wurde die Gesamtzellleitfähigkeit G_{ges} aus der mittleren Steigung der Regressionsgeraden der gemessenen Strom-Spannungs-Beziehungen anhand des Ohm`schen Gesetzes ermittelt. Hieraus wurde die relative Leitfähigkeit G_{rel} ± SEM, bezogen auf die Kontrollmessungen mit $G_{rel} = 1$, bestimmt.

Mit der QUB Software (Research Foundation, State University, Buffalo, USA) wurden die charakteristischen Öffnungen des ENaC in Single-channel-Messungen analysiert. In den Stromspuren auf dem Oszillograph zeigte sich eine Kanalöffnung als negative Amplitude, bei einer Klemmspannung von -100 mV gleichbedeutend mit einem Na^+-Ionen-Einstrom. Die Stromspuren wurden mit 0,5 kHz digital nachgefiltert und mit Hilfe des Segmental k-Means Algorithmus idealisiert, um Kanalöffnungen eindeutig zu identifizieren (Qin 2004).

Anhand der unterschiedlichen Stromausschläge (Amplituden) wurde die Anzahl der jeweiligen Ereignisse (geschlossen, ein oder mehrere Kanäle geöffnet) bestimmt.

Die Einzelkanalleitfähigkeit G_s und die Offenwahrscheinlichkeit (P_o) wurde aus Amplitudenhistogrammen erstellt. G_s und deren Änderung durch Benzimidazolon-Gabe wurde mit Hilfe der unterschiedlichen Amplitudenhöhen berechnet. Mit P_o wurde der Anteil der Offenzeit eines Kanals an der Gesamtmesszeit mit Werten zwischen 0 und 1 bestimmt. Die Offenwahrscheinlichkeit im Patch (NP_o) wurde als das Produkt aus der Anzahl der Kanäle (N) und deren P_o beschrieben und wie folgt berechnet (Lazrak et al. 2000a):

$$NP_o = \sum_{i=0}^{N} i \cdot t_i / T$$

P_o: Offenwahrscheinlichkeit
N: Anzahl an Kanälen in einem Patch
t_i: Gesamtdauer während der *i* Kanäle offen sind
i Anzahl gleichzeitig geöffneter Kanäle
T: Gesamtmessdauer

2.6 Statistik

Die Anzahl der Messwerte wurde mit n angegeben. Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert ± SD (standard deviation, Standardabweichung) oder als arithmetischer Mittelwert ± SEM (Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes) angegeben. Dabei wurde der Mittelwert $\bar{x}$ folgendermaßen berechnet

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 \ldots + x_n}{n}$$

SD wurde wie folgt berechnet:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Σ: Summenzeichen
x: Messwert
$\bar{x}$: Mittelwert der Messwerte
n: Anzahl der Messwerte

SEM wurde folgendermaßen berechnet:

$$\mathrm{SEM} = \frac{\mathrm{SD}}{\sqrt{\mathrm{n}}}$$

2.6.1 Statistik Ussing-Kammer-Messungen

Aus einer Zellkultur wurden jeweils Experimente mit Benzimidazolonen und Kontrollexperimente gleichzeitig und in dem gleichen zeitlichen Ablauf durchgeführt. Ausschlusskriterium war ein $R_{te} < 200\ \Omega \cdot cm^2$.

Signifikante Unterschiede zwischen den mit Benzimidazolonen behandelten Monolayern und der Kontrollgruppe wurden durch die einfache Varianzanalyse (ANOVA) und den Dunnett-Test, ein post hoc Test, erfasst. Die Ergebnisse der Messungen von Tram34 in m-Ringer wurden mit der Zweiweg-ANOVA und dem Dunnett-Test ausgewertet.

Als Signifikanzgrenze wurde $p < 0,05$ festgelegt. Statistisch signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind mit (*) und nicht signifikante Ergebnisse mit (n.s.) gekennzeichnet.

2.6.2 Statistik Patch-clamp-Messungen

Die aus den Whole-cell-Messungen ermittelten G_{rel} wurden mit der Friedman-ANOVA und dem Dunnett-Test ausgewertet.

Mit dem Mann Whitney U-Test wurden die Amplituden, die ermittelte G_s und NP_o der Single-channel-Messungen vor und nach Zugabe der Benzimidazolone ausgewertet.

Als Signifikanzgrenze wurde $p < 0,05$ festgelegt. Statistisch signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind mit (*)und nicht signifikante Ergebnisse mit (n.s.) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Messung transepithelialer Ströme von Monolayern mit der Ussing-Kammer

In diesem Kapitel werden die Messergebnisse und Auswertungen der zuvor beschriebenen Ussing-Kammer-Technik dargestellt.

Es wurden Monolayer aus sechs verschiedenen Zellisolierungen von fetalen distalen Rattenlungenepithelzellen verwendet. Dabei betrug der durchschnittliche spezifische Epithelwiderstand (R_{te}) zu Beginn der Messungen 757 ± 231 $\Omega \cdot cm^2$ und nahm während einer Messdauer von etwa 1,5 h kontinuierlich ab. Am Ende der Messungen wurde ein durchschnittlicher R_{te} von 476 ± 168 $\Omega \cdot cm^2$ gemessen.

3.1.1 Wirkung der Benzimidazolone auf den I_{SC}

Zunächst wurde die Wirkung von 1-EBIO, DC-EBIO, Chlorzoxazon (CLZ) und Riluzol (RLZ) auf den Verlauf des Kurzschlussstromes I_{SC} in der m-Ringer-Lösung im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet.

Abb 9 zeigt den Verlauf einer Originalmessreihe mit Zugabe von DC-EBIO. Dargestellt sind die Werte für I_{SC} und R_{te} im zeitlichen Verlauf. Durch DC-EBIO-Applikation ist deutlich ein anhaltender Anstieg des I_{SC} zu erkennen. Der jeweilige transiente Abfall des I_{SC} nach DC-EBIO-Applikation stellt einen unvermeidbaren Artefakt nach Substanzzugabe dar. Dieser wurde jedoch nicht weiter untersucht, um sich auf die anhaltenden Effekte durch DC-EBIO zu konzentrieren.

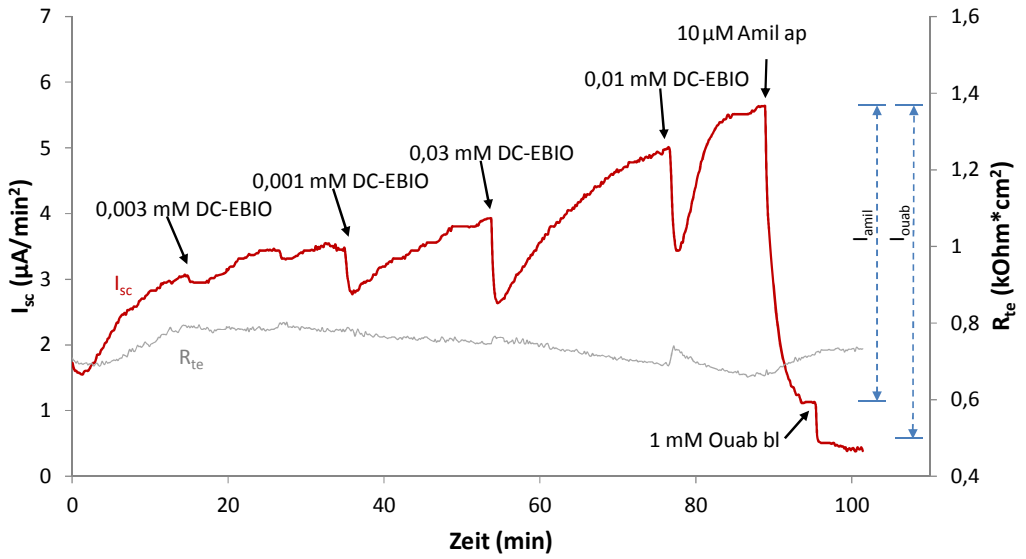

Abb 9 Originalmessreihe m-Ringer-Lösung. Dargestellt sind die Werte im zeitlichen Verlauf (min) für den Kurzschlussstrom I_{SC} (µA/cm², rote Spur) und den spezifischen transepithelialen Widerstand R_{te} (kOhm · cm², graue Spur). DC-EBIO wurde in aufsteigenden Konzentrationen apikal (ap) und basolateral (bl) appliziert. Gegen Ende wurden 10 µM Amilorid (Amil) ap hinzugegben. Nach Stabilisierung des I_{SC} wurde anschließend 1 mM Ouabain (Ouab) bl zugegeben. Durch die Doppelpfeile soll gezeigt werden, aus welchen I_{SC}-Werten der Amilorid-sensitive Strom (I_{amil}) und der Ouabain-sensitive Strom (I_{ouab}) ermittelt wurden.

In die weitere Auswertung gingen der Ausgangswert von I_{SC} (base) und die Gleichgewichtswerte nach Applikation der Benzimidazolone ein. Die Benzimidazolone wurden in den in Tab 5 angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Dabei wurden sie jeweils gleichzeitig auf der apikalen und basolateralen Seite der Epithelmonolayer zugegeben.

Tab 5 Applizierte Konzentrationen von 1-EBIO, DC-EBIO, Chlorzoxazon und Riluzol, in mM

1-EBIO (mM)	DC-EBIO (mM)	Chlorzoxazon (mM)	Riluzol (mM)
0,1	0,003	0,1	0,01
0,3	0,01	0,3	0,03
1	0,03	1	0,1
3	0,1		0,3
	0,3		

Der I_{SC}-Wert nach Gabe der jeweils höchsten Konzentration von 1-EBIO (3 mM), DC-EBIO (0,3 mM), CLZ (1 mM) und RLZ (0,3mM) wurde im Diagramm als max I_{SC} dargestellt. Als letztes wurde I_{SC} nach Gabe von 10 µM Amilorid (amil) und 1 mM Ouabain (ouab) gemessen. Einen Überblick über die gemessenen I_{SC}-Werte gibt Abb 10.

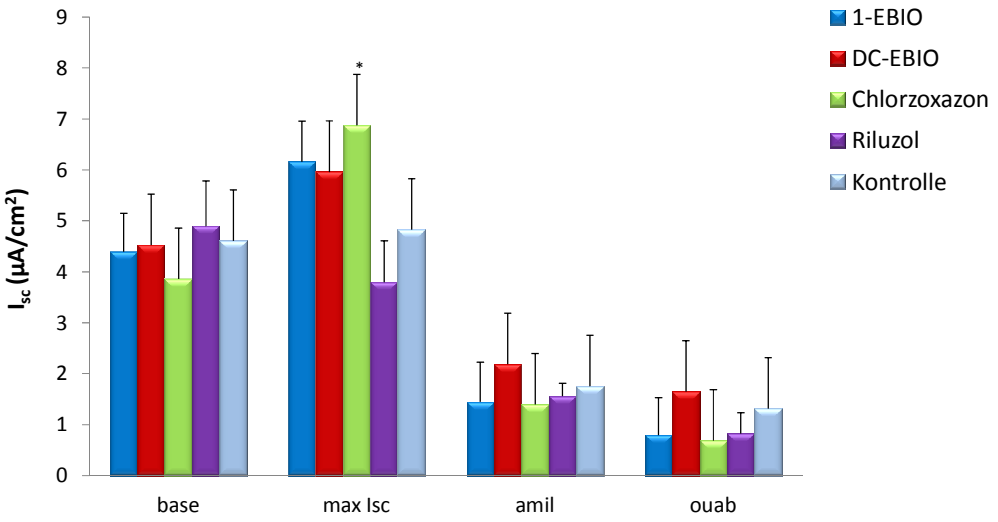

Abb 10 Vergleichende Darstellung der Änderungen des transepithelialen Stromes (I_{SC}) in m-Ringer-Lösung in Ussing-Kammer-Messungen. Angegeben sind die I_{SC}-Werte ± SD zu Beginn der Messung (base), in der Plateau-Phase nach der größten Dosis der verabreichten Substanzen (max I_{SC}), nach Gabe von Amilorid (amil) und nach Gabe von Ouabain (ouab). Im Vergleich dazu sind die Werte der Kontrollgruppe angegeben. Statistisch signifikante Werte gegen die Kontrolle sind gekennzeichnet mit (*) für $p < 0,05$.

In der einfachen Varianzanalyse ergab sich für max I_{SC} zwischen allen Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,015$). Betrachtet man den Kurvenverlauf von I_{SC}, war ein tendenzieller Anstieg des I_{SC} (max I_{SC}) nach Gabe von 1-EBIO ($6,2 \pm 0,8$ µA/cm², $n = 4$, n.s.) und DC-EBIO ($6,0 \pm 1,9$ µA/cm², $n = 6$, n.s.) im Vergleich zur Kontrolle ($4,8 \pm 1,7$ µA/cm², $n = 18$) zu messen. Nur nach Gabe von CLZ ($6,9 \pm 1,6$ µA/cm², $n = 5$, $*p < 0,05$) war der Anstieg des I_{SC} im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant. Im Gegensatz dazu konnte ein leichter Rückgang des I_{SC} nach Gabe von RLZ ($3,8 \pm 0,8$ µA/cm², $n = 6$, n.s.) gemessen werden.

Durch apikale Amiloridgabe (10 µM) sollte der Natriumstromanteil von I_{SC} bestimmt werden. Hier zeigte sich eine deutliche Verringerung des I_{SC} in allen Monolayern, in Abb 10 dargestellt in Block amil.

Anschließend wurde Ouabain (1 mM) zur Hemmung der Na^+, K^+-ATPase auf der basolateralen Seite zugegeben. Hier zeigte sich ein weiterer Rückgang des I_{SC}, in Abb 10 dargestellt in Block ouab.

Um den durch apikale Amilorid-sensitive Na^+-Kanäle getragenen Strom besser zu erfassen, wurde der Amilorid-sensitive I_{SC} (I_{amil}) nach der in Kapitel 2.3.7 beschriebenen Formel ermittelt und in Abb 11 dargestellt. Ebenso erfolgte mit Hilfe des Ouabain-sensitiven I_{SC} (I_{ouab}) eine Berechnung aller aktiven, durch die Na^+, K^+-ATPase angetriebenen Transportprozesse.

In der einfachen Varianzanalyse ergab sich für I_{amil} zwischen allen Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied (p = 0,001). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (3,1 ± 1,0 µA/cm^2, n = 18) war I_{amil} nach Gabe von 1-EBIO (5,1 ± 0,7 µA/cm^2, n = 4, *p < 0,05) erhöht. DC-EBIO (4,0 ± 1,5 µA/cm^2, n = 6, n.s) und CLZ (4,3 ± 1,1 µA/cm^2, n = 5, n.s.) zeigten tendenziell erhöhte Werte. Nach Gabe von RLZ (2,4 ± 0,7 µA/cm^2, n = 5, n.s.) zeigte sich tendenziell ein verringerter Wert.

In der einfachen Varianzanalyse ergab sich für I_{ouab} zwischen allen Gruppen ebenso ein statistisch signifikanter Unterschied (p = 0,002). I_{ouab} war im Vergleich zur Kontrollgruppe (3,5 ± 0,9 µA/cm^2, n = 17) nach Gabe von 1-EBIO (5,7 ± 0,6 µA/cm^2, n = 4, *p < 0,05), und CLZ (5,0 ± 1,2 µA/cm^2, n = 5, *p < 0,05) erhöht. Nach DC-EBIO-Gabe (4,6 ± 1,6 µA/cm^2, n = 6, n.s.) zeigte sich I_{ouab} im Trend erhöht, nach RLZ (3,1 ± 0,8 µA/cm^2, n = 4, n.s.) zeigte sich wieder ein tendenziell verringerter Wert.

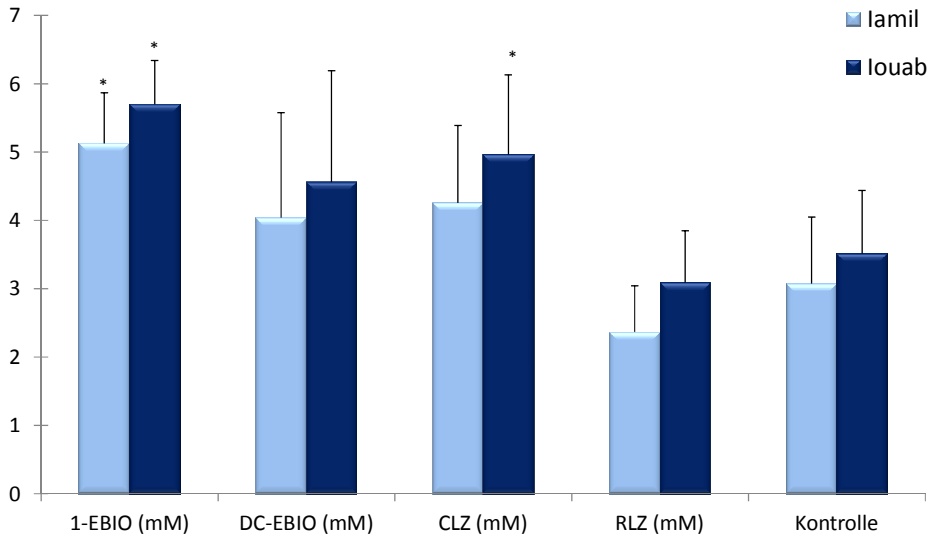

Abb 11 Zusammenfassende Darstellung der Amilorid- und Ouabain-sensitiven transepithelialen Ströme (I_{amil} und I_{ouab}) in m-Ringer-Lösung in Ussing-Kammer-Messungen. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD (Standardabweichung). Ein Anstieg von I_{amil} und I_{ouab} zeigte sich nach Gabe von 1-EBIO, DC-EBIO und CLZ (Chlorzoxazon). Nach Gabe von RLZ (Riluzol) zeigte sich jedoch ein Rückgang. Vergleichend sind die Werte der Kontrollgruppe dargestellt. Statistisch signifikante Werte gegen die Kontrolle sind gekennzeichnet mit (*) für p < 0,05.

Der mittlere Verlauf der R_{te} während der beschriebenen Messungen mit m-Ringer-Lösung ist in Abb 12 angegeben. Zwischen dem ersten (base) und dem höchsten I_{SC} Messwert (max I_{SC}) waren durchschnittlich 1,5 Stunden vergangen. In dieser Zeit sank der Widerstand kontinuierlich, auch bei den unbehandelten Kontrollmonolayern. Niedrigste Werte für R_{te} waren jedoch nach Zugabe von RLZ zu beobachten.

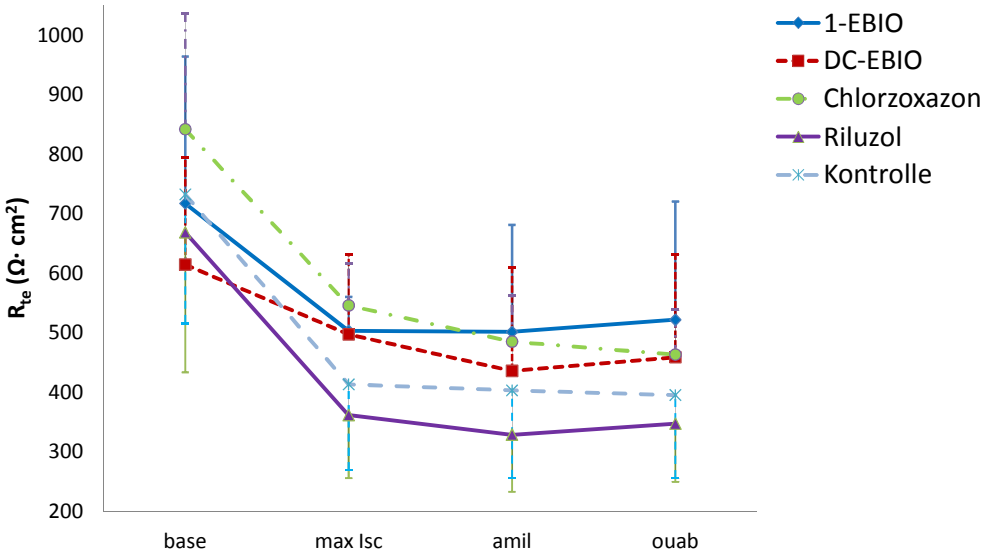

Abb 12 Vergleichende Darstellung der Änderungen des transepithelialen Widerstandes (R_{te}).
Angegeben sind die Werte für R_{te} zu Beginn der Messung (base), in der Plateau-Phase nach der höchsten Dosis der verabreichten Substanzen (max I_{SC}), nach Gabe von Amilorid (amil) und nach Gabe von Ouabain (ouab). Im Vergleich dazu sind die Werte der Kontrollgruppe angegeben. Zur besseren Übersicht wurden entweder die positiven oder negativen SD-Werte eingezeichnet.

Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen wurden für 1-EBIO und DC-EBIO bestimmt und durch die Kurven in Abb 13 dargestellt. Der relative Stromanstieg ergab sich durch Normalisierung der Amilorid-sensitiven I_{SC} für die jeweiligen I_{SC}-Werte einer Messreihe durch den minimalen I_{amil} der Messreihe.

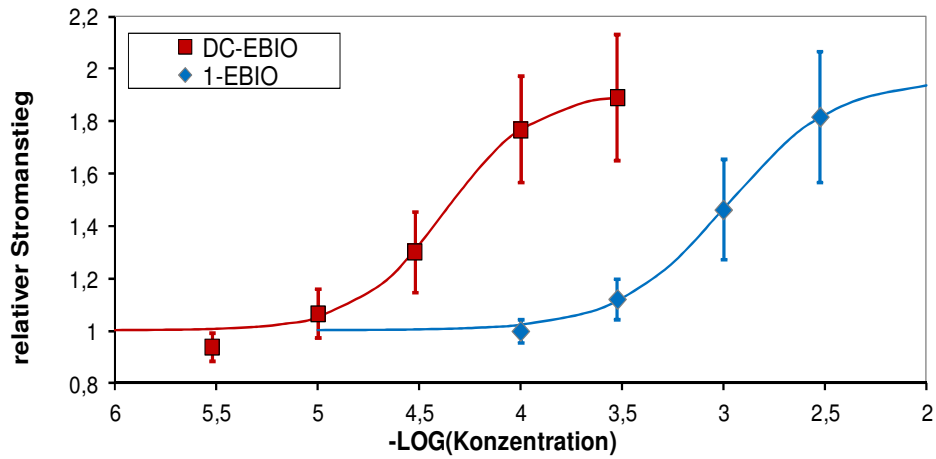

Abb 13 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von 1-EBIO (n = 6) und DC-EBIO (n = 12) auf den Amilorid-sensitiven Strom in Monolayern aus fetalen distalen Alveolarepithelzellen. Der relative Stromanstieg ist gegen die logarithmisch dargestellte Konzentration aufgetragen. Angegeben sind die Mittelwerte für den relativen Stromanstieg im Vergleich zur Kontrolle ± SEM.

Anhand der in Kapitel 2 beschriebenen Hill-Gleichung ließen sich daraus die in Tab 6 zusammengefassten Werte ermitteln.

Tab 6 Aus den Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für 1-EBIO und DC-EBIO ermittelteWerte.
EC_{50} = Konzentration des halbmaximalen Effektes, E_{max} = maximaler Effekt (1.0 = Kontrolle),
h = Hill Koeffizient (Steilheit der Kurve).

	EC_{50}	**E_{max}**	**h**
1-EBIO	0,97 ± 0,23 mM	1,92 ± 0,11	1,8 ± 0
DC-EBIO	43 ± 5,3 µM	1,91 ± 0,05	1,96 ± 0,37

3.1.2 Wirkung von Tram34 auf den I_{SC}

In dieser Versuchsreihe mit m-Ringer-Lösung sollte getestet werden, ob der I_{SC}-Anstieg durch Benzimidazolone über K^+-Kanäle vermittelt war. In diesem Fall müsste in Monolayern, die zuvor Benzimidazolone erhalten haben, I_{tram} größer als in Kontrollmonolayern sein.

Zunächst wurde mit Tram34 der Anteil des K^+-Stroms über den IK am I_{SC} bestimmt. Dazu wurde 0,1 mM DC-EBIO in die apikale und basolaterale Kammer gegeben. Nach Erreichen der Plateau-Phase wurde 1 µM Tram34 apikal und basolateral zugegeben. Die Kontrollmonolayer wurden zur selben Zeit mit Tram34 behandelt.

In Abb 14 ist der Verlauf des I_{SC} und R_{te} während einer Messung gezeigt.

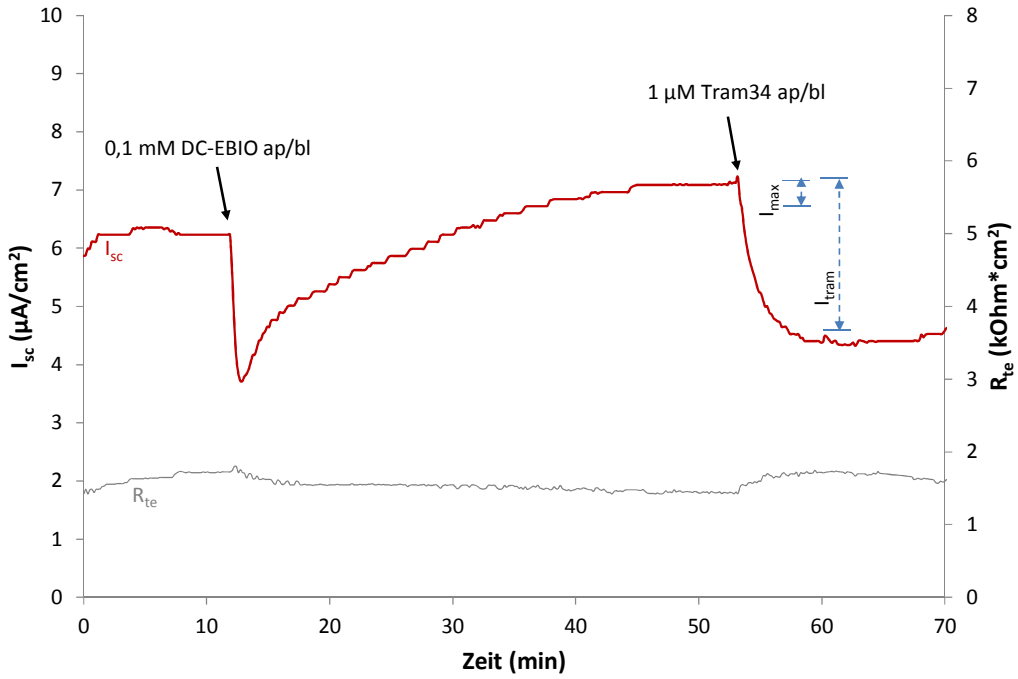

Abb 14 Originalmessreihe Tram 34 in m-Ringer-Lösung. Dargestellt sind die Werte im zeitlichen Verlauf (min) für den Kurzschlussstrom I_{SC} (µA/cm², rote Spur) und den spezifischen transepithelialen R_{te} (kOhm · cm², graue Spur). Nach Zugabe von 0,1 mM DC-EBIO apikal (ap) und basolateral (bl) wurde in der Plateauphase 1µM Tram34 ap und bl appliziert. Durch die Doppelpfeile soll gezeigt werden, aus welchen I_{SC}-Werten der Tram34-sensitive Strom (I_{ampho}) und I_{max} ermittelt wurden.

Um die alleinige Wirkung von Tram34 auf den I_{SC} nach Gabe von DC-EBIO im Vergleich zu Kontrollmonolayern zu betrachten, wurden I_{tram} und I_{max} (s. Kapitel 2.3.7) bestimmt.

Dargestellt sind die Ergebnisse in Abb 15 als Mittelwerte ± SEM. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied von I_{tram} nach vorheriger DC-EBIO-Gabe im Vergleich zu Kontrollmonolayern.

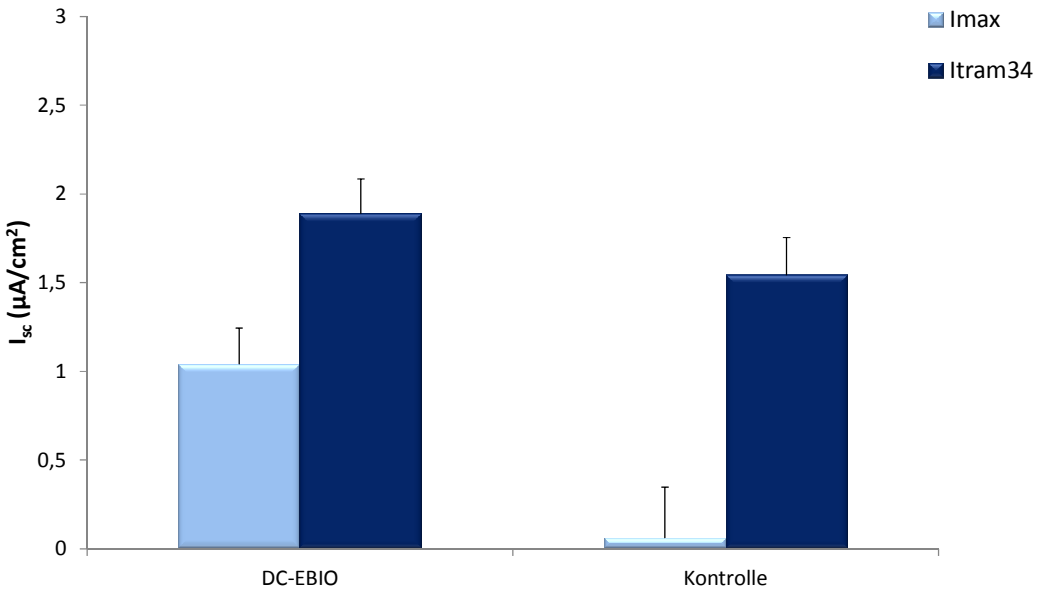

Abb 15 Zusammenfassende Darstellung der alleinigen I_{SC}-Zunahme nach 0,1 mM DC-EBIO-Applikation (I_{max}) und der Tram34-sensitiven transepithelialen Ströme (I_{tram}) in m-Ringer Lösung. Im Vergleich dazu sind I_{max} und I_{tram} der Kontrollgruppe dargestellt. Angegeben sind die Werte für I_{tram} nach Gabe von 1 µM Tram34. Dargestellt sind I_{max} und I_{tram} als Mittelwerte ± SEM. Die Unterschiede sind nicht statistisch signifikant.

Weitere Versuche dieser Art wurden mit UCL1684 durchgeführt. Nach apikaler und basolateraler Gabe von 100 nM UCL1684 zeigte sich jedoch keine Veränderung des I_{SC}, weder in den mit DC-EBIO behandelten Monolayern noch in den Kontrollmonolayern. Letztendlich konnte mit keinem K^+-Kanal-Blocker eine Interaktion mit den Effekten der Benzimidazolone nachgewiesen werden.

3.1.3 Messung mit K^+-Gradient

In einer weiteren Versuchsreihe wurde mit dem in Kapitel 2 beschriebenen K^+-Gradienten gearbeitet, um eine Beteiligung von K^+-Kanälen an den Benzimidazolon-Effekten nachzuweisen.

Mit I_{ouab} konnte die Aktivität der basolateralen Na^+, K^+-ATPase bestimmt werden. Diese ist jedoch auch vom apikalen Na^+-Transport via ENaC und anderer Na^+-Kanäle abhängig. Durch die Permeabilisation der apikalen Membran mit 10 µM Amphotericin B wurde dieser mögliche limitierende Faktor umgangen (Thome et al. 2003). Es kam zu einem initialen Anstieg des I_{SC}. Danach wurden in aufsteigender Konzentration 1-EBIO (0,1 mM, 0,3 mM, 1mM, 3 mM), DC-EBIO (0,003 mM, 0,01 mM, 0,03 mM, 0,1 mM),

CLZ (0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM, 3 mM) oder RLZ (0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM) in beide Kammern zugegeben. Mit Erreichen der Plateauphase nach der letzten Konzentration wurde 1 µM Tram34 apikal und basolateral zugegeben, um durch Hemmung des IK dessen Anteil an I_{SC} zu definieren.

In Abb 16 wird der Versuchsablauf beispielhaft an einer Messung mit DC-EBIO-Gabe gezeigt. Dargestellt sind der I_{SC}- und R_{te}-Verlauf und die applizierten Substanzen.

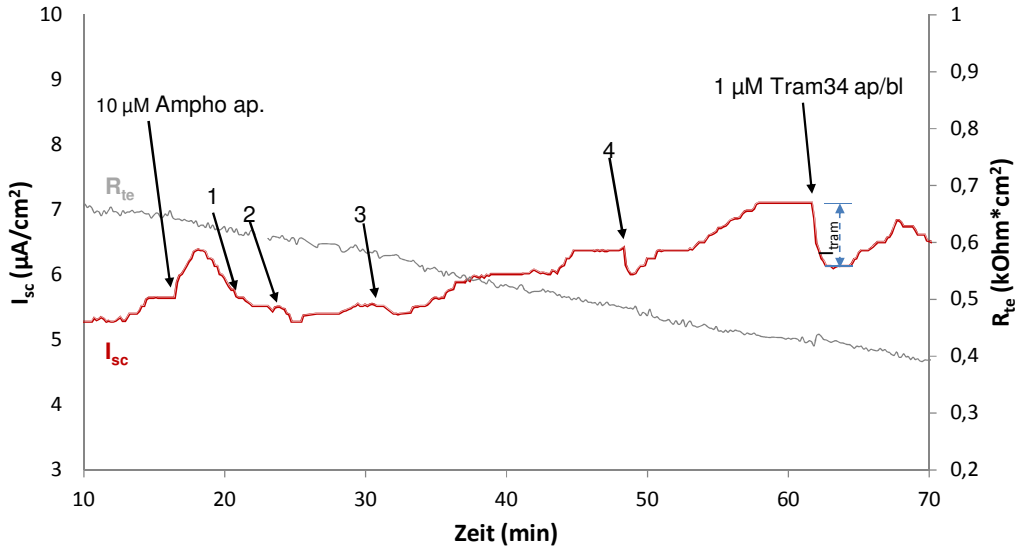

Abb 16 Originalmessreihe K^+-Gradient. Dargestellt sind die Werte im zeitlichen Verlauf (min) für den Kurzschlussstrom I_{SC} (µA/cm², rote Spur) und den spezifischen transepithelialen Widerstand R_{te} (kOhm · cm², graue Spur). Nach Zugabe von 10 µM Amphotericin B (Ampho) apikal (ap) wurde nacheinander DC-EBIO in den Konzentrationen 0,003 mM (1), 0,01 mM (2), 0,03 mM (3), 0,1 mM (4) ap und basolateral (bl) appliziert. In der letzten Plateauphase wurde 1µM Tram34 ap und bl zugegeben. Durch den Doppelpfeil soll gezeigt werden, aus welchen I_{SC}-Werten der Tram34-sensitive Strom (I_{tram}) ermittelt wurde.

Um die alleinige Wirkung von Tram34 auf den I_{SC} nach Benzimidazolon-Gabe im Vergleich zu Kontrollmonolayern zu betrachten, wurde I_{tram} nach der in Kapitel 2.3.7 beschriebene Formel bestimmt. Die Ergebnisse der Mittelwerte ± SD sind in Abb 17 zusammengefasst. Folgende Werte wurden für I_{tram} ermittelt: für 1-EBIO 0,38 ± 0,04 µA/cm² (n = 4), DC-EBIO 0,63 ± 0,28 µA/cm² (n = 5), CLZ 0,48 ± 0,21 µA/cm² (n = 6) und RLZ 0,57 ± 0,18 µA/cm² (n = 6) im Vergleich zur Kontrolle mit 0,59 ± 0,21 µA/cm² (n = 11). In der einfachen Varianzanalyse ergab sich für I_{tram} zwischen allen Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied (p = 0,322). Monolayer, die nach Amphotericin B-Gabe mit 1-EBIO, DC-EBIO, CLZ oder RLZ behandelt wurden, zeigten somit keine statistisch signifikante Änderung des I_{tram} verglichen mit den Kontrollmonolayern.

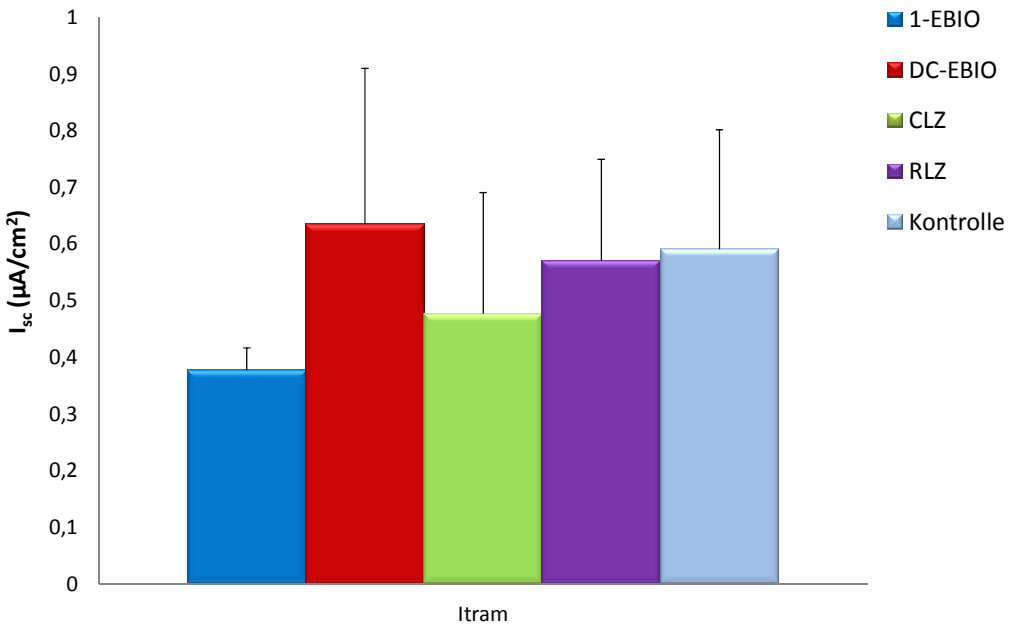

Abb 17 Zusammenfassende Darstellung der Tram 34-sensitiven transepithelialen Ströme (I_{tram}) in K^+-Gradient Lösung. Angegeben sind die Werte für I_{tram} nach Gabe von 1-EBIO, DC-EBIO, CLZ (Chlorzoxazon) und RLZ (Riluzol) als Mittelwerte ± SD (Standardabweichung). Vergleichend sind die Werte der Kontrollgruppe dargestellt.

Nach Tram34 sollte auch ein SK-Blocker getestet werden. Dazu wurde nach demselben Versuchsprotokoll 10 nM Scyllatoxin apikal und basolateral zugegeben. Diese Versuche wurden allerdings bereits nach sechs Messungen beendet, da kein Effekt auf den I_{SC}-Verlauf zu erkennen war.

3.1.4 Messung der apikalen Na^+-Permeabilität

Hierfür wurden die in Kapitel 2 beschriebenen Na^+-Gradient-Lösungen mit einem Na^+-Gradient 145:5 mM von apikal nach basolateral in Kombination mit basoteral appliziertem Amphotericin B verwendet. Dadurch konnte der Amilorid-sensitive Strom unabhängig von der Aktivität der Na^+, K^+-ATPase gemessen werden.

Abb 18 zeigt den Verlauf einer Originalmessreihe mit Zugabe von 1-EBIO. Dargestellt sind die Werte für I_{SC} und R_{te} im zeitlichen Verlauf.

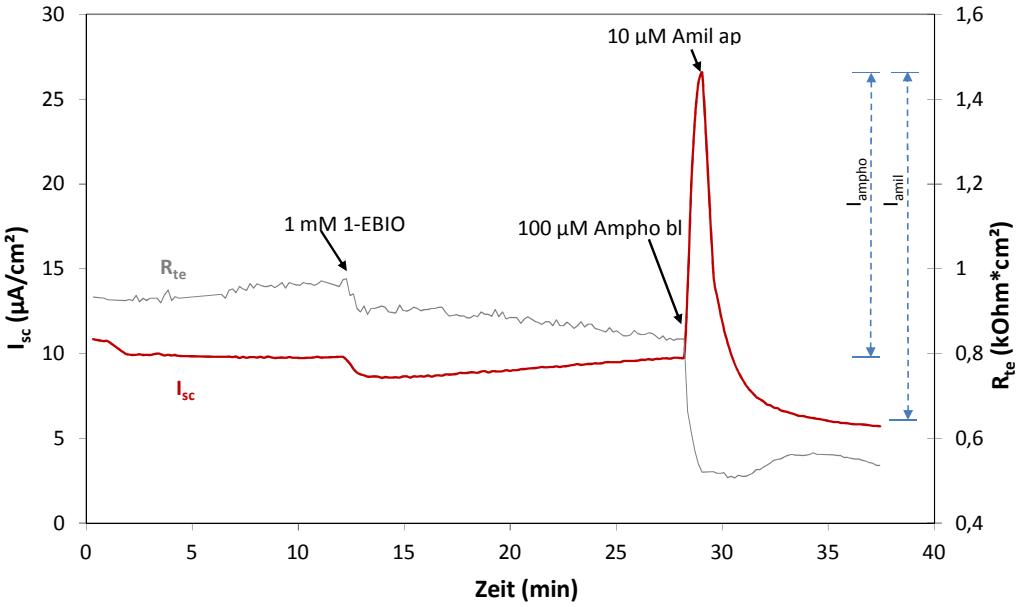

Abb 18 Originalmessreihe Na^+-Gradient. Dargestellt sind die Werte im zeitlichen Verlauf (min) für I_{SC} (µA/cm², rote Spur) und R_{te} (kOhm · cm², graue Spur). Nach Zugabe von 1 mM 1-EBIO apikal (ap) wurde 100 µM Amphotericin B (Ampho) basolateral (bl) appliziert. Sofort nach Erreichen des maximalen I_{SC}-Anstiegs wurde 10 µM Amilorid (Amil) apikal zugegeben. Durch die Doppelpfeile soll gezeigt werden, aus welchen I_{SC}-Werten der Amphotericin B-induzierte Strom (I_{ampho}) und der Amilorid-sensitive Strom (I_{amil}) ermittelt wurden.

Zu Beginn der Messung wurde I_{SC} (base) bestimmt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1-EBIO (1 mM), DC-EBIO (0,1 mM), CLZ (1 mM) und RLZ (0,3mM). Im Vergleich zu den Kontrollmonolayern kam es zu keinen signifikanten Änderungen des max I_{SC}, dargestellt in Abb 19.

Im nächsten Schritt wurde 100 µM Amphotericin B in die basolaterale Kammer appliziert. Dadurch wurde die Permeabilität der basolateralen Membran für Na^+ und K^+ sehr stark erhöht, sodass die Na^+, K^+-ATPase ausgeschaltet und eine freie Beweglichkeit für Kationen hergestellt wurde. Es kam dadurch zu einem starken Anstieg des I_{SC}.

Sobald sich nach Amphotericin B-Gabe kein weiterer Anstieg des I_{SC} andeutete, wurde 10 µM Amilorid apikal appliziert. Daraus resultierte ein schneller I_{SC}-Rückgang. Zusammenfassend sind die gemessenen I_{SC}-Werte in Abb 19 dargestellt. In der einfachen Varianzanalyse ergab sich für I_{SC} nach Amphotericin B-Gabe zwischen allen Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0{,}001$), sowie für I_{SC} nach Amilorid-Gabe zwischen allen Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0{,}018$).

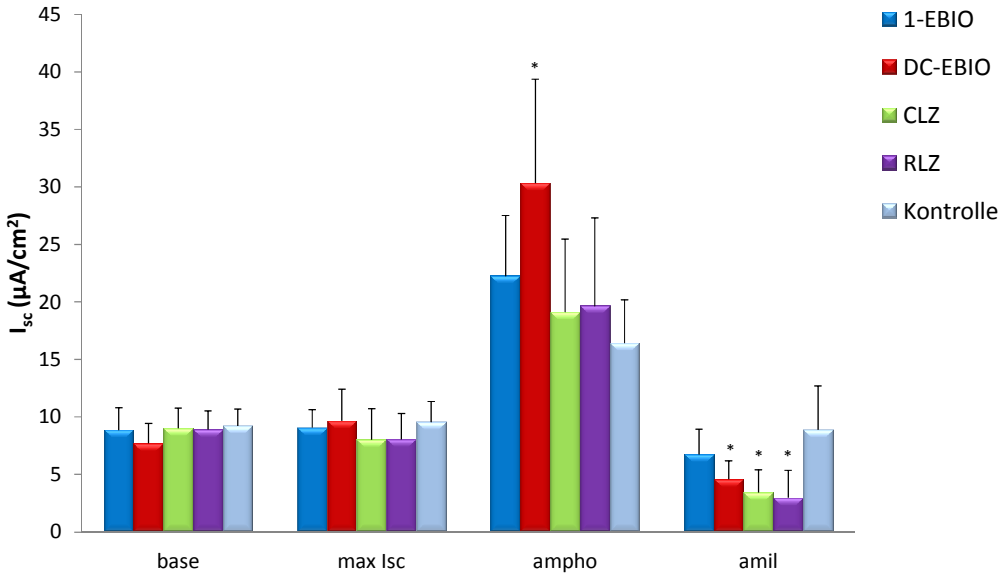

Abb 19 Vergleichende Darstellung der Änderungen des transepithelialen Stromes (I_{SC}) in Na^+-Gradient-Lösung. Angegeben sind die I_{SC}-Werte ± SD zu Beginn der Messung (base), in der Plateau-Phase nach Verabreichen der Substanzen (max I_{SC}), nach Gabe von Amphotericin B (ampho) und nach Gabe von Amilorid (amil). Im Vergleich dazu sind die Werte der Kontrollgruppe angegeben. Statistisch signifikante Werte gegen die Kontrolle sind gekennzeichnet mit (*) für $p < 0,05$.
CLZ: Chlorzoxazon, RLZ: Riluzol, SD: Standardabweichung

Um nur die Änderung des I_{SC} zu beurteilen, wurde I_{ampho} und I_{amil} wieder nach der in Kapitel 2.3.7 beschriebenen Formel berechnet und in Abb 20 graphisch dargestellt.

In der einfachen Varianzanalyse ergab sich für I_{ampho} nach Amphotericin B-Gabe zwischen allen Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$).Im Vergleich zur Kontrollgruppe (6,9 ± 3,2 µA/cm², n = 13) zeigte I_{ampho} nach Gabe von 1-EBIO (13,2 ± 3,8 µA/cm², n = 5, *$p < 0,05$), DC-EBIO (20,7 ± 6,4 µA/cm², n = 3, *$p < 0,05$) und CLZ (11,1 ± 4,4 µA/cm², n = 12, *$p < 0,05$) signifikant erhöhte Werte. Nach RLZ-Gabe (11,6 ± 6,1 µA/cm², n = 11, *$p < 0,05$) zeigten sich ebenfalls erhöhte Werte. Durch die Gabe von 1-EBIO, DC-EBIO, CLZ und RLZ kam es somit zu einer erhöhten Permeabilität der apikalen Zellmembran für Na^+.

In der einfachen Varianzanalyse ergab sich für I_{amil} nach Amilorid-Gabe zwischen allen Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Für I_{amil} ergaben sich im Vergleich zur Kontrollgruppe (7,5 ± 2,7 µA/cm², n = 13) erhöhte Werte nach Gabe von 1-EBIO (15,5 ± 4,7 µA/cm², n = 5, *$p < 0,05$) und DC-EBIO (25,7 ± 7,5 µA/cm², n = 3, *$p < 0,05$). Tendenziell erhöhte Werte für I_{amil} zeigten sich nach Gabe von CLZ (15,7 ± 5,5 µA/cm², n = 12, n.s.) und RLZ (16,7 ± 7,9 µA/cm², n = 11, n.s.). Damit ergaben sich für den Amilorid-sensitiven I_{SC} signifikant erhöhte Werte durch die vorherige

Gabe von 1-EBIO und DC-EBIO. Aufgrund des hohen Na^+-Gradienten kam es zu einem starken Anstieg des Amilorid-sensitiven I_{SC}.

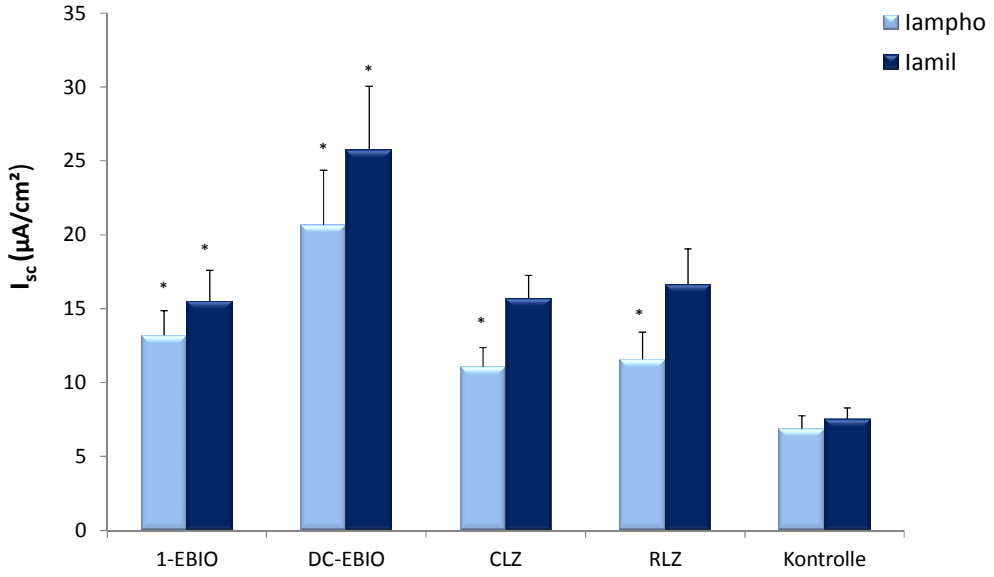

Abb 20 Zusammenfassende Darstellung der Amphotericin B-induzierten und Amilorid-sensitiven transepithelialen Ströme (I_{ampho} und I_{amil}) in Na^+-Gradient Lösung. Angegeben sind die Werte für I_{ampho} und I_{amil} nach Gabe von 1-EBIO, DC-EBIO, CLZ (Chlorzoxazone) und RLZ (Riluzole) als Mittelwerte ± SD (Standardabweichung). Vergleichend sind die Werte der Kontrollgruppe dargestellt. Statistisch signifikante Werte gegen die Kontrolle sind gekennzeichnet mit (*) für $p < 0,05$.

3.2 Messungen mit der Patch-clamp-Technik

3.2.1 Whole-cell-Messungen

Wie bereits beschrieben, kann mit Whole-cell-Messungen der Gesamtstrom einer Zelle bei unterschiedlichen Spannungen abgeleitet werden. An A549-Zellen sollte möglichst spezifisch der Amilorid-sensitive Na^+-Strom über ENaC gemessen werden. Deshalb enthielt Badlösung 1 hauptsächlich Na^+ als membrangängiges Ion (s. Tab 4). Pipettenlösung 1, die in der Whole-cell-Messung die intrazelluläre Ionenkonzentration festlegt, enthielt ebenso eine hohe Na^+-Konzentration. Durch das gleichzeitige Fehlen von K^+-Ionen konnte ein Strom über störende K^+-Kanäle ausgeschaltet werden.

Nach dem erfolgreichen Herstellen eines Gigaseals und Eröffnung des Patches wurden die Ströme in neun Messschritten bei Membranpotentialen von - 100 mV bis + 60 mV gemessen. Bei stabil bleibendem Gigaseal wurden an derselben Zelle in aufsteigender Reihenfolge verschiedene DC-EBIO-Konzentrationen (0,01 mM, 0,03 mM, 0,1 mM,

0,3 mM) verabreicht und die Messung jeweils wiederholt. Abschließend erfolgte die Zugabe von 10 µM Amilorid. In Abb 21 sind entsprechende Stromspuren einer Kontrollmessung und nach Gabe von 0,3 mM DC-EBIO gezeigt. Dabei ist eine deutliche Zunahme der Amplituden der Zellströme I (pA) zu erkennen.

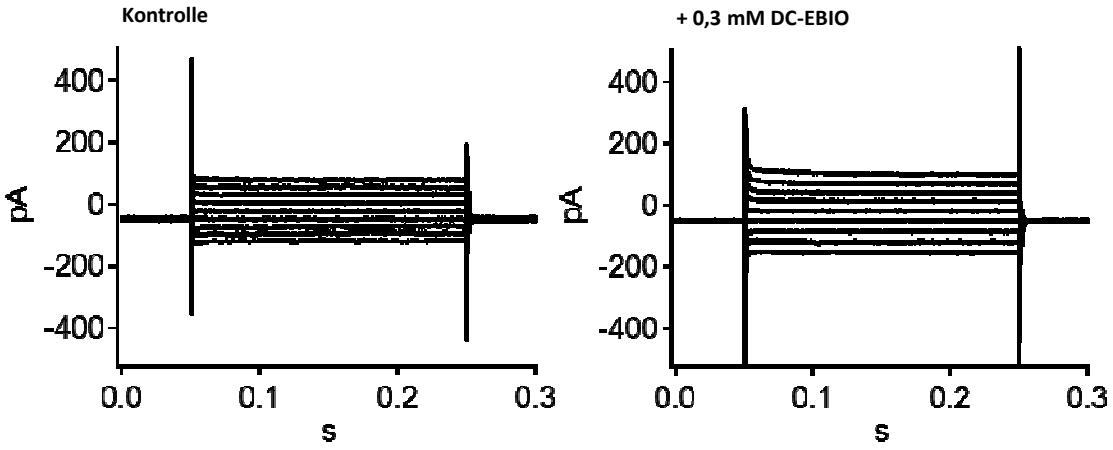

Abb 21 Zusammenfassende Darstellung von Whole-cell-Messungen im Patch-clamp nach Durchlaufen eines Pulsprotokolls. Vergleichend dargestellt sind die gemessenen Ströme in pA bei den Membranpotentialen – 100,- 80, - 60, - 40, - 20, 0, + 20, + 40 und + 60 mV in der Kontrolle und nach Gabe von 0,3 mM DC-EBIO. Auf der x-Achse ist die Zeit in Sekunden (s) aufgetragen.

Ein Strom-Spannungs-Diagramm (Abb 22) zeigt die verschieden I/V-Kurven erstellt aus den Mittelwerten der gemessenen Stromwerte I (pA) ± SEM bei angelegter Spannung V_m (mV) für die Kontrollmessungen ohne (n = 7), nach Zugabe von DC-EBIO in den Konzentrationen 0,01 mM (n = 7), 0,03 mM (n = 7), 0,1 mM (n = 7), 0,3 mM (n = 5) und nach Amilorid-Zugabe (n = 4).

Dabei ist ein annähernd linearer Verlauf der I/V-Kurven zu erkennen, so dass keine spannungsabhängigen Kanäle beteiligt waren. Durch DC-EBIO-Applikation kam es zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung von G, erkennbar an der zunehmenden Steigung der I/V-Kurven. Diese Leitfähigkeitserhöhung war fast vollständig Amilorid-sensitiv, da die I/V-Kurven vor DC-EBIO und nach Amilorid-Gabe einen fast identischen Verlauf zeigen.

Das Umkehrpotential liegt bei ungefähr -5 mV, entsprechend einem V_{Na} bei annähernd gleich hoher Na^+-Ionen-Konzentration extra- und intrazellulär.

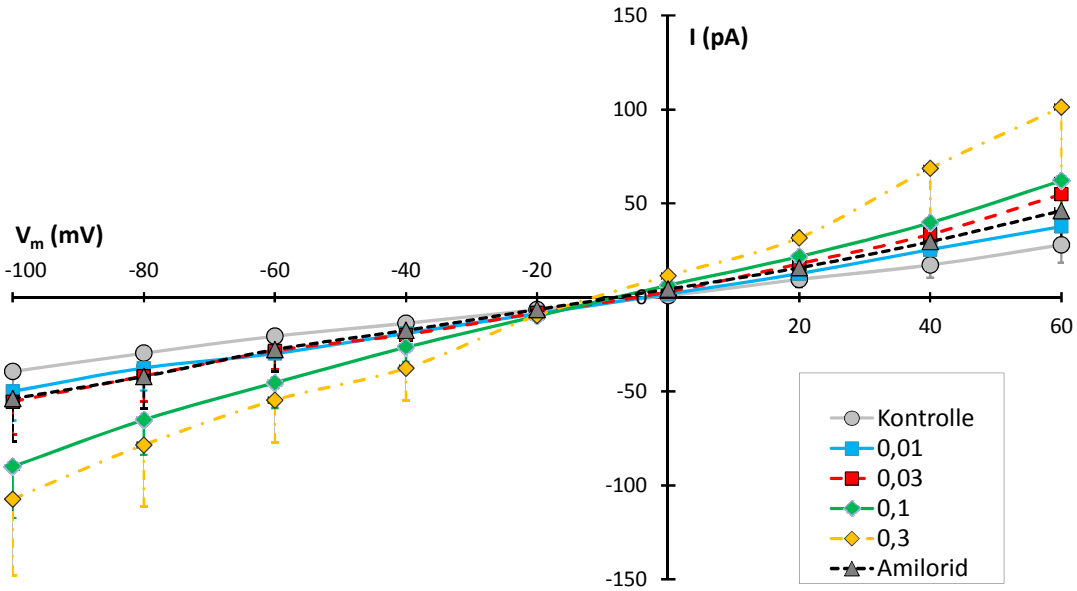

Abb 22 Strom-Spannungs-Diagramm erstellt aus Whole-cell-Messungen mit der Patch-clamp-Methode an A549-Zellen.
Die annähernd linear verlaufenden I/V-Kurven wurden erstellt aus den Mittelwerten der gemessenen Ströme I (pA) ± SEM bei angelegter Spannung V_m (mV) für die Messungen ohne (Kontrolle), nach Zugabe von 0,01 mM (blau)/ 0,03 mM (rot)/ 0,1 mM (grün) und 0,3 mM (gelb) DC-EBIO und nach Gabe von 10 µM Amilorid. DC-EBIO führte konzentrationsabhängig zu Erhöhung der Leitfähigkeit G, welche annähernd Amilorid-sensitiv war. Das Umkehrpotential liegt bei ungefähr -5 mV, bei hoher Natrium-Ionen-Konzentration in Bad- und Pipettenlösung.

Rechnerisch wurde die Gesamtzellleitfähigkeit G_{ges} aus der mittleren Steigung der Regressionsgeraden der gemessenen Strom-Spannungs-Beziehungen ermittelt. Hieraus wurde die relative Leitfähigkeit G_{rel} ± SEM bestimmt, graphisch zusammengefasst in Abb 23. Es zeigte sich eine tendenzielle Zunahme von G_{rel} nach Gabe von 0,01 mM DC-EBIO (1,70 ± 0,47, n = 7, n.s.) und 0,03 mM DC-EBIO (2,16 ± 0,58, n = 7, n.s.). Nach Gabe von 0,1 mM DC-EBIO (3,49 ± 1,35, n = 7, *p < 0,05) und 0,3 mM DC-EBIO (3,85 ± 2,63, n = 5, *p < 0,05) war eine statistisch signifikante Zunahme von G_{rel} im Vergleich zur Kontrollmessung mit G_{rel} = 1 zu messen. Diese Zunahme war durch Applikation von 10 µM Amilorid fast vollständig reversibel (1,01 ± 0,08, n = 4).

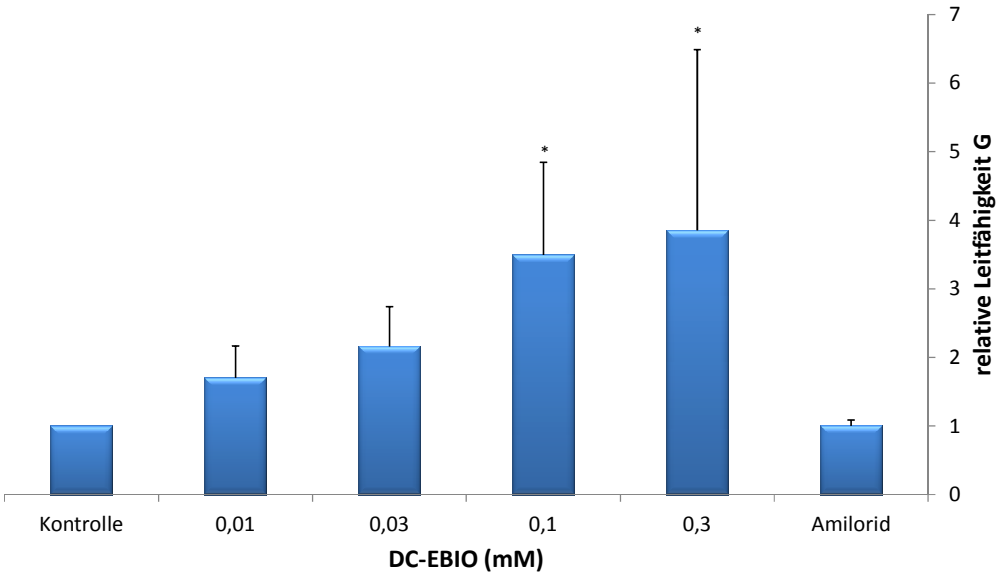

Abb 23 Änderung der relativen Leitfähigkeit in Whole-cell-Messungen mit der Patch-clamp-Technik. Nach Durchlaufen der Pulsprotokolle von -100 mV bis +60 mV in 20 mV-Schritten wurden aus den Regressionsgeraden der Strom-Spannungs-Kurve die Leitfähigkeiten ermittelt. Dargestellt ist die relative Leitfähigkeit G_{rel} als Mittelwerte ± SEM nach Gabe von 0,01 mM, 0,03 mM, 0,1 mM und 0,3 mM DC-EBIO, sowie nach 10 µM Amilorid im Vergleich zur Kontrolle. Statistisch signifikante Werte gegen die Kontrolle sind gekennzeichnet mit (*) für $p < 0,05$.

3.2.2 Single-channel-Messungen

In der cell-attached Konfiguration wurde die Aktivität einzelner Amilorid-sensitiver epithelialer Natriumkanäle (ENaC) von A549-Zellen bei einem Membranpotential von -100 mV gemessen. Anfangs wurden Messungen ohne Benzimidazolon-Zugabe (Kontrolle) durchgeführt. Es wurden die Amplituden, die Dauer und die Häufigkeit der Kanalöffnungen gemessen. Anschließend wurde das Bad mit 1 mM 1-EBIO oder 0,1 mM DC-EBIO perfundiert. Nach einer Einwaschzeit wurde erneut die ENaC-Aktivität bestimmt.

Annähernd die Hälfte der Patches enthielten Kanäle mit einem Kationeneinstrom (negativer Stromausschlag) und einer Einzelkanalleitfähigkeit G_s von ungefähr 4 pS. Weiterhin wurden noch 20 pS- und 40 pS-Kanäle beobachtet, die jedoch nicht weiter ausgewertet wurden.

Einen Ausschnitt einer Patch-clamp-Messung mit zwei 4 pS-Kanälen unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von DC-EBIO ist in Abb 24 dargestellt.

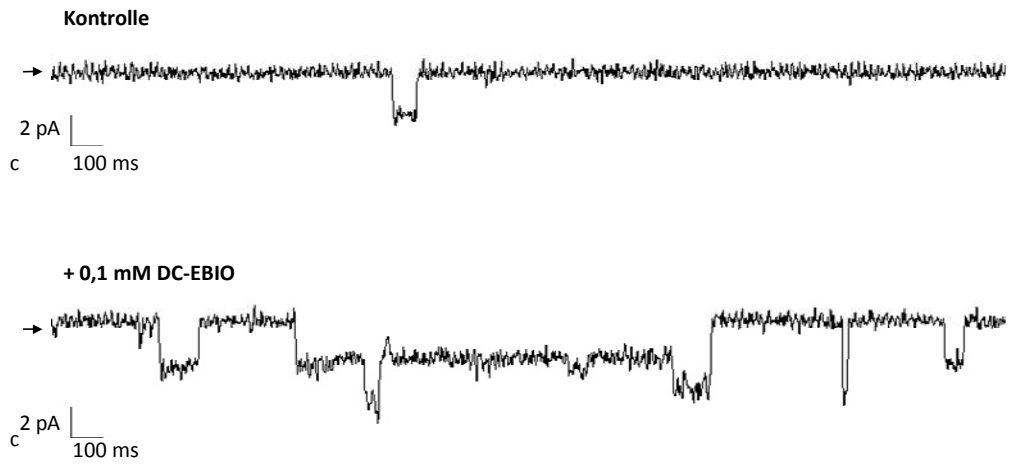

Abb 24 Einzelkanalmessungen an einer A549 Zelle. Die obere Bildhälfte zeigt eine Aufzeichnung unter Kontrollbedingungen. Der Zustand, in dem alle Kanäle geschlossen sind, wird durch c gekennzeichnet. Das Öffnen eines ENaC ist erkennbar an der Auslenkung der Stromspur nach unten. Die untere Bildhälfte zeigt das Kanalverhalten nach Zugabe von 0,1 mM DC-EBIO. Zu erkennen ist das Öffnen eines ENaC mit einer Leitfähigkeit von ungefähr 4 pS. Kurzfristig sind auch zwei 4 pS-Kanäle gleichzeitig geöffnet. Gemessen wurde bei einem Membranpotential von -100 mV. Die Zeit ist in ms angegeben, die Höhe der Amplituden in pA.

Bei der Auswertung der Stromspuren wurden Amplitudenhistogramme mit der relativen Häufigkeit der unterschiedlichen Amplituden erstellt. Mithilfe angepasster Gausskurven konnte die mittlere Einzelkanalleitfähigkeit G_s bestimmt werden. Abb 25 zeigt ein entsprechendes Amplitudenhistogramm nach Gabe von 0,1 mM DC-EBIO.

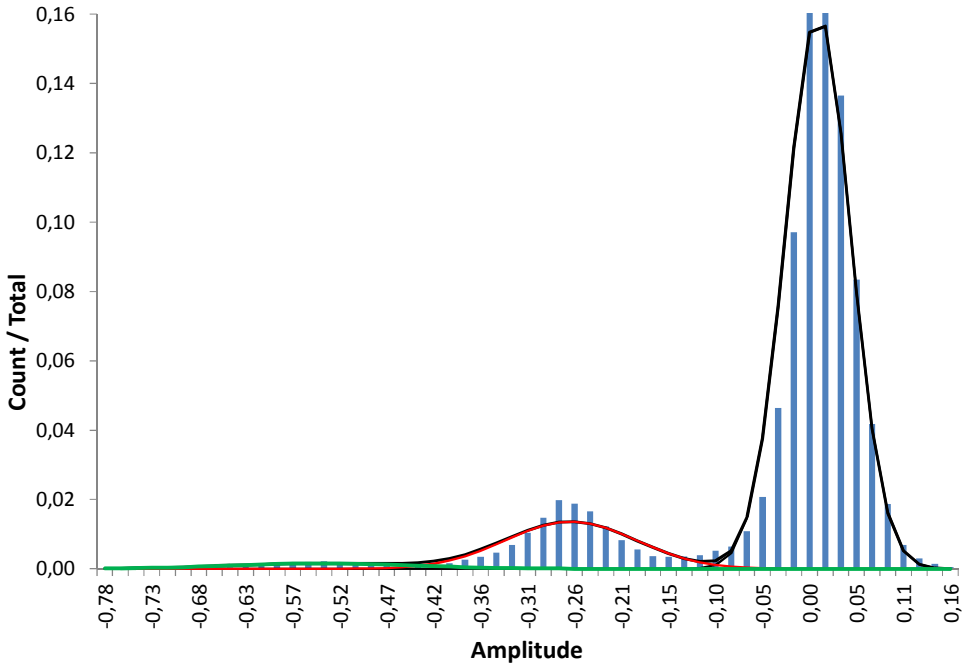

Abb 25 Amplitudenhistogramm mit angepassten Gausskurven, erstellt aus einer Patch-clamp Einzelkanalmessung. Dargestellt ist die relative Anzahl (count/ Total) der unterschiedlichen Amplitudenhöhen (Amplitude, in pA) in diesem Patch nach Zugabe von 0,1 mM DC-EBIO. Die schwarze Gausskurve zeigt die Häufigkeit ohne Kanalöffnung, die rote Kurve die Häufigkeit der Öffnung eines epithelialen Na^+-Kanals mit einer mittleren Leitfähigkeit von 3 pS, die grüne Kurve die Häufigkeit der gleichzeitigen Öffnung zweier Kanäle (6 pS). Gemessen wurde bei einem Haltepotential von -100 mV.

G_s blieb durch Zugabe von 1-EBIO (3,96 ± 1,28, n = 14, n.s.) nahezu unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe (3,62 ± 1,03, n = 14). Ebenso wenig konnte durch Zugabe von DC-EBIO die Leitfähigkeit (5,11 ± 1,21, n = 5, n.s.), verglichen mit der Kontrolle (4,14 ± 1,08, n = 5), statistisch signifikant verändert werden (Abb 26).

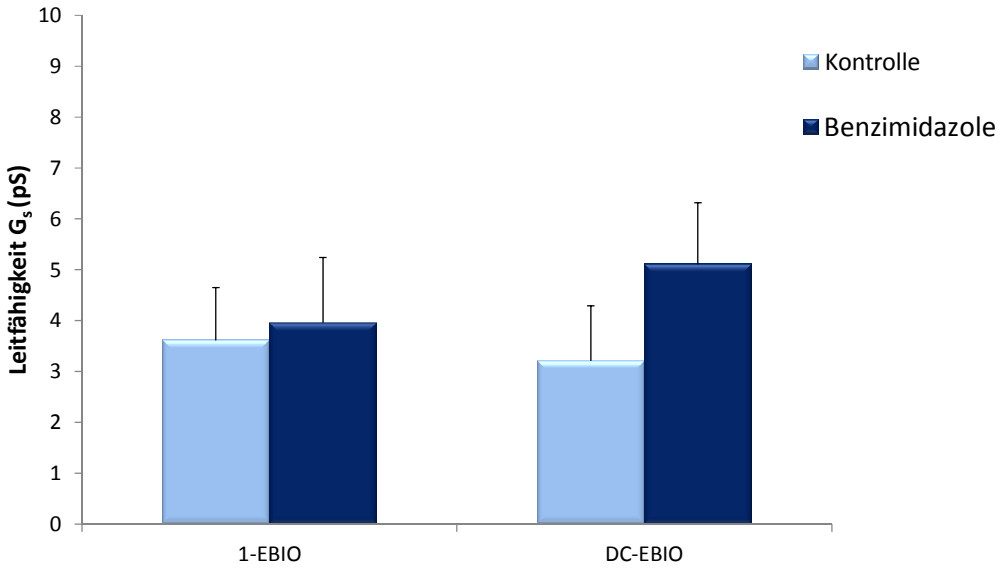

Abb 26 Zusammenfassende Darstellung der Einzelkanalleitfähigkeit G_s der amilorid-sensitiven epithelialen Natriumkanäle (ENaC) in Single-channel-Messungen an A549-Zellen . Dargestellt ist G_s vor (Kontrolle) und nach Gabe der Benzimidazole 1-EBIO (1 mM, n = 14) und DC-EBIO (0,1 mM, n = 5). Gemessen wurde bei einem Membranpotential von -100 mV. Angegeben sind die Ergebnisse als Mittelwerte ± SD. Es ist keine statistisch signifikante Änderung von G_s nach Gabe von 1-EBIO und DC-EBIO im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen.

Anhand der in Kapitel 2.7.7 erläuterten Formel wurde die Offenwahrscheinlichkeit im Patch als NP_o berechnet. Durch Gabe von 1-EBIO und DC-EBIO kam es zu einer deutlichen Erhöhung von NP_o im Vergleich zur Kontrolle. Diese stieg mitunter so stark an, dass sogar das gleichzeitige Öffnen mehrerer Kanäle beobachtet werden konnte. Dabei wurde in der Berechnung von NP_o die Kanalöffnungsdauer jedes einzelnen ENaC berücksichtigt. In den Kontrollmessungen lag die errechnete NP_o für ENaC bei 0,06 ± 0,02, n = 14 und wurde nach Gabe von 1-EBIO signifikant erhöht (0,18 ± 0,04, n = 14, *p < 0,05). Durch Gabe von DC-EBIO wurde NP_o um das Dreifache erhöht (0,19 ± 0,06, n = 5, *p < 0,05), im Vergleich zu den Kontrollmessungen (0,06 ± 0,03, n = 5). Die Ergebnisse sind in Abb 27 zusammenfassend dargestellt.

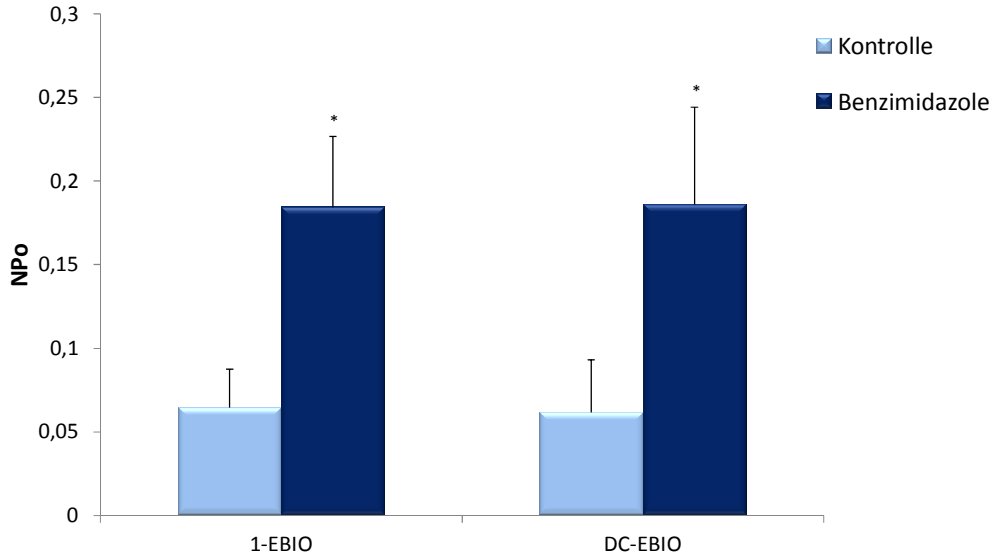

Abb 27 Zusammenfassende Darstellung der Kanalaktivität im Patch NP_o von amilorid-sensitiven epithelialen Natriumkanälen (ENaC) in Single-channel-Messungen an A549-Zellen.
Dargestellt sind NP_o vor (Kontrolle) und nach Gabe der Benzimidazole 1-EBIO (1 mM, n =14) und DC-EBIO (0,1 mM, n = 5). Gemessen wurde bei einem Membranpotential von -100 mV. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. Statistisch signifikante Werte gegen die Kontrolle sind gekennzeichnet mit (*) für $p < 0,05$.

4 Diskussion

Sowohl bei Frühgeborenen und Kindern wie auch bei Erwachsenen gibt es verschiedene Erkrankungen der Lunge mit verminderter alveolärer Flüssigkeits-Clearance und pathologischer Flüssigkeitsansammlung in der Lunge. Der dem entgegen wirkende aktive gerichtete Na^+-Transport kann pharmakologisch bisher nur über β-Mimetika beeinflusst werden und ist sogleich Voraussetzung für den Flüssigkeitsabtransport aus der Lunge (Benos et al. 1992, Hummler et al. 1996, Ware und Matthay 2001). Eine Steigerung der alveolären Flüssigkeits-Clearance könnte zu einer besseren Lungenfunktion und rascheren Genesung schwer kranker Intensivpatienten beitragen. Ziel dieser Arbeit war es, eine spezifische pharmakologische Erhöhung des aktiven transepithelialen Na^+-Transports in FDLE-Zellen und damit der AFC durch als Kaliumkanalaktivatoren beschriebene Benzimidazolone zu untersuchen.

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die hier vorgestellten Untersuchungen begannen aufgrund von Hinweisen aus Experimenten an CF-Epithelien, in denen Benzimidazolone vermutlich über eine K^+-Kanal-aktivierende und somit die Zelle hyperpolarisierende Wirkung den transepithelialen Na^+-Transport stimulieren (Gao et al. 2001, Singh et al. 2001).

In ersten Ussing-Kammer-Messungen konnte der vermutete Effekt eines erhöhten Na^+-Transportes durch Benzimidazolone beobachtet werden. Dies zeigte sich in einem deutlichen und dosisabhängigen Anstieg des Kurzschlussstromes I_{SC} nach Zugabe der Substanzen 1-EBIO, DC-EBIO und Chlorzoxazon, jedoch nicht durch Riluzol, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein I_{SC}-Anstieg war dabei gleichbedeutend mit einem erhöhten Kationen-Nettotransport von apikal nach basolateral, wobei als wichtigste Kationen Na^+- und K^+-Ionen für den Transport in Frage kommen. Nach apikaler Zugabe von Amilorid zur selektiven Hemmung epithelialer Natriumkanäle am Ende jeder Messung kam es zu einem Rückgang des I_{SC}. Dieser Rückgang war jedoch stärker nach Gabe von 1-EBIO, DC-EBIO und CLZ im Vergleich zu unbehandelten Monolayern. Damit konnte gezeigt werden, dass der beobachtete I_{SC}-Anstieg hauptsächlich durch einen erhöhten Na^+-Transport zustande gekommen war. Dies war mit der vermuteten Öffnung von K^+-Kanälen und der daraus folgenden Hyperpolarisation der Zellmembran vereinbar.

Weitere Versuche bestätigten nicht die Vermutung, dass den beobachteten Benzimidazolonwirkungen eine Aktivierung von K^+-Kanälen zugrunde lag. Dazu wurde der Effekt verschiedener und für SK und IK unterschiedlich spezifische Inhibitoren untersucht. Der hierbei durch Tram34 und UCL1684 beobachtete Rückgang des I_{SC} war immer annähernd gleich, nach Benzimidazolon-Gabe allenfalls geringfügig höher als in der Kontrollgruppe. In weiteren Experimenten konnte die Wirkung der Benzimidazolone auf basolaterale K^+-Kanäle und die anschließende spezifische Blockierung dieser gezielt gemessen werden. Eine zuvor mit Amphotericin B permeabilisierte apikale Membran machte die Beeinflussung der basolateralen Transportwege durch apikale Na^+- und Cl^--Kanäle nicht mehr möglich. Bei gleichzeitig anliegendem, von apikal nach basolateral gerichteten, K^+-Gradienten konnte hierbei keine Steigerung des K^+-Stromes beobachtet werden. Der I_{SC}-Rückgang durch Tram34 zeigte keine signifikanten Unterschiede nach Vorbehandlung mit Benzimidazolonen im Vergleich zu Kontrollmessungen.

Da in den anfänglichen Messungen ein erhöhter Na^+-Transport durch Benzimidazolone, aber keine Aktivierung über basolaterale Ca^{2+}-abhängigen K^+-Kanäle zu beobachten war, war es naheliegend, in weiteren Experimenten die apikalen Transportwege zu untersuchen. Dafür wurde ein Versuchsreihe gewählt, in der weder die Na^+, K^+-ATPase, noch die basolateralen K^+-Kanäle Einfluss auf den I_{SC} nehmen konnten (Devor et al. 1996a). Überraschenderweise zeigte sich in diesen Versuchen bei ausgeschalteter basolateraler Membran und einem Na^+-Gradienten von apikal nach basolateral ein erheblicher Einfluss der Benzimidazolone auf die Na^+-Permeabilität. Diese konnte sowohl durch 1-EBIO, DC-EBIO und Chlorzoxazon, wie auch durch Riluzol deutlich erhöht werden. Damit ergab sich ein gänzlich neuer Befund. Benzimidazolone waren bis dahin noch nie mit einer Aktivierung von epithelialen Na^+-Kanälen in Verbindung gebracht worden. In der Literatur wurde für unterschiedliche Benzimidazolone nur eine Aktivierung verschiedener K^+-Kanäle beschrieben (Cao et al. 2001, Cao et al. 2002, Devor et al. 1996b, Gao et al. 2001, Singh et al. 2001, Syme et al. 2000).

Jedoch waren sämtliche Ussing-Kammer-Experimente vereinbar mit der neuen Erkenntnis, dass Benzimidazolone in FDLE-Zellen über eine direkte Na^+-Kanal-Aktivierung wirken. In den ersten Messungen konnte die durch Benzimidazolone erzielte starke Zunahme des I_{SC} durch Amilorid bis auf einen geringen Reststrom gehemmt werden. Dieser hohe Amilorid-sensitive I_{SC} zeigt, dass es zu einer Erhöhung der epithelialen Na^+-Absorption gekommen war. In einer anderen Studie wurde dieser Effekt

der Benzimidazolone bereits beschrieben, allerdings in Zusammenhang mit einer gleichzeitigen Erhöhung der basolateralen K^+-Leitfähigkeit (Gao et al. 2001). Hierbei handelte es sich um Epithelzellen mit homozygoter ΔF508-Mutation des CFTR-Gen. Durch dieses defekte Gen kommt es aufgrund einer fehlenden ENaC-Hemmung vielmehr zu einer dauerhaften und maximalen ENaC-Aktivierung. Somit war eine Erhöhung des apikalen Na^+-Transportes durch Aktivierung von ENaC in diesen Zellen nicht möglich und dadurch nicht messbar. Auch Lazrak et al. berichten, dass diese durch die CFTR-Mutation bedingte maximale ENaC-Aktivität durch Forskolin und Trypsin nicht weiter erhöht werden konnte (Lazrak et al. 2011). Im Gegensatz dazu weisen die hier verwendeten FDLE-Zellen intaktes CFTR (Wildtyp) auf. ENaC war nicht maximal aktiv, dadurch stimulierbar und somit eine Aktivierung überhaupt zu erkennen. Dieser Effekt war allerdings viel stärker ausgeprägt als der Effekt der K^+-Kanal-Aktivierung. Durch die Na^+-Gradient-Messungen mit permeabilisierter basolateraler Membran konnte zusätzlich die erhöhte apikale Na^+-Permeabilität ohne Einfluss durch die basolateralen Transportmechanismen gemessen und ein entsprechender Anstieg nachgewiesen werden.

Um die bisherigen Erkenntnisse zu bestätigen wurden zusätzliche Patch-clamp-Messungen gemacht. In Whole-cell-Messungen konnte durch DC-EBIO eine Zunahme der Leitfähigkeit von Amilorid-sensitiven epithelialen Na^+-Kanälen gezeigt werden. In Single-channel-Messungen konnte der Beweis erbracht werden, dass der durch Benzimidazolone erhöhte Na^+-Transport über apikale epitheliale Na^+-Kanäle mit einer Leitfähigkeit von 4 pS zustande kommt. Dies wiederum ist ein typisches Merkmal von ENaC.

Damit konnten die in einer großen Anzahl von Ussing-Kammer-Experimenten gefundenen Effekte durch Patch-clamp-Messungen überprüft und bestätigt werden. Letztendlich lässt sich aus den Experimente in ihrer Gesamtheit die Schlussfolgerung ziehen, dass Benzimidazolone nicht nur, wie bisher angenommen, K^+-Kanäle aktivieren, sondern auch ENaC in Lungenepithelzellen. Damit wird ein neuer Angriffspunkt zur Aktivierung von ENaC aufgezeigt, welcher mit weiterentwickelten, selektiveren Substanzen potentiell therapeutisch nutzbar sein könnte.

4.2 Untersuchungsmaterial

Die Testung der Wirkung der Benzimidazolone auf den epithelialen Ionentransport in vitro erfolgte an Primärkulturen aus FDLE-Zellen von Ratten. Die Zellen wurden in Anlehnung an die von Jassal et al. verwendete Methode kultiviert und enthielten zu

95 % AT II-Zellen (Jassal et al. 1991). Dadurch war es möglich, die Wirkung der Benzimidazolone auf den vektoriellen epithelialen Na^+-Transport fast ausschließlich an AT II-Zellen zu untersuchen, welche auch in vivo hauptsächlich für die Flüssigkeitsresorption aus der Lunge verantwortlich sind. Bereits in anderen Studien wurden Ratten AT II-Zellen in vitro untersucht, da sie vergleichbare Eigenschaften mit menschlichen AT II-Zellen aufweisen, aber leichter zu gewinnen und zu kultivieren sind (Matthay et al. 2002, O'Brodovich et al. 1990b).

Fetale Epithelzellen haben eine hohe Teilungsrate und ein konfluentes Wachstumsverhalten, weshalb sie sich besonders für die Bildung von lückenlosen Monolayern auf permeablen Membranen eignen (Jassal et al. 1991).

Für Patch-clamp-Messungen, in denen die Eigenschaften einzelner Zellen oder Ionenkanäle untersucht werden sollen, wurden die einfacher zu kultivierenden A549-Zellen verwendet. Diese Zellen weisen viele Eigenschaften von AT II-Zellen auf. Insbesondere enthalten sie mRNA der α-, β- und γ-Untereinheiten des ENaC und Na^+-Ströme sind reversibel durch Amilorid hemmbar (Lazrak et al. 2000a, Lazrak et al. 2000b, Lieber et al. 1976). Im Gegensatz zu A549-Zellen waren FDLE-Zellen für Patch-clamp-Messungen weniger geeignet. Bedingt durch ihr schnelleres Wachstum würde es schnell zu Zell-Zell-Verbindungen über gap junctions kommen, so dass die Spannungsklemme nicht mehr vollständig wirksam wäre.

Durch die Verwendung von unterschiedlichen Zellkulturen aus Ratten- sowie humanen Lungenepithelzellen konnte der neu gefundene Effekt der ENaC-Aktivierung durch Benzimidazolone in Zellen unterschiedlicher Spezies gezeigt und gleichzeitig bekräftigt werden.

4.3 Verwendete Substanzen und Lösungen

Verschiedene Arbeiten berichten von Hinweisen über eine K^+-Kanal aktivierende und dadurch den epithelialen Na^+-Transport stimulierende Wirkung der Benzimidazolone (Gao 2001, Singh 2001). Davon ausgehend wurden die Substanzen 1-EBIO, DC-EBIO, Chlorzoxazon und Riluzol getestet, welche alle als Aktivatoren der Ca^{2+}-abhängigen SK- und IK-Kanäle bekannt sind (Cao et al. 2001, Cao et al. 2002, Devor et al. 1996b, Jensen et al. 1998, Ledoux et al. 2006, Pedarzani et al. 2001, Syme et al. 2000). 1-EBIO wurde als einer der ersten K_{Ca}-Aktivatoren aus der Gruppe der Benzimidazolone bekannt (Devor et al. 1996b, Hougaard et al. 2007, Syme et al. 2000). Danach wurden verschiedene Analoga

entwickelt, darunter auch der potentere Wirkstoff DC-EBIO (Singh et al. 2001). Während 1-EBIO und DC-EBIO noch vergleichsweise neue Substanzen ohne klinische Anwendung sind, ist eine Untersuchung der Wirkung von CLZ und RLZ auf die AFC ebenso interessant. Chlorzoxazon wird klinisch bereits als zentral wirksames Muskelrelaxans eingesetzt (Elenbaas 1980). Riluzol findet Anwendung in der Therapie der Amyotrophen Lateralsklerose und weist strukturelle Ähnlichkeiten mit 1-EBIO und CLZ auf (Cao et al. 2002). Nur für RLZ wurde, im Gegensatz zu 1-EBIO, DC-EBIO und CLZ, auch eine Aktivierung von BK-Kanälen in neuroendokrinen Zellen beschrieben (Wu und Li 1999).

Die Auswahl der applizierten Konzentrationen der Benzimidazolone richtete sich zu Beginn der Versuche nach den Werten bisheriger Untersuchungen anderer Autoren. Als Grundlage für den Großteil der Versuche jedoch dienten die aus den anfänglichen Messungen erstellten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen. Der Konzentrationsbereich von 1-EBIO wurde mit 0,1 mM bis maximal 3 mM sogar etwas höher als in der Literatur berichtet gewählt (Jensen et al. 1998, John et al. 2007, Pedarzani et al. 2001), und orientiert sich letztendlich an dem ermittelten EC_{50}- Wert (0,97 mM). DC-EBIO konnte in einem um eine Zehnerpotenz geringeren Konzentrationsbereich, in Anlehnung an Literatur und ermittelte EC_{50}-Werte (43 µM), getestet werden (John et al. 2007). Ein Vergleich der beiden ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Kurven verdeutlicht die potentere Wirkung von DC-EBIO im Vergleich zu 1-EBIO. In weiteren Studien wurde eine K^+-Kanal-Aktivierung mit konsekutiver Erhöhung der Cl^--Sekretion durch diese Substanzen mit vergleichbaren EC_{50}-Werten (1-EBIO: 0,21 mM; DC-EBIO: 19 µM) gezeigt (Singh et al. 2001).

CLZ wurde anfangs bis 3 mM appliziert. Allerdings kam es nach dieser Konzentration zu keinem weiteren I_{SC}–Anstieg im Vergleich zu 1 mM CLZ. Deshalb wurde CLZ nur in den Konzentrationen 0,1 mM, 0,3 mM und 1 mM getestet, vergleichbar mit der von Gao et al. verwendeten Konzentration von 0,4 mM (Gao et al. 2001). Für CLZ wurde ebenso der relative Stromanstieg gegen die Konzentration halblogarithmisch zur Ermittlung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen aufgetragen. Es ergab sich jedoch kein sigmoidaler Kurvenverlauf, sodass für CLZ kein EC_{50}-Wert ermittelt werden konnte. Eine aktivierende Wirkung von RLZ wurde an rekombinanten SK-Kanälen in den Konzentrationen 30 µM und 100 µM gezeigt (Cao et al. 2002), woran sich auch die von uns gewählten Konzentrationen orientierten.

Aufgrund ihres lipophilen Charakters wurden 1-EBIO, DC-EBIO, CLZ und RLZ apikal und basolateral appliziert (Gao et al. 2001, Jimonet et al. 1999). Ohne Kenntnis der genauen Bindungsstelle und des Wirkmechanismus der verschiedenen Benzimidazolone konnten diese über die apikale oder basolaterale Zellmembran oder auch intrazellulär wirken. Dies war insbesondere von Vorteil, da anfangs nur von einer Aktivierung basolateraler K^+-Kanäle durch Benzimidazolone ausgegangen wurde. Da für Benzimidazolone nun aber auch eine ENaC-Aktivierung gezeigt werden konnte, konnten diese vermutlich direkt an ENaC wirken.

Um zu bestimmen, welcher Anteil des I_{SC}-Anstiegs durch apikalen Na^+-Einstrom zustande gekommen war, wurde Amilorid apikal zugegeben. Dabei wurde die übliche Amiloridkonzentration (10 µM) zur selektiven ENaC-Blockade gewählt (Gao et al. 2001, Matalon et al. 1996).

Zur Hemmung der Na^+, K^+-ATPase wurde Ouabain basolateral in ausreichender Konzentration (1 mM) zugegeben (Matalon et al. 1996). Dadurch konnte der Anteil des I_{SC}, für welchen die Na^+, K^+-ATPase verantwortlich war, ermittelt werden.

Um den I_{SC}-Anteil durch eine vermutete K_{Ca}-Aktivierung der Benzimidazolone zu ermitteln, wurden spezifische Blocker sowohl für IK als auch SK verwendet. Der gegenüber anderen Ionen 200 – 1500 fach selektivere IK-Blocker Tram34 wurde in einer Konzentration von 1 µM getestet (Wulff et al. 2000), allerdings war kein statistisch signifikanter Effekt zu messen. Weiterhin wurden die SK-Blocker Scyllatoxin und UCL1684 verwendet. Da aber bei beiden Substanzen kein Effekt auf den I_{SC} zu erkennen war, wurden diese Versuche weder vertieft, noch weiter ausgewertet.

Für die ersten Ussing-Kammer-Messungen wurde eine modifizierte Ringer-Lösung als Badlösung verwendet, um die Effekte der Benzimidazolone auf den Kurzschlussstrom I_{SC} im Vergleich zu den Kontrollmonolayern zu beobachten. Diese modifizierte Ringer-Lösung unterschied sich auf der apikalen Seite nur hinsichtlich des enthaltenen Mannitols von Glukose basolateral, jeweils in derselben Konzentration. Da Mannitol nicht membrangängig ist, konnte somit ein Transport von Na^+-Ionen zusammen mit Glukose über einen möglichen apikalen Na^+-Glukose-Kotransporter in die Zelle ausgeschlossen werden (Icard und Saumon 1999). Die Badlösungen wurden in Anlehnung an die physiologische Extrazellulärflüssigkeit der Lunge und bisherige Badlösungen anderer Autoren gewählt und entsprechend modifiziert (Gao et al. 2001).

4.4 Messmethodik und Versuchsdurchführung

Die von H. Ussing entwickelte Ussing-Kammer-Technik eignet sich hervorragend zur Messung transepithelialer Ströme (Ussing und Zerahn 1951). Somit lassen sich auch konfluente AT II-Monolayer in die Ussing-Kammer einsetzen (O'Brodovich et al. 1990b, Thome et al. 2001, Thome et al. 2003). Werden diese in der Ussing-Kammer dann kurzgeschlossen, kann eine Änderung des I_{SC} nur durch Ionentransport über die Monolayer bedingt sein. Waren die Epithelzellen jedoch nicht ausreichend dicht gewachsen, war dies an einem geringeren R_{te} zu erkennen. Deshalb wurden nur Monolayer mit einem $R_{te} > 800\ \Omega \cdot cm^2$ in die Ussing-Kammern eingesetzt, um einen parazellulären Ionentransport auszuschließen (Cheek et al. 1989).

Mit der Patch-clamp-Technik lässt sich das Kanalverhalten einzelner Zellen messen. Dadurch konnten im Anschluss an die Ussing-Kammer-Experimente die gefundenen neuen Effekte der Benzimidazolone direkt an apikalen epithelialen Na^+-Kanälen untersucht werden.

In Whole-cell-Messungen wurde bei unterschiedlichen Spannungen der Gesamtstrom einer Zelle abgeleitet. Unter der aus den Ussing-Kammern abgeleiteten Vermutung, dass eine Aktivierung von Na^+-Kanälen durch Benzimidazolone stattfindet, wurde eine Bad- und Pipettenlösung mit hoher Na^+-Ionen-Konzentration gewählt. Damit standen für den apikalen Kationentransport überwiegend Na^+-Ionen zur Verfügung.

Eine Erhöhung der Leitfähigkeit G durch DC-EBIO konnte in einem Strom-Spannungs-Diagramm dargestellt werden. Nach Gabe von Amilorid in der bekannten Konzentration war die Erhöhung von G fast vollständig reversibel. Dies lässt darauf schließen, dass durch DC-EBIO die Leitfähigkeit von Amilorid-sensitiven epithelialen Na^+-Kanälen in A549-Zellen erhöht werden konnte. Die Messungen wurden mit dem potenteren Benzimidazolon DC-EBIO, erkennbar in den Konzentrations-Wirkung-Kurven von 1-EBIO und DC-EBIO, durchgeführt, da diese Versuche nur zur Bestätigung der Ergebnisse der Ussing-Kammer-Messungen dienten.

Single-channel-Messungen wurden durchgeführt, um einen Beweis für den vermuteten direkten Effekt der Benzimidazolone auf ENaC zu bekommen. Diese wurden in der cell-attached Konfiguration bei einem Haltepotential von -100 mV durchgeführt.

Zur Auswertung kamen Messungen, in denen Kanäle mit einer Einzelkanalleitfähigkeit G_s von 4 pS gemessen werden konnten. Diese Kanäle wurden in Na^+-transportierenden Epithelien und insbesondere aber in AT II- und A549-Zellen als hochselektiv für

Na^+-Ionen beschrieben ($P_{Na+}/P_{K+} \geq 10$), mit einer hohen Amilorid-Sensitivität (Benos et al. 1995, Benos et al. 1996, Jain et al. 2001, Lazrak et al. 2000b, Lazrak und Matalon 2003, Voilley et al. 1994). In ungefähr der Hälfte der Patches konnten Kanäle mit 4 pS, als typische ENaC-Eigenschaft, gemessen werden. Gemessen und ausgewertet wurden die Amplituden, die Dauer und die Anzahl der Kanalöffnungen vor und nach Zugabe von 1-EBIO und DC-EBIO. Durch 1-EBIO und DC-EBIO konnte die Offenwahrscheinlichkeit und Kanalaktivität im Patch um das Dreifache im Vergleich zur Kontrolle erhöht werden.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Whole-cell-Messungen, zeigen die Ergebnisse der Single-channel-Messungen eine direkte Wirkung der Benzimidazolone über ENaC.

4.5 Vergleich der Wirkung der getesteten Benzimidazolone

Durch die Benzimidazolone 1-EBIO, DC-EBIO und Chlorzoxazon konnte eine Erhöhung des Na^+-Transportes in FDLE-Zellen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Riluzol-Gabe nicht der dabei erwartete I_{SC}-Anstieg. Vielmehr kam es zu einem vorübergehenden inhibitorischen Effekt. Cao et al. berichten von einer Poren-blockierende Wirkung von RLZ (Cao et al. 2002). Eine nicht selektive Blockierung epithelialer Na^+-Kanäle wäre eine mögliche Erklärung des beobachteten transitorischen inhibitorischen Effektes auf den I_{SC}-Verlauf. Dafür spricht auch der leicht verminderte I_{amil} im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den Na^+-Gradient-Versuchen konnte für alle Benzimidazolone, auch Riluzol, eine erhöhte Amilorid-sensitive Na^+-Permeabilität der apikalen Zellmembran im Vergleich zu den Kontrollmonolayern gemessen werden. Dies lässt vermuten, dass RLZ in den Versuchen mit modifizierter Ringer-Lösung eventuell die basolateralen Transportmechanismen inhibiert hat. Allerdings lassen sich diesbezüglich nur Vermutungen aufstellen, da weder Wirkmechanismus, noch molekulare Bindungsstellen von Riluzol vollständig bekannt sind. Zusammenfassend ließ sich nur für 1-EBIO, DC-EBIO und Chlorzoxazon eine eindeutige Erhöhung des Amilorid-sensitiven epithelialen Na^+-Transportes zeigen, weshalb nur diese drei Benzimidazolone für die anschließenden Patch-clamp-Messungen weiter verwendet wurden.

4.6 Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass die Benzimidazolone 1-EBIO, DC-EBIO und Chlorzoxazon direkt über apikale ENaC den transepithelialen Na^+-Transport erhöhen können.

RLZ konnte nur in Messungen mit Na^+-Gradient die Amilorid-sensitive apikale Membranleitfähigkeit erhöhen. Daraus kann nicht allein auf eine mögliche ENaC-Aktivierung durch diese Substanz geschlossen werden.

An der gemessenen Erhöhung des I_{SC} durch Benzimidazolone könnten auch in Lungenepithelzellen vorkommende, apikale K^+-Kanäle beteiligt gewesen sein (Bardou et al. 2009, Leroy et al. 2004, Sakuma et al. 1998). Allerdings konnte keine Änderung des I_{SC} in Ussing-Kammer-Messungen mit IK- und SK-Blockern in modifizierter Ringer-Lösung gezeigt werden, sodass eine wesentliche Beteiligung von apikalen IK und SK nicht belegt werden konnte.

Gao et al. berichten von einer Zunahme der Cl^--Sekretion durch Erhöhung der basolateralen K^+-Leitfähigkeit durch Benzimidazolone (Gao et al. 2001). Um in den hier durchgeführten Messungen einen Effekt der Benzimidazolone auf den Cl^--Strom auszuschließen, wurde Cl^- in den K^+-Gadient- und den Patch-clamp-Lösungen fast vollständig durch das impermeable Gluconat ersetzt (vgl. Tab 2 und Tab 3). Weiterhin gibt es bisher noch unpublizierte Messungen an FDLE- und Calu-3-Zellen mit intaktem CFTR (Wildtyp), in denen mithilfe eines CFTR-Inhibitors eine Beteiligung von CFTR nicht nachgewiesen werden konnte (Thome et al., Publikation in Vorbereitung).

Bisher ist der Wirkmechanismus der getesteten Substanzen noch unbekannt. Anhand der Messungen lässt sich vermuten, dass sie nicht über dieselbe Bindungsstelle wie Amilorid wirken. Single-channel-Messungen zeigen, dass 1-EBIO und DC-EBIO nur von intrazellulär wirken konnten, da die Patch-Außenseite durch die Pipette von der Badlösung isoliert war.

Eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit könnte durch direkte Aktivierung der Na^+-Kanäle zustande gekommen sein. Eventuell wurden dabei auch Kanäle mit niedriger Grundaktivität oder ansonsten stille Kanäle aktiviert. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits bei der Aktivierung von IK und SK durch 1-EBIO und CLZ gemacht (Devor et al. 1996b, Syme et al. 2000).

Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Benzimidazolone sind für eine klinische Anwendung allerdings ungeeignet, da die hohen Konzentrationen zu weitreichenden unerwünschten Nebenwirkungen führen würden.

Dennoch konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Na^+-Resorption in Lungenepithelzellen durch Aktivierung von Amilorid-sensitiven apikalen Na^+-Kanälen möglich ist. Eine Entwicklung weiterer, selektiver Moleküle in Anlehnung an die getesteten Substanzen, könnte zu einer spezifischeren Aktivierung von ENaC führen und damit therapeutischen Nutzen bei schweren Lungenerkrankungen haben.

5 Zusammenfassung

Zahlreiche Erkrankungen der Lunge sind durch verminderte Flüssigkeitsresorption aus der Lunge bedingt. Bisher gibt es nur wenig therapeutische Möglichkeiten, die alveoläre Flüssigkeitsclearance zu erhöhen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der bisher als Kaliumkanalaktivatoren bekannten Benzimidazolone 1-Ethyl-2-benzimidazolinone (1-EBIO), 5,6-Dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2*H*-benzimidazol-2-one (DC-EBIO), Chlorzoxazon und Riluzol auf den vektoriellen epithelialen Natriumtransport untersucht.

Primärkulturen wurden von fetalen distalen Rattenlungenepithelzellen (FDLE) erstellt, um daraus Monolayer auf permeablen Membranen zu bilden. Anschließend wurde in Ussing-Kammer-Messungen der Effekt der Benzimidazolone auf den vektoriellen Natriumtransport durch Messung des Kurzschlussstromes (I_{SC}) der FDLE-Monolayern untersucht. Durch Gabe von Amilorid, ein selektiver Blocker des epithelialen Natriumkanals (ENaC), wurde der Anteil des I_{SC} über ENaC bestimmt.

Mit der Patch-clamp-Technik wurde unter Verwendung von A549-Zellen die Amilorid-sensitive Membranleitfähigkeit in Ganzzellmessungen und die Leitfähigkeit und Offenwahrscheinlichkeit im Patch (NP_o) einzelner ENaC in Einzelkanalmessungen bestimmt.

Der I_{SC} konnte durch 1-EBIO, DC-EBIO und Chlorzoxazon, jedoch nicht durch Riluzol, deutlich erhöht werden. Dabei wurde der halbmaximale Effekt (EC_{50}) durch 0,97 ± 0,23 mM 1-EBIO und 43 ± 5,3 µM DC-EBIO erreicht. In Messungen mit Natriumgradienten und permeabilisierter basolateraler Membran zeigte sich eine deutliche Zunahme des I_{SC} und damit eine Erhöhung der Amilorid-sensitiven Na^+-Permeabilität durch alle getesteten Benzimidazolone. Anschließende Versuche mit Kaliumgradienten und permeabilisierter apikaler Membran zeigten keine signifikante Erhöhung der basolateralen Membranleitfähigkeit. Der durch DC-EBIO erhöhte I_{SC} konnte nur leicht durch den Kaliumkanalblocker Tram34 vermindert werden. Somit konnte kein ausreichender Nachweis über eine K^+-Kanal-Aktivierung der Benzimidazolone gezeigt werden. Jedoch ergaben diese Versuche den neuen Befund, dass Benzimidazolone zu einer Aktivierung epithelialer Na^+-Kanäle führen.

Zur Überprüfung dieser neuen Erkenntnisse wurden Patch-clamp-Messungen durchgeführt. In A549-Zellen führte 0,1 mM DC-EBIO zu einer Amilorid-sensitiven Erhöhung der Membranleitfähigkeit. In Einzelkanalmessungen konnte NP_o des ENaC mit

einer Leitfähigkeit von 4 pS durch 1 mM 1-EBIO und 0,1 mM DC-EBIO um das Dreifache erhöht werden. Die Einzelkanalleitfähigkeit blieb dabei unverändert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass 1-EBIO, DC-EBIO und Chlorzoxazon den vektoriellen Na^+-Transport und die Amilorid-sensitive apikale Na^+-Permeabilität in FDLE-Zellen erhöhen. Die Amilorid-sensitive Membranleitfähigkeit von A549-Zellen wurde durch DC-EBIO, die NP_o von Na^+-Kanälen mit ENaC-Eigenschaften wurde durch 1-EBIO und DC-EBIO erhöht. Riluzol hingegen führte nur zu einer Erhöhung der Amilorid-sensitiven apikalen Na^+-Permeabilität.

Die getesteten Benzimidazolone kommen allerdings für eine klinische Anwendung aufgrund der starken Nebenwirkungen nicht in Frage. Jedoch zeigt diese Studie, dass durch Entwicklung geeigneterer Substanzen eine Erhöhung des vektoriellen Na^+-Transportes und damit der Alveolären Flüssigkeits-Clearance durch Aktivierung Amilorid-sensitiver apikaler Na^+-Kanäle in Epithelzellen der Lunge möglich ist.

6 Literaturverzeichnis

1. The New Ussing Pulse Measurement Method. University of Göteborg, Departement of Physiology, http://goto.glocalnet.net/medimet/The%20Ussing%20Pulse%20Measurement%20Method.PDF, (Stand 2007)

2. Albertine K.H. und Staub N.C.: The Structure of the Lungs Relative to Their Principal Function. In: Murray J.F. und Nadel J.A. (Hrsg) Textbook of Respiratory Medicine, Band 1, 1. Aufl., Saunders (W.B.) Co Ltd, S. 12-36 (1988)

3. Andreeva A.V., Kutuzov M.A. und Voyno-Yasenetskaya T.A.: Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 293: 259-271 (2007)

4. Bardou O., Trinh N.T. und Brochiero E.: Molecular diversity and function of K+ channels in airway and alveolar epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 296: 145-155 (2009)

5. Barker P.M., Gowen C.W., Lawson E.E. und Knowles M.R.: Decreased sodium ion absorption across nasal epithelium of very premature infants with respiratory distress syndrome. J Pediatr 130: 373-377 (1997)

6. Benos D.J., Awayda M.S., Berdiev B.K., Bradford A.L., Fuller C.M., Senyk O. und Ismailov I.I.: Diversity and regulation of amiloride-sensitive Na+ channels. Kidney Int 49: 1632-1637 (1996)

7. Benos D.J., Awayda M.S., Ismailov I.I. und Johnson J.P.: Structure and function of amiloride-sensitive Na+ channels. J Membr Biol 143: 1-18 (1995)

8. Benos D.J., Cunningham S., Baker R.R., Beason K.B., Oh Y. und Smith P.R.: Molecular characteristics of amiloride-sensitive sodium channels. Rev Physiol Biochem Pharmacol 120: 31-113 (1992)

9. Bhalla V. und Hallows K.R.: Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. J Am Soc Nephrol 19: 1845-1854 (2008)

10. Bildl W.: Protein-Protein-Interaktionen in den „Gating"-Domänen von Kaliumkanälen. Dissertation, Universität Freiburg (2003)

11. Borok Z., Liebler J.M., Lubman R.L., Foster M.J., Zhou B., Li X., Zabski S.M., Kim K.J. und Crandall E.D.: Na transport proteins are expressed by rat alveolar epithelial type I cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 282: 599-608 (2002)

12. Boucher R.C.: Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. Pflugers Arch 445: 495-498 (2003)

13. Cao Y.J., Dreixler J.C., Couey J.J. und Houamed K.M.: Modulation of recombinant and native neuronal SK channels by the neuroprotective drug riluzole. Eur J Pharmacol 449: 47-54 (2002)

14. Cao Y.J., Dreixler J.C., Roizen J.D., Roberts M.T. und Houamed K.M.: Modulation of Recombinant Small-Conductance Ca2+-Activated K+ Channels by the Muscle Relaxant Chlorzoxazone and Structurally Related Compounds. J Pharmacol Exp Ther 296: 683-689 (2001)

15. Cheek J.M., Kim K.J. und Crandall E.D.: Tight monolayers of rat alveolar epithelial cells: bioelectric properties and active sodium transport. Am J Physiol 256: 688-693 (1989)

16. Chilvers M.A. und O'Callaghan C.: Local mucociliary defence mechanisms. Paediatr Respir Rev 1: 27-34 (2000)

17. Clarke L.L.: A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 296: 1151-1166 (2009)

18. Crandall E.D. und Matthay M.A.: Alveolar epithelial transport. Basic science to clinical medicine. Am J Respir Crit Care Med 163: 1021-1029 (2001)

19. Devor D.C., Singh A.K., Bridges R.J. und Frizzell R.A.: Modulation of Cl- secretion by benzimidazolones. II. Coordinate regulation of apical GCl and basolateral GK. Am J Physiol 271: 785-795 (1996a)

20. Devor D.C., Singh A.K., Frizzell R.A. und Bridges R.J.: Modulation of Cl- secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca(2+)-dependent K+ channel. Am J Physiol 271: 775-784 (1996b)

21. Devor D.C., Singh A.K., Gerlach A.C., Frizzell R.A. und Bridges R.J.: Inhibition of intestinal Cl- secretion by clotrimazole: direct effect on basolateral membrane K+ channels. Am J Physiol 273: 531-540 (1997)

22. Dobbs L.G., Gonzalez R., Matthay M.A., Carter E.P., Allen L. und Verkman A.S.: Highly water-permeable type I alveolar epithelial cells confer high water permeability between the airspace and vasculature in rat lung. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 2991-2996 (1998)

23. Eaton D.C., Chen J., Ramosevac S., Matalon S. und Jain L.: Regulation of Na+ channels in lung alveolar type II epithelial cells. Proc Am Thorac Soc 1: 10-16 (2004)

24. Elenbaas J.K.: Centrally acting oral skeletal muscle relaxants. Am J Hosp Pharm 37: 1313-1323 (1980)

25. Fang X., Fukuda N., Barbry P., Sartori C., Verkman A.S. und Matthay M.A.: Novel Role for CFTR in Fluid Absorption from the Distal Airspaces of the Lung. J Gen Physiol 119: 199-208 (2002)

26. Folkesson H.G., Norlin A. und Baines D.L.: Salt and water transport across the alveolar epithelium in the developing lung: correlations between function and recent molecular biology advances (Review). Int J Mol Med 2: 515-531 (1998)

27. Folkesson H.G. und Matthay M.A.: Alveolar Epithelial Ion and Fluid Transport: Recent Progress. Am J Respir Cell Mol Biol 35: 10-19 (2006)

28. Fronius M.: Elektrophysiologische Untersuchungen zur Elektrolyt-Resorption am Lungenepithel von Xenopus laevis. Dissertation, Universität Gießen (2003)

29. Gao L., Yankaskas J.R., Fuller C.M., Sorscher E.J., Matalon S., Forman H.J. und Venglarik C.J.: Chlorzoxazone or 1-EBIO increases Na(+) absorption across cystic fibrosis airway epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281: 1123-1129 (2001)

30. Gitter A.H.: Ussing-Kammer-Brevier. Universität Berlin, http://www.fh-jena.de/~gitter/ussikamr.pdf, (Stand 2007)

31. Grunnet M., Jensen B.S., Olesen S.P. und Klaerke D.A.: Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance Ca2+-activated K+ channels. Pflugers Arch 441: 544-550 (2001)

32. Guidot D.M., Folkesson H.G., Jain L., Sznajder J.I., Pittet J.F. und Matthay M.A.: Integrating acute lung injury and regulation of alveolar fluid clearance. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291: 301-306 (2006)

33. Guo Y., Duvall M.D., Crow J.P. und Matalon S.: Nitric oxide inhibits Na+ absorption across cultured alveolar type II monolayers. Am J Physiol 274: 369-377 (1998)

34. Gutman G.A., Grissmer S., Aldrich R., Chandy K.G., Wulff H. und Wei A.D.: Calcium-Activated Potassium Channels. IUPHAR database (IUPHAR-DB), http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=69, (Stand 2011)

35. Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B. und Sigworth F.J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch 391: 85-100 (1981)

36. Helve O., Andersson S., Kirjavainen T. und Pitkanen O.M.: Improvement of lung compliance during postnatal adaptation correlates with airway sodium transport. Am J Respir Crit Care Med 173: 448-452 (2006)

37. Helve O., Pitkanen O., Janer C. und Andersson S.: Pulmonary fluid balance in the human newborn infant. Neonatology 95: 347-352 (2009)

38. Helve O., Pitkanen O.M., Andersson S., O'Brodovich H., Kirjavainen T. und Otulakowski G.: Low Expression of Human Epithelial Sodium Channel in Airway Epithelium of Preterm Infants With Respiratory Distress. Pediatrics 113: 1267-1272 (2004)

39. Herzog E.L., Brody A.R., Colby T.V., Mason R. und Williams M.C.: Knowns and unknowns of the alveolus. Proc Am Thorac Soc 5: 778-782 (2008)

40. Hille B.: Potassium Channels and Chloride Channels. In: Hille B. (Hrsg) Ion Channels of Excitable Membranes, 3. Aufl., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, S. 131-167 (2001)

41. Hirschberg B., Maylie J., Adelman J.P. und Marrion N.V.: Gating of recombinant small-conductance Ca-activated K+ channels by calcium. J Gen Physiol 111: 565-581 (1998)

42. Hougaard C., Eriksen B.L., Jorgensen S., Johansen T.H., Dyhring T., Madsen L.S., Strobaek D. und Christophersen P.: Selective positive modulation of the SK3 and SK2 subtypes of small conductance Ca2+-activated K+ channels. Br J Pharmacol 151: 655-665 (2007)

43. Hummler E., Barker P., Gatzy J., Beermann F., Verdumo C., Schmidt A., Boucher R. und Rossier B.C.: Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in *αENaC*-deficient mice. Nat Genet 12: 325-328 (1996)

44. Hummler E. und Planes C.: Importance of ENaC-mediated sodium transport in alveolar fluid clearance using genetically-engineered mice. Cell Physiol Biochem 25: 63-70 (2010)

45. Icard P. und Saumon G.: Alveolar sodium and liquid transport in mice. Am J Physiol 277: 1232-1238 (1999)

46. Invitrogen GmbH: Foetal Bovine Serum. Invitrogen GmbH, http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/B-12637-r1_EU_0804_FBS.pdf, (Stand 2004)

47. Jain L., Chen X.J., Ramosevac S., Brown L.A. und Eaton D.C.: Expression of highly selective sodium channels in alveolar type II cells is determined by culture conditions. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 280: 646-658 (2001)

48. Jassal D., Han R.N., Caniggia I., Post M. und Tanswell A.K.: Growth of distal fetal rat lung epithelial cells in a defined serum- free medium. In Vitro Cell Dev Biol 27A: 625-632 (1991)

49. Jensen B.S., Strobak D., Christophersen P., Jorgensen T.D., Hansen C., Silahtaroglu A., Olesen S.P. und Ahring P.K.: Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca2+-activated K+ channel. Am J Physiol 275: 848-856 (1998)

50. Jiang X., Ingbar D.H. und O'Grady S.M.: Adrenergic stimulation of Na+ transport across alveolar epithelial cells involves activation of apical Cl- channels. Am J Physiol 275: 1610-1620 (1998)

51. Jimonet P., Audiau F., Barreau M., Blanchard J.C., Boireau A., Bour Y., Coleno M.A., Doble A., Doerflinger G., Huu C.D., Donat M.H., Duchesne J.M., Ganil P., Gueremy C., Honor E., Just B., Kerphirique R., Gontier S., Hubert P., Laduron P.M., Le B.J., Meunier M., Miquet J.M., Nemecek C. und Mignani S.: Riluzole series. Synthesis and in vivo "antiglutamate" activity of 6-substituted-2-benzothiazolamines and 3-substituted-2-imino-benzothiazolines. J Med Chem 42: 2828-2843 (1999)

52. John V.H., Dale T.J., Hollands E.C., Chen M.X., Partington L., Downie D.L., Meadows H.J. und Trezise D.J.: Novel 384-well population patch clamp electrophysiology assays for Ca2+-activated K+ channels. J Biomol Screen 12: 50-60 (2007)

53. Johnson M.D., Widdicombe J.H., Allen L., Barbry P. und Dobbs L.G.: Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 1966-1971 (2002)

54. Joiner W.J., Khanna R., Schlichter L.C. und Kaczmarek L.K.: Calmodulin regulates assembly and trafficking of SK4/IK1 Ca2+-activated K+ channels. J Biol Chem 276: 37980-37985 (2001)

55. Kalache K.D.: Die fetale intratracheale Lungenflüssigkeitsdynamik. Habilitationsschrift, Universität Berlin (2000)

56. Kalache K.D., Chaoui R., Marks B., Wauer R. und Bollmann R.: Does fetal tracheal fluid flow during fetal breathing movements change before the onset of labour? Br J Obstet Gynaecol 109: 514-519 (2002)

57. Klemme M.: Der Effekt von aktivierter bzw. inhibierter alveolärer Flüssigkeitsclearance auf lungenmechanische Meßgrößen und das Gesamtlungenwasser. Dissertation, Universität München (2009)

58. Kohler M., Hirschberg B., Bond C.T., Kinzie J.M., Marrion N.V., Maylie J. und Adelman J.P.: Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. Science 273: 1709-1714 (1996)

59. Korbmacher C., Greger R., Brenner B. und Silbernagl S.: Die Zelle als Baustein. In: Klinke R., Pape H.C. und Silbernagl S. (Hrsg) Physiologie, 5. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 13-51 (2005)

60. Koval M.: Tight junctions, but not too tight: fine control of lung permeability by claudins. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 297: 217-218 (2009)

61. Krahner A.: Die Ussing-Kammer. Universität Hannover, http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/264.htm, (Stand 2008)

62. Krochmal E.M., Ballard S.T., Yankaskas J.R., Boucher R.C. und Gatzy J.T.: Volume and ion transport by fetal rat alveolar and tracheal epithelia in submersion culture. Am J Physiol 256: 397-407 (1989)

63. Kurachi Y., Jan L.Y. und Lazdunski M.: Potassium Ion Channels Molecular Structure, Function, and Disease. In: Kurachi Y., Jan L.Y. und Lazdunski M. (Hrsg) Potassium Ion Channels Molecular Structure, Function, and Disease, Academic Press, San Diego, S. xxi (1999)

64. Lazrak A., Jurkuvenaite A., Chen L., Keeling K.M., Collawn J.F., Bedwell D.M. und Matalon S.: Enhancement of alveolar epithelial sodium channel activity with decreased cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in mouse lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 301: 557-567 (2011)

65. Lazrak A., Samanta A. und Matalon S.: Biophysical properties and molecular characterization of amiloride- sensitive sodium channels in A549 cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 278: 848-857 (2000a)

66. Lazrak A., Samanta A., Venetsanou K., Barbry P. und Matalon S.: Modification of biophysical properties of lung epithelial Na(+) channels by dexamethasone. Am J Physiol Cell Physiol 279: 762-770 (2000b)

67. Lazrak A. und Matalon S.: cAMP-induced changes of apical membrane potentials of confluent H441 monolayers. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 285: 443-450 (2003)

68. Leclercq S.: Transportphysiologische Untersuchungen am isolierten Pansenepithel des Schafes unter Berücksichtigung verschiedener osmotischer Gradienten. Dissertation, Universität Berlin (1999)

69. Ledoux J., Werner M.E., Brayden J.E. und Nelson M.T.: Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. Physiology (Bethesda) 21: 69-78 (2006)

70. Leroy C., Dagenais A., Berthiaume Y. und Brochiero E.: Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 286: 1027-1037 (2004)

71. Levis R.A. und Rae J.L.: The use of quartz patch pipettes for low noise single channel recording. Biophys J 65: 1666-1677 (1993)

72. Li H., Sheppard D.N. und Hug M.J.: Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. J Cyst Fibros 3 Suppl 2: 123-126 (2004)

73. Lieber M., Smith B., Szakal A., Nelson-Rees W. und Todaro G.: A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. Int J Cancer 17: 62-70 (1976)

74. Lindl T. und Gstraunthaler G.: Mediumwechsel und Fütterungszyklen. In: Zell- und Gewebekultur, 6. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Springer, Heidelberg, S. 129-132 (2008)

75. Matalon S., Bauer M.L., Benos D.J., Kleyman T.R., Lin C., Cragoe E.J. Jr. und O'Brodovich H.: Fetal lung epithelial cells contain two populations of amiloride-sensitive Na+ channels. Am J Physiol 264: 357-364 (1993)

76. Matalon S., Benos D.J. und Jackson R.M.: Biophysical and molecular properties of amiloride-inhibitable Na+ channels in alveolar epithelial cells. Am J Physiol 271: 1-22 (1996)

77. Matalon S. und O'Brodovich H.: Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance. Annu Rev Physiol 61: 627-661 (1999)

78. Matthay M.A., Folkesson H.G. und Clerici C.: Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. Physiol Rev 82: 569-600 (2002)

79. Matthay M.A., Folkesson H.G. und Verkman A.S.: Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung. Am J Physiol 270: 487-503 (1996)

80. McCray P.B., Jr., Bettencourt J.D. und Bastacky J.: Developing bronchopulmonary epithelium of the human fetus secretes fluid. Am J Physiol 262: 270-279 (1992)

81. Mutlu G.M. und Sznajder J.I.: Mechanisms of pulmonary edema clearance. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 289: 685-695 (2005)

82. Mutlu G.M., Koch W.J. und Factor P.: Alveolar Epithelial {beta}2-Adrenergic Receptors: Their Role in Regulation of Alveolar Active Sodium Transport. Am J Respir Crit Care Med 170: 1270-1275 (2004)

83. Neher E. und Sakmann B.: Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature 260: 799-802 (1976)

84. Nelson N.M.: Respiration and Circulation before Birth. In: Smith C.A. und Nelson N.M. (Hrsg) The Physiology of the Newborn Infant, 4. Aufl., Charles C Thomas, Springfield, S. 15-116 (1976)

85. O'Brodovich H.: Pulmonary edema in infants and children. Curr Opin Pediatr 17: 381-384 (2005)

86. O'Brodovich H., Hannam V., Seear M. und Mullen J.B.: Amiloride impairs lung water clearance in newborn guinea pigs. J Appl Physiol 68: 1758-1762 (1990a)

87. O'Brodovich H., Rafii B. und Post M.: Bioelectric properties of fetal alveolar epithelial monolayers. Am J Physiol 258: 201-206 (1990b)

88. O'Brodovich H.M.: Immature epithelial Na+ channel expression is one of the pathogenetic mechanisms leading to human neonatal respiratory distress syndrome. Proc Assoc Am Physicians 108: 345-355 (1996)

89. Pedarzani P., Mosbacher J., Rivard A., Cingolani L.A., Oliver D., Stocker M., Adelman J.P. und Fakler B.: Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance Ca2+-activated K+ channels. J Biol Chem 276: 9762-9769 (2001)

90. Penner R.: A Practical Guide to Patch Clamping. In: Sakmann B. und Neher E. (Hrsg) Single-channel recording, 2. Aufl., Plenum Press, New York, London, S. 3-28 (1995)

91. Perkins G.D., McAuley D.F., Thickett D.R. und Gao F.: The beta-Agonist Lung Injury Trial (BALTI): A Randomized Placebo-controlled Clinical Trial. Am J Respir Crit Care Med 173: 281-287 (2006)

92. Pfister R.E., Ramsden C.A., Neil H.L., Kyriakides M.A. und Berger P.J.: Volume and secretion rate of lung liquid in the final days of gestation and labour in the fetal sheep. J Physiol 535: 889-899 (2001)

93. Physiologic Instruments Inc.: EasyMount Electrode Set Instructions. Physiologic Instruments Inc., http://www.physiologicinstruments.com/Chamber_Accessories_Electrodes_s/50.htm, (Stand 2009)

94. Planes C., Friedlander G., Loiseau A., Amiel C. und Clerici C.: Inhibition of Na-K-ATPase activity after prolonged hypoxia in an alveolar epithelial cell line. Am J Physiol 271: 70-78 (1996)

95. Qin F.: Restoration of single-channel currents using the segmental k-means method based on hidden Markov modeling. Biophys J 86: 1488-1501 (2004)

96. Sakuma T., Takahashi K., Ohya N., Nakada T. und Matthay M.A.: Effects of ATP-sensitive potassium channel opener on potassium transport and alveolar fluid clearance in the resected human lung. Pharmacol Toxicol 83: 16-22 (1998)

97. Salonikidis P.S.: Das Patch-Clamp Verfahren. DFG Research Center Molecular Physiology of the Brain, http://www.dpi.physik.uni-goettingen.de/Praktika/Biophysik/Versuche/2007s/-Patch-Clamp.pdf, (Stand 2007)

98. Sankaranarayanan A., Raman G., Busch C., Schultz T., Zimin P.I., Hoyer J., Kohler R. und Wulff H.: Naphtho[1,2-d]thiazol-2-ylamine (SKA-31), a new activator of KCa2 and KCa3.1 potassium channels, potentiates the endothelium-derived hyperpolarizing factor response and lowers blood pressure. Mol Pharmacol 75: 281-295 (2009)

99. Sartori C. und Matthay M.A.: Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights. Eur Respir J 20: 1299-1313 (2002)

100. Schmitz S.: Zellbiologische und Routinemethoden. In: Der Experimentator Zellkultur, 1. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, München, S. 190-207 (2007)

101. Schmitz S.: Zellkultursupplemente und andere Zusätze. In: Der Experimentator Zellkultur, 1. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, München, S. 109-120 (2007)

102. Schneeberger E.E. und Lynch R.D.: The tight junction: a multifunctional complex. Am J Physiol Cell Physiol 286: 1213-1228 (2004)

103. Sievers B.: Funktionelle Untersuchungen zur Nebenwirkung des Antiepileptikums Carbamazepin auf den Wasser- und Elektrolythaushalt der Ratte. Dissertation, Universität Kiel (2008)

104. Singh A.K., Devor D.C., Gerlach A.C., Gondor M., Pilewski J.M. und Bridges R.J.: Stimulation of Cl- Secretion by Chlorzoxazone. J Pharmacol Exp Ther 292: 778-787 (2000)

105. Singh S., Syme C.A., Singh A.K., Devor D.C. und Bridges R.J.: Benzimidazolone Activators of Chloride Secretion: Potential Therapeutics for Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. J Pharmacol Exp Ther 296: 600-611 (2001)

106. Smith D.E., Otulakowski G., Yeger H., Post M., Cutz E. und O'Brodovich H.M.: Epithelial Na(+) channel (ENaC) expression in the developing normal and abnormal human perinatal lung. Am J Respir Crit Care Med 161: 1322-1331 (2000)

107. Song Y., Fukuda N., Bai C., Ma T., Matthay M.A. und Verkman A.S.: Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice. J Physiol 525: 771-779 (2000)

108. Syme C.A., Gerlach A.C., Singh A.K. und Devor D.C.: Pharmacological activation of cloned intermediate- and small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels. Am J Physiol Cell Physiol 278: 570-581 (2000)

109. Thome U., Chen L., Factor P., Dumasius V., Freeman B., Sznajder J.I. und Matalon S.: Na,K-ATPase gene transfer mitigates oxidant-induced decrease of active sodium transport in rat fetal ATII cells. Am J Respir Cell Mol Biol 24: 245-252 (2001)

110. Thome U.H., Davis I.C., Nguyen S.V., Shelton B.J. und Matalon S.: Modulation of sodium transport in fetal alveolar epithelial cells by oxygen and corticosterone. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284: 376-385 (2003)

111. Ussing H.H. und Zerahn K.: Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Acta Physiol Scand 23: 110-127 (1951)

112. Van Scott M.R., Davis C.W. und Boucher R.C.: Na+ and Cl- transport across rabbit nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells. Am J Physiol 256: 893-901 (1989)

113. Vergara C., Latorre R., Marrion N.V. und Adelman J.P.: Calcium-activated potassium channels. Curr Opin Neurobiol 8: 321-329 (1998)

114. Vilos G.A. und Liggins G.C.: Intrathoracic pressures in fetal sheep. J Dev Physiol 4: 247-256 (1982)

115. Voilley N., Lingueglia E., Champigny G., Mattei M.G., Waldmann R., Lazdunski M. und Barbry P.: The lung amiloride-sensitive Na+ channel: biophysical properties, pharmacology, ontogenesis, and molecular cloning. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 247-251 (1994)

116. Wallner M., Toro L. und Meera P.: Calcium-Activated Potassium Channels in Muscle and Brain. In: Kurachi Y., Jan L.Y. und Lazdunski M. (Hrsg) Potassium Ion Channels Molecular Structure, Function, and Disease, Academic Press, San Diego, S. 117-140 (1999)

117. Ware L.B. und Matthay M.A.: Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med 163: 1376-1383 (2001)

118. Wauer R.R., Flemmer A.W. und Kalache K.D.: Funktionelle Entwicklung der Lunge. In: Wauer R R (Hrsg) Surfactanttherapie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie, 3.Aufl. Aufl., Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, S. 28-41 (2004)

119. Weber M.: Elektrolyttransport am normalen und diätetisch adaptierten Caecum der Ratte: In-Vitro-Untersuchung in der Ussing-Kammer und histomorphologischer Vergleich. Med. Dissertation, Universität München (1996)

120. Wei A.D., Gutman G.A., Aldrich R., Chandy K.G., Grissmer S. und Wulff H.: International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. Pharmacol Rev 57: 463-472 (2005)

121. Wilson S.M., Brown S.G., McTavish N., McNeill R.P., Husband E.M., Inglis S.K., Olver R.E. und Clunes M.T.: Expression of intermediate-conductance, Ca2+-activated K+ channel (KCNN4) in H441 human distal airway epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291: 957-965 (2006)

122. Wilson S.M., Olver R.E. und Walters D.V.: Developmental regulation of lumenal lung fluid and electrolyte transport. Respir Physiol Neurobiol 159: 247-255 (2007)

123. Winkler A.: Der Einfluss von Östradiol und Progesteron auf die Nasenpotenzialdifferenz von Frühgeborenen. Dissertation, Universität Ulm (2006)

124. Wu S.N. und Li H.F.: Characterization of riluzole-induced stimulation of large-conductance calcium-activated potassium channels in rat pituitary GH3 cells. J Investig Med 47: 484-495 (1999)

125. Wulff H., Miller M.J., Hansel W., Grissmer S., Cahalan M.D. und Chandy K.G.: Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca2+-activated K+ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 8151-8156 (2000)

126. Yellen G.: The voltage-gated potassium channels and their relatives. Nature 419: 35-42 (2002)

127. Zemans R.L. und Matthay M.A.: Bench-to-bedside review: the role of the alveolar epithelium in the resolution of pulmonary edema in acute lung injury. Crit Care 8: 469-477 (2004)

128. Zielke H.R., Zielke C.L. und Ozand P.T.: Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. Fed Proc 43: 121-125 (1984)

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Thome für die exzellente Betreuung dieser Arbeit und seine langjährige unermüdliche Unterstützung.

Ein weiterer Dank geht an Herrn PD Dr. O. Wittekindt für seine Unterstützung ganz besonders zum Ende der Arbeit hin.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. P. Dietl für die Möglichkeit der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit im Institut für Allgemeine Physiologie der Universität Ulm.

Herrn Uwe Kirchner, Frau Melanie Timmler und Frau Christiane Buchholz möchte ich für die allzeit freundliche Unterstützung bei der Bewältigung der Laboraufgaben bedanken.

Michael Fauler möchte ich besonders für seine konstruktive Kritik und die wertvollen Anregungen danken.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine Physiologie der Universität Ulm für ihr freundliches Entgegenkommen, sowie allen nicht namentlich erwähnten Freunden und Bekannten für ihre vielfältige Unterstützung.

Ein großer Dank gilt meinem Mann, meinen Kindern und meiner Mutter, die mich mit ihrer Geduld, Freude und Liebe immer unterstützt haben.

Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.