



**Fachbereich Biologie**

**Mechanismus der CFTR-Aktivierung durch Sildenafil  
in Hinblick auf Mukoviszidose**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

**Geraldine Leier**

geb. in Soest

März 2011

**Dekan:** Prof. Dr. Christian Klämbt

**Erster Gutachter:** Prof. Dr. Wolf-Michael Weber

**Zweite Gutachterin:** Prof. Dr. Eva Liebau

**Tag der mündlichen Prüfung:** 23. Mai 2011

**Tag der Promotion:** 03. Juni 2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Epithelien .....	1
1.2 Mukoviszidose .....	6
1.3 Der Cl <sup>-</sup> -Kanal CFTR .....	10
1.3.1 Struktur und Regulation des CFTR .....	10
1.3.2 Mutationsklassen des CFTR.....	15
1.3.3 Die häufigste Mutation $\Delta F508$ -CFTR .....	16
1.3.4 Das <i>trafficking</i> des CFTR-Proteins .....	17
1.4 Modelle der Mukoviszidoseforschung.....	21
1.4.1 Das heterologe Expressionssystem der <i>X. laevis</i> Oozyten .....	22
1.4.2 Humane Zelllinien als Mukoviszidosemodelle .....	23
1.5 Ansätze zur Therapie der Mukoviszidose.....	24
1.6 Die Familie der Phosphodiesterasen .....	29
1.6.1 Der PDE-5 Inhibitor SL .....	30
1.6.2 SL-Wirkmechanismus bei der Behandlung von Bluthochdruck und erektiler Dysfunktion .....	31
1.6.3 Charakterisierung des PDE-5 Inhibitors SL im Hinblick auf Mukoviszidose	33
1.7 Ziele der Arbeit .....	34
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>36</b>
2.1.1 Verwendete Chemikalien und Lösungen .....	36
2.2 Das heterologe Expressionssystem der <i>X. laevis</i> Oozyten .....	36
2.2.1 Der Krallenfrosch <i>X. laevis</i> und seine Oozyten .....	37
2.2.2 Hälterung des Krallenfrosches <i>X. laevis</i> .....	38
2.2.3 Isolation der Oozyten durch Laparotomie.....	38
2.2.4 Vereinzelung der Oozyten .....	39
2.2.5 Sortierung der Oozyten .....	41

---

2.2.6	Mikroinjektion.....	41
2.2.7	Herstellung der Glaskapillaren zur Injektion der mRNA.....	42
2.2.8	Elektrophysiologische Messungen der <i>X. laevis</i> Oozyten mit der <i>Voltage clamp</i> -Technik (VC).....	43
2.2.9	Ablauf einer VC-Messung.....	45
2.2.10	Herstellung der Messelektroden .....	48
2.2.11	Auswertung der VC-Messungen.....	48
2.3	Molekularbiologische Methoden .....	49
2.3.1	Verwendete Plasmidvektoren.....	49
2.3.2	Plasmidtransformation.....	52
2.3.3	Nährmedien und Agarplatten .....	53
2.3.4	Glycerinkultur.....	53
2.3.5	Plasmid-Minipräparation .....	54
2.3.6	DNA-Isolation durch Plasmid-Midipräparation.....	54
2.3.7	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren .....	54
2.3.8	Schema zur Vorbereitung und dem Ablauf der <i>in vitro</i> -Transkription .....	55
2.3.9	Restriktion von Nukleinsäuren .....	56
2.3.10	DNA-Agarosegelelektrophorese .....	56
2.3.11	Phenol-Chloroform Extraktion .....	58
2.3.12	Präzipitation der Nukleinsäuren durch Natriumacetat .....	58
2.3.13	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	59
2.3.14	Klonierung von PCR-Fragmenten .....	59
2.3.15	Sequenzanalysen der PCR-Fragmente .....	59
2.4	Molekularbiologische Methoden mit RNA .....	60
2.4.1	Vorbereitungen zum Arbeiten mit RNA.....	60
2.4.2	<i>In vitro</i> -Transkription (IVT) .....	60
2.4.3	Aufreinigung der mRNA .....	61
2.4.4	Präzipitation der mRNA mit Ammoniumacetat .....	62
2.4.5	RNA-Gelelektrophorese .....	62
2.4.6	Herstellung des DEPC-H <sub>2</sub> O.....	64
2.4.7	Isolation von Gesamt-RNA aus <i>X. laevis</i> Oozyten .....	64
2.5	PCR-Techniken.....	65
2.5.1	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	65

2.5.2	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> ; PCR).....	66
2.6	Elektrophysiologische Messungen des transepithelialen Transports mit der Ussing Kammer .....	67
2.6.1	Durchführung einer Ussing Kammer Messung.....	69
2.6.2	Zusammensetzung des ZK-Ringers sowie der applizierten Substanzen .....	69
2.7	Zellbiologische Methoden .....	71
2.7.1	Verwendete Zelllinien .....	71
2.7.2	Vorbereitung der Deckgläser für die Immunofluoreszenz .....	72
2.7.3	Beschichtung von Zellkulturflaschen und Glasdeckgläsern .....	72
2.7.4	Kultivierung der Zelllinien.....	73
2.7.5	Passagieren der Zelllinien .....	74
2.7.6	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer .....	75
2.7.7	Aussäen der Zellen auf Filtern und Deckgläsern .....	75
2.7.8	Einfrieren von Zellen .....	76
2.7.9	Auftauen von Zellen.....	76
2.8	Immunofluoreszenzoptische Methoden.....	77
2.8.1	Immunofluoreszenz Färbung .....	77
2.8.2	Die <i>Qdots</i> Nanokristall-Technik.....	79
2.8.3	Aufnahmen der Immunofluoreszenz Präparate mit dem <i>Zeiss Meta 510</i> Mikroskop .....	80
2.8.4	Auswertung der Immunofluoreszenz Aufnahmen .....	80
2.9	Biochemische Methoden.....	81
2.9.1	Proteinisolation.....	81
2.9.2	Biconinsäuretest (BCA-Test) zur Proteinkonzentrationsbestimmung .....	82
2.9.3	Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE) .....	83
2.9.4	SDS-PAGE.....	83
2.9.5	Western Blotting.....	86
2.9.6	Blocken der PVDF-Membran.....	88
2.9.7	Antikörperfärbung der PVDF-Membran.....	89
2.9.8	Detektion mittels NBT/BCIP .....	89
2.9.9	Detektion mittels <i>Enhanced</i> Chemilumineszenz (ECL).....	90
2.9.10	Semi-quantitative Auswertung der Western Blots.....	92

2.10	Statistik .....	92
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>93</b>
3.1	Untersuchung zum Einfluss des mRNA-Poly-adenylierungsgrades auf die CFTR-Expression in <i>X. laevis</i> Oozyten .....	93
3.2	Nachweis der PDE-5-Expression in <i>X. laevis</i> Oozyten .....	97
3.3	Einfluss von SL auf die CFTR-Expression in <i>X. laevis</i> Oozyten .....	99
3.3.1	Einfluss von SL auf den $\Delta F508$ -CFTR .....	99
3.3.2	Einfluss von SL auf den wt-CFTR .....	102
3.3.3	Inhibition der PKA-abhängigen Exozytose durch H8 .....	105
3.4	Untersuchung des Wirkmechanismus von SL auf den wt-CFTR .....	106
3.4.1	Inhibition der cGMP-Signalkaskade .....	108
3.5	Kontrollexperimente mit <i>X. laevis</i> Oozyten .....	110
3.6	Untersuchung der Wirkung und des Wirkmechanismus von SL auf humane bronchiale Epithelzellen in der Ussing Kammer .....	112
3.6.1	Initiale Parameter der humanen bronchialen Epithelzellen .....	113
3.6.2	Kontrollexperimente in der Ussing Kammer .....	114
3.6.3	Funktionale Analyse des Effekts verschiedener SL-Konzentrationen auf den $\Delta F508$ -CFTR in CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen .....	118
3.6.4	Untersuchung des Wirkmechanismus von SL auf den $\Delta F508$ -CFTR in CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen .....	122
3.6.5	Funktionale Analyse des Effekts verschiedener SL-Konzentrationen auf den wt-CFTR in 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen .....	125
3.6.6	Untersuchung des Wirkmechanismus von SL auf den wt-CFTR in 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen .....	128
3.7	Western Blot Analysen .....	130
3.7.1	Wirkung verschiedener SL-Konzentrationen auf den wt-CFTR in 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen sowie den $\Delta F508$ -CFTR in CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen .....	131
3.7.2	Analyse des Wirkmechanismus von SL mittels des Guanylatzyklase Inhibitors ODQ .....	135
3.8	Immunofluoreszenzoptische Untersuchungen .....	138
3.8.1	Untersuchung des Effekts sowie des Mechanismus von SL auf den $\Delta F508$ -CFTR .....	138

3.8.2	Untersuchung des Effekts und des Wirkmechanismus von SL auf den wt-CFTR in 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen .....	142
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>145</b>
4.1	Optimierung der wt-CFTR-Expression in <i>X. laevis</i> Oozyten in Abhängigkeit von der Polyadenylierung der mRNA .....	146
4.2	Nachweis der PDE-5 in <i>X. laevis</i> Oozyten .....	149
4.3	Einfluss von SL auf den CFTR.....	149
4.3.1	Wirkung von SL auf den CFTR im heterologen Expressionssystem der <i>X. laevis</i> Oozyten .....	150
4.3.2	Wirkung von SL auf den CFTR in funktionalen Messungen von humanen bronchialen Epithelzellen .....	154
4.3.3	Untersuchung der SL-Wirkung auf den CFTR in humanen bronchialen Epithelzellen durch Western Blot Analysen.....	159
4.3.4	Untersuchung der SL-Wirkung auf den CFTR in humanen bronchialen Epithelzellen durch Immunofluoreszenzen .....	161
4.3.5	Zusammenfassung der Wirkung von SL.....	163
4.4	Untersuchung des SL-Wirkmechanismus auf den CFTR.....	167
4.4.1	Modell des potentiellen SL-Wirkmechanismus auf den $\Delta F508$ - sowie den wt-CFTR .....	172
<b>5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>176</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>180</b>
<b>7</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>182</b>
<b>8</b>	<b>Literaturangaben.....</b>	<b>183</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>200</b>
9.1	Chemikalien und Zusätze.....	200
9.2	Verwendete Geräte .....	204
9.3	Verwendete Primer .....	208
9.4	Verwendete Antikörper.....	209
	<b>Danksagung .....</b>	<b>210</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>211</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematischer Aufbau des respiratorischen Epithels mit den allgemeinen Transportwegen von Epithelzellen.....	3
<b>Abbildung 2:</b> Vereinfachtes Schema der Transportmechanismen über eine Transportepithelzelle.....	5
<b>Abbildung 3:</b> Schema der Veränderungen der Transportmechanismen bei Mukoviszidose .....	7
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Struktur des CFTR-Kanals. ....	11
<b>Abbildung 5:</b> Schema des Öffnungs- und Schließmechanismus des CFTR-Kanals .....	13
<b>Abbildung 6:</b> Die verschiedenen Mutationsklassen I-V des CFTR.....	16
<b>Abbildung 7:</b> Das CFTR <i>trafficking</i> .....	20
<b>Abbildung 8:</b> Die Oozyten des Krallenfrosches <i>X. laevis</i> .....	22
<b>Abbildung 9:</b> Ansatzpunkte für die Wirkung von Potentioren und Korrektoren.....	26
<b>Abbildung 10:</b> Sildenafilcitrat .....	30
<b>Abbildung 11:</b> Schema des Wirkmechanismus von SL.....	32
<b>Abbildung 12:</b> Modell einer <i>X. laevis</i> Oozyte .....	37
<b>Abbildung 13:</b> Laparotomie eines <i>X. laevis</i> Weibchens .....	39
<b>Abbildung 14:</b> Schematische Darstellung der VC- Messapparatur .....	44
<b>Abbildung 15:</b> Vektorkarte des <i>pSTI</i> -Plasmids .....	50
<b>Abbildung 16:</b> Vektorkarte des <i>pALTER</i> -Plasmids .....	51
<b>Abbildung 17:</b> Schema zur Linearisierung und zur IVT-Reaktion.....	55
<b>Abbildung 18:</b> Größendarstellung der DNA-Marker.....	57
<b>Abbildung 19:</b> RNA-Marker.....	63
<b>Abbildung 20:</b> Schematischer Aufbau der verwendeten Ussing Kammer .....	68
<b>Abbildung 21:</b> Darstellung der zur Zellzahlbestimmung verwendeten Neubauer Zählkammer	75
<b>Abbildung 22:</b> Struktur der Nanokristalle .....	79
<b>Abbildung 23:</b> Darstellung einer repräsentativen BCA-Eichgeraden .....	82
<b>Abbildung 24:</b> Protein Marker .....	86
<b>Abbildung 25:</b> Aufbau des Western Blots .....	87
<b>Abbildung 26:</b> Denaturierendes Agarosegel.....	93
<b>Abbildung 27:</b> Repräsentative VC-Messung einer CFTR-A120-exprimierenden Oozyte .....	94
<b>Abbildung 28:</b> cAMP-vermittelter Stromanstieg in Abhängigkeit von der Polyadenylierung..	96
<b>Abbildung 29:</b> cAMP-vermittelter Leitfähigkeitsanstieg in Abhängigkeit von der Polyadenylierung .....	96



<b>Abbildung 30:</b> cAMP-vermittelter Kapazitätsanstieg in Abhängigkeit von der Polyadenylierung .....	97
<b>Abbildung 32:</b> <i>Alignment</i> der <i>X. laevis</i> Sequenzen.....	98
<b>Abbildung 31:</b> Agarosegel.....	98
<b>Abbildung 33:</b> Denaturierendes Agarosegel der $\Delta F508$ -CFTR-mRNA.....	99
<b>Abbildung 34:</b> VC-Messung einer $\Delta F508$ -CFTR-exprimierenden Oozyte .....	100
<b>Abbildung 35:</b> VC-Messung einer $\Delta F508$ -CFTR-exprimierenden Oozyte nach Injektion von 60 $\mu M$ SL.....	101
<b>Abbildung 36:</b> SL-Wirkung auf den $\Delta F508$ -CFTR-Strom .....	101
<b>Abbildung 37:</b> VC-Messung einer wt-CFTR-exprimierenden Oozyte nach SL-Injektion.....	103
<b>Abbildung 38:</b> Wirkung von SL auf den cAMP/ IBMX-vermittelten wt-CFTR-Strom.....	103
<b>Abbildung 39:</b> Wirkung von SL auf die Membrankapazität (wt-CFTR).....	104
<b>Abbildung 40:</b> Wirkung von H8 auf die SL-vermittelte Kapazitätserhöhung .....	105
<b>Abbildung 41:</b> Einfluss von cGMP auf die elektrophysiologischen Parameter einer wt-CFTR-exprimierenden Oozyte .....	107
<b>Abbildung 42:</b> cGMP-vermittelter wt-CFTR-Stromanstieg .....	107
<b>Abbildung 43:</b> Einfluss der Inhibitoren KT5823 und ODQ auf den wt-CFTR-Strom .....	109
<b>Abbildung 44:</b> Einfluss der Inhibitoren KT5823 und ODQ auf die wt-CFTR-Membrankapazität .....	109
<b>Abbildung 45:</b> Kontrollmessung einer nicht-injizierten Oozyte.....	110
<b>Abbildung 46:</b> Einfluss der verwendeten Substanzen auf den Strom nicht-injizierter Kontrolloozyten .....	111
<b>Abbildung 47:</b> Kontrollmessung eines 16HBE14o <sup>-</sup> -Monolayers zur Analyse des Effekts von DMSO .....	114
<b>Abbildung 48:</b> Stromänderung nach ODQ-, KT5823- und DMSO-Applikation (CFBE41o <sup>-</sup> )	116
<b>Abbildung 49:</b> Kapazitätsänderung nach der Applikation von ODQ, KT5823 und DMSO (CFBE41o <sup>-</sup> ).....	116
<b>Abbildung 50:</b> Stromänderung durch die Applikation von ODQ, KT5823 und DMSO (16HBE14o <sup>-</sup> ).....	117
<b>Abbildung 51:</b> Kapazitätsänderung nach der Applikation von ODQ, KT5823 und DMSO (16HBE14o <sup>-</sup> ).....	117
<b>Abbildung 52:</b> Repräsentative Messung zur Erfassung des SL-Effekts in CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen.	119
<b>Abbildung 53:</b> Effekt von SL auf den Kurzschlussstrom in CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen.....	120
<b>Abbildung 54:</b> Reduktion der SL-vermittelten Stromerhöhung durch den CFTR <sub>inh</sub> -172 in CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen .....	121

<b>Abbildung 55:</b> Effekt von SL auf die Membrankapazität in CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen .....	121
<b>Abbildung 56:</b> Wirkung von ODQ auf den aktivierenden SL-Effekt in CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen ....	124
<b>Abbildung 57:</b> Effekt von KT5823 und ODQ auf den SL-vermittelten Kurzschlussstrom in CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen .....	124
<b>Abbildung 58:</b> Effekt von KT5823 und ODQ auf die SL-vermittelte Kapazitätserhöhung in CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen .....	125
<b>Abbildung 59:</b> Einfluss von SL auf die elektrophysiologischen Parameter in 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen .....	126
<b>Abbildung 60:</b> Effekt von SL auf den transepithelialen Kurzschlussstrom in 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen .....	127
<b>Abbildung 61:</b> Inhibition der SL-vermittelten Stromerhöhung durch den CFTR <sub>inh</sub> -172 in 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen .....	127
<b>Abbildung 62:</b> Effekt von KT5823 und ODQ auf den SL-vermittelten Stromanstieg in 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen .....	129
<b>Abbildung 63:</b> Färbung der PVDF-Membran mit Coomassie blau .....	131
<b>Abbildung 64:</b> Western Blot Analysen zur Untersuchung des SL-Effekts.....	133
<b>Abbildung 65:</b> Semi-quantitative ΔF508-CFTR-Proteinexpression nach SL-Inkubation .....	134
<b>Abbildung 66:</b> Semi-quantitative wt-CFTR-Proteinexpression nach SL-Inkubation in 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen .....	134
<b>Abbildung 67:</b> Western Blot Analysen zur Untersuchung der Inhibition durch ODQ .....	135
<b>Abbildung 68:</b> Semi-quantitative ΔF508-CFTR-Proteinexpression in den CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen	136
<b>Abbildung 69:</b> Semi-quantitative wt-CFTR-Proteinexpression der 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen .....	137
<b>Abbildung 70:</b> Nachweis der ΔF508-CFTR-Moleküle in CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen .....	140
<b>Abbildung 71:</b> Menge der <i>Qdot</i> -gekoppelten ΔF508-CFTR-Moleküle in den CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen .....	141
<b>Abbildung 72:</b> Effekt von KT5823 auf die SL-vermittelte ΔF508-CFTR-Molekülanzahl.....	141
<b>Abbildung 73:</b> Nachweis der wt-CFTR-Moleküle in 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen .....	143
<b>Abbildung 74:</b> Menge der <i>Qdot</i> -gekoppelten wt-CFTR-Moleküle in den 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen	144
<b>Abbildung 75:</b> Effekt von KT5823 auf die SL-vermittelte wt-CFTR-Anzahl.....	144
<b>Abbildung 76:</b> Schema der potentiellen Wirkmechanismen von SL auf den CFTR .....	173

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Tricaine-Lösung .....	39
<b>Tabelle 2:</b> Kollagenase-Lösung.....	40
<b>Tabelle 3:</b> Oozyten Ringer (ORi).....	40
<b>Tabelle 4:</b> Ca <sup>2+</sup> -freier ORi .....	40
<b>Tabelle 5:</b> Eigenschaften der verwendeten Plasmidvektoren.....	49
<b>Tabelle 6:</b> SOC-Medium .....	52
<b>Tabelle 7:</b> LB-Medium.....	53
<b>Tabelle 8:</b> Zusammensetzung der verschiedenen Restriktionsverdau.....	56
<b>Tabelle 9:</b> 10x TBE-Puffer.....	57
<b>Tabelle 10:</b> IVT-Reaktionsansatz.....	61
<b>Tabelle 11:</b> 1%-iges Agarosegel .....	63
<b>Tabelle 12:</b> 5x RNA-Laufpuffer.....	63
<b>Tabelle 13:</b> Standard Probenansatz .....	63
<b>Tabelle 14:</b> Ansatz der RT-PCR-Reaktion.....	65
<b>Tabelle 15:</b> PCR-Ansatz.....	66
<b>Tabelle 16:</b> Protokoll des PCR-Programms .....	67
<b>Tabelle 17:</b> ZK-Ringer .....	71
<b>Tabelle 18:</b> 1%-ige Fibronektinlösung.....	73
<b>Tabelle 19:</b> 1x PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> ).....	73
<b>Tabelle 20:</b> MEM Kulturmedium.....	74
<b>Tabelle 21:</b> Einfriermedium .....	76
<b>Tabelle 22:</b> HEPES-Puffer .....	78
<b>Tabelle 23:</b> GNS-Blockierlösung .....	79
<b>Tabelle 24:</b> 4x Probenpuffer.....	83
<b>Tabelle 25:</b> Trenngelzusammensetzung für 4 7,5%-ige Minigele.....	84
<b>Tabelle 26:</b> Sammelgelzusammensetzung für 4 3,9%-ige Minigele .....	85
<b>Tabelle 27:</b> Sammelgelpuffer .....	85
<b>Tabelle 28:</b> Trenngelpuffer.....	85
<b>Tabelle 29:</b> Elektrophorese Laufpuffer .....	85
<b>Tabelle 30:</b> Transferpuffer .....	87
<b>Tabelle 31:</b> PVDF-Färbelösung .....	87
<b>Tabelle 32:</b> PVDF-Entfärbelösung.....	88
<b>Tabelle 33:</b> Coomassie Gelfärbelösung.....	88

---

<b>Tabelle 34:</b> Coomassie Gelentfärbelösung.....	88
<b>Tabelle 35:</b> TBS-Tween .....	88
<b>Tabelle 36:</b> 10x TBS .....	89
<b>Tabelle 37:</b> BCIP-Stammlösung.....	90
<b>Tabelle 38:</b> NBT-Stammlösung .....	90
<b>Tabelle 39:</b> AP-Entwicklungspuffer.....	90
<b>Tabelle 40:</b> Detektionslösung A .....	91
<b>Tabelle 41:</b> Detektionslösung B .....	91
<b>Tabelle 42:</b> p-Cumarsäure-Stammlösung (90 mM).....	91
<b>Tabelle 43:</b> $\beta$ -Aminophthalhydrazid-Stammlösung (250 mM).....	91
<b>Tabelle 44:</b> Initiale Parameter konfluenter CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen.....	113
<b>Tabelle 45:</b> Initiale Parameter konfluenter 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen.....	113
<b>Tabelle 46:</b> Initiale Parameter konfluenter CFBE41o <sup>-</sup> -Zellen nach KT5823 oder ODQ Inkubation .....	122
<b>Tabelle 47:</b> Initiale Parameter konfluenter 16HBE14o <sup>-</sup> -Zellen nach KT5823 oder ODQ Inkubation .....	128
<b>Tabelle 48:</b> Chemikalien und Zusätze .....	200
<b>Tabelle 49:</b> Verwendete Geräte.....	204
<b>Tabelle 50:</b> Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer.....	208
<b>Tabelle 51:</b> Nukleotidsequenzen der verwendeten Antikörper .....	209

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

%	Prozent
*	Signifikanzlevel von $p \leq 0,05$
**	Signifikanzlevel von $p \leq 0,01$
°C	Grad Celsius
μ	Micro
A	Ampere
A	Analog
Abb.	Abbildung
ABC-Proteine	<i>ATP Binding Cassette</i> -Proteine
AON	<i>Antisense</i> Oligonukleotide
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASL	<i>airway surface liquid</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Biconinsäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyphosphat p-Toluidine
BE	Badelektrode
BHK	Babyhamster Nierenzellen ( <i>baby hamster kidney</i> )
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
C	Kapazität
c	komplementäre
ca.	<i>circa</i>
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAL	CFTR <i>associated ligand</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CF	Mukoviszidose (Zystische Fibrose; <i>cystic fibrosis</i> )
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat

---

---

Cl <sup>-</sup>	Chlorid
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
D	Digital
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSP-boards	<i>digital signal processing boards</i>
DTT	Dithiotreitol
ECL	<i>Enhanced</i> Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
ENaC	epithelialer Natriumkanal ( <i>epithelial sodium channel</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradierung
F	Farad
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Leitfähigkeit
GAF	cGMP-bindende PDEs, <i>Anabaena</i> Adenylyl-Cyclasen u. <i>E.coli</i> FhLA
GMP	Guanosinmonophosphat
GNS	Ziegenserum ( <i>goat normal serum</i> )
GTP	Guanosintriphosphat
h	Human
h	Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
H8	N-[2-(methylamino)ethyl]-5) isoquinolinesulfonamide, Dihydrochlorid
HCl	Salzsäure

---

---

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hrp	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
Hsc	<i>heat shock conjugate</i>
Hsp	<i>heat shock protein</i>
IBMX	Isobutylmethylxanthin
I <sub>m</sub>	Membranstrom
I <sub>sc</sub>	Kurzschlussstrom
IVT	<i>in vitro</i> -Transkription
k	Kilo
K <sup>+</sup>	Kalium
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
M	Molar
MCC	<i>mucociliary clearance</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
ME	Messelektrode
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minuten
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRP	<i>Multidrug resistance-related</i> Protein
MSD	membrandurchspannende Domänen ( <i>membrane spanning domains</i> )
n	Nano
N	Normal
Na <sup>+</sup>	Natrium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NBD	Nukleotid Bindedomäne
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chlorid

---

---

NHERF	<i>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>- Exchanger regulatory factor isoform</i>
NO	Stickstoffmonoxid
Ø	Durchmesser
OD	optische Dichte
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
ORCC	<i>outwardly rectifying chloride channel</i>
ORi	Oozyten Ringer
ori	<i>origin of replication</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PABP	Poly(A)-Bindepotein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCL	<i>periciliary liquid layer</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PD	Potentialdifferenz
PDE	Phosphodiesterase
PDZ	PSD95, <i>disc large, zonula occludens-1</i>
PK	Proteinkinase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>Qdots</i>	<i>Quantum dots</i>
R	regulatorische
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runde pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
R <sub>t</sub>	epithelialer Widerstand
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
S	Siemens
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts ( <i>standard error of the mean</i> )
SL	Sildenafil
β	Beta

---



---

SUR	Sulfonylharnstoff Rezeptor ( <i>sulfonylurea receptor</i> )
SV 40 Antigen	<i>simian virus 40 large T-antigen</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TM	transmembrane
Tricaine	MS222; 3-Aminobenzoic-acid-ethyl-ester
ü.N.	über Nacht
U <sub>c</sub>	Klemmpotential
U <sub>m</sub>	Membranpotential
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VC	<i>voltage clamp</i>
V <sub>t</sub>	transepitheliale Spannung
Wt	Wildtyp
x g	x fache der Erdbeschleunigung
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zellkultur
α	Alpha
γ	Gamma
Δ	Delta
Ω	Ohm

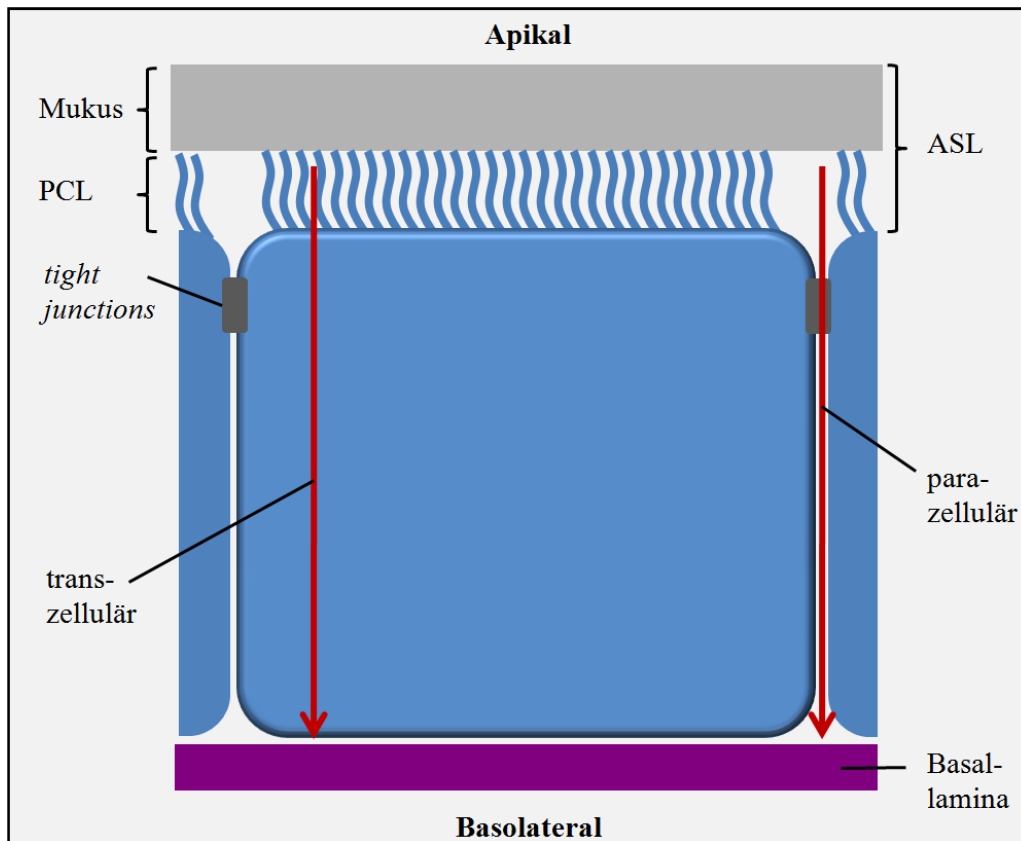
---

# 1 Einleitung

## 1.1 Epithelien

Um die Körperhämöostase aufrecht zu erhalten, ist es für den menschlichen Körper unerlässlich selektive Barrieren zu erschaffen. Auf der zellulären Ebene wird diese Barriere- und Transportfunktion durch die Plasmamembran vermittelt, welche selektiv die Auf- und Abgabe von Stoffen und Flüssigkeiten reguliert. Auf der Ebene des Gesamtorganismus gewährleisten Epithelien den regulierten Stoffaustausch mit der Umgebung und die Aufrechterhaltung des inneren Milieus (Schmidt und Lang 2007). Dazu bedecken Epithelien die exponierten Oberflächen des Organismus, wie der Haut und der Lunge, aber auch die Hohlräume der Organe, wie z.B. den Darm (Silverthorn D.U. 2009). Epithelien bilden typischerweise eine funktionale Polarität aus. Die apikale Zellmembran ist der funktionellen Außenseite zugewandt und zur Oberflächenvergrößerung oft mit Mikrovilli besetzt. Die basolaterale Zellmembran ist dagegen dem Körperinneren zugewandt. An diese schließt die Basallamina an, welche die Epithelzellen mit dem darunter liegenden Gewebe verbindet. Die beschriebene funktionale Polarität wird durch die *tight junctions*, auch Schlussleistenkomplex genannt, aufgebaut. *Tight junctions* verhindern die laterale Diffusion von Transportmolekülen von apikal zu basolateral, sowie von basolateral zu apikal, und schaffen somit die Voraussetzung für die Regulation des gerichteten Stoffaustauschs (Silverthorn D.U. 2009). Aufgrund der Proteinzusammensetzung der *tight junctions* und deren Menge wird die Dichte eines Epithels bestimmt. So ist die Menge und Zusammensetzung der *tight junction* Proteine in der Harnblase unterschiedlich zu der im Darm. Das Epithel im Darm muss besonders durchlässig sein, wohingegen das Epithel der Harnblase sehr dicht ist. Bei sehr dichten Epithelien, mit sehr undurchlässigen *tight junction* Komplexen, kann die Stoffaufnahme nur zu einem begrenzten Anteil durch den Intermediärspalt, auch parazellulär genannt, erfolgen (Marchiando et al. 2010). Die Stoffaufnahme (Resorption) und die Stoffabgabe (Sekretion) erfolgen somit vorwiegend über die apikale und basolaterale Plasmamembran der Epithelien. Dieser Stofftransport wird als transzellulär bezeichnet

(Schmidt und Lang 2007). Eine andere Möglichkeit der Einteilung von Epithelien erfolgt aufgrund ihrer Funktion in Austauschepithelien, Transportepithelien, schützende und sekretorische Epithelien. So ist der Darm z.B. ein klassisches Beispiel für ein Austauschepithel. Das respiratorische Epithel ist dagegen ein Beispiel für ein Transportepithel. Dieses apikal dem Lungenlumen zugewandte Epithel weist einige morphologische Besonderheiten auf. Die apikale Membran ist mit Kinozilien besetzt und dieser Membran ist ein mukushaltiger Flüssigkeitsfilm, *airway surface liquid* (ASL), aufgelagert (Hirche et al. 2005). Die ASL unterteilt sich in zwei Schichten: Mukus und *periciliary liquid layer* (PCL) (Tiddens et al. 2010). Das serosale PCL ermöglicht das rhythmische Schlagen der Zilien, wodurch der Mukus, welcher dem PCL aufliegt, aus der Lunge in Richtung des Rachenraumes transportiert werden kann. Dort wird der Mukus durch eine unbewusste Reaktion verschluckt (Schmidt und Lang 2007). So können Bakterien, Viren und andere Schmutzpartikel, welche an im Mukus enthaltene Glykoproteine (Muzine) binden, aus der Lunge entfernt werden (Knowles und Boucher 2002). Dieser Abwehr- und Reinigungsmechanismus wird *mucociliary clearance* (MCC) genannt (Thelin und Boucher 2007) und bildet die erste Abwehrlinie gegen Bakterien, Viren und Dehydratation der Atemwege. Die schematische Struktur einer Epithelzelle des respiratorischen Trakts mit den verschiedenen allgemeinen Transportwegen von Epithelzellen ist in der Abb. 1 dargestellt.



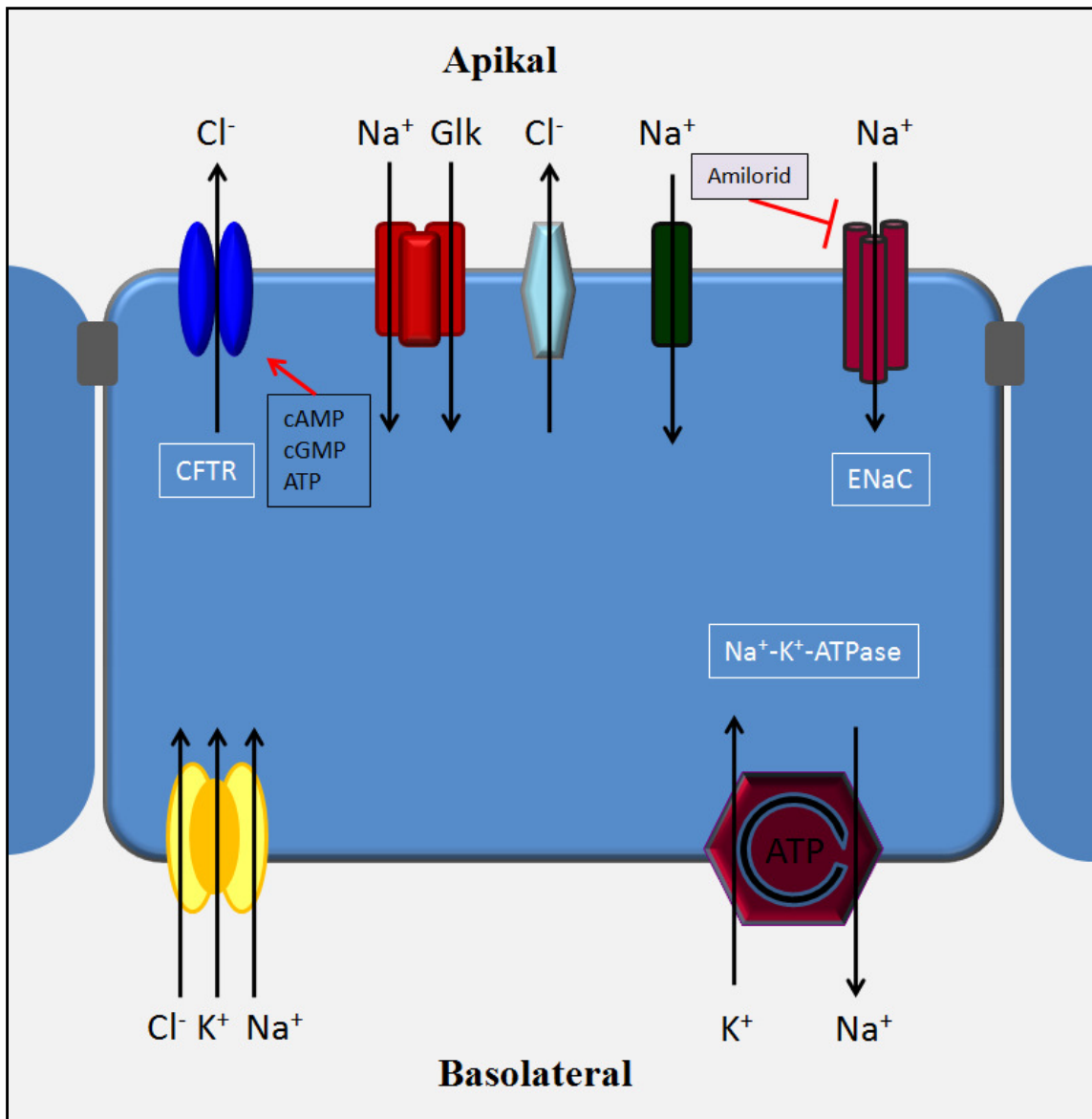
**Abbildung 1: Schematischer Aufbau des respiratorischen Epithels mit den allgemeinen Transportwegen von Epithelzellen**

Die Epithelzelle bildet eine funktionale Polarität in apikal und basolateral aus. Die basolaterale Membran grenzt an die verankernde Basallamina, welche dem Körperinneren zugewandt ist. Die apikale Membran ist der funktionellen Außenseite zugewandt und trägt im respiratorischen Epithel eine Vielzahl von Kinozilien, welche in die Schicht des PCL hereinragen. Dem serosalen PCL ist der Mukus aufgelagert. Der Mukus und das PCL bilden die ASL, welche für die mucoliliary clearance verantwortlich ist. Die Resorption und die Sekretion können entweder über den Intermediärspalt (parazellulär) oder über die apikale und basolaterale Membran der Epithelzellen (transzellulär) erfolgen.

Auf der zellulären Ebene wird die Barriere- und Transportfunktion des Epithels durch die Plasmamembranen gewährleistet. Dabei können Resorption und Sekretion nur über aktive und passive Transportprozesse vermittelt werden, da die Plasmamembran für die zu transportierenden Ionen sowie die meisten Moleküle undurchlässig ist. Der gerichtete Stofftransport über die apikale und basolaterale Membran wird über unterschiedlich lokalisierte Transportsysteme gewährleistet.  $\text{Na}^+$  wird z.B. apikal über den Amilorid sensitiven epithelialen Natriumkanal (ENaC; *epithelial sodium channel*) oder weitere Amilorid insensitive Natriumkanäle aufgenommen und über die basolateral lokalisierte  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  aus der Zelle sekretiert (Silverthorn D.U. 2009).  $\text{Cl}^-$  wird basolateral

vorwiegend über den  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -Cotransporter in die Zelle resorbiert und über den cAMP-abhängigen *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) sowie den  $\text{Cl}^-$ -Kanal ORCC (*outwardly rectifying chloride channel*) über die apikale Plasmamembran sekretiert (Rückes-Nilges et al. 1999). Die beschriebenen Transportprozesse werden über die basolateral lokalisierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase angetrieben, welche für die notwendige Energiegewinnung ATP hydrolysiert. Wasser kann den transportierten Ionen passiv osmotisch durch die Plasmamembran nachdiffundieren. Weiterhin erfolgt der Transport von Aminosäuren über apikal lokalisierte Symporter, wie z.B. den Glukose sekretierenden  $\text{Na}^+$ -Glukose-Symporter SGLT (Schmidt und Lang 2007). Dieser Symporter ist jedoch nicht in allen Transportepithelien, wie z.B. dem respiratorischen Epithel, vorhanden. Einige typische in diesen Epithelien vorkommende Transportmechanismen sind schematisch in Abb. 2 gezeigt.

Wie wichtig die Aufrechterhaltung der Epithelfunktion für den Körper ist, wird klar, wenn es, z.B. durch die Mutation eines Transportproteins, zu einem Ungleichgewicht im Ionentransport kommt. Ein Beispiel für eine solche Fehlregulation ist die Stoffwechselerkrankung Mukoviszidose.



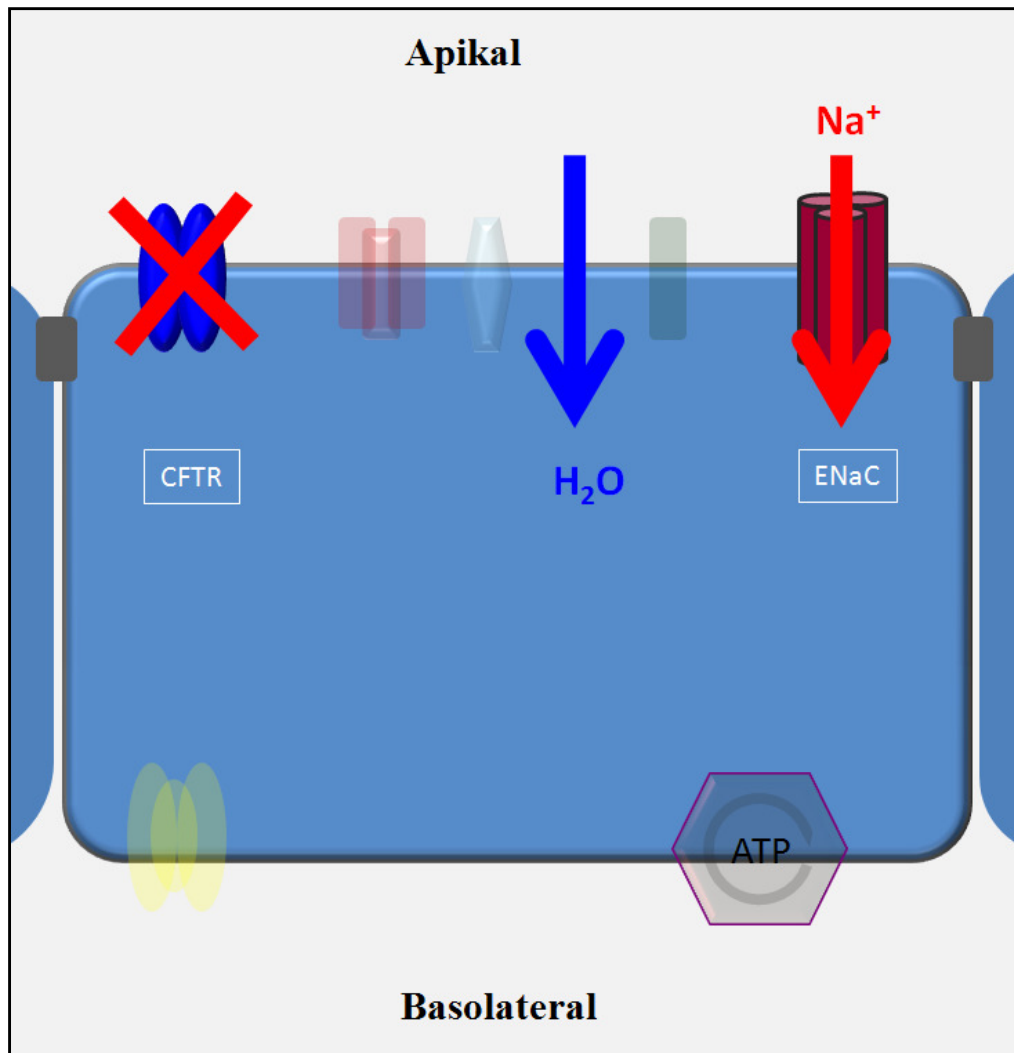
**Abbildung 2: Vereinfachtes Schema der Transportmechanismen über eine Transportepithelzelle**

Die Abbildung zeigt ein vereinfachtes Modell einer Transportepithelzelle mit einer Auswahl der häufigsten Transportmechanismen. Dabei erfolgt die  $\text{Na}^+$ -Aufnahme in die Zelle überwiegend apikal über den Amilorid sensitiven ENaC, aber auch über Amilorid insensitive  $\text{Na}^+$ -Kanäle.  $\text{Na}^+$  wird nun über die basolaterale  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase unter ATP-Verbrauch aus der Zelle sekretiert.  $\text{Cl}^-$  wird basolateral über den  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -Cotransporter in die Zelle resorbiert und über den ORCC und den cAMP- und cGMP-regulierten CFTR sekretiert. Die Aufnahme von Glukose (Glk.) erfolgt mit Ausnahme des respiratorischen Epithels z.B. über den  $\text{Na}^+$ -Glukose Symporter, welcher in der apikalen Membran lokalisiert ist.

## 1.2 Mukoviszidose

Die Erbkrankheit Mukoviszidose, welche auch Zystische Fibrose (*cystic fibrosis*; CF) genannt wird, ist die häufigste autosomal-rezessive Stoffwechselerkrankung der kaukasischen Bevölkerung. Die Geburtenrate der Krankheit beläuft sich auf ca. 1:2500 (Lindemann et al. 2004). Außerdem sind ca. 4% der Deutschen nicht erkrankte heterozygote Merkmalsträger (Pletz et al. 2010). Da während des Krankheitsverlaufs Epithelien verschiedener Organe und alle exokrinen Drüsen betroffen sind, wird Mukoviszidose auch als Multiorgankrankheit bezeichnet. Dabei sind am häufigsten die Lunge, das Pankreas, der Darm und der Reproduktionstrakt betroffen (Lindemann et al. 2004).

Die Ursache für die Krankheit ist eine Mutation im CFTR-Gen, welches für einen zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) regulierten Cl<sup>-</sup>-Kanal kodiert (Riordan et al. 1989). Aufgrund der Mutation ist die Expression des CFTR-Proteins unterdrückt, wodurch die Cl<sup>-</sup>-Sekretion dieses vorwiegend in Epithelzellen exprimierten Kanals gestört ist. Diese gestörte Cl<sup>-</sup>-Sekretion bedingt eine geringere osmotische Treibkraft des Wassers und damit eine geringere Diffusion von diesem aus der Zelle (Clunes und Boucher 2007). Weiterhin verursacht die Fehlregulation des CFTR ein Ungleichgewicht im Ionen-transport der CF-Epithelien, welche sich durch eine drastisch erhöhte Na<sup>+</sup>-Absorption über den ENaC manifestiert (Knowles et al. 1981). Diese Na<sup>+</sup>-Hyperabsorption führt zu einem osmotisch bedingten Wassereinstrom in die Zelle. Die veränderten Transportmechanismen der Epithelzellen bei Mukoviszidose sind in Abb. 3 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3: Schema der Veränderungen der Transportmechanismen bei Mukoviszidose**  
*Durch die Mutation des CFTR und die daraus resultierende Unterdrückung der CFTR-Expression ist die  $Cl^-$ -Sekretion der Zelle stark vermindert. Gleichzeitig ist eine Hyperabsorption von  $Na^+$  über den ENaC zu beobachten. Diese führt zu einem stark erhöhten osmotisch bedingten Einstrom von Wasser in die Zelle.*

Die große Bedeutung der Fehlregulation des ENaC für das Krankheitsbild der Mukoviszidose wurde durch Untersuchungen im Mausmodell bestätigt, in denen gezeigt werden konnte, dass schon die stark erhöhte  $Na^+$ -Aufnahme die klinischen Symptome der Mukoviszidose in den Atemwegen hervorrufen kann (Mall et al. 2004). Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht vollständig aufgeklärt, welche molekularen Mechanismen der Hyperabsorption durch ENaC zu Grunde liegen. Eine mögliche Ursache ist die erhöhte mRNA-Expression der drei ENaC-Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  im Nasenepithel von CF-Patienten im Gegensatz zu Gesunden (Bangel et al. 2008).



Weiterhin ist die fehlende Inhibition des ENaC durch den defekten CFTR eine mögliche Ursache. Diese Inhibition wird jedoch kontrovers diskutiert. So konnte z.B. eine Arbeitsgruppe die Inhibition des ENaC aufgrund einer Aktivierung des CFTR durch cAMP in Maus Zellen mittels Einzelkanalmessungen durch die *patch clamp* Technik zeigen (Letz und Korbmacher 1997). Auch im Expressionssystem der *Xenopus laevis* (*X. laevis*) Oozyten konnte nach Expression beider Kanäle durch die Aktivierung des wildtyp (wt)-CFTR eine Unterdrückung der ENaC-vermittelten Na<sup>+</sup>-Leitfähigkeit ermittelt werden (Mall et al. 1996). Diese Interaktion konnte jedoch im selben System von einer anderen Arbeitsgruppe nicht reproduziert werden (Nagel et al. 2005). Auch im CFTR-defizienten Schweinemodell resultiert zumindest direkt nach der Geburt der Schweine, aus dem Verlust des CFTR keine erhöhte Na<sup>+</sup>-Absorption. In dieser Untersuchung konnte durch die Messung der Na<sup>+</sup>-Absorptionsrate an isolierten Nasen- und Lungenepithelzellen der Schweine keine veränderte Regulation des ENaC durch den defekten CFTR detektiert werden (Chen et al. 2010).

Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist die verstärkte Aktivierung des ENaC-Kanals durch im ASL vorkommende Proteasen. Aufgrund der Viskosität des Mukus sind die im ASL gelösten Proteaseinhibitoren nicht mehr in der Lage die Proteasen zu inhibieren (Myerburg et al. 2006). Ein Beispiel für eine nicht mehr inhibierte Protease ist die Neutrophilelastase, welche aufgrund von Entzündungsreaktionen von den Neutrophilen freigesetzt wird. Diese kann nun den ENaC proteolytisch spalten und so aktivieren (Caldwell et al. 2005; Harris et al. 2007). Eine Aktivierung des ENaC durch Proteasen konnte außerdem unter anderem für Furin (Hughey et al. 2004), Trypsin (Vallet et al. 1997), Chymotrypsin (Chraibi et al. 1998), Kallikrein (Picard et al. 2008), Plasmin (Passero et al. 2008) und Prostasin (Donaldson et al. 2002) nachgewiesen werden. Ob jedoch diese ENaC-Prozessierung bei Mukoviszidose zur Hyperabsorption führt, ist bisher noch völlig unklar.

Durch die beschriebene verminderte Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit kommt es schon ab Geburt der CF-Kinder zu einem erhöhten Flüssigkeits- und Salzverlust über den Schweiß, sowie zu einem viskosen Drüsensekret. Weiterhin haben bis zu 85% der Betroffenen bereits bei der Geburt oder ab den ersten Lebensjahren eine exokrine Pankreasinsuffizienz, die zu einer Fettmaldigestion und einem Nahrungsmangel führt (Pletz et al. 2010). Gleichzeitig weisen CF-Patienten im Dünndarm eine Resorptions- und

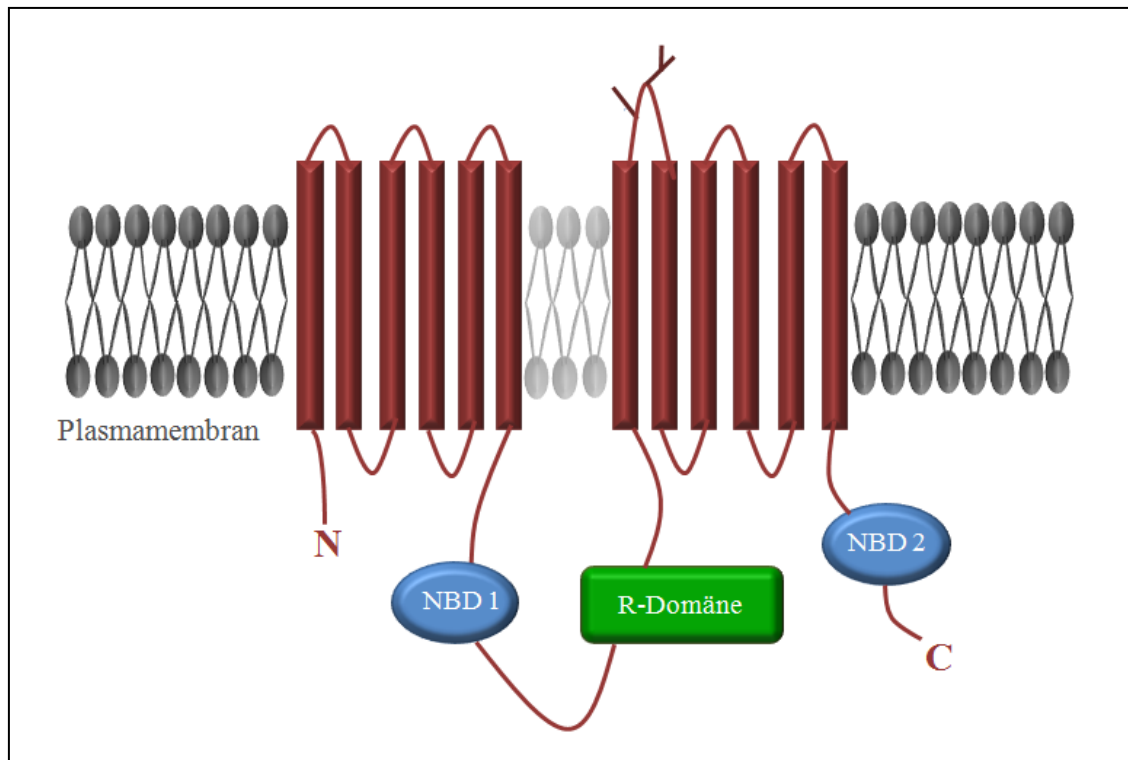
Transportstörung auf, welche zu einer Eindickung des Darminhalts, einer defekten Alkalisierung der Sekrete und einer Fehlbesiedelung von Bakterien führt (Eggermont und De Boeck 1991). Die Infertilität ist bei den weiblichen Betroffenen durch eine erhöhte Viskosität des Zervixschleims und einer reduzierten Spermienpenetration begründet. Die männlichen Patienten weisen eine obstruktive Azoospermie auf (Hirche et al. 2005). Die charakteristischsten Symptome der Krankheit sind jedoch für den respiratorischen Trakt beschrieben. Noch heute ist die häufigste Todesursache von CF-Patienten das Lungenversagen, welches durch chronische Lungenentzündungen und der Zerstörung des Lungengewebes verursacht wird (Hirche et al. 2005). Im respiratorischen Trakt führt die genetisch bedingte Störung der Cl<sup>-</sup>-Sekretion und die Na<sup>+</sup>-Hyperabsorption zur Dehydration des Mukus, was möglicherweise auch mit einer Verminderung der Höhe des ASL einhergeht (Clunes und Boucher 2007). Der Mukus ist viskoser, wodurch die Kinozilien nicht mehr in der Lage sind effektiv zu schlagen und die MCC nicht mehr erfolgen kann. Aufgrund der Tatsache, dass der Mukus nicht mehr abtransportiert werden kann, bildet dieser einen idealen Nährboden für Bakterien. In der Jugendzeit ist meist eine Besiedlung mit den Pathogenen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Haemophilus influenza* nachweisbar. Bei einem Großteil der erwachsenen Patienten konnte außerdem das Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) in der Lunge festgestellt werden (Ramsey 1996). Weiterhin ist aber auch eine vermehrte Besiedelung mit Pilzen, wie z.B. *Aspergillus fumigatus*, vorhanden (Pletz et al. 2010). Dieser verstärkte Pathogenbefall führt zusätzlich zu einer Entzündungsreaktion und einer damit einhergehenden Aktivierung des Immunsystems, wie z.B. der Aktivierung von Neutrophilen. Aufgrund der andauernden Besiedlung kommt es zu chronischen Infektionen und Entzündungen des Lungengewebes, was oftmals zur Schädigung des Lungengewebes bis hin zum Lungenversagen führt. Da eine Mutation des CFTR die Ursache für die Krankheit Mukoviszidose ist, wird der CFTR im Folgenden genauer beschrieben.

## 1.3 Der Cl<sup>-</sup>-Kanal CFTR

Das CFTR-Gen besteht aus 27 Exons, 250 Kilobasen (kb) und wurde auf dem langen Arm des Chromosom 7 in der Region 7q31-32 lokalisiert (Knowlton et al. 1985; Riordan et al. 1989). Seit der Klonierung des CFTR-Proteins, welches aus 1480 Aminosäuren besteht, ist dieses in vielen Organen wie z.B. der Lunge, das Pankreas, dem Darm, der Niere und den Schweißdrüsen nachgewiesen worden (Riordan et al. 1989; Davidson und Porteous 1998; Akabas 2000). Durch Sequenzvergleiche war es möglich den CFTR zur Familie der ATP Binding Cassette Proteine (ABC-Proteine), von denen allein im Menschen 48 identifiziert wurden, zuzuordnen (Dean et al. 2001). Bei den meisten Mitgliedern dieser Superfamilie handelt es sich um Transporter, welche ATP hydrolysieren, um ihre Substrate aktiv über die Plasmamembran zu transportieren (Sheppard und Welsh 1999). Der CFTR stellt hier eine Ausnahme in der Familie dar, da dieser das einzige Mitglied ist, welches einen Ionenkanal darstellt (Gadsby und Nairn 1999). Zu den Mitgliedern der ABC-Superfamilie gehören unter anderem Multidrug resistance-related (MRP) Proteine, ein Sulfonylharnstoff Rezeptor (SUR; sulfonylurea receptor) und auch Proteine zur Nahrungsaufnahme bei Bakterien (Higgins et al. 1982; Gadsby et al. 2006). Die ABC-Proteine zeichnen sich weiterhin durch eine relativ einheitliche Struktur aus, die im Folgenden anhand des CFTR genauer beschrieben wird.

### 1.3.1 Struktur und Regulation des CFTR

Der CFTR-Kanal besteht aus fünf Domänen und seine schematische Struktur ist in der folgenden Abb. 4 dargestellt. Wie für ABC-Transporter typisch, bildet der CFTR zwei membrandurchspannende Domänen (MSD 1 und MSD 2; membrane spanning domains) sowie zwei zytoplasmatisch gelegene Nukleotide bindende Domänen (NBD1 und NBD2) aus (Smith et al. 2002). Die beiden MSD bestehen aus jeweils sechs transmembranen Helices (TM), welche die eigentliche Pore des Kanals bilden. Eine besondere Rolle spielen dabei die TM 1 und TM 6 der MSD 1, da die positiv geladenen Aminosäuren Arginin 334 und Lysin 335 der TM 6, sowie das Lysin an der Position 95 der TM 1, aufgrund der Lokalisation sowie ihrer positiven Ladungen eine Anziehung auf Cl<sup>-</sup> ausüben, so dass dieses durch die Pore wandert (Smith et al. 2001; Linsdell 2006).



**Abbildung 4: Schematische Struktur des CFTR-Kanals.**

In diesem Schema ist die Domänenstruktur des CFTR mit den beiden membran-durchspannenden Domänen (rot), den Nukleotide Bindestellen (NBD 1 und 2; blau) und der Regulatorischen (R-) Domäne (grün) in der Plasmamembran dargestellt (inspiriert durch (Davidson und Dorin JR. 2001).

Im Gegensatz zu den ABC-Proteinen enthält der CFTR eine weitere einzigartige Domäne, welche Regulatorische- oder auch R-Domäne genannt wird. Die R-Domäne beinhaltet zahlreiche Positionen für die Phosphorylierung durch Proteinkinasen (PK). Durch die *patch clamp* Technik konnte in verschiedenen Zellen eine Phosphorylierung der R-Domäne durch die PKA, PKC und PKG nachgewiesen werden (Anderson et al. 1991; Berger et al. 1993). Dabei wird die PKG durch den sekundären Botenstoff cGMP aktiviert, welches durch die Guanylatzyklase generiert wird (French et al. 1995). *In vivo* kommt die PKG in einer gelösten (PKG I) und einer membrangebundenen Form (PKG II) vor. In *patch clamp* Studien an *X. laevis* Oozyten konnte bisher jedoch nur eine Aktivierung des CFTR durch die PKG II nachgewiesen werden (Vaandrager et al. 1997).

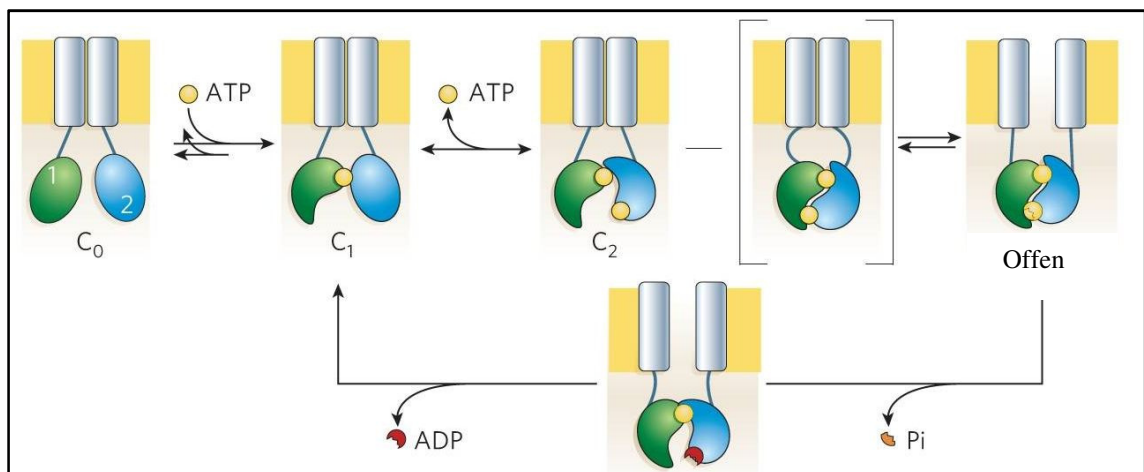
Die PKA und PKC sind hingegen von cAMP, ebenfalls einem sekundären Botenstoff abhängig (Rich et al. 1990; Schwiebert et al. 1999). Zumeist wird aber nur die Aktivierung durch die PKA erwähnt, da die PKC eine eher unterstützende Funktion hat.

So konnte die Arbeitsgruppe um Hanrahan mit CFTR-transfizierten Zellen nachweisen, dass die PKC-Phosphorylierung den Kanal nur geringfügig aktiviert, aber die Affinität der PKA für die Phosphorylierung des CFTR erhöht (Tabcharani et al. 1991). Die Phosphorylierung der R-Domäne ist die Voraussetzung für die Aktivierung des Kanals (Ostedgaard et al. 2001). Die Dephosphorylierung der R-Domäne durch Phosphatasen hingegen gewährleistet die Inaktivierung (Aleksandrov et al. 2007). Somit ist über die Phosphorylierung und Dephosphorylierung eine dynamische Regulation der Aktivität des Kanals möglich (Riordan 2008). Wie wichtig die R-Domäne für die Regulation ist, zeigten Csanády et al. durch die Deletion der R-Domäne. Anhand von *X. laevis* Oozyten, welche den CFTR oder eine deletierte Form des CFTR exprimierten, konnten sie mittels der *patch clamp* Technik sowie durch VC-Messungen nachweisen, dass die Deletion der R-Domäne zu einer konstitutiven Aktivität des CFTR-Kanal führte (Csanády et al. 2000).

Die Phosphorylierung der R-Domäne ist zwar notwendig, jedoch nicht hinreichend für das Öffnen des CFTR-Kanals. Um den Kanal zu öffnen, muss ATP an die beiden NBD-Domänen binden. Anhand von kristallographischen Untersuchungen konnte ermittelt werden, dass durch die Bindung des ATP an die ATP-Bindestelle der NBD sich die beiden NBD einander annähern, so dass eine *Sandwich* Struktur entsteht (Lewis et al. 2004). Dabei bindet ein ATP an die ATP-Bindestelle, welche aus den Walker A und B Motiven der NBD 1 und der ABC-Signatur (LSGGO Sequenz) der NBD 2 besteht. Diese komplementäre Anordnung der NBDs wird auch *Head to Tail* Dimer genannt. Außerdem bindet ein weiteres ATP an die zweite ATP-Bindestelle, welche sich äquivalent aus den Walker A und B Motiven der NBD 2 und der ABC-Signatur der NBD 1 zusammensetzt. Bis heute konnten z.B. durch das Einfügen von positionsspezifischen Mutationen eine Reihe von Aminosäuren in den NBDs identifiziert werden, die mit dem ATP interagieren und so dessen Bindung an die Bindestellen stabilisieren (Vergani et al. 2005; Mense et al. 2006). Durch die nun entstandene Heterodimer ähnliche Struktur wird ein Signal vermittelt, welches zur Öffnung des Kanals führt (Lewis et al. 2004; Vergani et al. 2005). Dabei ist der genaue Öffnungsmechanismus der Kanalpore noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Das Schließen des Kanals wird durch die Auflösung der Dimerstruktur der beiden NBD ausgelöst. Dazu wird das ATP, welches an die Walker Motive der NBD 2 gebunden ist,

in ADP und anorganisches Phosphat hydrolysiert. Die Hydrolyse ist wahrscheinlich nicht direkt der Auslöser zum Schließen des Kanals, sondern das Vorhandensein des Spaltungsprodukts ADP (Gadsby et al. 2006). Anschließend bleibt der Kanal solange geschlossen bis wieder an beiden ATP-Bindestellen ein ATP gebunden ist. Ein aktuelles Schema des Öffnungs- und Schließmechanismus ist in Abb. 5 gezeigt.

Die Walker A und B Sequenz sowie die ABC-Signatur sind innerhalb der Familie der ABC-Proteine hoch konserviert. Sequenzvergleiche des CFTR mit anderen ABC-Transportern konnten jedoch Basenaustausche in der CFTR-Sequenz feststellen. So sind in der Walker B Sequenz der NBD 1 ein Glutamin und ein Histidin gegen ein Lysin ausgetauscht. Zusätzlich gibt es zwei weitere Austausche in der ABC-Signatur der NBD 2. Die beiden Bereiche bilden die ATP-Bindestelle, an der kein ATP hydrolysiert werden kann. Diese Basenaustausche sind somit die Ursache für nur eine ATP-Bindestelle, welche eine hydrolytische Funktion aufweist (Gadsby et al. 2006).



**Abbildung 5: Schema des Öffnungs- und Schließmechanismus des CFTR-Kanals**

*Mechanismus des Kanal-gatings. Zunächst bindet ein ATP an die beiden NBD, so dass diese eine Head to Tail Struktur ausbilden. Durch die Bindung von zwei ATP-Molekülen kommt es zur Annäherung der beiden NBD und zum Öffnen des Kanals. Das Schließen des Kanals erfolgt durch die Hydrolyse eines der beiden ATP in ADP und anorganisches Phosphat (bearbeitet nach (Gadsby et al. 2006)).*

Neben den bisher beschriebenen Domänen, welche für den *gating* Mechanismus des CFTR wichtig sind, gibt es weitere Domänen im Amino- (N) und Carboxyl-(C) Terminus des Proteins, welche der Interaktion mit anderen Proteinen dienen. Im C-Terminus des CFTR konnte eine PDZ (PSD95, disc large, zonula

*occludens-1*)-interagierende Domäne, zwei endozytotische Motive, eine Proteinphosphatase-2A-bindende Domäne und eine AMP-Kinase-bindende Domäne identifiziert werden (Guggino und Stanton 2006). Dabei interagiert die PDZ-bindende Domäne des CFTR unter anderem mit den Proteinen NHERF (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>- Exchanger regulatory factor isoform*) und CAL (*CFTR associated ligand*) (Shenolikar et al. 2004). Ein Beispiel für eine Proteininteraktion ist die Aktivierung des CFTR durch die PKA mittels Bildung eines Multiproteinkomplexes. So bindet NHERF1 mit einer seiner zwei PDZ-Domänen an den CFTR und mit der zweiten PDZ-Domäne an den  $\beta$ 2-adrenogenen Rezeptor. Wenn der Rezeptor nun durch einen Agonisten aktiviert wird, werden GTP-bindende Proteine, der Adenosin-2b-Rezeptor und die Adenylatzyklase aktiviert. Die Aktivierung der Adenylatzyklase führt im Folgenden zur Bildung von cAMP. Dieses erhöht die Aktivität der PKA, welche durch Ezrin in den Multiproteinkomplex integriert ist. Die Erhöhung der PKA-Aktivität führt schlussendlich zur Aktivierung des CFTR (Guggino und Stanton 2006).

Die beschriebenen Domänen zur Proteininteraktion des CFTR haben aber nicht nur eine Funktion für die Eigenregulation, sondern ermöglichen auch eine Regulation weiterer Proteine. Unter anderem werden die K<sup>+</sup>-Kanäle ROMK 1 und 2, der *ORCC*, Anionen Austauscher und Aquaporin Kanäle durch den CFTR reguliert (Schwiebert et al. 1998; Favia et al. 2006). Die zuvor beschriebenen Regulationswege zeigen nur einen kleinen Ausschnitt der bisher bekannten Regulationswege des CFTR auf. Außerdem ist ein Teil dieser Mechanismen bis heute nicht vollständig verstanden, so dass sie einen Ansatzpunkt für weitere Studien bieten.

Die proteininteragierenden PDZ-Domänen des CFTR spielen neben der Interaktion mit anderen Proteinen eine große Rolle bei der kontroversen Diskussion, ob der CFTR *in vivo* als Monomer oder Dimer agiert. So vermuten einige Arbeitsgruppen eine Dimerbildung der CFTR-Moleküle mittels ihrer PDZ-Domänen (Raghuram et al. 2001; Zhang et al. 2009). Es gibt aber ebenso viele Untersuchungen, die vermuten lassen, dass der CFTR als Monomer agiert (Marshall et al. 1994; Chen et al. 2002). Um eine endgültige Aussage treffen zu können sind somit eine Fülle weiterer Untersuchungen notwendig.

### 1.3.2 Mutationsklassen des CFTR

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind über 1800 Mutationen im CFTR-Gen bekannt (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr> (18.03.2011)), welche die Erbkrankheit Mukoviszidose verursachen. Diese können in sechs verschiedene Mutationsklassen (I-IV) eingeordnet werden. Dabei erfolgt die Klassifizierung anhand der Auswirkung auf die Funktion des Proteins (siehe Abb. 6).

Die Klasse I beinhaltet Mutationen, welche die Synthese der mRNA betreffen. In diesen Fällen kann aufgrund von *nonsense* Mutationen, nicht korrektem Spleißen, *frameshifts* (Leserasterverschiebungen) und dadurch entstehender Stopcodons keine funktionsfähige mRNA hergestellt werden (Will et al. 1993). In manchen Fällen der *nonsense* und *frameshift* Mutationen ist jedoch nur die Menge des mRNA-Transkripts reduziert (Hamosh et al. 1991).

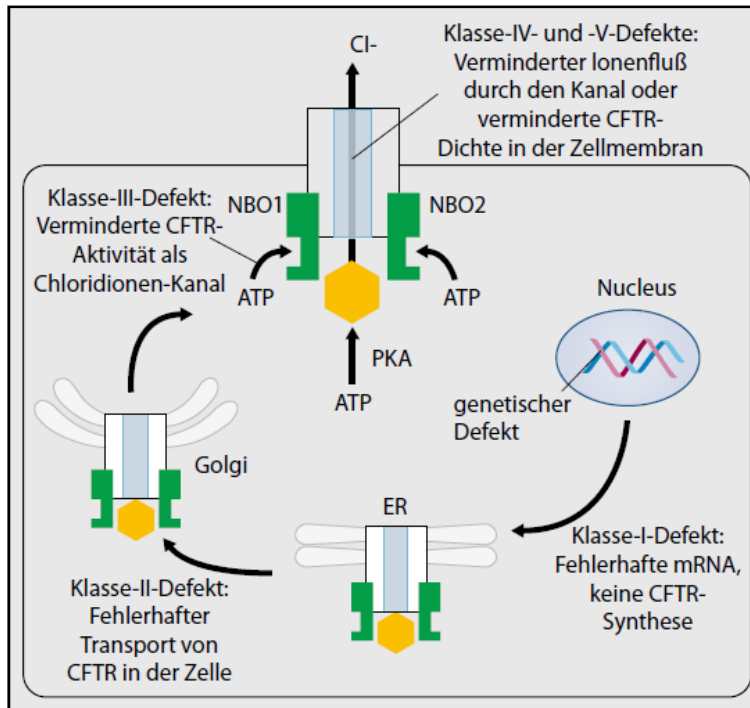
Zu den Klasse II Mutationen gehört unter anderem die häufigste Mutation  $\Delta F508$ -CFTR. Die Mutationen der Klasse II führen oftmals zum Verlust einer Aminosäure, woraus eine Blockierung der Reifung und der Insertion des Proteins in die Plasmamembran resultiert. Im Falle des  $\Delta F508$ -CFTR wird das Protein aufgrund der Fehlfaltung im ER degradiert (Denning et al. 1992). Während die Mutationen der Klasse I und II zu keiner Reifung und Insertion des Proteins in die Plasmamembran führt, ist dies bei der Mutationsklasse III nicht der Fall. Diese Mutationen führen zu einer reduzierten Aktivierbarkeit des CFTR, aufgrund von Mutationen in den NBD des Proteins. Ein Beispiel für diese Mutationsart ist die Mutation G551D, bei der die Bindung von ATP, aufgrund eines Defekts in der ATP-Bindestelle zwei reduziert ist (Bompadre et al. 2008).

Auch die Mutationen der Klasse IV führen zu korrekt inserierten CFTR-Kanälen. Bei diesen Kanälen ist jedoch eine reduzierte Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit festzustellen, die durch Mutationen in den transmembranen Segmenten der MSD verursacht wird. So befindet sich die Mutation R117 in der TM 2, wohingegen R347P in der sechsten TM lokalisiert ist (Zielenski und Tsui 1995). Die Klassen III und IV verursachen eher milde Formen der Mukoviszidose und sind möglicherweise durch die Anwendung eines Potentiators therapierbar (siehe Abschnitt 1.5).

Die Klasse V beinhaltet Mutationen, die z.B. durch Defekte im Promotor oder durch Veränderung des Spleißens zu einer geringeren funktionalen Proteinmenge führen



(Zielenski und Tsui 1995). In einigen Klassifizierungen wird eine weitere Klasse von Mutationen (VI) beschrieben, welche durch eine verkürzte Insertionszeit des Proteins in der Membran gekennzeichnet ist (Anderson 2010).



**Abbildung 6: Die verschiedenen Mutationsklassen I-V des CFTR**

Das Schema verdeutlicht die Auswirkungen der unterschiedlichen Mutationsklassen. So führen die Defekte der Klasse I und II zur Verhinderung der Insertion des CFTR-Proteins in die Plasmamembran, wohingegen die Klassen III-V die Aktivität des inserierten Proteins beeinflussen (Pletz et al. 2010).

### 1.3.3 Die häufigste Mutation $\Delta F508$ -CFTR

Die meisten Mutationen der zuvor charakterisierten Mutationsklassen, welche zu Mukoviszidose führen, sind sehr selten. Die in ca. 70% aller Patienten vorliegende  $\Delta F508$ -CFTR-Mutation, welche durch die Deletion eines Phenylalanins an der Position 508 hervorgerufen wird, stellt eine Ausnahme dar (Riordan et al. 1989). Vor allem im nördlichen Europa, sowie in den USA, handelt es sich um die weit verbreitetste Mutation. Hochauflösende Kristallstrukturanalysen der CFTR-NBD aus der Maus konnten zeigen, dass die  $\Delta F508$ -CFTR-Mutation an der Oberfläche der NBD 1 lokalisiert ist, dort aber nur zu einer sehr geringen Veränderung in der Struktur führt (Lewis et al. 2004). Vielmehr konnten Du et al. zeigen, dass aufgrund der Mutation und der daraus resultierenden gestörten Interaktion mit der NBD 2, diese NBD ein Ziel für den Abbau durch Proteasen darstellt (Du et al. 2005). Durch Strukturvorhersagen anhand von Sequenzvergleichen des ABC-Transporters Sav1866 von *S. aureus* mit dem CFTR wird ein partieller Verlust der Interaktion der NBD 1 mit der MSD 1 durch diese

Mutation vorhergesagt (Mornon et al. 2008). Weitergehend wird das  $\Delta F508$ -CFTR-Protein aufgrund seiner durch die Mutation hervorgerufenen Fehlfaltung durch die Qualitätskontrolle des ER erkannt. Das Protein verbleibt im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und wird anschließend durch das Proteasom degradiert (Cheng et al. 1990).

Ein weiteres Charakteristikum des  $\Delta F508$ -Protein ist es, dass der fehlgefaltete Kanal im Fall der Insertion in die Plasmamembran eine Restleitfähigkeit aufweist (Denning et al. 1992). Untersuchungen an Insektenzellen konnten zeigen, dass die Inkubation unter niedrigen Temperaturen von ca. 27°C zu einer partiellen Wiederherstellung der Reifung und Insertion führt (Li et al. 1993). Dieser Ansatz ist jedoch therapeutisch nicht anwendbar. Der genaue Mechanismus des *traffickings* des defekten Proteins, aber auch des wt-Proteins, wird im Abschnitt 1.3.4 detaillierter beschrieben.

### 1.3.4 Das *trafficking* des CFTR-Proteins

Das *trafficking* des CFTR verläuft sehr ineffizient. So konnten Ward und Kopito nachweisen, dass ca. 70% der wt-CFTR-Proteine sowie 99% der fehlgefalteten  $\Delta F508$ -CFTR-Proteine nicht in die Plasmamembran inseriert, sondern zuvor degradiert werden (Ward und Kopito 1994). Die meisten anderen ABC-Transporter werden hingegen zu 100% aus dem ER transportiert (Loo et al. 1998). Die Degradierung des wt-CFTR ist möglicherweise auf eine häufig auftretende Fehlfaltung des Proteins zurückzuführen. Eine andere Vermutung der Arbeitsgruppe Bebek ist, dass zu viele CFTR-Moleküle im ER synthetisiert werden sollen. Dies führt zu einer zu starken Auslastung des ER, wodurch ein Teil der Proteine degradiert wird (Rab et al. 2007).

Die Synthese des CFTR-Polypeptids erfolgt im rauen ER. Anhand von *pulse chase* Untersuchungen, bei denen das CFTR-Protein radioaktiv markiert wird und so während der Proteintranslation verfolgbar bleibt, konnte festgestellt werden, dass das CFTR-Protein schon kotranslational gefaltet wird (Kleizen et al. 2005). Außerdem werden die transmembranen Segmente in die ER-Membran verlagert. Dabei fördern zytosolische und lumenale Chaperone die Faltung des entstehenden Proteins (Amaral 2004). Zu nennen sind hier Calretikulin und Calnexin, welches in der ER-Membran vorhanden ist, sowie die zytosolischen Hsc (*Heat shock conjugate*)-Hsp (*Heat shock protein*)-40/70 und Hsp-90-Chaperonsysteme (Yang et al. 1993; Meacham et al. 1999). Innerhalb des

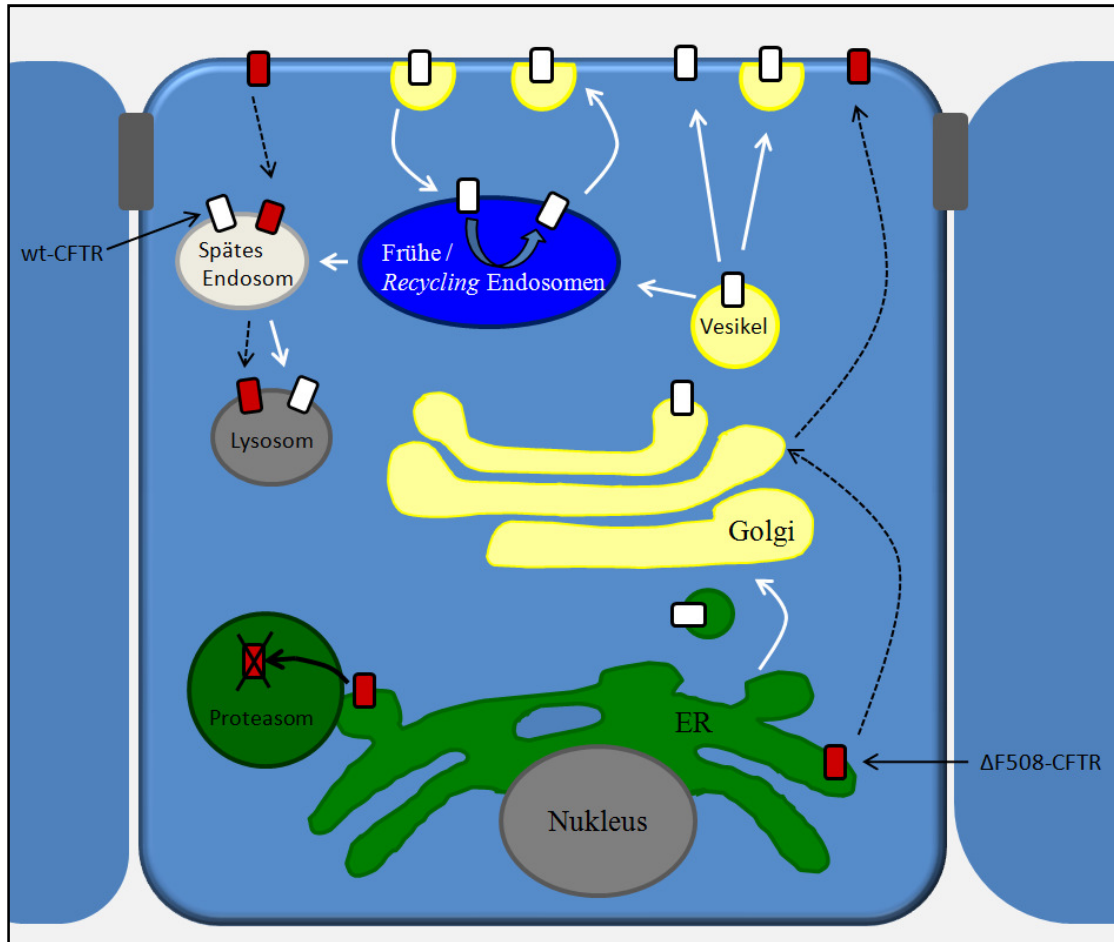
ER finden ebenfalls schon die ersten Qualitätskontrollen des neu synthetisierten Proteins statt. So bindet nach der Synthese der TM 1 ein Proteinkomplex mit Derlin-1/RMA 1 und überprüft zusammen mit dem Hsc-70-Chaperonkomplex die Faltung des entstehenden Proteins. Kommt es bei der Synthese des Proteins zu einem Defekt, wie z.B. bei  $\Delta F508$ -CFTR, initialisiert der Derlin-1/Hsc-70-Komplex den Abbau des Proteins. Dazu bindet ein weiterer Komplex aus der E3-Ubiquitin-Ligase sowie E2-konjugierte Enzyme an den CFTR und markieren es durch Ubiquitinierung zum Abbau (Younger et al. 2006; Sun et al. 2006).

Ein späteres Faltungs- und Kontrollsystem ist das bereits erwähnte Lektin Chaperonsystem Calnexin und Calreticulin. Dieses bindet an N-Acetylglukosamine des vierten zytoplasmatischen Loops des CFTR und glykolisieren das Protein (Pind et al. 1994). Weiterhin sind diese Chaperone ebenfalls an der Degradierung fehlgefalteter Proteine beteiligt. Wenn Calnexin einen Faltungsdefekt feststellt, aktiviert es eine  $\alpha$ -1,2-Mannosidase I. Diese entfernt eine Mannose von der Signalsequenz des mutierten Proteins und kennzeichnet es somit zusätzlich zur Ubiquitinierung und dem daraus resultierenden Abbau (Kleizen et al. 2005). Es ist außerdem bekannt, dass Calreticulin den Transport des mutierten Proteins zum 26 S Proteasom erhöht. Damit das 26 S Proteasom das  $\Delta F508$ -CFTR-Protein degradieren kann, muss das fehlgefaltete Protein zuvor noch durch eine ERAD *Pathway* Retrotranslokase von der ER-Membran in das Zytosol verschoben werden. Dort ist das 26 S Proteasom in der Lage das mutierte Protein aufgrund seiner Ubiquitinierung zu erkennen und abzubauen (Kleizen et al. 2005). Dieser Abbauweg, welchen auch das  $\Delta F508$ -CFTR-Protein durchläuft, wird auch ERAD (Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradierung) genannt (Ward und Kopito 1994).

Erst wenn die Faltung innerhalb und zwischen den Domänen korrekt abgeschlossen ist, wird das Protein aus dem ER exportiert (Younger et al. 2006). Für diesen Prozess werden die Proteine in COP II Vesikeln verpackt und in den Golgi Apparat transportiert (Lee et al. 2004). Im Golgi Apparat finden die letzten Modifikationen des Proteins statt. Danach wird das nun komplex glykolysierte Protein in sekretorischen Vesikeln zur Plasmamembran transportiert. Ein Teil der Proteine wird direkt in die Plasmamembran inseriert. Der andere Teil verbleibt in intrazellulären Vesikeln, die erst aktiviert durch die PKA mit der Plasmamembran verschmelzen (Weber et al. 1999; Ameen et al. 2003).

Die in die Plasmamembran inserierten CFTR-Proteine werden schnell wieder endozytiert. Durch Biotinylierungsexperimente konnte herausgefunden werden, dass 10% der Proteinmenge in der Membran pro Minute (min) endozytiert werden (Prince et al. 1994). Nach der Internalisierung gelangen die Proteine in frühe und *recycling* Endosomen. Von dort wird ein Großteil wieder durch Clathrin ummantelte COP I Vesikel in die Plasmamembran *recycled*. Der Rest wird in späte Endosomen, multivesikuläre Zellkörper sowie Lysosomen transferiert und dort degradiert (Cholon et al. 2010).

Für den Fall, dass der  $\Delta F508$ -CFTR aus dem ER transportiert und in die Plasmamembran inseriert wird, ist das fehlgefaltete Protein sehr instabil. Die beschriebene Internalisierung erfolgt sechs mal schneller als bei dem wt-CFTR. Danach wird das  $\Delta F508$ -CFTR-Protein, wahrscheinlich aufgrund seiner defekten Faltung, nicht mehr *recycled* sondern ubiquitiniert und in späten Endosomen, multivesikulären Zellkörpern sowie Lysosomen degradiert (Sharma et al. 2004). Ein Schema des *trafficking* des wt-CFTR aber auch des  $\Delta F508$ -CFTR ist in Abb. 7 dargestellt. Um die beschriebenen Mechanismen, wie z.B. das *trafficking*, zu untersuchen, oder auch Therapieansätze zu entwickeln, werden in der Mukoviszidose Forschung verschiedene Modellsysteme genutzt.



**Abbildung 7: Das CFTR trafficking**

Das CFTR-Protein wird im ER synthetisiert. Dann wird das korrekt gefaltete CFTR-Protein in den Golgi Apparat und von dort zur Plasmamembran transportiert. Die inserierten Proteine werden nachfolgend internalisiert und von dort entweder wieder eingebaut oder in späte Endosomen und Lysosomen überführt und dort abgebaut. Das  $\Delta F508$ -CFTR-Protein wird hingegen im ER als nicht korrekt gefaltet registriert und daraufhin proteasomal abgebaut. Die wenigen fehlgefalteten Kanäle, welche die Plasmamembran erreichen, werden schnell wieder in späte Endosomen internalisiert und abgebaut (bearbeitet nach (Bertrand und Frizzell 2003)).

## 1.4 Modelle der Mukoviszidoseforschung

Die Untersuchungen der Mukoviszidose zugrunde liegenden Mechanismen oder möglicher Therapieansätze werden in der Mukoviszidoseforschung in zahlreichen Modellsystemen durchgeführt. In wenigen Studien werden Luftröhren oder primäre Lungenzellen von CF-Patienten als Untersuchungsobjekt genutzt (Song et al. 2009; Cholon et al. 2010). Deren Gebrauch ist jedoch sehr limitiert, da diese nur nach einer Lungentransplantation zur Verfügung stehen.

Viele Studien werden außerdem in Organismen wie Mäusen oder Schweinen durchgeführt, da diese dem Menschen genetisch recht ähnlich sind. So konnte 2004 eine Maus generiert werden, welche die  $\beta$ -Untereinheit des ENaC-Kanals überexprimiert und phänotypisch die respiratorischen Symptome der Mukoviszidose aufzeigt (Mall et al. 2004). Die CFTR-defiziente Maus dagegen zeigte keine Symptome im respiratorischen Trakt und im Pankreas sondern nur in der Nase (Grubb und Boucher 1999). Hierdurch ist der Einsatz dieses Modells limitiert, weil der respiratorische Trakt vordergründig im Interesse vieler Untersuchungen liegt. Aufgrund der anatomischen und physiologischen hohen Ähnlichkeit des Schweins mit dem Menschen, ist das Schwein in den letzten Jahren zunehmend in das Visier der Forscher gerückt. So konnte die Arbeitsgruppe um Welsh ein Schwein genetisch so verändern, dass es defizient für das CFTR-Protein ist. Im Gegensatz zur Maus weist dieses CF-Schwein die charakteristischen Symptome im respiratorischen Trakt, im Dünndarm und im Pankreas auf (Rogers et al. 2008).

Um jedoch die molekularen Grundlagen und Wechselwirkungen der betroffenen Kanäle untereinander und mit applizierten Stoffen zu untersuchen, werden zunächst vor allem immortalisierte Zelllinien oder z.B. *X. laevis* Oozyten genutzt. Die beiden Modellsysteme werden nachfolgend genauer charakterisiert, da diese im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit zur Untersuchung des Effekts und des Wirkungsmechanismus von Sildenafil genutzt wurden.

### 1.4.1 Das heterologe Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten



**Abbildung 8: Die Oozyten des Krallenfrosches *X. laevis***

*Aufnahme mehrerer typischer *X. laevis* Oozyten der Entwicklungsstadien V und VI. In diesen Stadien zeichnen sich die Oozyten durch eine klare Zweifarbigkeit aus. Bei der hellen Hälfte handelt es sich um den unpigmentierten, vegetativen Pol, während die animale Hemisphäre zum Schutz des enthaltenen Nukleus pigmentiert ist (Quelle: [www.xenopus.com](http://www.xenopus.com)).*

Die Oozyten des Krallenfrosches *X. laevis* können dazu genutzt werden fremde (exogene) Proteine zu exprimieren. Für diese Studien eignen sich jedoch nur *X. laevis* Oozyten der Stadien V und VI, welche eine klare farbige Zweiteilung zeigen. Dabei ist die dunkle, animale Hemisphäre zum Schutz des enthaltenen Nukleus pigmentiert, während die vegetative Hemisphäre, aufgrund der fehlenden Pigmentierung, heller ist (Abb. 8). Um exogene Proteine in diesen Oozyten zu exprimieren, wird mRNA, welche für das zu exprimierende Protein kodiert durch Mikroinjektion in die Oozyte eingebracht. Um eine stabile Expression zu gewährleisten, sollte die mRNA eine 5'-Cap Struktur (P<sup>1</sup>-5'-(7-methyl)-guanosin-P<sup>3</sup>-5'-guanosin-triphosphat)), sowie eine Polyadenylierungssequenz am 3'-Ende der mRNA enthalten (Huez et al. 1974; Galili et al. 1988). Aus diesem Grund weisen die gebräuchlichen Vektoren, welche zur Generierung der mRNA verwendet werden, Polyadenylierungen mit einer Länge von ca. 30-130 Nukleotiden auf (z.B. (Hoffman und Donaldson 1988)). Innerhalb der Oozyte werden zudem die erforderlichen Modifikationen wie z.B. Glykolisierungen vorgenommen (Ceriotti und Colman 1995). Für den Fall, dass es sich bei dem exprimierten Protein, wie z.B. in Rahmen dieser Arbeit, um einen Ionenkanal handelt, wird dieser außerdem in die Membran der Oozyte inseriert. Die Charakterisierung eines elektrogenen Ionenkanals kann z.B. durch elektrophysiologische Verfahren wie *Voltage Clamp* (VC) Messungen oder die sogenannte *patch clamp* Methode erfolgen, da der Fluss der Ionen über die Membran elektrophysiologisch messbar ist. Innerhalb dieser Messungen werden die exprimierten Proteine z.B. durch Aktivatoren, Inhibitoren, Proteasen, verschiedene pH-Werte oder Ionenkonzentrationen wie z.B. Na<sup>+</sup> charakterisiert. Dabei wird die Änderung der Leitfähigkeit sowie des Stromflusses über die Membran

gemessen. Beispielsweise erfolgt die Charakterisierung des CFTR zumeist über die Aktivierung des Kanals mittels cAMP, welches in VC-Messungen zu einer Erhöhung des Membranstroms, der Leitfähigkeit sowie der Kapazität führt (Weber et al. 1999). Es ist jedoch ebenso möglich den CFTR-Kanal durch Inhibitoren, wie den Cl<sup>-</sup>-Kanalblocker NPPB (Cunningham et al. 1992) oder dem CFTR-spezifischen CFTR<sub>inh</sub>-172, zu hemmen (Taddei et al. 2004).

### **1.4.2 Humane Zelllinien als Mukoviszidosemodelle**

Da die Verfügbarkeit von humanem Gewebe zur Erforschung der Mukoviszidose sehr begrenzt ist, wurden viele Zelllinien aus humanen Zellen von gesunden Personen oder Mukoviszidose Patienten generiert. Die genutzten Zellen stammen aus unterschiedlichen Organen des Menschen, so dass z.B. Regulationsmechanismen gewebespezifisch untersucht werden können. Weiterhin ist es möglich in den Zellen Auswirkungen von chemischen Stoffen wie z.B. Aktivatoren oder Inhibitoren auf die Ionenkanäle CFTR und ENaC zu untersuchen. Dies ist auf Proteinebene z.B. durch Western Blot und immunfluoreszenzoptische Methoden möglich. Eine weitere Besonderheit einiger Zelllinien ist es, dass sie polarisierte, dichte Zellmonolayer ausbilden. Diese Epithelien können dann in sogenannte Ussing Kammern eingespannt und elektrophysiologisch untersucht werden. Diese 1952 von Ussing und Zerahn entwickelte Methode erlaubt die Messung des Ionentransports über Epithelien (Ussing und Zerahn 1951). Auch bei dieser Methode erfolgt die Charakterisierung der epithelialen Ionentransportsysteme z.B. über die Applikation von aktivierenden oder inhibierenden Substanzen, der Ionenkonzentrationen sowie des pH-Werts. Durch Ussing Kammer Messungen werden neben der Untersuchung der Mechanismen der Mukoviszidose auch mögliche Therapieansätze untersucht, da anhand der eingespannten Zellmonolayer z.B. eine Aussage über die Aufnahme und Wirkung von Therapeutika möglich ist.



## 1.5 Ansätze zur Therapie der Mukoviszidose

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die Therapie der Mukoviszidose vor allem durch die Verhinderung von Komplikationen und einer Verlangsamung des Fortschreitens der Krankheit geprägt. So werden dauerhaft Antibiotika und zum Teil auch Entzündungshemmer verabreicht, um den Pathogenbefall und die Entzündung der Atemwege zu behandeln. Das weitere Spektrum der Behandlungsmöglichkeiten umfasst die Verabreichung von Pankreasenzymen, Drainagen bis hin zu Lungentransplantationen (Pletz et al. 2010). Eine weitere Möglichkeit, die Rehydratation des Mukus zu erreichen, ist die Behandlung mit Osmolyten wie z.B. Mannitol, dessen Wirkung und Verträglichkeit zurzeit in einer klinischen Phase III getestet wird (Goralski et al. 2010). Im Fokus der Forschung stehen außerdem vor allem zwei Ansätze, um die Krankheit effektiv behandeln zu können. Zum einen die Wiederherstellung der  $\text{Cl}^-$ -Sekretion über den CFTR und zum zweiten die Reduktion der  $\text{Na}^+$ -Hyperabsorption. Eine Möglichkeit, die erhöhte Aktivität des ENaC zu inhibieren, ist die Therapie mit dem Diuretikum Amilorid oder des stärker wirkenden Analoges Benzamil (Hofmann et al. 1998). Unsere Arbeitsgruppe hat mit den Antisense-Oligonukleotiden (AON) eine weitere Therapiemöglichkeit zur Inhibition des ENaC entwickelt. Bei den eingesetzten AON handelt es sich um 16 Basenpaare kurze, synthetische und einzelsträngige DNA-Moleküle, welche komplementär zu ENaC-kodierenden mRNA-Motiven sind. Die AON binden an die ENaC-mRNA und unterdrücken so spezifisch deren Expression. So konnte von Sobczak et al. eine ca. 66%-ige Inhibition der  $\text{Na}^+$ -Absorption über ENaC nach einer Transfektion mit AON nachgewiesen werden. In primären Nasenepithelzellen von CF-Patienten konnte sogar eine 75%-ige Inhibition aufgezeigt werden (Sobczak et al. 2009). Für diese Untersuchungen wurden aus operativ entfernten Nasenpolypen von Gesunden und CF-Patienten primäre Nasenepithelzellen vereinzelt und kultiviert. Weiterhin konnte für die Anwendung der AON im Gegensatz zur Amiloridtherapie eine sehr viele höhere maximale Wirkungsdauer von 72 Stunden beschrieben werden (Sobczak et al. 2010a).

Neben der Blockierung der  $\text{Na}^+$ -Hyperabsorption ist die Wiederherstellung der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit ein Hauptziel der Mukoviszidose Forschung. In einigen Forschungsvorhaben wird deshalb versucht eine Aktivitätserhöhung alternativer  $\text{Cl}^-$ -Kanäle, wie z.B. eines  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierten  $\text{Cl}^-$ -Kanals, zu erreichen. So wird durch die Applikation der

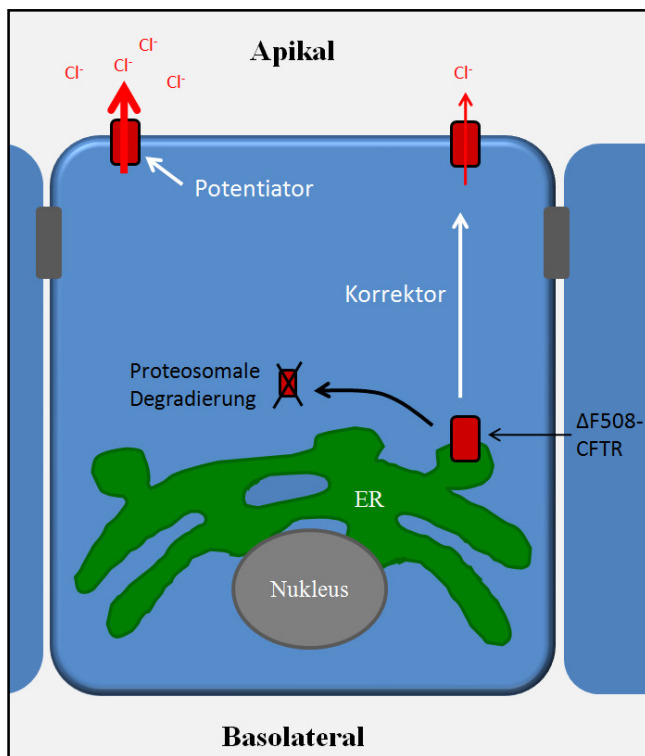
Substanz Moli 1901  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt, welches den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^-$ -Kanal aktiviert und zu einer erhöhten  $\text{Cl}^-$ -Sekretion führt (Ratjen 2008). Bisher zeigen diese Studien aber nur geringe Erfolge. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der CFTR neben der  $\text{Cl}^-$ -Sekretion vor allem eine Funktion als Regulatorprotein hat, und diese regulatorische Funktion des CFTR nicht durch alternative Kanäle kompensiert werden kann.

Seit der Entdeckung des CFTR-Gens als Ursache für Mukoviszidose wird der CFTR-Gentransfer als Möglichkeit zur Wiederherstellung der CFTR-Funktion erforscht. Dabei wird die Einbringung des wt-CFTR-Gens in die Zellen angestrebt. Dies wird über verschiedene Transportvehikel wie z.B. rekombinante Adenoviren, rekombinante adeno-assoziierte Viren, kationische Liposomen und kationische Polymervektoren vermittelt (Mueller und Flotte 2008). Der erste Gentransfer wurde 1990 von der Arbeitsgruppe Welsh beschrieben, die eine Transfektion von CFTR in HeLa-Zellen über ein virales T7-Hybridexpressionssystem nachweisen konnten (Rich et al. 1990). Jedoch führt der Transfer von wt-CFTR-DNA nach den bisherigen Erkenntnissen nur zu einer sehr schwachen und kurzzeitigen Expression des CFTR, sowie zu inflammatorischen Reaktionen des Immunsystems (Gibson et al. 2003). Aufgrund der kurzen Wirkungsdauer muss die Transfektion regelmäßig wiederholt werden, wodurch Entzündungsreaktionen und die Aktivierung des Immunsystems hervorgerufen werden. Aus diesen Gründen wird von unserer Arbeitsgruppe, anstatt der Einbringung der DNA, eine Transfektion mit CFTR-mRNA angestrebt. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die mRNA unter anderem nicht in den Nukleus gelangen muss. Außerdem fehlen die das Immunsystem beeinträchtigenden Viruspartikel sowie die Fremd-DNA. In ersten Versuchen war es möglich in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen, welche homozygot für den mutierten  $\Delta\text{F508}$ -CFTR sind und so keine CFTR-Aktivität zeigen, eine Wiederherstellung der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in der Ussing Kammer zu erreichen (Bangel-Ruland et al. 2010).

Da die Einbringung des CFTR-Gens durch gentechnische Methoden in naher Zukunft nicht unmittelbar therapeutisch angewendet werden kann, wird außerdem versucht die Aktivität des defekten Kanals durch verschiedene chemische Substanzen wieder herzustellen. Ein Beispiel für diese Anwendung ist die Wiederherstellung der CFTR-Funktion bei verfrühten Stoppcodons, welche den Klasse I Mutationen zugeordnet sind (siehe Abschnitt 1.3.2). Zur Therapie werden Stoffe appliziert, die verhindern können,

dass das verfrühte Stoppcodon abgelesen wird. Dies führt möglicherweise zur Synthese des vollständigen Proteins und somit zu einem funktionellen CFTR-Kanal. Beispiele für diese Stoffe sind Gentamycin und der Stoff PTC124<sup>®</sup> (Wilschanski et al. 2003; Welch et al. 2007).

Neben der Therapie der verfrühten Stoppcodons werden vor allem Therapiemöglichkeiten für die häufigste Mutation  $\Delta F508$ -CFTR untersucht. Dabei ist besonders interessant, dass nachgewiesen werden konnte, dass schon der Einbau von 10-15% des fehlgefalteten CFTR aufgrund der Restleitfähigkeit zu einer Linderung der CF-Symptome führt (Johnson et al. 1992; Farmen et al. 2005). Aus diesem Grund ist die Suche nach Stoffen, welche die Restleitfähigkeit des inserierten  $\Delta F508$ -CFTR erhöhen (Potentioren) oder die zu einer gesteigerten Insertion des fehlgefalteten CFTR führen (Korrektoren) in den Fokus zahlreicher Forschungsprojekte gerückt (Abb. 9). Für eine erfolgreiche Therapie scheint eine Kombination aus einem Korrektor und einem Potentiator, der die Kanalaktivität und bestenfalls auch die Stabilität des Proteins erhöht, am sinnvollsten zu sein (Jurkuvenaite et al. 2010).



**Abbildung 9: Ansatzpunkte für die Wirkung von Potentioren und Korrektoren**

Das Schema veranschaulicht die Ansatzpunkte sowie die Wirkweise von Korrektoren, welche die Insertion des  $\Delta F508$ -CFTR fördern. Weiterhin ist auch die aktivierende Wirkung der Potentioren auf bereits inserierte Kanäle dargestellt (inspiriert von (Guggino und Stanton 2006)).

Einige weitere Beispiele für Potentiatoren sind VRT-532 (Van Goor et al. 2006), der Phosphodiesterase-3 Inhibitor Milrinone (O'Grady et al. 2002), die Flavonoide Genistein und Apigenin (Illek und Fischer 1998) sowie einige Phenylglycine und Sulfonamide (Pedemonte et al. 2005b). Ein weiterer Potentiator ist VX-770, für den in kultivierten humanen Zellen der Lunge von CF- und nicht-CF-Patienten eine erhöhte Aktivität des CFTR in Ussing Kammer Messungen nachgewiesen werden konnte (Van Goor et al. 2009). Dieser Potentiator wird zurzeit in einer klinischen Untersuchung der Phase II in CF-Patienten, welche homozygot für die Mutation  $\Delta F508$  sind, getestet. Die untersuchten Wirkungsmechanismen der Potentiatoren sind nicht einheitlich und reichen von der Erhöhung der Phosphorylierung des CFTR-Kanals bis zur Erhöhung der Konzentration der aktivierenden sekundären Botenstoffe. Neben den reinen Potentiatoren gibt es auch Stoffe, bei denen zusätzlich zur potenzierenden Wirkung ein korrigierender Effekt auf den CFTR-Kanal detektiert wurde. So führt der Potentiator Curcumin in Membran *patches* zu einer Erhöhung der Offenzeit des CFTR-Kanals (Berger et al. 2005). Zusätzlich zu diesem potenzierenden Effekt konnte nach der Inkubation mit Curcumin in  $\Delta F508$ -CFTR-Mäusen eine Normalisierung der nasalen Potentialdifferenz (PD), also des Potentials über das Nasenepithel, welches vorwiegend durch die  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit bestimmt wird, gemessen werden. Außerdem konnte eine erhöhte Menge von CFTR-Molekülen in der Plasmamembran von  $\Delta F508$ -CFTR-exprimierenden Babyhamster Nierenzellen (BHK; *Baby hamster kidney*) durch Curcumin Inkubation nachgewiesen werden (Egan et al. 2004). Der Korrektor Curcumin stellt somit auch das *trafficking* des mutierten Kanals wieder her, was zu einer erhöhten Menge an CFTR-Molekülen in der Plasmamembran führt.

Die Applikation von Chaperonen wie z.B. Corr-4a (Varga et al. 2008), Corr-2b (Wang et al. 2006), Corr-3a (Loo et al. 2008), VRT-532 (Van Goor et al. 2006) und VRT-325 (Van Goor et al. 2006), welche dem  $\Delta F508$ -CFTR, aufgrund der Förderung der Proteinreifung, das Verlassen des ER ermöglichen, ist eine weitere Option der Korrektur. Für den bekanntesten Bisaminomethylbithizole Derivat Korrektor Corr-4a (2-(5-chloro-2-methoxy-phenylamino)-49-methyl-[4,5,9 bithiazolyl-29-yl]-phenymethanon) konnte in Epithelzellen aus der Rattenschilddrüse bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine Korrektur des  $\Delta F508$ -CFTR *trafficking* um 8% herbeigeführt werden (Pedemonte et al. 2005a). Corr-4a weist den Vorteil auf, dass

zusätzlich die Stabilität des geretteten CFTR in der Membran erhöht wird (Varga et al. 2008). Weitere Korrektoren sind unter anderem Natrium-4-Phenylbutyrate (Rubenstein et al. 1997), Glafenine (Robert et al. 2010) und Miglustat (Norez et al. 2006). Für die meisten dieser Stoffe ist die Wirkung nur *in vitro*, z.B. in der Zellkultur nachgewiesen. Von *in vivo* Experimenten gibt es bisher nur zu wenigen Korrektoren Daten. Eine Ausnahme stellt hierbei der 1997 identifizierte Korrektor Natrium-4-Phenylbutyrat dar. Für diesen Korrektor konnte in einer klinischen Studie jedoch nur ein sehr geringer Effekt nachgewiesen werden (Rubenstein und Zeitlin 1998). In vielen Studien werden auch die Mechanismen der Korrektoren untersucht. Ein Beispiel ist die Analyse des Wirkungsmechanismus der Korrektoren VRT-325 und corr-4a. Um zu untersuchen, ob die Korrektoren direkt an den CFTR binden, fügten Wang et al. in die Proteinsequenz des CFTR Cysteine ein, welche im Protein Disulfidbrückenbindungen ausbilden. Da die Inkubation mit den Korrektoren VRT-325 und corr-4a zu einer Verhinderung der Ausbildung dieser Disulfidbrücken führte, wurde auf eine direkte Interaktion dieser Substanzen mit dem CFTR geschlossen (Wang et al. 2007). Die Arbeitsgruppe von Galiotta hingegen unterstützt die Theorie, dass Korrektoren über intermediäre Proteine indirekt auf den CFTR wirken. Dies beruht auf der Erkenntnis, dass die korrigierende Wirkung einiger Korrektoren zelltypabhängig ist. Dies bedeutet, dass in manchen Zelltypen nicht alle notwendigen intermediären Proteine vorhanden sind. Eine direkte Interaktion ist hingegen in jedem Zelltyp möglich (Powers et al. 2009; Pedemonte et al. 2010). Um den Wirkmechanismus der bekannten Korrektoren endgültig aufklären zu können, sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

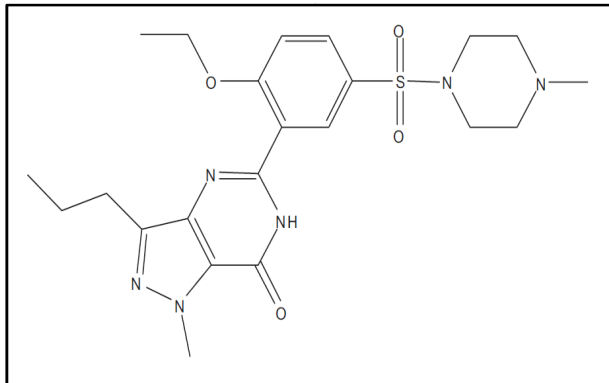
Ein weiterer Stoff, welcher als Korrektor identifiziert wurde, ist der Phosphodiesterase-5 Inhibitor Sildenafil (SL). Da der korrigierende Effekt dieses Korrektors sowie der Wirkmechanismus von SL auf den CFTR untersucht werden sollte, wird SL im Folgenden genauer beschrieben.

## 1.6 Die Familie der Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen (PDE) sind Enzyme die zyklische Nukleotide wie cAMP oder cGMP abbauen und diese so inaktivieren. Dabei spalten sie die Phosphodiesterbindung der zyklischen Nukleotide (Corbin und Francis 1999). Bei diesen Enzymen handelt es sich somit um die Gegenspieler zu den Guanylat- und Adenylatzyklasen. In Säugetieren konnten bis heute elf PDE Familien beschrieben werden, die mit eins bis elf betitelt sind (Conti 2000) und sich in ihrer Substratspezifität für cAMP oder cGMP unterscheiden. Die PDE der Familien vier, sieben und acht sind spezifisch für cAMP, wohingegen die Familien fünf, sechs und neun substratspezifisch für cGMP sind. Die Familien eins, zwei, drei, zehn und elf sind nicht streng substratspezifisch, sondern katalysieren den Abbau von cAMP und cGMP (Corbin et al. 2002).

Die PDE-5, welche wie beschrieben von SL inhibiert wird, ist unter anderem in der Lunge, dem Penisschwellkörper (*Corpus cavernosum*) und den Thrombozyten nachgewiesen worden (Corbin und Francis 1999). In der Lunge ist die PDE-5 mit 80% die am häufigsten vorkommende PDE. Diese weist eine homodimere Struktur auf und besitzt neben der cGMP-hydrolysierenden Domäne zwei GAF (cGMP-bindende PDEs, *Anabaena* Adenylyl-Cyclasen u. *E.coli* FhLA) Domänen, welche ebenfalls cGMP binden (Koesling et al. 2005). Im Falle einer Bindung von cGMP an die GAF-Domänen ist eine Phosphorylierung der PDE durch die PKG möglich. Dies resultiert in einer längeren Aktivierung der PDE-5 sowie einer erhöhten Affinität zu cGMP. Somit reguliert cGMP den Abbau durch diesen negativen Rückkopplungsmechanismus selbst (Gopal et al. 2001; Koesling et al. 2005). Der Rückkopplungsmechanismus stellt somit sicher, dass die cGMP-Konzentration in der Zelle nicht so stark ansteigt, da dies weitreichende Folgen hat, welche im Anschluss anhand der Inhibition der PDE-5 durch SL verdeutlicht werden.

### 1.6.1 Der PDE-5 Inhibitor SL



**Abbildung 10: Sildenafilcitrat**

Strukturformel von Sildenafilcitrat  
(entnommen aus (Robert et al. 2008)).

Durch groß angelegte sogenannte *high throughput screenings* wurde SL als ein möglicher Korrektor des mutierten  $\Delta F508$ -CFTR entdeckt (Dormer et al. 2005). In diesen *screenings* wurde die Wirkung bereits zugelassener Pharmazeutika auf den CFTR getestet. Der Vorteil bereits zugelassener Substanzen liegt in einer potentiell schnelleren Zulassung zur Therapie der betroffenen Krankheit, da ihre Nebenwirkungen und ihre Metabolisierung bereits bekannt sind. Der *in vivo* Effekt von SL auf den CFTR im respiratorischen Trakt von CF-Patienten wird zurzeit in einer klinischen Studie der Phase II ermittelt ([www.clinicalTrials.gov](http://www.clinicalTrials.gov); NCT01132482).

Bei SL handelt es sich um einen PDE-5-Inhibitor, der aufgrund seiner muskelrelaxierenden Wirkung (Vasodilatation) für die Therapie des pulmonalen Bluthochdrucks entwickelt wurde, da durch die Dilatation der Blutgefäße eine geringe Erniedrigung des Blutdrucks hervorgerufen wird. Für diese Anwendung wurde die aktive Substanz Sildenafilcitrat, dessen Strukturformel in Abb. 10 dargestellt ist, im Jahr 2006 unter dem handelsüblichen Namen Revatio<sup>®</sup> (Pfizer; Berlin; Deutschland) zugelassen. Die erste Zulassung des Wirkstoffes erfolgte aber schon 1998 zur Therapie der erektilen Dysfunktion mit dem Handelsnamen Viagra<sup>®</sup> (Pfizer; Berlin; Deutschland) (Goldenberg 1998). Im Jahre 2003 wurden mit Vardenafil (Levitra<sup>®</sup>; Bayer HealthCare; Leverkusen; Deutschland) und Tadalafil (Cialis<sup>®</sup>; Lilly Pharma; Indianapolis; USA) zwei weitere PDE-5-Blocker mit dem gleichen Wirkmechanismus zur Behandlung der erektilen Dysfunktion vermarktet (Gupta et al. 2005).

Der Wirkstoff Sildenafilcitrat hat eine Halbwertszeit von ca. drei bis vier Stunden und wird über die Cytochrome P-450 (CYP) Isoenzyme CYP3A4 und CYP2C9

metabolisiert (Schwartz und Kloner 2010). SL blockiert hochselektiv die Inhibition der PDE-5, welche den Abbau von cGMP katalysiert, und führt so zum Anstieg der cGMP-Konzentration (Gupta et al. 2005). Die Wirkung verschiedener PDE-Blocker ist auf ihre strukturelle Ähnlichkeit mit dem Substrat der entsprechenden PDE erklärbar. So ist SL strukturell ähnlich zum sekundären Botenstoff cGMP und konkurriert deshalb mit diesem um die Bindung an der PDE-5. Als Konsequenz der Bindung von SL an die PDE-5 wird ein Großteil der cGMP-Moleküle nicht abgebaut.

### **1.6.2 SL-Wirkmechanismus bei der Behandlung von Bluthochdruck und erektiler Dysfunktion**

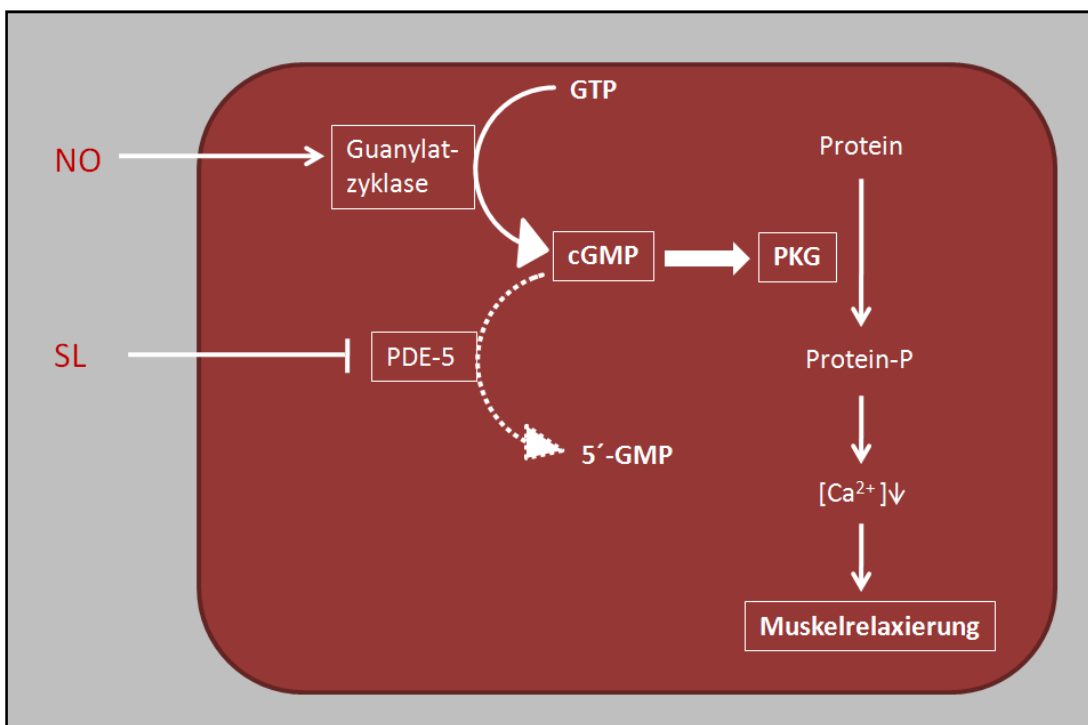
In beiden Anwendungsfällen greift SL in die Regulation der cGMP-Konzentration ein und verursacht so Veränderungen in einer cGMP-abhängigen Signalkaskade (Abb. 11). Innerhalb dieser Signalkaskade führt die Ausschüttung des Botenstoffes Stickstoffmonoxid (NO) zur Aktivierung der frei in der Zelle vorkommenden Guanylatzyklase. Diese synthetisiert im Folgenden den sekundären Botenstoff cGMP aus Guanosintri-phosphat (GTP), aufgrund dessen eine Erhöhung der cGMP-Konzentration verursacht wird. Gleichzeitig degradiert die PDE-5 cGMP zu Guanosinmonophosphat (GMP) und reduziert auf diesem Wege die cGMP-Konzentration (Corbin et al. 2002). Der cGMP-Level wird somit aus der Balance der Synthese und dem Abbau des cGMP bestimmt. An diesem Punkt der Signalkaskade greift SL ein. Es inhibiert den Abbau des cGMP und verschiebt so die Balance in Richtung der cGMP-Synthese (Ballard et al. 1998). Die cGMP-regulierte PKG wird nun durch die steigende cGMP-Konzentration aktiviert. Die PKG wiederum führt zur Reduktion der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufgrund von phosphorylierungs-spezifischen Proteinen. Welche Proteine die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration senken, ist noch nicht vollständig geklärt. Unter anderem könnten aber die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, der Inositoltriphosphat Rezeptor,  $\text{K}^{+}$ - oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle beteiligt sein (Corbin und Francis 1999). Im nächsten Schritt dieser Signalkaskade führt die reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer Entspannung der glatten Muskulatur.

Im Falle einer erektilen Dysfunktion führt die Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Relaxierung der glatten Muskulatur des Penisschwellkörpers sowie der Penisarteriolen. Dies verursacht einen erhöhten Blutstrom in den Penis durch die Arterien. Die Arterien drücken durch das vergrößerte Volumen die Venen ab. Die erhöhte Blutmenge führt



wiederum zu einem Blutstau, der schlussendlich eine Erektion herbeiführt (Corbin und Francis 1999). SL erhöht somit durch die Relaxierung im Penisschwellkörper den Prozess der normalen Erektion. Dies bedeutet, dass ohne einen hormonellen Impuls, welcher zur Ausschüttung von NO führt, keine Erektion unterstützt wird, da nur dann cGMP gebildet wird (Ballard et al. 1998).

Bei der Behandlung des Bluthochdrucks führt die Inhibition der PDE-5 ebenfalls zur Erhöhung der cGMP-Konzentration. Auch in der Gefäßmuskulatur wird die zuvor beschriebene Signalkaskade aktiviert, die eine Gefäßerweiterung durch die Entspannung der glatten Muskulatur hervorruft (Koesling et al. 2005).



**Abbildung 11: Schema des Wirkmechanismus von SL**

Die Abbildung verdeutlicht die inhibierende Wirkung von Sildenafil (SL) auf die Phosphodiesterase-5 (PDE-5), sowie die Veränderungen innerhalb dieser Signalkaskade beginnend mit der Erhöhung der cGMP-Konzentration bis hin zur Muskelrelaxierung (bearbeitet nach (Corbin und Francis 1999)).

### 1.6.3 Charakterisierung des PDE-5 Inhibitors SL im Hinblick auf Mukoviszidose

Neben den beschriebenen Wirkungen auf die Relaxierung der Muskeln konnte gezeigt werden, dass SL bei der Krankheit Mukoviszidose entzündungshemmende Effekte aufweist (Toward et al. 2004). Außerdem vermindert es die Adhäsion von pathogenen Bakterien wie *P. aeruginosa* in den Luftwegen (Poschet et al. 2007). Im Jahre 2005 konnte weiterhin erstmals festgestellt werden, dass SL das *trafficking* des  $\Delta F508$ -CFTR korrigiert. Die zweistündige Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$  SL führte zu einer Verschiebung der Lokalisation des  $\Delta F508$ -CFTR vom Zellinneren zur Plasmamembran. Für diese Untersuchungen wurden isolierte Nasenepithelzellen von CF-Patienten und Gesunden sowie  $\Delta F508$ -CFTR-exprimierende Nasenepithelzellen (CF15) mit SL inkubiert und mittels immunofluoreszenzoptischer Methoden untersucht. Für den wt-CFTR konnte in diesen Untersuchungen kein Effekt nachgewiesen werden, während für die  $\Delta F508$ -CFTR-Zellen eine Erhöhung der CFTR-Expression in der Plasmamembran von 32% detektiert werden konnte. In einer angeschlossenen Iodid Efflux Studie konnte zusätzlich die Wiederherstellung der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in den CF15-Zellen durch 1 mM SL erreicht werden (Dormer et al. 2005).

Kürzlich konnte der Effekt von SL auf den CFTR in  $\Delta F508$ -CFTR-Mäusen bestätigt werden. Lubamba et al. verabreichten wt- und  $\Delta F508$ -CFTR-Mäusen 0,7 mg/kg SL, sowie die beiden Analoga Vardenafil und Tadalafil. Die Konzentration von 0,7 mg/kg SL entspricht der klinisch angewendeten Dosis und verursacht eine zirkulierende Konzentration der Substanz von ca. 1  $\mu\text{M}$ . Vor der Verabreichung sowie nach einem Zeitraum von einer bzw. 24 Stunden wurde die nasale PD gemessen. Dabei konnte in den untersuchten  $\Delta F508$ -CFTR-Mäusen eine Wiederherstellung der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit registriert werden. Im Gegensatz zu Dormer et al. konnten Lubamba et al. zusätzlich einen potenzierenden Effekt der Aktivität des wt-CFTR durch SL nachweisen (Lubamba et al. 2008; Lubamba et al. 2010). Durch welchen Mechanismus SL auf den CFTR wirkt, ist bisher noch nicht näher untersucht worden. Zum einen wäre es möglich, dass SL, wie einige andere Korrektoren, eine direkte Interaktion mit dem CFTR zeigt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass SL auch hier über die Erhöhung der cGMP-Konzentration wirkt, wie bereits im Abschnitt 1.6.2 beschrieben wird (Dormer et al. 2005; Lubamba et al. 2008).

## 1.7 Ziele der Arbeit

Bei der häufigsten angeborenen Stoffwechselerkrankung Mukoviszidose führt die Mutation des CFTR zu einer defekten Cl<sup>-</sup>-Sekretion, welche weitreichende physiologische Folgen hat und zu einer stark verminderten Lebenserwartung der Betroffenen führt. Aus diesem Grund wird seit vielen Jahren nach Therapiemöglichkeiten geforscht, welche die Cl<sup>-</sup>-Sekretion wiederherstellen. Ein Ansatz nutzt sogenannte Korrektoren und/oder Potentioren zur Therapie der Mukoviszidose. Dabei beheben Korrektoren den Transportdefekt der häufigsten Mutation  $\Delta F508$ -CFTR, wohingegen Potentioren die Aktivität der fehlgefalteten Kanäle in der Plasmamembran erhöhen (Robert et al. 2008). Ein möglicher Korrektor ist der PDE-5-Inhibitor SL. Im Rahmen dieser Arbeit war es daher vorgesehen, den bereits beschriebenen korrigierenden Effekt von SL auf den  $\Delta F508$ -CFTR und den Effekt auf den wt-CFTR zu verifizieren sowie den zugrunde liegenden Mechanismus zu untersuchen. Im ersten Teil der Arbeit wurde für diese Untersuchungen das heterologe Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten genutzt. Bei dieser Methode wird mRNA in die Oozyten injiziert, welche das Protein synthetisieren und den funktionellen Kanal in die Membran einbauen. Im Vorfeld der Untersuchungen in den *X. laevis* Oozyten war es vorgesehen verschiedene mRNAs mit unterschiedlich langen Poly(A)-Schwänzen von 20, 70 und 120 Adeninen zu untersuchen, um eine größtmögliche Expression des wt-CFTR in den Oozyten zu erzielen. Die Quantifizierung der Expression erfolgt über die Aktivierung des CFTR-Kanals mittels cAMP in VC-Messungen.

Da zudem die Expression der PDE-5 in den *X. laevis* Oozyten eine Voraussetzung für die Inhibition eben dieser PDE durch SL ist, war es ein Ziel zu überprüfen, ob die Oozyten die PDE-5 endogen exprimieren. Dieses Vorhaben wurde mittels molekularbiologischer Untersuchungen anhand der isolierten Gesamt-mRNA der Oozyten realisiert.

Nach dem Abschluss der beschriebenen Voruntersuchungen wurde mit der Analyse des Effekts von SL auf den CFTR begonnen. Für diese Experimente sollten wt-CFTR und  $\Delta F508$ -CFTR-exprimierende Oozyten mit SL injiziert und der cAMP-vermittelte Strom über die Membran gemessen werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es den Wirkmechanismus von SL auf den CFTR zu untersuchen. In vorangegangenen Veröffentlichungen wurde entweder eine direkte oder eine cGMP-abhängige Wirkung

von SL auf den CFTR vermutet (Dormer et al. 2005; Lubamba et al. 2008). Um den Mechanismus zu analysieren, ergab sich als weitere Zielsetzung die PKG sowie die Guanylatzyklase der cGMP-Signalkaskade zu inhibieren. Für diese Experimente wurden der Guanylatzyklase Inhibitor ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) sowie der PKG-Blocker KT5823 ausgewählt. Im Vorfeld hierzu war es jedoch zunächst vorgesehen zu überprüfen, ob cGMP zu einer Aktivierung des CFTR in VC-Messungen führt.

In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe Weber in Zusammenarbeit mit dem Mukoviszidose Zentrum in Gießen konnte anhand von elektrophysiologischen Messungen in Ussing Kammern nachgewiesen werden, dass eine Applikation von 150  $\mu\text{M}$  SL zu einer Aktivierung des  $\Delta\text{F508}$ -CFTR in der Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> führt (Rückes-Nilges et al. 2007). Aus diesem Grund war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit den Effekt verschiedener SL-Konzentrationen, sowie die Auswirkung der beiden cGMP-Signalweginhibitoren KT5823 und ODQ, zu analysieren. Für diese Untersuchungen wurden die  $\Delta\text{F508}$ -CFTR-Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> und die wt-CFTR-Zelllinie 16HBE14o<sup>-</sup> ausgewählt. Die Wirkung der Substanzen sollte zunächst in elektrophysiologischen Ussing Kammer Messungen analysiert werden. Weiterhin war es vorgesehen die Wirkung des SL sowie des Inhibitors ODQ auch auf der Ebene der Proteinexpression durch Western Blot Analysen nachzuweisen. In einer abschließenden Untersuchung sollten die CFTR-Kanäle in der Plasmamembran mittels immunofluoreszenzoptischer Methoden nach Inkubation mit verschiedenen SL-Konzentrationen in beiden Zelllinien quantifiziert werden. Auch mittels dieser Methode war es das Ziel den SL-Wirkmechanismus mittels des PKG-Inhibitors KT5823 zu analysieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1.1 Verwendete Chemikalien und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien und Zusätze werden im Anhang in der Tabelle (Tab.) 48 aufgeführt. Des Weiteren wurden alle Lösungen für die Experimente mit den *X. laevis* Oozyten mit VE-H<sub>2</sub>O angesetzt. Die Lösungen für die molekularbiologischen und biochemischen Methoden sowie für die immunfluoreszenzoptischen Analysen wurden mit Millipore-H<sub>2</sub>O hergestellt. Falls eine Ausnahme von dieser Regel besteht, ist dies ausdrücklich vermerkt.

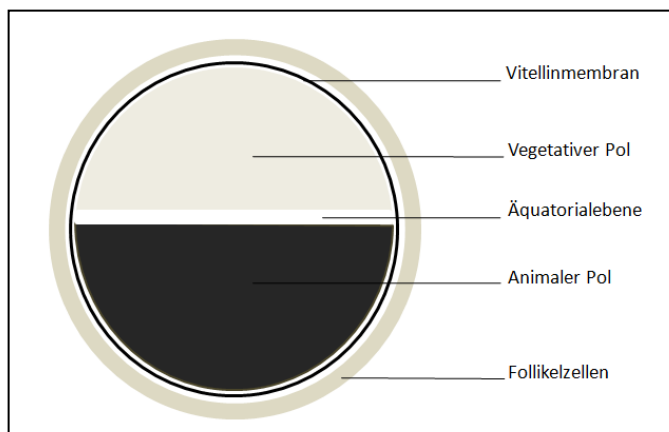
### 2.2 Das heterologe Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten

Im Jahre 1971 wurde zum ersten Mal die Möglichkeit der Charakterisierung von exogenen Proteinen in *X. laevis* Oozyten beschrieben (Gurdon et al. 1971). Unter anderem können so exogene Rezeptoren, Transporter oder Ionenkanäle in den Oozyten exprimiert werden. Für die heterologe Expression wird mRNA oder DNA in die Oozyte injiziert. Dabei erfolgt eine Injektion der DNA in den Nukleus der Oozyte, während die mRNA in das Zytoplasma injiziert wird. Bei der DNA muss somit noch eine Transkription erfolgen, während die mRNA direkt translatiert werden kann. Innerhalb dieser Arbeit erfolgte ausschließlich eine Injektion von mRNA, welche den Ionenkanal CFTR kodierte. Innerhalb von ca. 2-3 Tagen nach der Injektion der mRNA war gewährleistet, dass die Expression des Ionenkanals in der Membran der Oozyte erfolgt war (siehe 1.4.1). Dabei sind die einfache und kostengünstige Haltung der *X. laevis* Frösche, die große Anzahl der verfügbaren Oozyten sowie deren Größe und einfache Entnahme Vorteile dieser Methode. Bei der Charakterisierung der Ionenkanäle ist es jedoch sehr wichtig die zelleigenen Ionenkanäle der Oozyte, auch endogen genannt, zu berücksichtigen, um sie von den exogen exprimierten abgrenzen zu können (Dascal 1987; Sobczak et al. 2010b). Als Beispiel exprimieren die Oozyten mehrere endogene Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>- sowie K<sup>+</sup>-Kanäle. Dabei können die endogenen Cl<sup>-</sup>-Kanäle aber z.B. von dem in dieser Arbeit charakterisierten CFTR abgegrenzt werden, da die endogenen Kanäle nicht durch cAMP oder cGMP aktiviert werden können. Zur Kontrolle ist die

Messung nicht-injizierter Oozyten unter den gleichen Bedingungen wichtig, um die endogenen Merkmale der Oozyten sowie von deren Spendertieren zu erfassen.

### 2.2.1 Der Krallenfrosch *X. laevis* und seine Oozyten

Der Krallenfrosch *X. laevis*, auch afrikanischer Krallenfrosch oder aufgrund seines früheren Gebrauchs zur Feststellung einer Schwangerschaft auch Apothekerfrosch genannt, gehört zur Familie der Zungenlosen (*Pipidae*). Es handelt sich um dämmerungs- und nachtaktive Tiere. Die Frösche besitzen eine durchschnittliche Größe von 11-13 cm und haben an ihren Vorder- und Hinterbeinen Schwimmhäute und Krallen. Im Abdomen der weiblichen Frösche befinden sich die Ovarlappen, welche aus Bindegewebe, Follikelzellen, Blutgefäßen und den Oozyten bestehen. Da die Oogenese bei den Fröschen asynchron verläuft, sind alle sechs verschiedenen Reifestadien der Oozyten im Ovarlappen vorhanden. Durch eine hormonelle Stimulation werden die unreifen Eizellen zu reifen Eizellen, welche dann befruchtet werden können. Die Oozyten haben einen Durchmesser von 1-1,3 mm und bestehen aus einem animalen und einem vegetativen Pol (Gold R. 1993; Weber 1999). Die animale Hemisphäre beinhaltet den Nukleus der Oozyte und ist zu dessen Schutz pigmentiert. Die Oozyte ist von einer Vitellinmembran, welche der Stabilisierung der Oozyte dient, und einer Schicht aus Follikelzellen umgeben. Die Follikelzellen sind durch *gap junctions* aneinander als auch an die Oozyte gekoppelt. Im sechsten Stadium bildet die Oozyte zwischen den beiden Hemisphären in der Äquatorialebene zusätzlich noch einen unpigmentierten Bereich aus (siehe Abb. 12).



**Abbildung 12: Modell einer *X. laevis* Oozyte**

Die Oozyten des Krallenfrosches bestehen aus dem animalen und dem vegetativen Pol. Weiterhin ist die Oozyte von einer Vitellinschicht, sowie einer Schicht aus Follikelzellen, umgeben (bearbeitet nach (Gold R. 1993)).

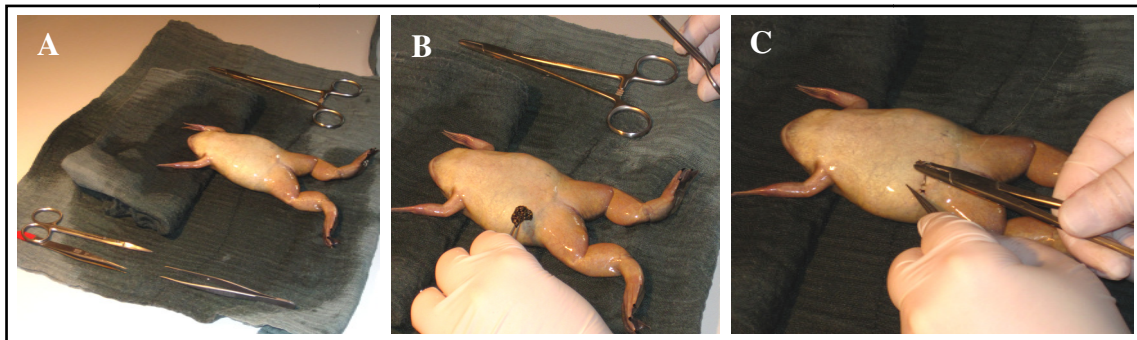
### **2.2.2 Hälterung des Krallenfrosches *X. laevis***

Die verwendeten Froschweibchen wurden von der Firma *African Xenopus Facility* (Knysna; Südafrika) bezogen und unter der Tierversuchsnummer A72/2003 registriert. Die Frösche werden in ca. 70 Liter (l) umfassenden Wasserbecken gehalten, welche durch ein Pumpsystem kontinuierlich mit Wasser versorgt werden. Weiterhin werden die Becken durch Sprudelsteine mit Sauerstoff begast. Die Becken enthalten zusätzlich Rückzugsmöglichkeiten für die Tiere in Form von PVC-Rohren, sowie eine Abdeckung aus Plexiglas. Für die gleichbleibende Qualität der Oozyten ist es außerdem wichtig die Wassertemperatur konstant bei ca. 16-18°C zu halten. Die Tiere werden 2 x wöchentlich mit Trockenfutter der Marke *Frog Brittle Nuggets* (Nasco; Fort Atkinson; USA) gefüttert.

### **2.2.3 Isolation der Oozyten durch Laparotomie**

Um die Oozyten aus den Froschweibchen zu entnehmen, wurden die Frösche zunächst für eine halbe Stunde in dem Anästhetikum Tricaine (MS 222; 3-Aminobenzoic-acid-ethyl-ester) betäubt. Die Zusammensetzung der Tricaine-Lösung ist in Tab. 1 gezeigt. Um das Überleben der Tiere zu sichern, ist es wichtig darauf zu achten, dass die Nüstern über Wasser sind, da es sich bei den *X. laevis* Fröschen um Lungenatmer handelt. Nach der Inkubationszeit wurde zunächst der Umkehrreflex getestet. Wenn die Tiere auf dieses horizontale Drehen ihres Körpers nicht mehr reagieren, werden sie mit Leitungswasser abgewaschen. Der Frosch wurde nun für die Operation auf feuchte Mullkompressen (Danz GmbH & Co KG; Wetter; Deutschland) gelegt, um eine Dehydration zu vermeiden. Nun wurde die ventrale Seite des Abdomens durch einen ca. 1 cm langen Schnitt mit einer Präparierschere geöffnet. Mittels einer Pinzette konnte nun ein Teil des Ovars entnommen werden. Der entnommene Ovarlappen wurde in eine Kollagenaselösung gegeben. Nachdem eine hinreichende Menge des Ovars entnommen wurde, konnte der Schnitt mit einem resorbierenden Garn (*Layofil Catgut plain*; Vömel; Kronberg; Deutschland) verschlossen werden (siehe Abb. 13). Nach der Operation wird das Froschweibchen zum Aufwachen in ein Gefäß mit Wasser gesetzt. Sobald der Frosch erwacht ist und weiterhin eine gewisse Zeit beobachtet wurde, wird der Frosch

in ein Einzelhaltungsbecken überführt. Die bei der Laparotomie verwendeten Scheren und Pinzetten wurden vor der Operation mit Ethanol desinfiziert, um das Risiko einer Infektion zu minimieren.



**Abbildung 13: Laparotomie**

Die Bilder zeigen den Ablauf einer Laparotomie: A: Ansicht des Operationsplatzes mit dem anästhesierten Frosch sowie dem desinfizierten OP-Besteck. B: Entnahme eines Teils des Ovarlappens mit den Oozyten aus einem abdominalem Schnitt C: Nach der Entnahme der Oozyten wird der Frosch mittels eines resorbierendes Garns wieder zugenäht

**Tabelle 1: Tricaine-Lösung**

Reagenzien	Konzentrationen
MS 222	1,5 g/l
pH 7,0	

## 2.2.4 Vereinzeln der Oozyten

Zur Entfernung des Bindegewebes, welches die einzelnen Oozyten verknüpft, wurden die Oozyten erst durch mechanische Trennung und dann durch einen zweistündigen Kollagenase Verdau bei Raumtemperatur (RT) unter leichten Bewegungen auf dem Schüttler (Typ 3005; GFL<sup>®</sup>; Burgwedel; Deutschland) separiert. Die Zusammensetzung der Kollagenase-Lösung ist in Tab. 2 gezeigt. Die Kollagenase löst das Bindegewebe um die Oozyten indem es das Kollagen spaltet. Nach der Inkubationszeit wurden die Oozyten dreimal mit Oozyten Ringer (ORi) (Tab. 3) und ein weiteres Mal mit einem Ca<sup>2+</sup>-freien ORi (Tab. 4) in Petrischalen (Sarstedt AG & Co.; Nürnberg; Deutschland) gewaschen. Das Waschen in Ca<sup>2+</sup>-freiem ORi dient der Lockerung von restlichen Zell-Zellkontakten, da Zellen im Allgemeinen für ihre Zell-Zellverbindungen zweiwertige Kationen, wie z.B. Ca<sup>2+</sup>, benötigen. Durch die Entfernung des Ca<sup>2+</sup> werden die Follikelzellen von der Oozyte gelöst. Dieser Effekt wird durch den im Ca<sup>2+</sup>-freien ORi



vorhandenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator EGTA unterstützt, der die restlichen  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Lösung entfernt. Die Inkubation in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem ORi erfolgte für 10 min. Abschließend wurden die Oozyten erneut dreimal mit ORi gewaschen, um den  $\text{Ca}^{2+}$ -freien ORi zu entfernen.

**Tabelle 2: Kollagenase-Lösung**

Reagenzien	Konzentrationen
Kollagenase NB8 aus <i>Chlostridium histolyticum</i>	1 mg/ml
in ORi	

**Tabelle 3: Oozyten Ringer (ORi)**

Reagenzien	Konzentrationen
NaCl	90 mM
KCl	3 mM
$\text{CaCl}_2$	2 mM
HEPES	5 mM
pH 7,6	

*Die Lösung sollte eine Osmolarität von 197 mosmol/l aufweisen.*

**Tabelle 4:  $\text{Ca}^{2+}$ -freier ORi**

Reagenzien	Konzentrationen
NaCl	90 mM
KCl	3 mM
EGTA	1,5 mM
HEPES	5 mM
pH 7,6	

*Die Lösung sollte eine Osmolarität von 197 mosmol/l aufweisen.*

### **2.2.5 Sortierung der Oozyten**

Nach dem Entfernen des Bindegewebes und der Follikelzellschicht konnten die Oozyten sortiert werden. Wie bereits erwähnt, verläuft die Oogenese in den Fröschen asynchron, wodurch alle Reifestadien der Oozyten vorhanden sind. Für die Versuche geeignet sind jedoch nur Oozyten der Reifestadien V und VI. Die Selektion dieser Oozyten erfolgte manuell unter dem Binokular (Askamania; Mikroskop Technik; Rathenau; Deutschland). Die Oozyten wurden bei 18°C in ORi gelagert jeden Tag auf ihre Qualität überprüft, das Medium gewechselt und die nicht brauchbaren Exemplare aussortiert. Hierdurch sollte die Lebensdauer der Oozyten verlängert und eine Kontamination mit Bakterien oder Pilzen verhindert werden.

### **2.2.6 Mikroinjektion**

Nach der Sortierung der Oozyten erfolgt die Mikroinjektion der mRNA, welche nachfolgend von der Synthesemaschinerie der Oozyte in Proteine translatiert wird. Für die Injektion wird ein Mikroinjektor (Nanoliter 2000; World Precision Instruments Inc.; Sarasota; USA) verwendet, der definierte Mengen injizieren kann. Da die Injektion in das Zytoplasma der Oozyte erfolgte, konnte eine Menge von 50,6 nl pro Oozyte injiziert werden. Pro Oozyte wurde für die Optimierung der hCFTR-Expression in Abhängigkeit von der Polyadenylierung eine Menge von 30 ng hCFTR-RNA injiziert, was eine Konzentration der mRNA von 0,6 µg/µl voraussetzt. Für die SL-Experimente wurden aufgrund der potenzierenden Wirkung des SL nur 23 ng hCFTR-mRNA (0,455 µg/µl) verwendet. Für die Einstellung der Konzentrationen wurde nach der Aufreinigung der mRNA zunächst die Konzentration der mRNA ermittelt und die Injektionskonzentration durch Zugabe von nukleasefreiem H<sub>2</sub>O (Fermentas; St. Leon-Roth; Deutschland) eingestellt. Die Injektion der ΔF508-CFTR-mRNA wurde mit einer Konzentration der mRNA von 0,8 µg/µl durchgeführt, was einer mRNA-Menge von 40 ng entspricht. Für die Injektion wurde zunächst der Injektionsplatz mit Ethanol desinfiziert. Des Weiteren wurden Glaskapillaren mit einem sterilen Mineralöl (Sigma-Aldrich; Steinheim; Deutschland) luftblasenfrei gefüllt und in den Mikroinjektor (Nanoliter 2000 Injector; World Precision Instruments; Sarasota; USA) eingespannt. Da die Glaskapillaren geschlossen waren, wurden sie im nächsten Schritt durch eine Pinzette geöffnet, um die

mRNA aufnehmen zu können. Die mRNA wurde in ein steriles Gefäß gegeben, welches mit Mineralöl gefüllt war. Aus diesem Gefäß wurde die mRNA in die Glaskapillare aufgenommen. Die Oozyten wurden auf einer extra angefertigten Bank platziert, wo sie gut angestochen, aber nicht wegrutschen konnten. Die Injektion der definierten Menge mRNA erfolgte durch das Anstechen der Oozyten mittels eines Mikromanipulators (DC 3 KS; Merzhäuser; Wetzlar; Deutschland) und die Applikation der mRNA in das Zytoplasma der Oozyte durch den Mikroinjektor. Nach der Injektion wurden die Oozyten für ca. 3 Tage bei 18°C gelagert, um eine vollständige Expression der einzelnen Ionenkanäle zu gewährleisten.

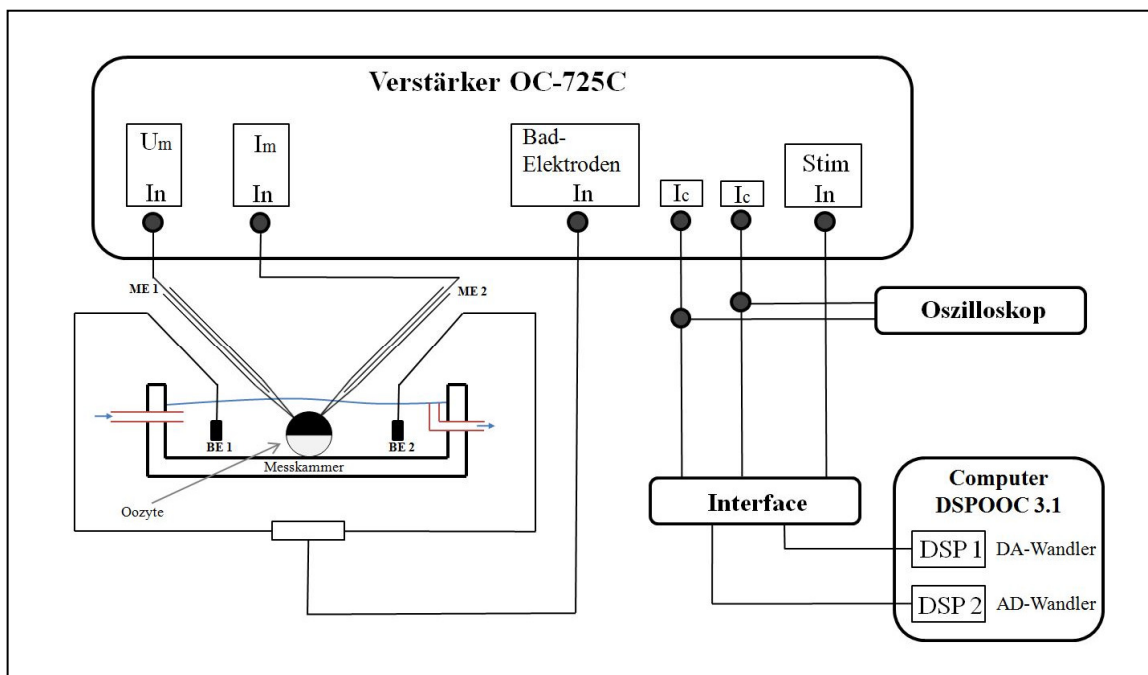
### **2.2.7 Herstellung der Glaskapillaren zur Injektion der mRNA**

Für die Herstellung der Glaskapillaren, welche bei der Injektion der mRNA verwendet werden, wurden Borosilikatkapillaren (World Precision Instruments; Sarasota; USA) mit dem Kapillarenpuller P-97 (Sutter Instrument Company; Kalifornien; USA) erstellt. Das verwendete Programm ist mit 99 betitelt und beinhaltet folgende Funktionen: *Heat*: 630; *Pull*: 10; *Velocity*: 40 und *Time*: 200. Der Unterschied zur Herstellung der Kapillaren für die VC-Messungen liegt in der Heizspirale und dem verwendeten Programm. Dies hat zur Konsequenz, dass es bei den zur Injektion genutzten Kapillaren, um Kapillaren mit einer feineren und auch geschlossenen Spitze handelt. Um sicherzustellen, dass die Kapillaren nukleasefrei sind, werden sie vor dem Gebrauch für 4 h bei 180°C gebacken.

### 2.2.8 Elektrophysiologische Messungen der *X. laevis* Oozyten mit der Voltage clamp-Technik (VC)

Die 1971 von Gurdon entwickelte Technik der VC ermöglicht die Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften von Membranen und deren exprimierten Proteinen (Gurdon et al. 1971). So können Ionenkanäle und andere Transportsysteme unter anderem durch Zugabe von Aktivatoren, Inhibitoren, Änderung des pH-Werts oder der Ionenkonzentration (z.B.  $\text{Na}^+$ ) anhand des über die Membran fließenden Stroms untersucht werden. Dabei ist es möglich das Membranpotential einer Zelle zu bestimmen und dieses durch die Applikation eines definierten Stroms auf einen bestimmten Wert zu klemmen. Das Membranpotential ( $U_m$ ) definiert sich als Differenz der Ionenkonzentrationen im Zellinneren und im extrazellulären Raum. Während der Messung wird das Membranpotential konstant gehalten und der applizierte Ausgleichsstrom wird abgeleitet und registriert. Dieser Ausgleichsstrom entspricht dem Stromfluss über die Membran.

Mit der verwendeten modifizierten VC-Apparatur werden die in *X. laevis* Oozyten heterolog exprimierten Ionenkanäle charakterisiert. Dazu werden zwei Messelektroden (ME1 und ME2) in die Oozyte eingestochen. Eine dieser Elektroden (Spannungselektrode) sowie eine der Badelektroden (BE), welche aus einem  $\text{Ag}^+/\text{AgCl}$ -Pellet bestehen, dient der Messung des Membranpotentials, welches während dieser Messungen auf -60 mV festgelegt wird (Klemmpotential). Das gemessene  $U_m$  wird mit dem vorgegebenen Klemmpotential ( $U_c$ ) verglichen. Ein Differenzverstärker vergleicht das gemessene Potential mit dem Sollwert und falls eine Differenz festgestellt wird, appliziert ein zweiter Differenzverstärker über die zweite Messelektrode (Stromelektrode) den zur Kompensation notwendigen Strom ( $I_m$ ). Die zweite BE dient der Erdung des Systems. Ein Modell der verwendeten Apparatur ist in Abb. 14 dargestellt.



**Abbildung 14: Schematische Darstellung der VC- Messapparatur**

Die Oozyte ist in einer Plexiglasschleife platziert und wird von zwei Messelektroden (ME 1 und 2) punktiert. Zusammen mit den zwei Badelektroden (BE 1 und 2) wird der Stromfluss über die Oozytenmembran bestimmt. Die Signale werden dann über den Verstärker OC-725C, einem Oszilloskop sowie dem Programm DSPOOC 3.1 auf dem Computer verarbeitet und dargestellt. Während der Messung wird die Oozyte kontinuierlich über einen Zu- und Ablauf (blaue Pfeile) mit Lösungen umspült (bearbeitet nach (Fels J. 2006)).

Die Charakterisierung des in dieser Arbeit exprimierten Ionenkanals CFTR erfolgt durch Zugabe von aktivierenden und inhibierenden Substanzen und der daraus resultierenden Veränderung des Stroms ( $I_m$ ). Die verwendete Apparatur ermöglicht außerdem die Messung der Membrankapazität ( $C_m$ ) sowie der Leitfähigkeit ( $G_m$ ).

Dabei ist die Membrankapazität ein Maß für die Membranoberfläche der Oozyte. Ein Anstieg wird durch Exozytose verursacht, während ein Abfall endozytische Prozesse widerspiegelt. Die Messelektroden sind mit einem Verstärker (OC-725C; Warner Instruments Inc.; Hamden; USA) verbunden. Der Verstärker ist weiterhin mit zwei digitalen *signal processing boards* (DSP-boards) verknüpft, welche die Signale des Verstärkers über Digital (D)/ Analog(A)- und A/D-Wandler verarbeiten. Das erste DSP-board misst den Strom und die Leitfähigkeit, wohingegen das zweite DSP-board zur Messung der Kapazität notwendig ist (Weber et al. 1999). Die Darstellung der Messungen erfolgt über die Software DSPOOC (Prof. Dr. W. van Driessche; KU Leuven; Belgien). Um die Präzision der Messung zu wahren, ist die gesamte Apparatur

auf einem schwingungsgedämpften Tisch innerhalb eines Farraday'schen Käfigs positioniert. Die Oozyte ist während der Messung in einer Kammer aus Plexiglas untergebracht. Durch einen Zu- und Ablauf wird die Kammer stetig mit frischen Lösungen versorgt. Durch einen Lösungsverteiler kann innerhalb der Messung zwischen verschiedenen Lösungen umgeschaltet werden.

### 2.2.9 Ablauf einer VC-Messung

Die zu messende Oozyte wurde entweder direkt in der Kammer platziert oder zunächst mit charakterisierenden Stoffen injiziert oder inkubiert. Wenn sich die Oozyte in der 1 ml umfassenden Messkammer befand, konnte sie mit Hilfe eines Binokulars sowie zweier über *Joysticks* gesteuerter Mikromanipulatoren mit den Messelektroden angestochen werden. Nach diesem Vorgang wurde die Messung gestartet und die Oozyte kontinuierlich mit ORi umspült. Nach der Stabilisierung der gemessenen Parameter Strom, Leitfähigkeit und Membrankapazität wurde das Membranpotential auf -60 mV geklemmt. Im Anschluss wurde der CFTR-Kanal durch die Applikation eines cAMP/IBMX-Cocktails oder eines cGMP/IBMX-Cocktails aktiviert. Zusätzlich zum cAMP-Cocktail wurden zum Teil auch weitere Stoffe in die Messkammer gegeben. Nachdem die Parameter ein gleichbleibendes Niveau erreicht hatten, wurde der Cocktail wieder durch ORi ersetzt, um die Substanzen auszuspülen und die Reversibilität der Reaktion zu untersuchen.

- zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)/Isobutylmethylxanthin (IBMX)-Cocktail:

Bei cAMP handelt es sich um einen sekundären Botenstoff, welcher durch die G-Protein aktivierte Adenylatzyklase generiert wird. Die Regulation des CFTR durch cAMP beruht auf der Aktivierung der PKA und PKC. Diese sind in der Lage die regulatorische Untereinheit des CFTR zu phosphorylieren, welches die Voraussetzung für die Aktivierung des CFTR durch ATP ist (Gadsby und Nairn 1999). Für die Aktivierung des CFTR in den durchgeführten VC-Messungen wurde das membrangängige cAMP-Analog (4-Chlorophenylthio)adenosine-3',5'-cyclic monophosphate (8-CPT-cAMP) verwendet. Für die VC-Messungen

wurde das cAMP-Analog mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  in ORi angesetzt. Zusätzlich wurde der PDE-4-Inhibitor IBMX mit einer Konzentration von 1 mM zugesetzt, da dieser den Abbau des cAMP verhindert.

- zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)/IBMX-Cocktail:

Der sekundäre Botenstoff cGMP wird durch die Guanylatzyklase generiert. Weiterhin aktiviert cGMP die PKG, welche die R-Domäne des CFTR phosphoryliert. Wie bereits beschrieben führt diese Phosphorylierung zu einer Bindung von ATP, woraus eine Aktivierung des CFTR resultiert (Vaandrager et al. 1997). Bisher konnte diese Aktivierung in *X. laevis* Oozyten nur durch die *patch clamp* Methode nachgewiesen werden (Sullivan et al. 1995). In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob der CFTR-Kanal auch in einer VC-Messung durch den sekundären Botenstoff cGMP aktiviert werden kann.

Dazu wurde das membranängige cGMP Analog 8-(4-Chlorophenylthio)guanosine-3',5'-cyclic monophosphat (8-CPT-cGMP) mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  verwendet. Das cGMP wurde zusammen mit dem PDE-Inhibitor IBMX (1 mM) in ORi gelöst.

- SL-Lösungen:

Um den Effekt von SL auf den heterolog exprimierten CFTR in Oozyten zu untersuchen, wurden die Oozyten 2 h vor der Messung mit Hilfe eines Mikroinjektors mit 26,7 nl 60  $\mu\text{M}$  SL injiziert. Der Vorgang der Injektion wird in dem Abschnitt 2.2.6 beschrieben. Bei SL handelt es sich um einen PDE-5-Inhibitor, welcher den Abbau von cGMP blockiert (siehe Punkt 1.6.1). Für die Untersuchung wurde Sildenafilcitrat ( $M = 666,7 \text{ mg/l}$ ) verwendet, welches eine aktive Form der Substanz darstellt. Es wurde zunächst eine SL-Stammlösung mit einer Konzentration von 50 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Für die Injektion wurde die Stammlösung mit Wasser auf die erforderliche Endkonzentration verdünnt.

- SL/KT5823-Lösung:

Innerhalb dieser Arbeit wurde der Wirkmechanismus von SL auf den CFTR untersucht. Um zu ermitteln, ob es sich um einen cGMP-abhängigen Mechanismus handelt, wurde in einigen Versuchen zusätzlich zum SL der PKG-Inhibitor KT5823 verwendet. Dazu wurden die Oozyten eine halbe Stunde vor der Injektion mit SL sowie danach mit 3  $\mu$ M KT5823 inkubiert. Außerdem wurde während der Aktivierung des CFTR zusätzlich KT5823 in die Messkammer hinzugefügt. Der Feststoff KT5823 (Enzo Lifescience; Lörrach; Deutschland) wurde zunächst in DMSO in einer Konzentration von 1 mM gelöst. Diese Stammlösung wurde dann mit ORi auf die Endkonzentration von 3  $\mu$ M verdünnt (Jiang et al. 2000).

- SL/ODQ(1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one)-Lösung:

Einen weiteren Stoff zur Untersuchung der cGMP-Abhängigkeit des SL-Mechanismus stellte ODQ (Enzo Lifescience; Lörrach; Deutschland) dar. Bei dieser Substanz handelt es sich um einen lichtempfindlichen, spezifischen und membrangängigen Guanylatzyklase Inhibitor. Von diesem Reinstoff wurde zunächst eine 25 mM Stammlösung in DMSO erstellt, welche dann mit ORi auf die verwendete Endkonzentration von 50  $\mu$ M verdünnt wurde (Tagliatalata et al. 1999). Die Oozyten wurden 30 min vor der Injektion des SL mit ODQ inkubiert und auch nach der Injektion weiter in der ODQ-enthaltenen Lösung gelagert. Während der Aktivierung des CFTR-Kanals in der VC-Messung wurde zusätzlich ODQ (50  $\mu$ M) in die Messkammer gegeben.

- H8 (N-[2-(methylamino)ethyl]-5) isoquinolinesulfonamide, Dihydrochlorid):

Für den Nachweis, dass SL in VC-Messungen zu einer cAMP- und somit PKA-abhängigen Kapazitätserhöhung durch Exozytose führt, wurde der PKA-Inhibitor H8 (Enzo Lifescience; Lörrach; Deutschland) verwendet. Diese Substanz ist ebenfalls membrangängig und wurde in einer Stammlösung von 10 mM angesetzt. Für die Anwendung wurde die Stammlösung mit ORi auf eine Konzentration von 30  $\mu$ M verdünnt. Die Oozyten wurden für 24 h in der H8-



Lösung inkubiert und dann in einer VC-Messung mit einem cAMP/IBMX-Cocktail charakterisiert. Ein Teil der Oozyten wurde zusätzlich 2 h vor der Messung mit SL injiziert.

### **2.2.10 Herstellung der Messelektroden**

Die Messelektroden bestehen aus einem Silberdraht (Bare 008<sup>00</sup>; A-M Systems, Inc.; Sequim; USA), welcher vor den Messungen mit Sandpapier gereinigt und mit einer 0,1 N HCl-Lösung chloriert wurde. Dann wurde der chlorierte Silberdraht in die mit 1 M KCl gefüllte Kapillaren eingebracht. Die bei der VC-Messung verwendeten Glaskapillaren (GC 120F-10; Harvard Apparatus Ltd.; Holliston, Massachusetts; USA) wurden mit Hilfe des Kapillar-Pullers-PC10 (Narishige International Inc.; New York; USA) hergestellt. Dabei wurden die Kapillaren möglichst gleichmäßig in eine Heizspirale eingespannt. Diese erhitzte sich auf 69,6°C und die Kapillaren wurden durch Gewichte auseinander gezogen. Bei dieser Methode lagen die Kapillaren nach dem Erhitzen geöffnet vor. Die Größe der Öffnung bestimmt den Widerstand der Messelektrode, welcher für die VC-Messung im Bereich von 0,5 bis 3,5 MΩ liegen sollte.

### **2.2.11 Auswertung der VC-Messungen**

Für die statistischen Analysen wurde die Differenz in Strom, Leitfähigkeit und Kapazität durch die Zugabe des cAMP/IBMX-Cocktails oder des cGMP/IBMX-Cocktails in Bezug auf die initialen Parameter (OR<sub>i</sub>) errechnet und die Ergebnisse als Mittelwert ± Standardabweichung (SEM) angegeben.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Verwendete Plasmidvektoren

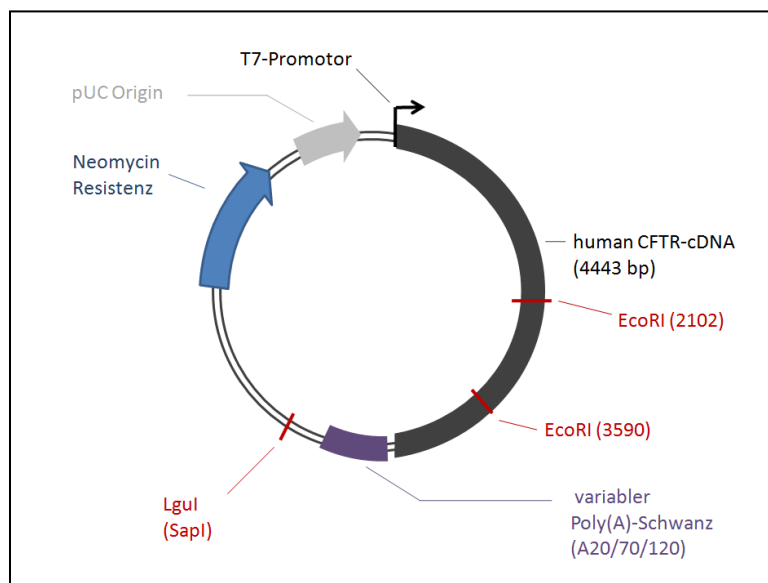
Für die Generierung der mRNA, welche in die *X. laevis* Oozyten injiziert wurde, werden Plasmidvektoren genutzt. Bei Plasmiden handelt es sich um kleine doppelsträngige, ringförmige DNA-Moleküle, die verschiedene Strukturen und Gene kodieren. Jedes Plasmid enthält einen Replikationsursprung (*origin of replication; ori*), welcher zur Vermehrung des Plasmids notwendig ist. Weiterhin kodieren die verwendeten Plasmide ein Gen für eine Antibiotikaresistenz. Anhand dieser Resistenz ist es bei der Vermehrung möglich zu unterscheiden, ob das Plasmid vom Bakterium aufgenommen wurde. Des Weiteren besitzen die Plasmide eine *multiple cloning site* (MCS), welche verschiedene Schnittstellen für Restriktionsenzyme besitzt. Über Restriktion und Ligation können so Inserts in das Plasmid eingebracht werden. Die MCS wird außerdem von verschiedenen Promotorsequenzen flankiert. An diese können je nach Sequenz verschiedene Polymerasen binden und das Insert ablesen. Je nach Lage und Orientierung der Promotorsequenzen kann das Insert in *sense* oder *antisense* Richtung ablesen werden. Im Fall der genutzten Plasmide wurde eine T7-Polymerase verwendet, welche das Plasmid in *sense* Richtung abliest und so die mRNA synthetisiert. Für die Herstellung der mRNA wurden die Plasmidvektoren *pSTI* und *pALTER* verwendet, deren Eigenschaften in Tab. 5 aufgelistet sind.

**Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten Plasmidvektoren**

	<i>pSTI</i>	<i>pALTER</i>
Insert	wt-CFTR	ΔF508-CFTR
Organismus	human	human
Größe des Vektors	8387 bp (bei 120A)	10342 bp
Größe des Inserts	4443 bp	4662 bp
Enzym zur Linearisierung	<i>LguI</i>	<i>NheI</i>
Poly(A)-Schwanz	120/70/20 Adenine	(nicht bekannt)
Polymerase	T7	T7

- *pSTI* (humaner wt-CFTR):

Bei diesem Plasmidvektor wurde die humane CFTR-cDNA (hCFTR) in den Klonierungsvektor *pSTI* inseriert. Die hCFTR-cDNA umfasst 4443 bp (*accession number*: NP\_000483.3; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Weiterhin kodiert der Vektor für eine Neomycin Resistenz. Für die Linearisierung des Plasmids wird das Enzym *LguI* verwendet, welches einmalig 3'-wärts der Polyadenylierungssequenz schneidet (Tab. 5). In diesem Vektor wurden im Anhang an das Insert verschieden lange Polyadenylierungssequenzen eingefügt. Das *pSTI*-Plasmid ist in Abb.15 dargestellt und besitzt mit einer Polyadenylierungssequenz von 120 Adeninen eine Gesamtgröße von 8387 bp (Tab. 5). Die unterschiedlichen Polyadenylierungen wurden genutzt, um die Auswirkung des Polyadenylierungsgrades auf die Expression des CFTR zu untersuchen. Das Plasmid wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. med. J. Rosenecker (Forschungszentrum der Kinderklinik und Poliklinik; Dr. von Haunersches Kinderspital; München; Deutschland) zur Verfügung gestellt.

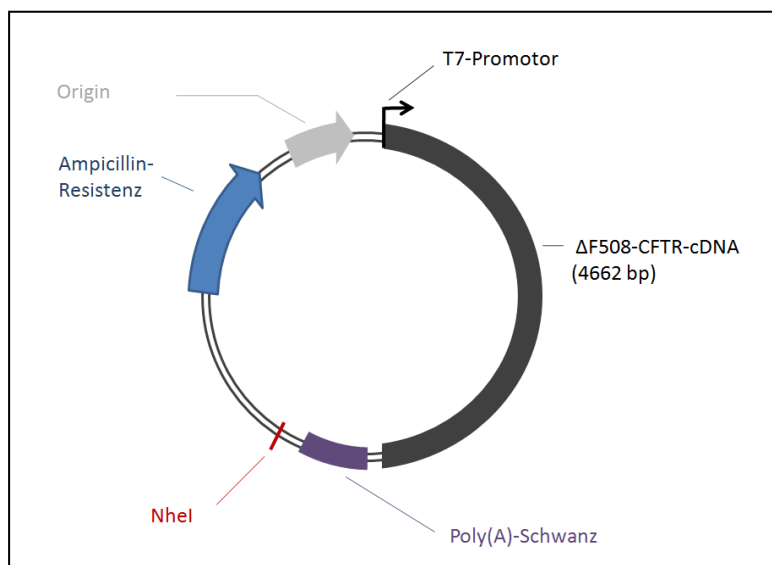


**Abbildung 15: Vektorkarte des *pSTI*-Plasmids**

Die Plasmidkarte zeigt die Struktur des *pSTI*-Plasmids, welches als Insert die hCFTR-cDNA beinhaltet. An die cDNA-Sequenz schließt sich ein variabler Poly(A)-Schwanz an, welcher bei einer Länge von 120 Adeninen(A) eine Gesamtgröße des Plasmids von 8387 bp bedingt. Der vor der hCFTR-cDNA inserierte T7-Promotor dient der Transkription der cDNA. Zusätzlich enthält der Vektor eine Neomycin Resistenz und einen pUC-Origin zur kontrollierten Amplifikation des Plasmids.

- *pALTER* ( $\Delta F508$ -CFTR):

Bei diesem Plasmidvektor, welcher in Abb. 16 dargestellt ist, wurde die cDNA des mutierten  $\Delta F508$ -CFTR in den Vektor *pALTER* inseriert. Der gesamte Vektor umfasst 10342 bp, während das  $\Delta F508$ -CFTR-Insert aus 4662 bp besteht (Tab. 5). Die unterschiedlichen Größen der wt-CFTR- und  $\Delta F508$ -CFTR-Inserts sind auf Modifikationen der CFTR-Sequenz, wie z.B. die Länge der 5'-UTR (nicht translatierte Bereiche; *untranslated region*) zurückzuführen. Das Plasmid enthält außerdem eine Ampicillin Resistenz. Zur Linearisierung wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *NheI* verdaut. Dieses Plasmid wurde uns von Prof. Dr. med. K. Kunzelmann (Universität Regensburg; Deutschland) für diese Versuche zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 16: Vektorkarte des *pALTER*-Plasmids**

Bei diesem Vektor ist die  $\Delta F508$ -CFTR-cDNA in den *pALTER*-Vektor kloniert. Der vorhandene T7-Promotor dient der Transkription der cDNA sowie des angefügten Poly(A)-Schwanzes. Die integrierte Ampicillinresistenz dient der Selektion der Insert tragenden Bakterien. Weiterhin enthält das Plasmid einen zur Vermehrung in Bakterien erforderlichen *ori*.

### 2.3.2 Plasmidtransformation

Um den beschriebenen Plasmidvektor *pALTER* zu amplifizieren, wurde der Vektor zunächst in Bakterien transformiert. Die Transformation wurde über einen Hitzeschock vermittelt. Hierzu wurden zunächst 100 µl kompetente Bakterien des Wirtsstamm *XLI-Blue MRF'* des Bakterienstamms *Escherichia coli* (Stratagene; Heidelberg; Deutschland) aufgetaut. Als nächstes wurden 10-100 ng der Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben, vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der darauf folgende Hitzeschock erfolgte für 1 min bei 42°C im Wasserbad (Thermo Haake DC10/P5; Thermo Electron; Karlsruhe; Deutschland). Nun wurde der Ansatz für 2 min auf Eis inkubiert und 980 µl SOC-Medium (siehe Tab. 6) sowie 20 µl 1 M Glukose hinzugefügt. Weiterhin wurde das Reaktionsgefäß für 2 h bei 180 rpm und 37°C auf dem Schüttler (Inova 4000; New Brunswick Scientific; Edison; USA) inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Bakterien für 2 min bei 2000 xg zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5804; Eppendorf; Hamburg; Deutschland) und das entstandene Pellet in 100 µl SOC-Medium resuspendiert. Die transformierten Bakterien wurden auf selektiven LB-Platten ausplattiert und über Nacht (ü.N.) bei 37°C im Brutschrank (Heraeus function line T12; Kendro; Hanau; Deutschland) inkubiert.

Für die Klonierung des PCR-Produkts mittels des *StrataClone<sup>TM</sup> PCR Cloning Kits* (Stratagene; La Jolla; USA) (siehe 2.3.14) wurde nach Angaben des Herstellers 1 µl des Ligationsansatzes in die dem Kit beigegefügt StrataClone<sup>TM</sup> Solo Pack<sup>®</sup> kompetenten Zellen transformiert.

**Tabelle 6: SOC-Medium**

Reagenzien	Konzentrationen
Trypton Medium	2% (w/v)
Hefe Extrakt	0,5% (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glukose	20 mM
pH 7,0	

### 2.3.3 Nährmedien und Agarplatten

Um die verwendeten Agarplatten und Flüssigkulturen anzusetzen, wurde zunächst LB-Medium hergestellt (Tab. 7). Für die Herstellung von Agarplatten wurden 2% Agar zu dem LB-Medium gegeben und das Medium nach dem Autoklavieren im Wasserbad auf 55°C abgekühlt, bevor Ampicillin (0.05 µl (100 µg/ml) Ampicillin in 1 ml LB-Medium) als selektives Antibiotikum hinzugefügt wurde. Für eine Blau-Weiß Selektion wurde zu 250 ml LB-Medium zusätzlich 250 µl X-Gal (5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranoside; 48 mg/ml DMF) zugegeben. Um Flüssigkulturen zu erstellen, wurde entsprechend Ampicillin (0.05 µl (100 µg/ml) Ampicillin in 1 ml LB-Medium) zugesetzt. Für eine nachfolgende Minipräparation wurde eine 6 ml Flüssigkultur hergestellt, bei der eine einzelne Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher oder einer Pipettenspitze aufgenommen wurde und in das Reaktionsgefäß mit der Flüssigkultur überführt wurde. Die Flüssigkultur wurde ü.N. bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Für eine nachfolgende Midipräparation wurde eine 50 ml Flüssigkultur mit 500 µl der 6 ml Flüssigkultur angeimpft und ebenfalls unter den gleichen Bedingungen ü.N. kultiviert.

**Tabelle 7: LB-Medium**

Reagenzien	Stoffmengen
NaCl	10 g
Trypton Medium	10 g
Hefe Extrakt	5 g
	ad 1 l
pH 7,0	

### 2.3.4 Glycerinkultur

Um die Bakterienzellen mit den transformierten Plasmiden dauerhaft haltbar zu machen, wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden 700 µl der Flüssigkultur mit 300 µl sterilem Glycerin vermischt. Abschließend werden die Kulturen bei -80°C dauerhaft gelagert. Nach dem Auftauen konnten die Bakterien durch Ausplattieren auf selektiven Agarplatten oder in einer Flüssigkultur wieder vermehrt werden.

### 2.3.5 Plasmid-Minipräparation

Nach dem Ausplattieren und der Inkubation der mit dem *pALTER*-Plasmid und dem PCR-Produkt transformierten Bakterien, wurde jeweils eine Kolonie von der Agarplatte in eine 6 ml Flüssigkultur übertragen und ü.N. kultiviert (siehe 2.3.3). Am nächsten Morgen wurden die amplifizierten Plasmide durch eine Plasmid-Minipräparation aus den Bakterien isoliert. Dazu wurden 2 ml der Kultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *mi-Plasmid MiniPrep* Kits nach Protokollangaben des Herstellers (Metabion; Martinsried, Deutschland). Bei der Elution wurde die Plasmid-DNA mittels 50 µl autoklaviertem Millipore-H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert und bei -20°C aufbewahrt. Um sicherzustellen, dass die isolierte Plasmid-DNA dem Insert entspricht, wird eine Restriktion des Inserts mittels Restriktionsenzymen durchgeführt und das Ergebnis durch eine Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht.

### 2.3.6 DNA-Isolation durch Plasmid-Midipräparation

Die Midipräparation wird ausgehend von einer 50 ml Flüssigkultur durchgeführt. In dieser Arbeit wurde die Midipräparation ausschließlich für das *pALTER*-Plasmid durchgeführt. Die Plasmid-Midipräparation ermöglicht die Isolation einer größeren Menge der Plasmid-DNA und führt außerdem zu einem höheren Reinheitsgrad der DNA als nach der Minipräparation. Für diesen Prozess wurde das *High Speed Midi Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben genutzt. Einzig die Pellettierung der Bakterien erfolgte bei 3200 xg für 25 min bei 4°C. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 50 µl H<sub>2</sub>O (autoklaviertes Millipore-H<sub>2</sub>O). Dieser Vorgang wurde außerdem einmal wiederholt, so dass schlussendlich eine Elutionsmenge von 100 µl vorlag.

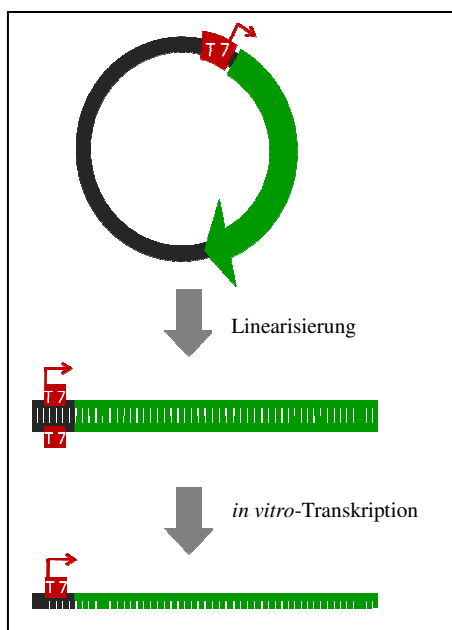
### 2.3.7 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte über eine Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm im Photometer (Nanodrop 1000; Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland). Die Wellenlänge von 260 nm entspricht dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren. Eine OD von 1 entspricht einer

Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Weiterhin kann durch das Verhältnis der OD bei 260 nm zu der OD bei 280 nm, welche dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht, eine Aussage über die Verunreinigung der Probe mit Proteinen getroffen werden. Bei einem Verhältnis von 1,7-2,1 handelt es sich um reine DNA, wo hingegen ein Verhältnis von 1,9-2,1 bei RNA für eine nicht mit Proteinen verunreinigte Probe spricht.

### 2.3.8 Schema zur Vorbereitung und dem Ablauf der *in vitro*-Transkription

Nach der Amplifikation des *pALTER*-Plasmids in Bakterien wurde die Plasmid-DNA im nächsten Schritt linearisiert. Für das beschriebene *pSTI*-Plasmid wurde hingegen keine Amplifizierung durchgeführt, da eine hinreichende Menge an Plasmid-DNA vorlag. Die Plasmid-DNA wurde aus diesem Grund direkt linearisiert. Nach der Linearisierung, welche in Abschnitt 2.3.9 beschrieben wird, erfolgte eine Phenol-Chloroform Extraktion (Abschnitt 2.3.11) und eine Präzipitation der DNA durch Natriumacetat und Ethanol (Abschnitt 2.3.12). Schlussendlich wurde die DNA in einer *in vitro*-Transkription (IVT) in mRNA transkribiert (siehe Abschnitt 2.3.2). (siehe Abb. 17). Nachfolgend wurde diese mRNA zur Injektion in die *X. laevis* Oozyten verwendet.



**Abbildung 17: Schema zur Linearisierung und zur IVT-Reaktion**

Das Plasmid wird zunächst durch ein einmalig 3'-wärts des Inserts schneidendes Restriktionsenzym linearisiert. Das lineare Plasmid dient dann als template für eine *in vitro*-Transkription, bei der die T7-Polymerase ein einsträngiges RNA Fragment synthetisiert (bearbeitet nach (Mülhardt 2009)).



### 2.3.9 Restriktion von Nukleinsäuren

Für die Restriktion von DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet, die sequenzspezifisch an die Nukleinsäuren binden und diese dort schneiden. Bei den sequenzspezifischen Schnittstellen handelt es sich meist um 4, 6 bzw. 8 bp, die palindromisch sind. Zur Analyse von Nukleinsäuren wurden 3 µl DNA für 2 h bei 37°C im Wasserbad (Thermo Haake DC10/P5; Thermo Electron; Karlsruhe; Deutschland) verdaut (Tab. 8). Die verwendeten 10x Puffer wurden entsprechend der Kodierung des Herstellers der verwendeten Enzyme (Fermentas; St. Leon-Roth, Deutschland) ausgewählt.

Für die nachfolgende IVT musste die Plasmid-DNA zunächst durch Restriktionsenzyme linearisiert werden. Dies bedeutet, dass ein Restriktionsenzym eingesetzt wird, das nur einmalig im gesamten Plasmid schneidet. Die Lokalisation der Schnittstelle lag 3'-wärts des Inserts mit dem Poly(A)-Schwanz. So wird sichergestellt, dass die Polymerase in der nachfolgenden IVT-Reaktion nicht unnötig lange mRNA-Transkripte synthetisiert, sondern nur das Insert abliest. Für diesen Prozess wurden 10 µg der Plasmid-DNA für ca. 16 h bei 37°C im Heizblock (Blockthermostat BT 200; Kleinfeld Labortechnik; Gehrden; Deutschland) verdaut (Tab.8). Die verwendeten Restriktionsenzyme für die Linearisierung der Plasmide *pALTER* und *pSTI* sind in Tab. 5 aufgelistet.

**Tabelle 8: Zusammensetzung der verschiedenen Restriktionsverdaue**

Restriktionsansätze	Analytische Restriktion	Linearisierung
Plasmid-DNA	3 µl	10 µg
10x Puffer	2 µl	10 µl
Enzym	1 µl	4 µl
Millipore H <sub>2</sub> O (autoklaviert)	ad 20 µl	ad 100 µl

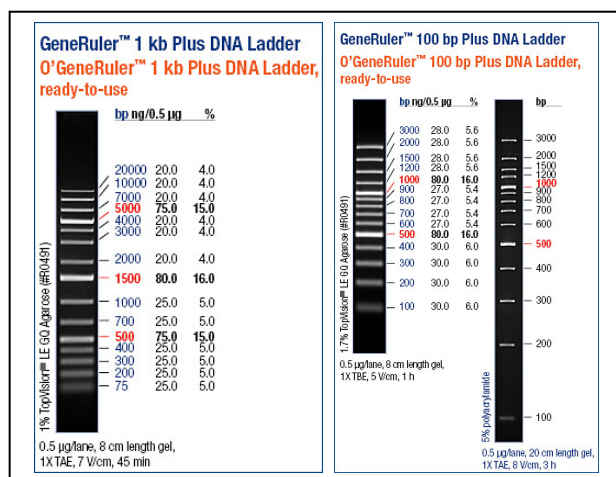
### 2.3.10 DNA-Agarosegelelektrophorese

Um die DNA nach der Größe aufzutrennen und so zu analysieren, wurde eine DNA-Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Bei dieser Methode wird das Prinzip der Porenbildung durch Agarose genutzt. Die DNA bewegt sich aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes durch die Poren. Dabei wandern die größeren DNA-Fragmente

langsamer als die kleineren Fragmente. Weiterhin bestimmt die Konzentration der Agarose die Porengröße, so dass durch die Konzentration die Sensitivität der Trennung vorgegeben wird. Für die Auftrennung der DNA wurden in dieser Arbeit 1%-ige Gele hergestellt. Dazu wurde 500 mg Agarose Seakem LE (Segetic; Borken, Deutschland) mit 50 ml 0,5x TBE-Puffer (Tab. 9) versetzt, erhitzt und 1,25 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben. Mit Hilfe des Ethidiumbromids wird die DNA im Gel sichtbar gemacht. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren, wodurch sich das Anregungsspektrum des Ethidiumbromid ändert und es im UV-Bereich angeregt werden kann. Die aufzutrennenden Proben wurden mit *6x loading dye* (Fermentas; St. Leon-Roth; Deutschland) versetzt. Als Größenstandards wurden der *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder* sowie der *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder* (Fermentas; St. Leon-Roth; Deutschland) verwendet, welche in Abb. 18 gezeigt sind. Die Proben wurden in einer horizontalen Gelkammer der Firma Biometra (Göttingen; Deutschland) bei ca. 128 V aufgetrennt. Abschließend wurde das Gel in einem *BioDocAnalyze* System (Biometra, Göttingen, Deutschland) mit UV-Licht bestrahlt und die DNA durch Anregung des Ethidiumbromids mit einer Digitalkamera detektiert.

**Tabelle 9: 10x TBE-Puffer**

Reagenzien	Konzentrationen
Tris	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	20 mM
pH 8,3	



**Abbildung 18: Größendarstellung der DNA-Marker**

Darstellung der verwendeten DNA-Marker *GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder* und *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder* (Quelle: [www.fermentas.de](http://www.fermentas.de)).

### 2.3.11 Phenol-Chloroform Extraktion

Diese Methode wurde an die Linearisierung der DNA angeschlossen, um Proteine, vor allem Nukleasen, aus der Probe zu entfernen. Dabei wird die Probe zunächst mit autoklaviertem Millipore-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt. Weiterhin wird ein Volumen eines Phenol-Chloroform Gemisches (Verhältnis 25:24; pH 7,5-8) zu der Probe hinzugefügt. Dann erfolgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation für 15 min bei 13000 xg, bei der die Proteine in die Lösungsmittelphase übergehen und die Plasmid-DNA in der wässrigen Phase verbleibt. Nun wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und wiederum Phenol-Chloroform zugegeben und die Auftrennung wiederholt. Nach der Isolation der wässrigen Phase wurde nun ein Volumen Chloroform in das Reaktionsgefäß gegeben und die Phasentrennung durch Zentrifugation ein weiteres Mal durchgeführt, um mögliche Phenolreste zu entfernen. Dies ist sinnvoll, da Phenol durch sein ähnliches Absorptionsspektrum die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren stört. Weiterhin sollte die DNA nach der Phenol-Chloroform Extraktion nukleasefrei sein, so dass ab diesem Zeitpunkt ausschließlich gestopfte Spitzen (Biosphere<sup>®</sup> Filter Tips; Sarstedt AG & Co.; Nürnbrecht; Deutschland) verwendet wurden.

### 2.3.12 Präzipitation der Nukleinsäuren durch Natriumacetat

Da nach der Phenol-Chloroform Extraktion ein sehr großes Volumen und somit eine geringe Konzentration der Probe vorlag, wurde die Plasmid-DNA präzipitiert. Bei diesem Schritt führt die Zugabe von 100%-igem Ethanol sowie eines Salzes zur Fällung der DNA. In dieser Arbeit wurde die DNA mittels eines 0,1-fachen Volumens 3 M Natriumacetats pH 5,0-5,2 sowie des 2,5x Volumens 100%-igen Ethanols gefällt. Nach Zugabe der Reagenzien wurde die Probe ü.N. bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch eine Zentrifugation (Eppendorf 5417R; Eppendorf; Hamburg; Deutschland) bei 13000 xg und 4°C für 60 min pelletiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 700 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut für 30 min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Abschließend trocknete das DNA-Pellet für ca. 10 min in der Vakuumzentrifuge, woraufhin die DNA nachfolgend in 10 µl H<sub>2</sub>O nukleasefreiem H<sub>2</sub>O (Fermentas; St. Leon-Roth; Deutschland) resuspendiert werden konnte. Die DNA

konnte nun bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt oder direkt in die *in vitro*-Transkription eingesetzt werden.

### **2.3.13 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten wurden diese nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarosegel mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Die weitere Isolation erfolgte mittels Gelextraktion mit dem *QIAquick Gelextraction* Kit der Firma Qiagen (Hilden; Deutschland) nach den Angaben des Herstellers.

### **2.3.14 Klonierung von PCR-Fragmenten**

Nach der Isolation der PCR-Fragmente wurden diese zunächst in den *StrataClone<sup>TM</sup> PCR Cloning Vector pSC-A* kloniert. Dazu wurde in dieser Arbeit das *StrataClone<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit* (Stratagene; La Jolla; USA) verwendet. Die Ligation des PCR-Fragments mit dem Vektor wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Nachfolgend wurde der entstandene Vektor zur Amplifikation in Bakterien transformiert (siehe Punkt 2.3.2).

### **2.3.15 Sequenzanalysen der PCR-Fragmente**

Die Sequenzierung wurde von der Firma GENterprise (Mainz; Deutschland) durchgeführt. Die Sequenzen wurden mittels des *Nucleotide –Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) mit bekannten Sequenzen der NCBI-Sequenzdatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen. Anschließend wurde sowohl die Sequenz des PCR-Produkts als auch die homologe veröffentlichte Sequenz in das Computerprogramm *GeneDoc* 2.6 importiert, wo die übereinstimmenden Sequenzbereiche einander zugeordnet und farblich markiert wurden.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden mit RNA

### 2.4.1 Vorbereitungen zum Arbeiten mit RNA

Um eine Kontamination mit Nukleasen zu vermeiden, wurden alle verwendeten Glaswaren vor dem Gebrauch für mindestens 4 h bei 180°C gebacken. Des Weiteren sollte unter möglichst nukleasefreien Bedingungen gearbeitet werden. Aus diesem Grund wurde sowohl der Arbeitsplatz als auch die Gelkammer mit *RNAse Away*<sup>®</sup> (Roth; Karlsruhe; Deutschland) gereinigt. Außerdem wurden für die Handhabung mit RNA nur sterile und nukleasefreie Verbrauchsmaterialien wie z. B. gestopfte Spitzen (Biosphere<sup>®</sup> *Filter Tips*; Sarstedt AG & Co.; Nürnberg; Deutschland) und nukleasefreies H<sub>2</sub>O (Fermentas; St. Leon-Roth; Deutschland) oder Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes H<sub>2</sub>O (siehe 2.4.6) verwendet.

### 2.4.2 *In vitro*-Transkription (IVT)

Bei dieser mRNA-Synthese wird aufgereinigte Plasmid-DNA als Matrize verwendet. Die Reaktion wurde mittels des *mMessage mMachin*e Kits der Firma Ambion (Texas, USA) durchgeführt. Nach der Bindung der im Kit enthaltenen T7-Polymerase an dem im Plasmidvektor enthaltenen T7-Promotor wird die mRNA synthetisiert. Die Polymerase transkribiert dabei den Bereich der linearisierten DNA 5'-wärts von der Promotorbindestelle bis zur Schnittstelle der Linearisierung, welche 3'-wärts des Inserts liegt. Zusätzlich wird während der Reaktion eine *Cap*-Struktur (*capped* (Kappe); P<sup>1</sup>-5'-(7-methyl)-guanosin-P<sup>3</sup>-5'-guanosin-triphosphat) an das 5'-Ende der mRNA angefügt. Diese *Cap*-Struktur sowie der kodierte Poly(A)-Schwanz erhöhen die Stabilität der mRNA. Die Inkubation des IVT-Ansatzes, welcher in Tabelle 10 aufgeführt ist, wurde für 2 h bei 37°C im Wasserbad (Thermo Haake DC10/P5; Thermo Electron; Karlsruhe; Deutschland) durchgeführt. Abschließend erfolgte der Verdau der DNA-Matrize durch Inkubation der Probe nach Zugabe von 1 µl Turbo DNase (2U/µl; im Kit enthalten) für 15 min bei 37°C im Wasserbad.

**Tabelle 10: IVT-Reaktionsansatz**

Reagenzien	Stoffmengen
Plasmid	1 µg
10x Puffer	2 µl
Cap/NTP	10 µl
T7-Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

### 2.4.3 Aufreinigung der mRNA

Die nach der IVT noch in der Probe enthaltenen Enzyme und freien Nukleotide wurden durch das *RNeasy Plus Mini* Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) entfernt. Dabei wurden zunächst 350 µl des RLT Plus-Puffers mit 1% β-Mercaptoethanol versetzt. Diese Lösung wurde dann zum IVT Ansatz pipettiert und in eine *gDNA Eliminator* Säule überführt. Die Säule wurde anschließend für 30 s bei 10000 xg zentrifugiert (Eppendorf 5804; Eppendorf; Hamburg; Deutschland). Der Durchlauf wurde weiter verwendet und mit einem Volumen 70%-igem Ethanol versetzt. Dieses Gemisch wurde nun in ein *RNeasy spin column* überführt und für 30 s bei 10000 xg zentrifugiert. In diesem Schritt bindet die mRNA an die in der Säule enthaltene Membran, während die Nukleotid- und Enzymreste nicht binden können und so in den Durchlauf gelangen. Nach diesem Schritt wurde der Durchlauf verworfen, die Säule mit 700 µl des RW1-Puffers benetzt und ein weiteres Mal bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Es erfolgten 2 weitere Waschschrte der Säule mit 500 µl des RPE-Puffers. Im ersten Waschschrte wurde die Probe für 30 s und bei dem zweiten Waschschrte für 2 min zentrifugiert, um letzte Flüssigkeitsreste zu entfernen. Zur Elution der mRNA wurde 50 µl H<sub>2</sub>O auf die Membran in der Säule pipettiert und eine 1-minütige Zentrifugation bei 13000 g vorgenommen. Um die gesamte mRNA-Menge von der Säule zu entfernen, wurde die Elution ein zweites Mal durchgeführt, so dass eine Gesamtelutionsmenge von 100 µl erreicht wurde.

#### 2.4.4 Präzipitation der mRNA mit Ammoniumacetat

Da nach der Aufreinigung der mRNA durch das große Volumen eine geringe Konzentration vorhanden war, wurde eine Präzipitation der mRNA durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde 0,1 Volumen Ammoniumacetat (5 M) sowie 2,5 Volumen 100%-iges Ethanol zur Probe gegeben. Nach Zugabe der Reagenzien wurde die Probe ü.N. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die mRNA durch eine Zentrifugation (Eppendorf 5417R; Eppendorf; Hamburg; Deutschland) bei  $13000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 60 min pelletiert. Weiterhin erfolgte das Waschen der mRNA durch Zugabe von  $500 \mu\text{l}$  70%-igem Ethanol, woran sich eine erneute Zentrifugation für 30 min bei gleichen Bedingungen anschloss. Abschließend wurde das mRNA-Pellet in der Vakuumzentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301; Eppendorf; Hamburg; Deutschland) getrocknet und in  $10 \mu\text{l H}_2\text{O}$  resuspendiert. Die mRNA konnte zur längerfristigen Aufbewahrung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

#### 2.4.5 RNA-Gelelektrophorese

Um die Qualität und die Größe des entstandenen mRNA-Fragments oder der isolierten Gesamt-RNA zu überprüfen, wurde eine denaturierende Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei führt die Zugabe von Formaldehyd zur Zerstörung der Sekundärstruktur der RNA, da es die Wasserstoffbrückenbindungen der Basen spaltet. Nach dem Erhitzen der Agarose ist es wichtig den Ansatz auf  $60^{\circ}\text{C}$  abkühlen zu lassen, bevor Formaldehyd zugegeben wird, da dieses ansonsten seine denaturierende Wirkung verliert. Die Zusammensetzung eines RNA-Gels ist in Tab. 11 aufgelistet, wohingegen der verwendete 5x RNA-Laufpuffer in Tab. 12 beschrieben wird. Sowohl der Marker als auch der 2x Probenpuffer enthalten bereits Ethidiumbromid, so dass dieses nicht in den Agarosegelansatz zugegeben werden muss. Zur Größenbestimmung der RNA-Fragmente wurden  $3 \mu\text{l}$  des *RiboRuler<sup>TM</sup> High Range RNA Marker* (Fermentas; St. Leon-Roth; Deutschland) (Abb. 19) verwendet. Vor der Auftragung auf das Agarosegel mussten sowohl der Marker als auch die Proben zusätzlich für 10 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  denaturiert werden. Der Standard Probenansatz ist in Tab. 13 aufgeführt. Für den Gellauf wurde der 5x RNA-Laufpuffer (Tab. 12) mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  zu einem einfachen Laufpuffer verdünnt. Die Auftrennung erfolgte bei 128 V im elektrischen Feld.

**Tabelle 11: 1%-iges Agarosegel**

Reagenzien	Stoffmengen
Agarose Seakem LE	500 mg
DEPC-H <sub>2</sub> O	37,5 ml
5x RNA-Laufpuffer	10 ml
Formaldehyd (37%)	2,5 ml

**Tabelle 12: 5x RNA-Laufpuffer**

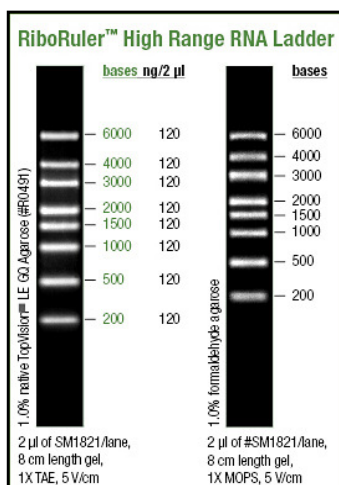
Reagenzien	Konzentrationen
MOPS	0,1 M
Natriumacetat	50 mM
EDTA (pH 8,0)	5 mM

pH 7,0

*Der Puffer wird mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt und nach dem Einstellen des pH-Werts autoklaviert. Außerdem muss der Puffer vor Licht geschützt werden.*

**Tabelle 13: Standard Probenansatz**

Reagenzien	Stoffmengen
RNA	0,5 µg
2x Loading Dye (Fermentas)	5 µl
H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)	ad 10 µl

**Abbildung 19: RNA-Marker**

*Größendarstellung des verwendeten RNA-Markers RiboRuler™ High Range RNA Ladder*

*(Quelle: [www.fermentas.de](http://www.fermentas.de)).*



### 2.4.6 Herstellung des DEPC-H<sub>2</sub>O

Um eine Kontamination mit Nukleasen auszuschließen, wurde für die Herstellung eines RNA-Agarosegels nur DEPC-H<sub>2</sub>O verwendet. Hierzu wurde Millipore-H<sub>2</sub>O mit 0,05% DEPC versetzt und die Lösung ü.N. bei 180 rpm und 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Das DEPC modifiziert Histidinreste im aktiven Zentrum der Nukleasen, so dass diese nicht mehr aktiv sind. Da DEPC sehr giftig ist, wurde es nach der Reaktion durch Autoklavieren bei 1,0 bar für 45 min bei 121°C in Kohlenstoffdioxid und Ethanol gespalten und so unschädlich gemacht.

### 2.4.7 Isolation von Gesamt-RNA aus *X. laevis* Oozyten

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mittels des *RNeasy Plus Mini* Kit von Qiagen (Hilden; Deutschland). Für die Isolation wurden 25 Oozyten des Krallenfrosches mit 600 µl RLT-Puffer versetzt und mit dem Pistill zerkleinert. Um die restlichen Fragmente der Oozyte zu entfernen, wurde das Gemisch für 3 min bei 13000 xg zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein *gDNA Eliminator column* überführt und die weitere Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Gesamt-RNA wurde zuletzt mit 50 µl nukleasefreiem H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert. Um sicherzustellen, dass keine weitere DNA im Ansatz vorhanden war, wurde zusätzlich ein DNA-Verdau durchgeführt. Dazu wurde analog zum Abschnitt 2.4.2 *Turbo DNase (1µl)* zugegeben und der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. Um Enzymreste und andere Verunreinigungen zu entfernen, wurde die Gesamt-RNA nachfolgend mit Ammoniumacetat (siehe 2.4.4) gefällt.

## 2.5 PCR-Techniken

### 2.5.1 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ermöglicht eine Umwandlung von mRNA in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA), wodurch eine nachfolgende Amplifikation der cDNA mittels PCR ermöglicht wird. Innerhalb der RT-PCR synthetisiert die reverse Transkriptase *SuperScript<sup>TM</sup> III* (Invitrogen; Karlsruhe; Deutschland) die Synthese der cDNA. Die *SuperScript<sup>TM</sup> III* Transkriptase entstammt dem MMLV (*moloney murine leukemia virus*) und wurde durch Mutationen so verändert, dass diese Transkriptase eine höhere Thermostabilität und eine reduzierte RNase H Aktivität aufweist. Zu Beginn der Reaktion wurde die mRNA mit den oligo(dT)<sub>30</sub>-Primern sowie Nukleotiden gemischt und für 5 min bei 65°C inkubiert, um die RNA-Sekundärstruktur zu zerstören. Als nächstes wurden der Erststrangpuffer, Dithiotreitol (DTT), die Transkriptase und der RNase Inhibitor *Ribolock* (Fermentas; St. Leon-Roth; Deutschland) hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 60 min auf 50°C erhitzt. Um die Reaktion zu stoppen, wurde der Reaktionsansatz nachfolgend für 15 min bei 70°C inkubiert. Der Ansatz für die RT-PCR wird in der Tab. 14 geschildert.

**Tabelle 14: Ansatz der RT-PCR-Reaktion**

Reagenzien	Volumen
Oligo (dT) <sub>30</sub>	1 µl
dNTPs (10 mM <i>each</i> )	1 µl
RNA	1 µg
5x <i>First Strand</i> Puffer	4 µl
DTT (0,1 M)	1 µl
<i>Ribolock</i> RNase Inhibitor (40 U/µl)	1 µl
<i>Super Scrip<sup>TM</sup> III</i> Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
nukleasefreies H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

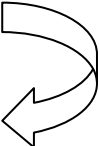
### 2.5.2 Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR)

Die PCR ermöglicht eine selektive Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Diese Reaktion lässt sich allgemein in drei verschiedene Schritte unterteilen. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird der Doppelstrang oder Einzelstrang der *template*-DNA durch eine Inkubation bei 94°C denaturiert. Danach wird die Temperatur auf ca. 60°C erniedrigt und es erfolgt der zweite Schritt, welcher *Annealing* genannt wird. Hierbei erfolgt die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige *template*-DNA. Im dritten und letzten Schritt eines Zyklus, auch *Extension* genannt, bindet die Polymerase an die Oligonukleotidprimer und verlängert diese bis 2 vollständige Doppelstränge entstanden sind, welche im nächsten Zyklus wieder als Matrize dienen. Aufgrund der hohen Temperaturen ist es notwendig hitzestabile Polymerasen, wie z.B. die *TopTaq Polymerase* (Qiagen; Hilden; Deutschland) zu verwenden. Für die durchgeführten PCR-Ansätze wurde das *TopTaq Kit* (Qiagen; Hilden; Deutschland) genutzt. Dieses Kit beinhaltet eine *Coral load*-Lösung, welche eine direkte Auftragung des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel ermöglicht. Des Weiteren wurde das Gen *hGap-Dh* als externe Referenz amplifiziert, um Schwankungen und Störungen innerhalb der PCR zu erkennen. Der Tabelle 15 ist der Ansatz der PCR-Proben zu entnehmen, während das verwendete PCR-Protokoll in Tab. 16 aufgelistet ist.

**Tabelle 15: PCR-Ansatz**

Reagenzien	Volumen
10x PCR-Puffer	5 µl
dNTPs (10 mM <i>each</i> )	1 µl
10x <i>Coral load</i>	5 µl
Primer <i>sense</i> (10 pmol/µl)	1 µl
Primer <i>antisense</i> (10 pmol/µl)	1 µl
<i>template</i> -DNA	x µl
<i>TopTaq</i> Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
nukleasefreies H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

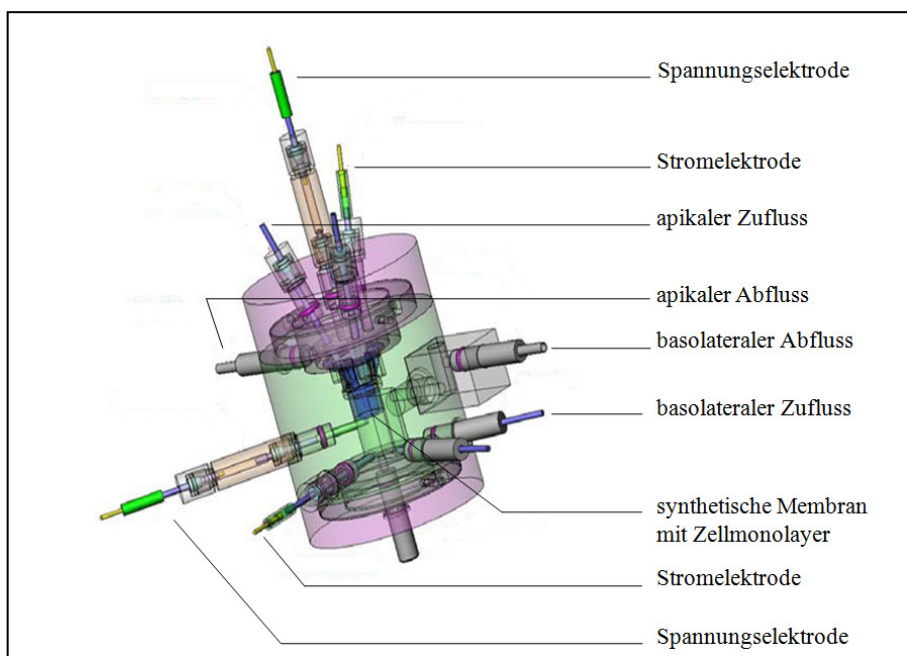
**Tabelle 16: Protokoll des PCR-Programms**

	Dauer	Temperatur	
1. Initiale Denaturierung	3 min	94°C	
2. Denaturierung	30 s	94°C	
3. Annealing	30 s	64°C	
4. Extension	1 min	72°C	
5. Finale Extension	10 min	72°C	35 Zyklen

## 2.6 Elektrophysiologische Messungen des transepithelialen Transports mit der Ussing Kammer

Bei der Ussing Kammer handelt es sich um eine 1951 von Ussing und Zerahn entwickelte Apparatur, die es ermöglicht den transepithelialen Transport sowie die Barrierefunktion eines Epithels zu charakterisieren (Ussing und Zerahn 1951). Die Barrierefunktion des Epithels, welche Aussagen über die Dichtigkeit des Epithels zulässt, wird durch den epithelialen Widerstand ( $R_t$ ) angegeben. Der transepitheliale Transport wird über den Stromfluss beschrieben. Mit der Apparatur können sowohl intakte Epithelien, aber auch auf synthetischen Membranen kultivierte Zellmonolayer gemessen werden. Diese Membranen werden in die Apparatur eingespannt, so dass die zwei Kammerhälften, die apikale und basolaterale Kammerhälfte, durch das eingespannte Epithel getrennt sind. Durch diese räumliche Trennung kann ein Stromfluss nur über das Epithel erfolgen, wodurch der Ionenfluss und damit Resorption und Sekretion des Epithels untersucht werden können. Der so erzeugte Strom wird durch einen entgegengesetzten Strom kompensiert, um die transepitheliale Spannung ( $V_{EP}$ ) in der Apparatur gleich null zu halten. Bei dem applizierten Strom spricht man von dem sogenannten Kurzschlussstrom ( $I_{SC}$ , *short circuit current*), welcher ein Maß für den elektrogenen Transport darstellt. In dieser Arbeit wurde eine modifizierte Ussing Kammer verwendet, die den  $I_{SC}$ , die Leitfähigkeit ( $G_t$ ) und die Kapazität ( $C_t$ ) des Epithels messen kann. Der zuvor erwähnte Widerstand des Epithels, welcher in Ohm ( $\Omega$ ) mal  $\text{cm}^2$  angegeben wird, lässt sich anhand des Ohmschen Gesetzes durch den

reziproken Wert der Leitfähigkeit errechnen. Während der Messung wird die transepitheliale Spannung ( $V_t$ ) über die zwei gewebe nahen Spannungselektroden ermittelt und der kompensierende Strom wird über die beiden gewebsfernen Stromelektroden appliziert. Die Höhe des zu kompensierenden Stroms wird über die *Voltage Clamp* Einheit errechnet. Gleichzeitig misst diese Einheit die Höhe des Ausgleichsstroms. Die erfassten Informationen werden durch eine spezielle *Hardware* sowie des zugehörigen Computerprogramms *ImpDsp 1.4* (Prof. Dr. W. van Driessche, Leuven, Belgien) registriert und dargestellt. Alle elektrophysiologischen Parameter werden während einer Messung auf  $1 \text{ cm}^2$  normalisiert und kontinuierlich aufgezeichnet. Ein Schema der verwendeten Ussing Kammer ist in Abb. 20 dargestellt.



**Abbildung 20: Schematischer Aufbau der verwendeten Ussing Kammer**

Das Epithel, welches auf der synthetischen Membran kultiviert wurde, trennt die apikale und basolaterale Kammerhälfte voneinander. Während der Messung werden die Zellen über die jeweiligen Zu- und Abflüsse mit Lösungen versorgt. Anhand der Spannungselektroden wird die transepitheliale Spannung über die Membran gemessen, so dass der kompensatorische Strom durch die *Voltage Clamp* Einheit registriert und über die Stromelektroden appliziert werden kann (bearbeitet nach <http://users.telenet.be/ep-devices/products.html>).

### 2.6.1 Durchführung einer Ussing Kammer Messung

Nach einem Kultivierungszeitraums von ca. einer Woche waren die ausgesäten Filter messbar. Die Filter wurden in der Ussing Kammer platziert und die Zellen mit physiologischer Ringerlösung (Zellkulturringer; ZK-Ringer) perfundiert. Vor der Messung wurden die benötigten Lösungen sowie die Kammer auf 37°C erwärmt. Die Applikation der Lösungen erfolgte über in die Apparatur integrierte Pumpen. Nach der Stabilisierung des Kurzschlussstroms, der Leitfähigkeit und der Kapazität wurde das Epithel durch Applikation verschiedener Substanzen charakterisiert. Die Aktivierung des CFTR-Kanals wurde durch Zugabe eines cAMP/IBMX-Cocktails (cAMP (100 µM)/ IBMX (1 mM) in ZK-Ringer) nachgewiesen, welcher basolateral appliziert wurde. Zusätzlich wurde der CFTR-Kanal durch den spezifischen Inhibitor CFTR<sub>inh</sub>-172 blockiert, der zeitgleich mit den aktivierenden Substanzen cAMP oder SL apikal zugeführt wurde. Weiterhin wurde der Einfluss von SL auf den Ionentransport in den Zellen untersucht. SL wurde dazu ebenfalls basolateral auf die Zellen gegeben. Um den Mechanismus der SL-Wirkung zu untersuchen, wurde eine Lösung aus SL und KT5823 oder eine Lösung aus SL und ODQ zugegeben. Nach jeder Zugabe eines Aktivators wurde dieser mit ZK-Ringer ausgewaschen.

### 2.6.2 Zusammensetzung des ZK-Ringers sowie der applizierten Substanzen

Alle verwendeten Lösungen wurden unter möglichst sterilen Bedingungen hergestellt, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Zusammensetzung des ZK-Ringers ist der Tab. 17 zu entnehmen.

- cAMP/IBMX-Cocktail:

Der CFTR-Aktivator wurde äquivalent zu den elektrophysiologischen Untersuchungen in den *X. laevis* Oozyten angesetzt (siehe Abschnitt 2.2.9). Der einzige Unterschied lag in der Lösung der Substanzen in ZK-Ringer anstatt in ORi.

- CFTR-Inhibitor CFTR<sub>inh</sub>-172:

Bei CFTR<sub>inh</sub>-172 handelt es sich um einen spezifischen CFTR-Inhibitor (Tocris Cookson Inc.; Ellisville; USA), der ebenfalls membrangängig ist (Taddei et al. 2004). Der Inhibitor wurde als 10 mM Stammlösung angesetzt und mit ZK-Ringer auf die applizierte Endkonzentration von 10 µM verdünnt.

- SL-Lösungen:

Für die Ussing Kammer Messungen wurde die 50 mM SL-Stammlösung in ZK-Ringer auf die Endkonzentrationen 30 µM, 45 µM, 60 µM, 200 µM und 400 µM verdünnt. Die SL-Stammlösung wurde teilweise zunächst zur besseren Löslichkeit in DMSO (9% der Lösung) aufgenommen. Anschließend wurde 2x ZK-Ringer (50%) und autoklaviertes H<sub>2</sub>O (41%) hinzugegeben.

- SL/KT5823-Lösung:

Für die Untersuchung der cGMP-Abhängigkeit des SL-Wirkmechanismus auf den CFTR wurde eine Lösung von SL (200 µM) und dem spezifischen PKG-Inhibitor KT5823 (3 µM) auf die Zellen gegeben. Dazu wurde die 1 mM KT5823-Stammlösung zusammen mit der SL-Stammlösung zunächst in DMSO (9%) verdünnt und dann 2x ZK-Ringer (50%) sowie autoklaviertes Millipore-H<sub>2</sub>O (41%) zugegeben. Zusätzlich wurden die kultivierten Monolayer 15 min vor der Messung mit einer KT5823-Lösung (3µM) inkubiert.

- SL/ODQ-Lösung:

Zur Untersuchung, ob der SL-Mechanismus über die cGMP-Signalkaskade vermittelt wird, wurde eine Lösung von SL (200 µM) und dem spezifischen Guanylatzyklase Inhibitor ODQ (10 µM) appliziert. Dazu wurde die 25 mM ODQ-Stammlösung zusammen mit der SL-Stammlösung in DMSO (9%) aufgenommen und dann mit 2x ZK-Ringer (50%) sowie autoklaviertem H<sub>2</sub>O (41%) auf die verwendete Endkonzentrationen verdünnt. Um auszuschließen, dass ODQ alleine schon eine Wirkung auf das Epithel zeigt, wurden Zellen nur

mit ODQ ohne SL inkubiert. Weiterhin wurden die kultivierten Monolayer 15 min vor der Messung mit einer 10  $\mu$ M ODQ-Lösung inkubiert.

- DMSO-Lösung (9%):

Um die Effekte von DMSO in den zuvor beschriebenen Lösungen zu kennen, wurde in einigen Ussing Kammer Messungen eine 9%-ige DMSO-Lösung appliziert.

**Tabelle 17: ZK-Ringer**

Reagenzien	Konzentrationen
NaCl	130 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Glukose	5 mM
HEPES	10 mM
pH 7,3	

## 2.7 Zellbiologische Methoden

### 2.7.1 Verwendete Zelllinien

Bei Zelllinien handelt es sich um immortalisierte Zellen, die aufgrund dieser Modifikation über einen längeren Zeitraum im Labor kultiviert werden können. Zur Generierung der Zelllinien wurden isolierte Zellen mit einem *pSVori*-Plasmid transformiert, welches ein *simian virus 40 large T-antigen* (SV 40 Antigen) sowie einen defekten Replikationsursprung (*ori*<sup>-</sup>) enthält. Für die Untersuchungen wurden die beiden Zelllinien 16HBE14o<sup>-</sup> und CFBE41o<sup>-</sup> verwendet, welche Anfang der 90er Jahre in der Arbeitsgruppe von Gruenert (*California Pacific Medical Center Research Institute*; San Francisco; USA) als Modellsysteme zur Erforschung der Mukoviszidose entwickelt wurden (Ehrhardt et al. 2006). Bei beiden Zelllinien handelt es sich um bronchiale



Epithelzellen aus der ersten Luftröhrengabelung. Sie eignen sich besonders für elektrophysiologische Untersuchungen, da beide Zelllinien *in vitro* polarisierte und durch die Ausbildung von *tight junctions* dichte Epithelstrukturen bilden (Gruenert et al. 2004). Die Zelllinie 16HBE14o<sup>-</sup> wurde aus gesunden menschlichen Epithelzellen generiert. Diese Zellen exprimieren endogen den wt-CFTR. Aufgrund dieser Eigenschaften wird die Zelllinie 16HBE14o<sup>-</sup> oft als Kontrolle für die CFBE41o<sup>-</sup>-Zelllinie genutzt, welche ein Modellsystem für Mukoviszidose darstellt. Die Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> wurde aus den Bronchien eines einjährigen Mukoviszidose Patienten hergestellt und ist homozygot für die häufigste Mutation  $\Delta F508$ -CFTR.

### **2.7.2 Vorbereitung der Deckgläser für die Immunfluoreszenz**

Für die Aussaat von Zellen auf Glasdeckgläsern ( $\varnothing=12$  mm; Roth; Karlsruhe; Deutschland) wurden die Deckgläser für 3 bis 4 h in Aceton inkubiert und ü.N. in einer 1%-igen Natriumcarbonatlösung geschüttelt. Weiterhin wurden die Glasdeckgläser dreimal mit Millipore-H<sub>2</sub>O gewaschen, vereinzelt und abschließend autoklaviert. Vor dem Aussäen der Zellen müssen die Deckgläser noch beschichtet werden.

### **2.7.3 Beschichtung von Zellkulturflaschen und Glasdeckgläsern**

Um die optimale Anheftung und ein polarisiertes Wachstum der Zellen auf den Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co.; Nürnberg; Deutschland) und Glasdeckgläsern zu gewährleisten, wurden die Materialien vor dem Aussäen der Zellen mit einer 1%-igen Fibronectinlösung (Tab. 18) beschichtet. Hierbei wurden z.B. Flaschen und Deckgläser mit einer ausreichenden Menge der Fibronectinlösung benetzt und anschließend entweder ü.N. unter der Sterilbank oder für 2 h im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet.

**Tabelle 18: 1%-ige Fibronectinlösung**

Reagenzien	Konzentrationen
Rinderserumalbumin (BSA) (7,5%)	0,13% (v/v)
Rinderkollagenase (1 mg/ml)	3% (v/v)
humanes Fibronectin (1 mg/ml)	1% (v/v)
autoklaviertes H <sub>2</sub> O	9,87% (v/v)
LHC Basalmedium	ad 100 ml

### 2.7.4 Kultivierung der Zelllinien

Zur Kultivierung der Zelllinien wurde in Abständen von ca. 2 Tagen das Kulturmedium gewechselt. Dazu wurde das vorhandene Medium entfernt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Dieser Waschschrift ist notwendig, um die von den Zellen abgeschiedenen Metaboliten, sowie die abgestorbenen Zellen zu entfernen. Abschließend wurde ca. 20 min vorgewärmtes Medium auf die Zellen gegeben, um sie mit neuen Nährstoffen zu versorgen. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank (Zellkultur-Inkubator; Heraeus BBD 6220; Kendro; Hanau; Deutschland) bei 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% sowie einer 95%-igen Luftfeuchtigkeit. Die Zusammensetzung des 1x PBS (*phosphate buffered saline*) (Tab. 19) und des Kulturmediums (Tab. 20) werden nachfolgend beschrieben.

**Tabelle 19: 1x PBS (*phosphate buffered saline*)**

Reagenzien	Konzentrationen
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2 H <sub>2</sub> O	10,2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
pH 7,3	

**Tabelle 20: MEM Kulturmedium**

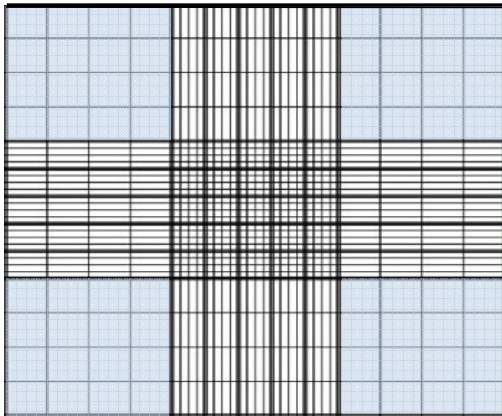
Reagenzien	Konzentrationen
fetales Kälberserum (FKS)	10% (v/v)
L-Glutamin (200 mM)	1% (v/v)
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	1% (v/v)
<i>Minimum Essential Medium Eagle (MEM)</i>	ad 250 ml

### 2.7.5 Passagieren der Zelllinien

Wenn die Zellen auf den Zellkulturflaschen eine Konfluenz von ca. 90% erreicht hatten, wurden sie gesplittet, um sicherzustellen, dass die Zellen sich nicht morphologisch verändern und durch das Medium optimal versorgt werden können. Bei diesem Prozess wird eine Trypsin-/EDTA-Lösung (0,25%/0,02%) zu den Zellen gegeben. Bei Trypsin handelt es sich um eine Endopeptidase, welche im Organismus aktiv ist und dort die Peptidverbindung von Arginin und Lysin spaltet. Diese Spaltung führt zu einer Verdauung der extrazellulären Zellmatrixproteine, wodurch die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes gelöst werden können. Das ebenfalls zugegebene EDTA destabilisiert als  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator zusätzlich die *tight junctions* der Zellen und unterstützt deren Lösen (Schmitz 2007). Vor der Trypsinzugabe wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Die Trypsinisierung erfolgte bei 37°C für ca. 5 min und das Ablösen der Zellen wurde durch Klopfen des Kulturgefäßes unterstützt. Danach wurden die Zellen mit einer sterilen Pipette im Kulturmedium resuspendiert und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG & Co.; Nürnberg; Deutschland) überführt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen durch eine 5-minütige Zentrifugation (Eppendorf 5702; Eppendorf; Hamburg; Deutschland) bei 500 xg pelletiert, um die Trypsin- und EDTA-Reste zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in der gewünschten Menge des Kulturmediums wieder aufgenommen. Die Zellen wurden nun verdünnt in neuen zuvor beschichteten Zellkulturgefäßen ausgesät oder zur Aussaat auf Deckgläsern und Filtern zunächst gezählt.

### 2.7.6 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer

Um eine Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten, war es erforderlich eine konstante Zellzahl einzusetzen. Daher wurde die Zellzahl vor dem Aussäen auf Filtern bzw. Deckgläsern mittels der Neubauer Zählkammer (Abb. 21) bestimmt. Zunächst wurde ein Deckglas auf dem Objektträger platziert, um die Zählkammer zu verschließen. Danach wurde ca. 20 µl einer Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und 2 Großquadrate, welche in der Darstellung in der Abb. 21 blau unterlegt sind, unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro ml ergibt sich aus dem Mittelwert multipliziert mit dem Faktor  $10^4$ .



**Abbildung 21: Darstellung der zur Zellzahlbestimmung verwendeten Neubauer Zählkammer**

*Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl der Zellsuspension in die Zellkammer gegeben und die Zellen in zwei Großquadraten gezählt. Die 4 auszählbaren Großquadrate sind in der Abbildung blau unterlegt (bearbeitet nach [www.zählkammer.de](http://www.zählkammer.de)).*

### 2.7.7 Aussäen der Zellen auf Filtern und Deckgläsern

Für transepitheliale Messungen in modifizierten Ussing Kammern wurden die Zellen auf Filtern mit einer Polyester membran (Costar<sup>®</sup> Transwell<sup>®</sup>; Corning Inc.; New York; USA) mit einer Porengröße von 0,4 µm und einer Fläche von 0,33 cm<sup>2</sup> ausgesät. Dazu wurde zunächst 1 ml Kulturmedium außen und 200 µl Kulturmedium im Filter vorgelegt. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden  $1,1 \times 10^5$  Zellen in den Filter gegeben. Für die Durchführung von Immunofluoreszenzen wurden je 4 mit Fibronectin beschichtete Glasdeckgläschen (Ø=12 mm) in einer Gewebekulturschale (Ø=3,5 cm; Sarstedt; Nürnberg; Deutschland) platziert und mit 1 ml Kulturmedium überschichtet. Als nächstes wurden  $3,5-4,5 \times 10^5$  Zellen auf die Deckgläser gegeben.

### 2.7.8 Einfrieren von Zellen

Um Zellen der verwendeten Zelllinien für die Langzeitaufbewahrung zu konservieren, wurden sie mit einem DMSO-enhaltenen Einfriermedium (Tab. 21) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Dieser Vorgang sollte langsam erfolgen, um das Eindringen des DMSO in die Zellen zu gewährleisten, wodurch die Bildung von Eiskristallen verhindert wird. Da DMSO bei RT zelltoxisch wirkt, muss das Medium vor der Zugabe zu den Zellen auf Eis gelagert werden. Die Zellen wurden, wie bei einer normalen Zellpassage, mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Abschnitt 2.6.5) von dem Zellkulturgefäß abgelöst und für 5 min bei 500 xg zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Zellpellet in 1,8 ml des Einfriermediums resuspendiert und in ein Kryoröhrchen (*CryoPure Tube* 1,8 ml; Sarstedt AG &Co.; Nürnberg; Deutschland) überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte schrittweise. Zunächst wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert, danach für 2 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und erst dann dauerhaft bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Tabelle 21: Einfriermedium**

Reagenzien	Konzentrationen
FKS	50% (v/v)
DMSO	10% (v/v)
Kulturmedium	ad 1,8 ml

### 2.7.9 Auftauen von Zellen

Um die Zellen bei Bedarf kultivieren zu können, mussten sie zunächst aufgetaut und vermehrt werden. Das Auftauen der Zellen muss aufgrund des DMSO zügig durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden die Zellen im Wasserbad (Isotemp 210; Fisher Scientific; Schwerte; Deutschland) bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Daraufhin wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen, welches vorgewärmtes Kulturmedium enthielt, überführt. Zur Entfernung des DMSO wurde das Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 500 xg (RT) zentrifugiert. Weiterhin wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem, vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden auf eine mit Fibronectin beschichtete T25-Zellkulturflasche ( $25\text{ cm}^2$  Wachstumsfläche) gegeben und im Brutschrank kultiviert.

## 2.8 Immunfluoreszenzoptische Methoden

### 2.8.1 Immunfluoreszenz Färbung

Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Deckgläschen zunächst vereinzelt. Nach einer Erholungszeit von mindestens einer Stunde wurden die Zellen auf den Deckgläsern mit SL in den Konzentrationen 45  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$  sowie der Lösung 60  $\mu\text{M}$  SL mit 3  $\mu\text{M}$  KT5823 für 2 h inkubiert. Dazu wurden die Stammlösungen der Substanzen (siehe Abschnitt 2.2.9) mit Kulturmedium auf die erforderliche Endkonzentration verdünnt. Als Kontrolle wurde ein Deckgläschen nur mit Medium und ein Weiteres nur mit DMSO (0,024%; entspricht der DMSO-Menge von der 400  $\mu\text{M}$  SL-Lösung) inkubiert. Weiterhin wurden der HEPES-Puffer (Tab. 22) sowie das 1x PBS zur Schonung der Zellen auf 37°C vorgewärmt. Nach der SL-Inkubation wurden die Zellen mit 0,05% Glutaraldehyd in HEPES-Puffer für 10 min bei 37°C im Brutschrank fixiert. Nach diesem Vorgang wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Zu diesem Zeitpunkt konnten die Zellen für einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden. Nun wurden die Zellen 5-mal für 5 min mit kaltem 1x PBS gewaschen. Während der Waschschrte wurden die Deckgläser auf einem Schüttler (Typ 3005; GFL<sup>®</sup>; Burgwedel; Deutschland) sehr leicht bewegt. Nachfolgend erfolgte eine Inkubation der Zellen für 60 min in 100 mM Glycin (in PBS) unter leichtem Schütteln. Die Zellen wurden 5-mal 5 min gewaschen und dann für 30 min in GNS-Blockierlösung (Tab. 23) inkubiert. Nach der Blockierung der unspezifischen Bindestellen erfolgte die Applikation des primären Antikörpers. In diesem Fall wurde der anti-CFTR-Antikörper MA1-935 (Wirtsspezies: Maus; Dianova; Hamburg; Deutschland) benutzt und 1:500 in GNS-Blockierlösung verdünnt. Weiterhin wurde jeweils ein 40  $\mu\text{l}$  Tropfen der Antikörperlösung auf einen Parafilm gegeben, die Deckgläschen invertiert mit den Zellen in den Tropfen gegeben und der Parafilm mit den Deckgläschen in einer feuchten Kammer für 60 min ohne Schütteln aufbewahrt. Die nur mit Medium versorgte Kontrolle wurde in diesem Schritt anstatt mit Antikörper nur mit GNS-Blockierlösung inkubiert. Nun wurden die Deckgläser in eine *4-well* Gewebekulturschale (PAA Laboratories GmbH; Pasching; Österreich) überführt und wiederum 5-mal 5 min mit 1x PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden in einen 40  $\mu\text{l}$  Tropfen der Blockierlösung mit dem sekundären Antikörper platziert und für 60 min in einer feuchten Kammer ohne Schütteln inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein mit

*Qdots*<sup>®</sup> 655 *goat* F(ab')<sub>2</sub> IgG Konjugaten gekoppelter anti-Maus Antikörper (Invitrogen; Karlsruhe; Deutschland) verwendet. Dieser Antikörper wurde zunächst 2 min zentrifugiert und die entsprechende Menge (1:200 Verdünnung) in GNS-Blockierlösung verdünnt. Die Deckgläser wurden in die *4-well* Gewebekulturschale transferiert und es erfolgten weitere 5 Waschschrte für 5 min mit 1x PBS sowie 2 weitere Waschschrte mit HEPES-Puffer. Nachfolgend wurden die Zellen ein weiteres Mal mit 0,05% Glutaraldehyd in HEPES-Puffer für 10 min bei 37°C im Brutschrank fixiert. Nach dieser Fixierung erfolgten 3 weitere Waschschrte mit 1x PBS für 5 min. Abschließend wurden die Deckgläser 5-mal in Millipore-H<sub>2</sub>O gewaschen, abgetropft und mit den Zellen nach oben auf einem Objektträger (Roth; Karlsruhe; Deutschland) platziert. Zuvor wurde auf die Objektträger ein Tropfen *Dako Fluorescent Mounting Medium* (Dako; Glostrup; Dänemark) gegeben. Die Deckgläser wurden mit einem Tropfen *Dako Fluorescent Mounting Medium* und einem Deckglas (24x60mm; Roth; Karlsruhe; Deutschland) abgedeckt. Nach einer minimalen Aushärtezeit von 12 h konnten die Präparate unter dem Mikroskop betrachtet werden.

**Tabelle 22: HEPES-Puffer**

Reagenzien	Konzentrationen
NaCl	140 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
Glukose	5 mM
HEPES	10 mM

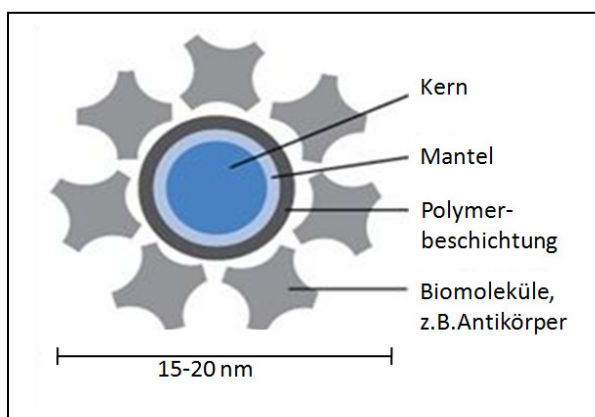
*Nachdem alle Reagenzien in Millipore-H<sub>2</sub>O gelöst waren, wurde der Puffer sterilfiltriert.*

**Tabelle 23: GNS-Blockierlösung**

Reagenzien	Konzentrationen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 M
NaCl	3 M
GNS	10% (v/v)
pH 7,8	

## 2.8.2 Die *Qdots* Nanokristall-Technik

Die Technik der *Quantum dots (Qdots)* wurde im Labor von Brus, Efros und Ekimov entwickelt. Bei den *Qdots* handelt es sich um Atomkomplexe, die z.B. als Fluorophore an primäre oder sekundäre Antikörper gekoppelt sein können. Der Vorteil der *Qdots* im Gegensatz zu traditionellen Fluorophoren, wie z.B. Cy3, ist in deren Photostabilität und einer hohen Lumineszenz begründet, wodurch lange Beobachtungszeiträume ermöglicht werden. *Qdots* absorbieren die Energie einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer anderen spezifischen Wellenlänge. Im Fall der genutzten *Qdots*<sup>®</sup> 655 goat F(ab')<sub>2</sub> IgG absorbieren sie eine Wellenlänge von 488 nm und emittieren Licht einer Wellenlänge von 655 nm. Ein weiterer Vorteil der *Qdots* besteht darin, dass sie ein sehr breites Absorptionsspektrum im kurzwelligen Bereich des Spektrums aufweisen. Die Sensitivität ist somit sehr hoch. Zusätzlich ist ihr Emissionsspektrum bei 655 nm jedoch sehr schmal, wodurch die Autofluoreszenz reduziert wird. Die *Qdots* bestehen aus einem Kern, einem Mantel und einer Polymerbeschichtung (siehe Abb. 22).



**Abbildung 22: Struktur der Nanokristalle**

Die verwendeten *Qdots* bestehen aus einem Cadmiumselenid Kern, der von einem Mantel aus Zinksulfid sowie einer Polymerbeschichtung umgeben ist. An diesen Komplex sind Biomoleküle gebunden. In der beschriebenen Anwendung handelt es sich dabei um einen Antikörper. Die Größe der *Qdots* beträgt zwischen 15-20 nm (bearbeitet nach [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).



Der Kern besteht aus dem Halbleiter Cadmiumselenid, der mit einer Schale aus Zinksulfid ummantelt ist. Diese Halbleiter sollen die optischen Eigenschaften der Qdots verbessern. Die Polymerbeschichtung dagegen verbindet die Qdots mit dem sekundären Antikörper. Der Komplex hat insgesamt eine Größe von ca. 15-20 nm ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

### **2.8.3 Aufnahmen der Immunfluoreszenz Präparate mit dem Zeiss Meta 510 Mikroskop**

Die Zellen wurden nach der Immunfluoreszenzfärbung im inversen *Zeiss Meta 510* (Zeiss; Oberkochen; Deutschland) angeschaut und aufgenommen. Dabei wurde ein 100x 1,45 vergrößerndes Öl-Immersion Objektiv sowie das Fluoreszenzfilterset F31-118Q von der Firma AHF Analysetechnik AG (Tübingen; Deutschland) genutzt. Das Objektiv wurde zunächst mit einem Tropfen Öl (Immersionöl 518F; Zeiss; Oberkochen; Deutschland) benetzt, bevor die Objektträger invers unter dem Mikroskop platziert wurden. Weiterhin wurden die *Qdots*, welche in der apikalen Membran an die CFTR-Moleküle gebunden sind, manuell fokussiert. Im Anschluss wurde im *Live*-bild des verwendeten Programms *Axiovision Release 4.6.3 SP1* (Zeiss; Oberkochen; Deutschland) möglichst eine einzelne Zelle ausgewählt, welche mit der Kamera *Axiocam MRc5* (Zeiss; Oberkochen; Deutschland) aufgenommen wurde. Für die Bestimmung der Zellgrenzen wurden eine zusätzliche Aufnahme der Zelle mit dem Fluorescein Filter erstellt. Für jeden durchgeführten Ansatz wurden 3 Deckgläser erstellt, von denen pro Deckglas 6 Zellen aufgenommen wurden, so dass pro Ansatz insgesamt 18 Zellen statistisch ausgewertet werden konnten.

### **2.8.4 Auswertung der Immunfluoreszenz Aufnahmen**

Um zunächst den Flächeninhalt der Zellen in Pixeln zu ermitteln, wurden die Bilder in das Programm *LSM Image Browser Release 4.2* (Zeiss, Oberkochen, Germany) importiert. Dabei wurden die Zellgrenzen anhand der zusätzlichen Aufnahme der Zelle mit dem Fluorescein Filter bestimmt. Anhand der Funktion *Overlay* wurde manuell ein Polygon um die Zelle gezeichnet. Aufgrund der Information, dass ein *Pixel* 0,054  $\mu\text{m}$  entspricht, errechnete das Programm den Flächeninhalt der Zelle. Nachfolgend wurden

die CFTR-Moleküle (Anzahl der *Qdots*) innerhalb dieses Polygons mit dem Programm *ImageJ 1.3.6* (Sun Microsystems, Inc.; Kalifornien; USA) manuell gezählt, so dass die Menge der CFTR-Moleküle (*Qdots*) pro  $\mu\text{m}^2$  errechnet werden konnte. Von diesen Werten wurde bei jeder Färbung der Mittelwert abgezogen, der sich bei der Auswertung der Zellen ergab, die nur mit *Qdots* nicht aber mit dem primären Antikörper inkubiert worden waren.

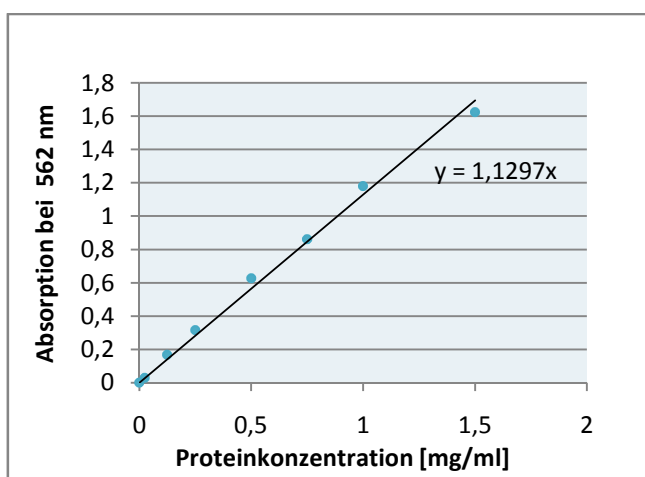
## 2.9 Biochemische Methoden

### 2.9.1 Proteinisolation

Zur Proteinisolation wurden die Zellen zunächst in Zellkulturflaschen (T-75) kultiviert. Für die Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> war es aufgrund einer geringen Zellzahl pro Kulturflasche notwendig zwei T-75 Zellkulturflaschen pro Ansatz zu kultivieren. Nach dem Erreichen einer ca. 95%-igen Konfluenz wurden die Zellen zunächst für 2 h bei 37°C mit den SL-Konzentrationen 45  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$ , der 60  $\mu\text{M}$  SL-Lösung mit 10  $\mu\text{M}$  ODQ, sowie nur mit DMSO zur Kontrolle, inkubiert. Die Herstellung der SL-Lösungen und der SL-Lösung mit ODQ (10  $\mu\text{M}$ ) erfolgte wie unter 2.8.1 beschrieben. Nachfolgend wurden die Proteine mit dem *ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction Kit* von Novagen (Merk; Darmstadt; Germany) isoliert. Dieses Kit ermöglicht die getrennte Isolation der Proteine aus dem Zytoplasma und der Zellmembran der Zellen. Für diesen Vorgang werden die Zellen zunächst 2x auf Eis mit 1x PBS gewaschen, mit 3 ml 1x PBS benetzt und anschließend mit Hilfe eines sterilen Zellschabers von der Kulturflasche gelöst. Dabei erfolgte die Resuspension der identisch inkubierten CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen in insgesamt 3 ml 1x PBS. Die weitere Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Gewinnung der Zellmembranproteine wurde der mitgelieferte Puffer A verwendet.

## 2.9.2 Biconinsäuretest (BCA-Test) zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die Konzentration der isolierten Proteine zu bestimmen, wurde die Proteinbestimmung mit Biconinsäure nach Smith aus dem Jahre 1985 genutzt (Smith et al. 1985). Dazu wurde das *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* der Firma Thermo Scientific Inc. (Waltham; Massachusetts; USA) verwendet. Bei dieser Methode bilden die Proteine mit den in der Lösung enthaltenen Kupferionen einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die bei dieser Reaktion zu  $\text{Cu}^+$  reduzierten Ionen bilden dann einen violetten Farbkomplex mit der Biconinsäure. Diese Farbreaktion ist photometrisch bei 562 nm messbar. Dabei ist die Absorption proportional zur Proteinkonzentration der Probe. Aus diesem Grund werden zur Bestimmung der unbekannt Proteinkonzentrationen definierte Konzentrationen von Kälberserumalbumin als Standard verwendet. Anhand der photometrisch gemessenen Absorption der bekannten Proteinkonzentrationen wird eine lineare Gerade erstellt, welche die Abhängigkeit der Proteinkonzentration von der photometrisch gemessenen Absorption wiedergibt. Ein Beispiel eines solchen Diagramms ist in Abb. 23 gezeigt. Anhand der Geradengleichung wird die Konzentration der isolierten Proteine errechnet. Für diese Bestimmung wurden die Membranproteinfraktionen zunächst 1:10 und die zytosolischen Proteinproben 1:5 in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  verdünnt. Die Durchführung des Tests erfolgte nach den Angaben des Herstellers.



**Abbildung 23: Darstellung einer repräsentativen BCA-Eichgeraden**

*In diesem Diagramm wurden die Proteinkonzentrationen der Proteinstandards gegen die ermittelte Absorption bei 562 nm aufgetragen. Durch die ermittelten Werte wurde eine Ausgleichsgerade gelegt. Anhand der Geradengleichung und der Absorptionen konnte nun die Proteinkonzentration der unbekannt Proben errechnet werden.*

### 2.9.3 Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben für die Auftrennung in der SDS-PAGE vorbereitet. Dazu wurden 40 µg der Membranproteine und 10 µg der zytosolischen Proteine mit 4x Probenpuffer (Tab. 24) versetzt, so dass der Puffer im Endvolumen einfach vorlag. Weiterhin wurde die Volumendifferenz zwischen den Proben mit Extraktionspuffer aus dem *ProteoExtract® Transmembrane Protein Extraction* Kit von Novagen (Merk; Darmstadt; Germany) aufgefüllt.

**Tabelle 24: 4x Probenpuffer**

Reagenzien	Konzentrationen
Tris	0,5 M
SDS	0,4% (w/v)
EDTA	4 mM
Glycerin	40% (w/v)
Bromphenolblau	0,4% (w/v)
DTT (1 M)	10% (w/v)

*DTT wird immer frisch zugesetzt.*

### 2.9.4 SDS-PAGE

Diese Methode wurde verwendet, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. In dieser Arbeit wurde die denaturierende, diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli durchgeführt (Laemmli 1970). Dabei gliedert sich das Polyacrylamidgel in zwei Bereiche, die sich in der Acrylamidkonzentration unterscheiden. Die Menge des Acrylamids ist maßgeblich für die Porengröße des Gels. So wird in das Sammelgel eine geringere Acrylamidkonzentration gegeben, wodurch eine große Porengröße entsteht, so dass die Proteine fokussiert werden. Das nachfolgende Trenngel besitzt eine höhere Acrylamidkonzentration, wodurch geringere Porengrößen entstehen. Die Poren bilden sich durch die radikalische Polymerisierung des Acrylamids mit N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid. Die Polymerisierung wird durch die Zugabe von 10%-igem Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet und das im Gelansatz vorhandene N,N,N',N'-Tetra-

methylethylendiamin (TEMED) stabilisiert die Polymerisierung. Die genauen Zusammensetzungen des Sammel- (Tab. 25) und Trenngels (Tab. 26), sowie die verwendeten Sammelgel- (Tab. 27) und Trenngelpuffer (Tab. 28) sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen. Um eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht zu gewährleisten, wird Natriumdodecylsulfat (SDS) in den Ansätzen und Puffern verwendet. Das negativ geladene SDS bildet mit den Aminosäuren der Proteine einen Komplex, wodurch die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. So wandern die Proteine im elektrischen Feld alle zum Pluspol. Weiterhin ist es notwendig die Proteine zu denaturieren, um die räumliche Struktur der Proteine zu zerstören, da diese Struktur ansonsten das Laufverhalten des Proteins im Gel bestimmt. Aus diesem Grund enthält der verwendete Probenpuffer DTT, da dieses die Disulfidbrücken der Proteine zerstört. Die Proteine wurden vor der Auftragung auf das Gel durch ein Erhitzen auf 95°C für 5 min zusätzlich denaturiert. Der Gellauf erfolgte in einer horizontalen Gelkammer der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) bei 30 mA. Dazu wurde weiterhin ein Elektrophorese Laufpuffer verwendet (Tab. 29). Als Größenstandard wurde der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* von Fermentas (St. Leon-Roth; Deutschland) genutzt, welcher in Abb. 29 dargestellt ist.

**Tabelle 25: Trenngelzusammensetzung für 4 7,5%-ige Minigele**

Reagenzien	Volumen
Acrylamid Gel 30 (30%)	3,75 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml
H <sub>2</sub> O	7,4 ml
TEMED	5 µl
APS (10% (w/v))	100 µl

**Tabelle 26: Sammelgelzusammensetzung für 4 3,9%-ige Minigele**

Reagenzien	Volumen
Acrylamid Gel 30 (30%)	1,3 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
H <sub>2</sub> O	6,2 ml
TEMED	10 µl
APS (10% (w/v))	100 µl

**Tabelle 27: Sammelgelpuffer**

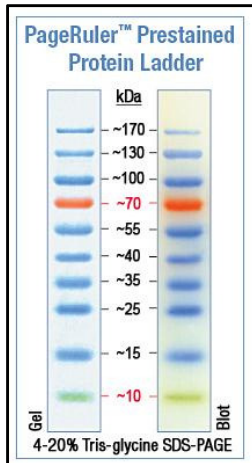
Reagenzien	Konzentrationen
Tris	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)
pH 8,8	

**Tabelle 28: Trenngelpuffer**

Reagenzien	Konzentrationen
Tris	0,5 M
SDS	0,4% (w/v)
pH 6,8	

**Tabelle 29: Elektrophorese Laufpuffer**

Reagenzien	Konzentrationen
Tris	23 mM
Glycerin	190 mM
SDS	0,2% (w/v)
pH 8,3	



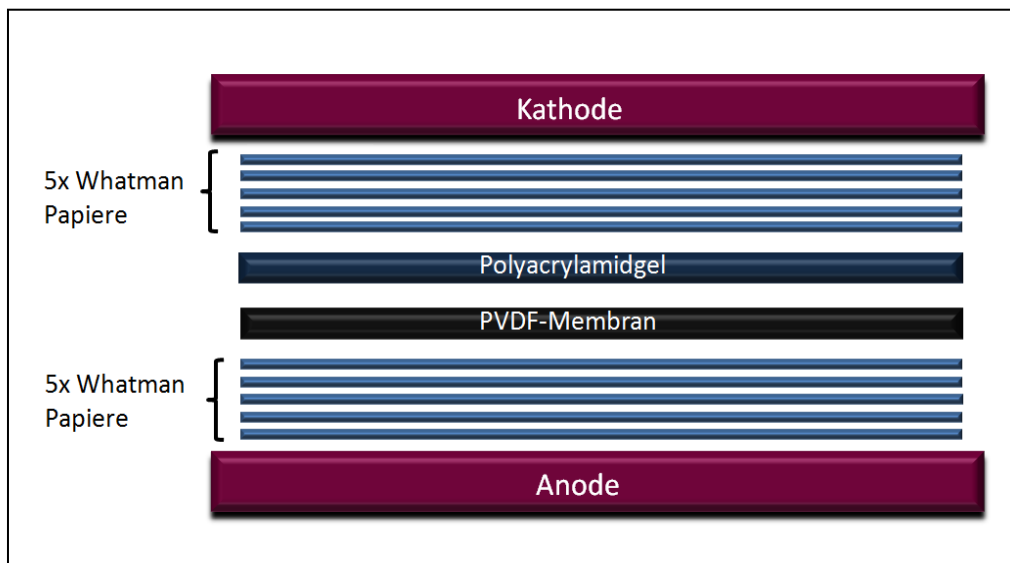
**Abbildung 24: Protein Marker**

*Größendarstellung des verwendeten Protein Markers PageRuler™ Prestained Protein Ladder (SM0671)*  
(Quelle: [www.fermentas.de](http://www.fermentas.de)).

### 2.9.5 Western Blotting

Nach der Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in der SDS-PAGE wurden die Proteine elektrophoretisch von dem Gel auf eine hydrophobe Polyvinylidendifluorid (PVDF) (Roti®PVDF-Membran; Roth; Karlsruhe; Deutschland) übertragen. Der Vorteil an der Bindung der Proteine an eine Membran ist ihre einfache Handhabung sowie die chemische Stabilität. Außerdem ist das Protein für Antikörper und Färbereaktionen leicht zugänglich. Für diese Methode wurde eine *FastBlot* Apparatur der Firma Biometra (Göttingen; Deutschland) verwendet. Zunächst wurden hierzu 5 Whatman Filterpapiere (190 g/cm<sup>2</sup>; Hartenstein; Würzburg; Deutschland) in Transferpuffer (Tab. 30) getränkt und auf der Anode übereinander geschichtet. Nun wurde die PVDF-Membran für ca. 30 s in Methanol aktiviert. Die PVDF-Membran wurde kurz in Transferpuffer gewaschen und dann auf die Whatman Papiere gelegt. Anschließend wurde das Gel auf der PVDF-Membran platziert und weitere 5 in Transferpuffer getränkte Whatman Papiere darauf gestapelt. Abschließend wurde der Stromkreislauf durch das Platzieren des Deckels auf den Whatman Papieren geschlossen. Der Deckel der Apparatur enthält die Kathode. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 5 mA pro cm<sup>2</sup> für 32 min. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 25 dargestellt. Die Effizienz der Übertragung wurde durch Anfärbung der PVDF-Membran mittels einer PVDF-Färbelösung (Tab. 31) überprüft. Nach einer Anfärbung für ca. 30 s erfolgte die Entfärbung der PVDF-Membran mittels der PVDF-Entfärbelösung (Tab. 32) für ca. 5 min. Weiterhin wurde das Polyacrylamidgel in Coomassie Färbelösung (Tab. 33) angefärbt, um festzustellen, ob

alle Proteine übertragen wurden. Nach einer ca. 20-minütigen Färbung erfolgte die Entfärbung des Gels in Entfärbelösung ü.N. (Tab. 34).



**Abbildung 25: Aufbau des Western Blots**

*Schematischer Versuchsaufbau des Western Blots. Auf die Anode wurden zunächst 5 in Transferpuffer getränkte Whatman Papiere gelegt. Darauf folgten die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran und das Polyacrylamidgel. Abschließend wurden wiederum 5 getränkte Whatman Papiere sowie der Deckel der Apparatur, der die Kathode enthält, platziert. Die Übertragung erfolgt aufgrund der negativen Ladung der Proteine durch SDS von der Kathode in Richtung der Anode.*

**Tabelle 30: Transferpuffer**

Reagenzien	Konzentrationen
Tris	39 mM
Glycin	48 mM
SDS	0,037% (w/v)
Methanol	10% (v/v)
pH 8,3	

**Tabelle 31: PVDF-Färbelösung**

Reagenzien	Konzentrationen
Coomassie Brilliant Blau R250	0,075% (w/v)
in Methanol	



**Tabelle 32: PVDF-Entfärbelösung**

Reagenzien	Konzentrationen
Ethanol	40% (v/v)
Methanol	10% (v/v)

**Tabelle 33: Coomassie Gelfärbelösung**

Reagenzien	Konzentrationen
Methanol	10% (v/v)
Essigsäure	7,5% (v/v)
Coomassie Brilliant Blau R 250	0,2% (w/v)

**Tabelle 34: Coomassie Gelentfärbelösung**

Reagenzien	Konzentrationen
Isopropanol	20% (v/v)

### 2.9.6 Blocken der PVDF-Membran

Die PVDF-Membran wurde für 2 h in 5% Milchpulver (w/v) in TBS-Tween (Tab. 35) blockiert, um die unspezifischen Bindestellen der Proteine abzusättigen. Dazu wurde die PVDF-Membran nach der Entfärbung zunächst in 1x TBS gewaschen, um die in der Entfärbelösung enthaltene Essigsäure zu entfernen, denn Essigsäure würde zur Präzipitation der Milch führen. Das 1x TBS wurde durch eine Verdünnung aus 10x TBS (Tab. 36) hergestellt.

**Tabelle 35: TBS-Tween**

Reagenzien	Volumen
10x TBS	100 ml
Tween	500 µl
	ad 1 l

**Tabelle 36: 10x TBS**

Reagenzien	Konzentrationen
Tris	10 mM
NaCl	1,5 mM
pH 7,5	

### 2.9.7 Antikörperfärbung der PVDF-Membran

Nach dem Blockieren der PVDF-Membran erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper. Zur Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die PVDF-Membran horizontal durch die 70 kDa Markerbande in 2 Hälften geteilt. Die obere Hälfte wurde mit dem Antikörper MA1-935 (Wirtspezies: Maus; Dianova; Hamburg; Deutschland), welcher an das CFTR-Protein bindet, inkubiert, während die zweite Hälfte als Ladekontrolle mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin (Wirtspezies: Maus; Dianova; Hamburg; Deutschland) inkubiert wurde. Der CFTR-Antikörper wurde 1:500 und der  $\alpha$ -Tubulin Antikörper 1:250 in 5%-igem Milchpulver in TBS-Tween verdünnt. Die Inkubation der PVDF-Membran erfolgte ü.N. auf dem Rollinkubator (RM5; Karl Hecht KG; Sondheim; Deutschland) bei 4°C. Nachfolgend wurden die PVDF-Membranen dreimal für 10 min bei RT mit TBS-Tween gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte. Aufgrund verschiedener Detektionsmethoden wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet und die PVDF-Membran darin bei RT inkubiert. Zum einen wurde ein Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase (hrp)*) gekoppelt ist und zum zweiten ein Antikörper an den eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist, verwendet. Beide Antikörper wurden 1:10000 verdünnt und die Applikation erfolgte für 1 h bei RT. Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die PVDF-Membran wiederum dreimal für 10 min mit TBS-Tween und ein weiteres Mal mit 1x TBS gewaschen.

### 2.9.8 Detektion mittels NBT/BCIP

Bei dieser Detektion reagiert die an den sekundären Antikörper gekoppelte AP mit BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyphosphate p-Toluidine Salz) und NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chlorid), wobei zwei Farbstoffe entstehen, die in direkter Nähe zum

Antikörper ausfallen. Zur Detektion wurden 49,5  $\mu$ l der BCIP-Stammlösung (Tab. 37) und 99  $\mu$ l der NBT-Stammlösung (Tab. 38) in 15 ml AP-Entwicklungspuffer (Tab. 39) verdünnt. Die PVDF-Membran wird in der Lösung inkubiert. Dies sollte im Dunkeln und ohne Schütteln durchgeführt werden. Nach der Reaktion wird die Membran in H<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und digitalisiert.

**Tabelle 37: BCIP-Stammlösung**

Reagenzien	Konzentrationen
BCIP	50 mg/ml
Dimethylformamid	100%

**Tabelle 38: NBT-Stammlösung**

Reagenzien	Konzentrationen
NBT	50 mg/ml
Dimethylformamid	70%

**Tabelle 39: AP-Entwicklungspuffer**

Reagenzien	Konzentrationen
Tris/HCL	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
pH 9,5	

### 2.9.9 Detektion mittels *Enhanced Chemilumineszenz* (ECL)

Bei dieser Detektionsmethode katalysiert die an den sekundären Antikörper gekoppelte hrp die Umsetzung von Luminol in die oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte über die Strahlungsabsorption und Schwärzung eines Röntgenfilms. Für diese Reaktion wurde die PVDF-Membran für ca. 1 min in einer Lösung aus den Detektionslösungen A und B

(1:1) gelegt (Tab. 40 und 41). Die Zusammensetzung, der für die Detektionslösungen verwendeten p-Cumarsäure- und  $\beta$ -Aminophthalhydrazid-Stammlösungen, sind in den Tab. 42 und 43 gezeigt. Weiterhin wurde der Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL; GE Healthcare; München; Deutschland) auf der PVDF-Membran platziert und für 1-7 min inkubiert. Zur Detektion der Reaktion wurde der Röntgenfilm für 3 min in Entwicklerlösung (Ilford Microphen; Harman Technology Ltd.; Chesire; England) und für 1 min in der Fixierlösung *Ecofix High Performance Fixing Bath* (1:10 Verdünnung) (Marco Photo Products; Stepelfeld; Deutschland) geschwenkt.

**Tabelle 40: Detektionslösung A**

Reagenzien	Volumen
Tris/HCL (100 mM; pH 8,5)	3 ml
p-Cumarsäure-Stammlösung	13,3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,66 $\mu$ l

**Tabelle 41: Detektionslösung B**

Reagenzien	Volumen
Tris/HCL (100 mM; pH 8,5)	3 ml
$\beta$ -Aminophthalhydrazid-Stammlösung	30 $\mu$ l

**Tabelle 42: p-Cumarsäure-Stammlösung (90 mM)**

Reagenzien	Stoffmengen
p-Cumarsäure	14 mg
DMSO	ad 1 ml

**Tabelle 43:  $\beta$ -Aminophthalhydrazid-Stammlösung (250 mM)**

Reagenzien	Stoffmengen
$\beta$ -Aminophthalhydrazid	44 mg
DMSO	ad 1 ml

### 2.9.10 Semi-quantitative Auswertung der Western Blots

Die Röntgenfilme und PVDF-Membranen wurden zunächst mittels eines *Scanners* digitalisiert und dann mit Hilfe des Programms *Image J 1.3.6* densitometrisch ausgewertet. Dabei bestimmt das Programm die Intensität der Banden und stellt diese als Flächeninhalte dar. Die Größe der Flächeninhalte ist somit proportional zur Bandenintensität. Anhand der Ladekontrolle  $\alpha$ -Tubulin wurden Schwankungen der Proteinmengen angeglichen.

## 2.10 Statistik

Um eine statistische Auswertung der erzeugten Daten zu erstellen, wurde das Programm *Origin 7.1* (Origin Lab; Northhampton; USA) verwendet. Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*) angegeben. Statistische Vergleichsanalysen wurden mit dem *Student's t-test* (Origin 7.1; Origin-Lab; Northhampton; USA) durchgeführt, wobei ein Signifikanzlevel von  $p \leq 0,05$  als signifikant und ein Signifikanzlevel von  $p \leq 0,01$  als hochsignifikant gesetzt wurde. In den Abbildungen ist ein Signifikanzlevel von  $p \leq 0,05$  mit einem Sternchen (\*) und von  $p \leq 0,01$  mit zwei Sternchen (\* \*) gekennzeichnet.

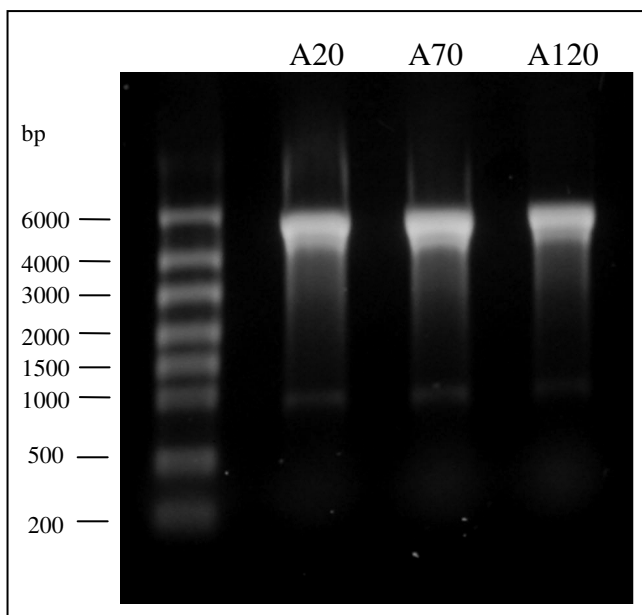
Innerhalb der Auswertung der Oozytenmessungen, gibt N die Zahl der operierten Frösche und n die Zahl der durchgeführten VC-Messungen an. In den Ussing Kammer Messungen steht n ebenfalls für die Zahl der gemessenen Filter. Die Zahl N in den Immunofluoreszenzen hingegen gibt die Anzahl der durchgeführten Färbungen an, während n die Anzahl der ausgezählten Zellen wiedergibt. In den Western Blot Untersuchungen ist die Zahl der Proteinisolierungen mit N gekennzeichnet. Die durchgeführten Western Blots werden durch die Zahl n repräsentiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchung zum Einfluss des mRNA-Polyadenylierungsgrades auf die CFTR-Expression in *X. laevis* Oozyten

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte zunächst eine Optimierung der wt-CFTR-Expression im heterologen Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten. Zu diesem Zweck wurde CFTR-mRNA mit unterschiedlich langen Polyadenylierungen generiert (20, 70, 120 Adenine). Im Folgenden werden die verwendeten mRNA-Varianten nach der Länge ihrer enthaltenen Polyadenylierung mit CFTR-A20, CFTR-A70 und CFTR-A120 bezeichnet.

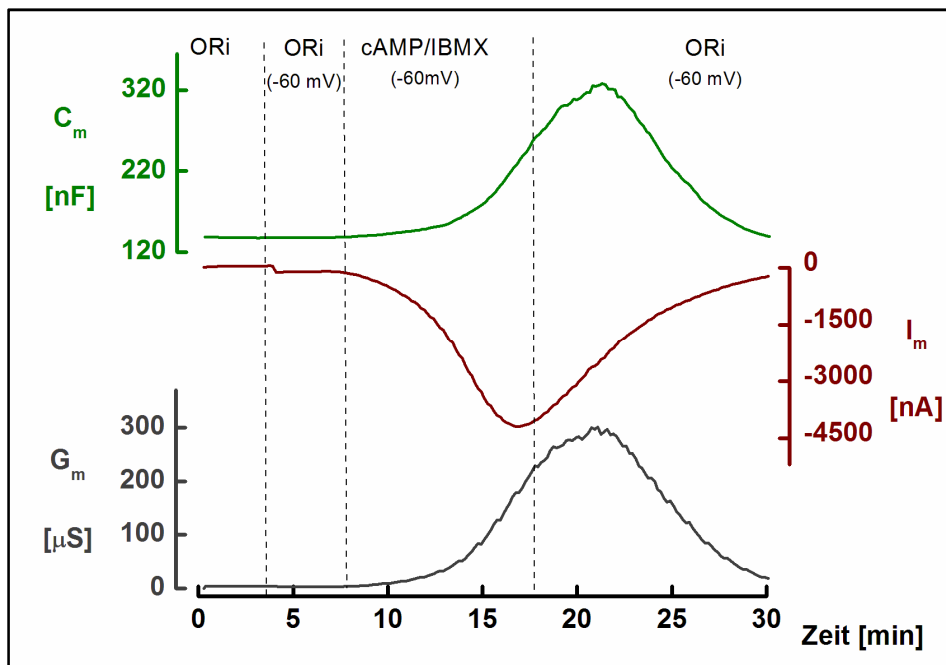
Nach erfolgter Generierung und Aufreinigung der drei mRNA-Varianten erfolgte zunächst eine photometrische Konzentrationsbestimmung. Um jedoch eine genauere Aussage über die Qualität der mRNA treffen zu können, wurde die mRNA in einem denaturierendem Agarosegel überprüft. Es wurden jeweils 0,5 µg jeder mRNA aufgetragen. In allen Ansätzen konnte eine starke, distinkte Bande bei ca. 5000 bp (CFTR) und eine schwache, unspezifische Bande bei ca. 1000 bp detektiert werden (Abb. 26).



**Abbildung 26: Denaturierendes Agarosegel**

Es wurden jeweils 0,5 µg der drei mRNA-Varianten (CFTR-A20; CFTR-A70 und CFTR-A120) in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Es konnte eine starke, distinkte Bande im Bereich von ~5000 bp, sowie eine schwache, unspezifische im Bereich von ~1000 bp (in dieser Abbildung nicht sichtbar) detektiert werden. Als Marker für dieses Agarosegel diente für dieses Agarosegel der RiboRuler™ High Range RNA Ladder (Fermentas).

Im Folgenden wurden die mRNA-Varianten in die *X. laevis* Oozyten injiziert und die Expressionstärke des CFTR durch eine VC-Messung quantifiziert. Nach einer anfänglichen Stabilisierungsphase der Messparameter unter ORi wurde das Membranpotential der Oozyte auf -60 mV geklemmt (Abb. 27). Anschließend wurde mit der Applikation des aktivierenden cAMP/IBMX-Cocktails begonnen. Daraufhin stiegen die drei Parameter Strom ( $I_m$ ), Leitfähigkeit ( $G_m$ ) und Membrankapazität ( $C_m$ ) der CFTR-A70- und CFTR-A120- (Abb. 27) exprimierenden Oozyten. Nach einem erneuten Lösungswechsel (ORi) fielen die Parameter wieder auf ihre Ausgangswerte zurück.



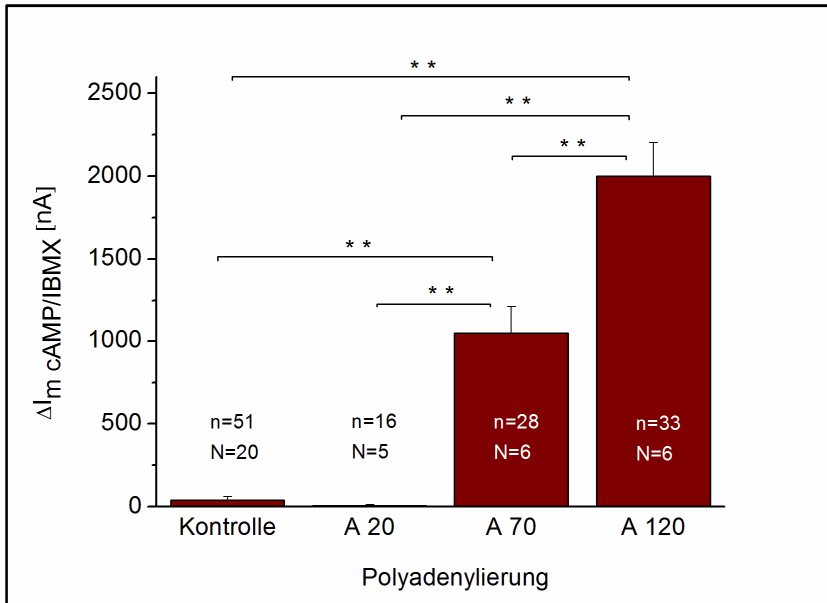
**Abbildung 27: Repräsentative VC-Messung einer CFTR-A120-exprimierenden Oozyte**

Während der Messung wurden die drei Parameter Strom ( $I_m$ ), Leitfähigkeit ( $G_m$ ) und Kapazität ( $C_m$ ) gemessen. Nach einer Stabilisierungsphase unter ORi und dem Klemmen des Membranpotentials auf -60 mV erfolgte die Aktivierung des CFTR durch die Applikation des cAMP/IBMX-Cocktails. Dies verursachte einen Anstieg aller drei Parameter. Nach einem Lösungswechsel auf ORi zeigte sich die Reversibilität der Aktivierung.

Für die statistische Auswertung der Messungen wurde der cAMP/IBMX-vermittelte Anstieg der drei Parameter in Relation zu den initialen Bedingungen unter ORi bestimmt und gemittelt. Es ergab sich ein durchschnittlicher Stromanstieg nach cAMP von  $39 \pm 20$  nA für die nicht-injizierten Kontrollen, sowie  $7 \pm 3$  nA für die CFTR-A20-exprimierenden Oozyten. Es konnte somit kein signifikanter Stromanstieg gemessen werden (Abb. 28). Dies trifft auch für die Leitfähigkeit und die Kapazität zu (Abb. 29 und 30). Die Expression der CFTR-A20-mRNA war in den Oozyten somit nicht erfolgreich, da die ermittelten Werte denen der Kontrolle entsprechen.

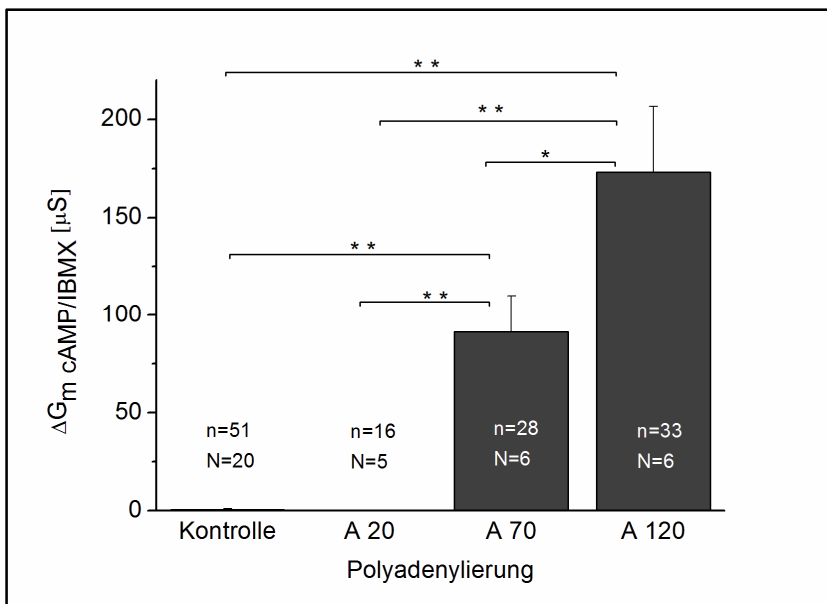
Während für die CFTR-A70-exprimierenden Oozyten ein Stromanstieg nach cAMP-Aktivierung von durchschnittlich  $1048 \pm 158$  nA (Abb. 28) festgestellt werden konnte, konnte für die CFTR-A120-exprimierenden Oozyten durchschnittlich ein cAMP-vermittelter Strom von  $1999 \pm 203$  nA gemessen werden. Außerdem konnte für die CFTR-A120-exprimierenden Oozyten eine signifikant erhöhte Leitfähigkeit ermittelt werden (Abb. 29). Die Kapazitätserhöhung der CFTR-A70- und CFTR-A120-exprimierenden Oozyten war jedoch nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 30). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die CFTR-A120-exprimierenden Oozyten durch Zugabe des cAMP/IBMX-Cocktails den höchsten Anstieg der gemessenen Parameter zeigten, und diese mRNA somit die größte CFTR-Expression hervorruft.





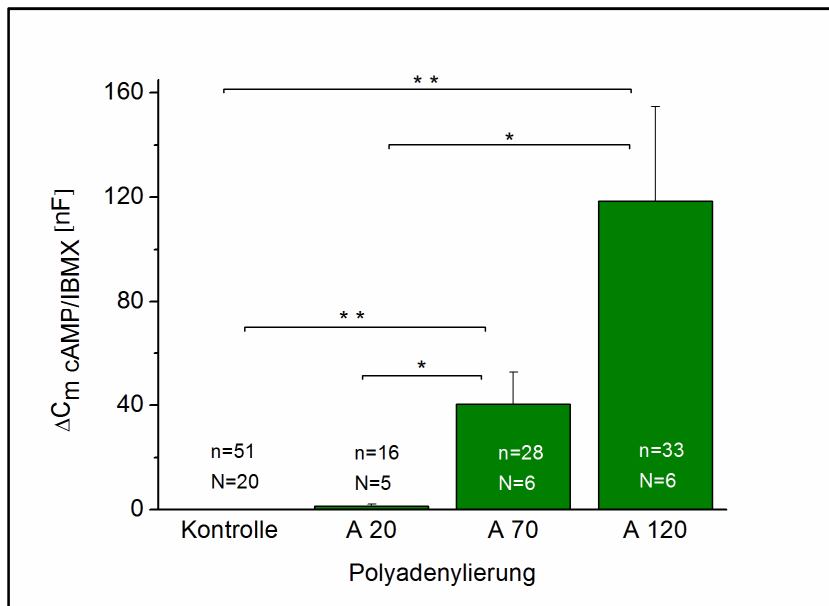
**Abbildung 28: cAMP-vermittelter Stromanstieg in Abhängigkeit von der Polyadenylierung**

Vergleich des gemessenen Stromanstiegs nach Applikation eines cAMP/IBMX-Cocktails in den Kontrolloozyten ( $40 \pm 21$  nA), CFTR-A20- ( $7 \pm 3$  nA), CFTR-A70- ( $1048 \pm 158$  nA) und CFTR-A120-exprimierenden Oozyten ( $1999 \pm 203$  nA). Für die CFTR-A120-exprimierenden Oozyten wurde die signifikant höchste Aktivierung gemessen ( $p \leq 0,01$ ).



**Abbildung 29: cAMP-vermittelter Leitfähigkeitsanstieg in Abhängigkeit von der Polyadenylierung**

Für die CFTR-A20-exprimierenden Oozyten konnte keine cAMP-vermittelte Erhöhung der Leitfähigkeit gemessen werden. Die Leitfähigkeit der CFTR-A120-exprimierenden Oozyten ( $173 \pm 33$  μS) war im Vergleich zu den CFTR-A70-exprimierenden Oozyten ( $91 \pm 19$  μS;  $p \leq 0,05$ ) und den Kontrollen ( $1 \pm 0$  μS;  $p \leq 0,01$ ) signifikant erhöht.

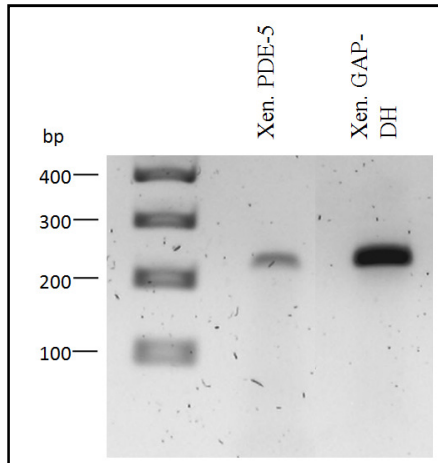


**Abbildung 30: cAMP-vermittelter Kapazitätsanstieg in Abhängigkeit von der Polyadenylierung**

In den Messungen der drei unterschiedlichen CFTR-mRNA-Varianten wurden folgende Erhöhungen nach der Applikation von cAMP/IBMX gemessen: CFTR-A20- ( $1 \pm 1$  nF), CFTR-70- ( $40 \pm 12$  nF) und CFTR-A120-exprimierende Oozyten ( $119 \pm 36$  nF). Es konnte kein Anstieg der Kapazität in den Kontrolloozyten gezeigt werden. Die Kapazität der CFTR-A70- und CFTR-A120-exprimierenden Oozyten war im Vergleich zur Kontrolle ( $p \leq 0,01$ ) und den CFTR-A20-exprimierenden Oozyten ( $p \leq 0,05$ ) signifikant erhöht.

### 3.2 Nachweis der PDE-5-Expression in *X. laevis* Oozyten

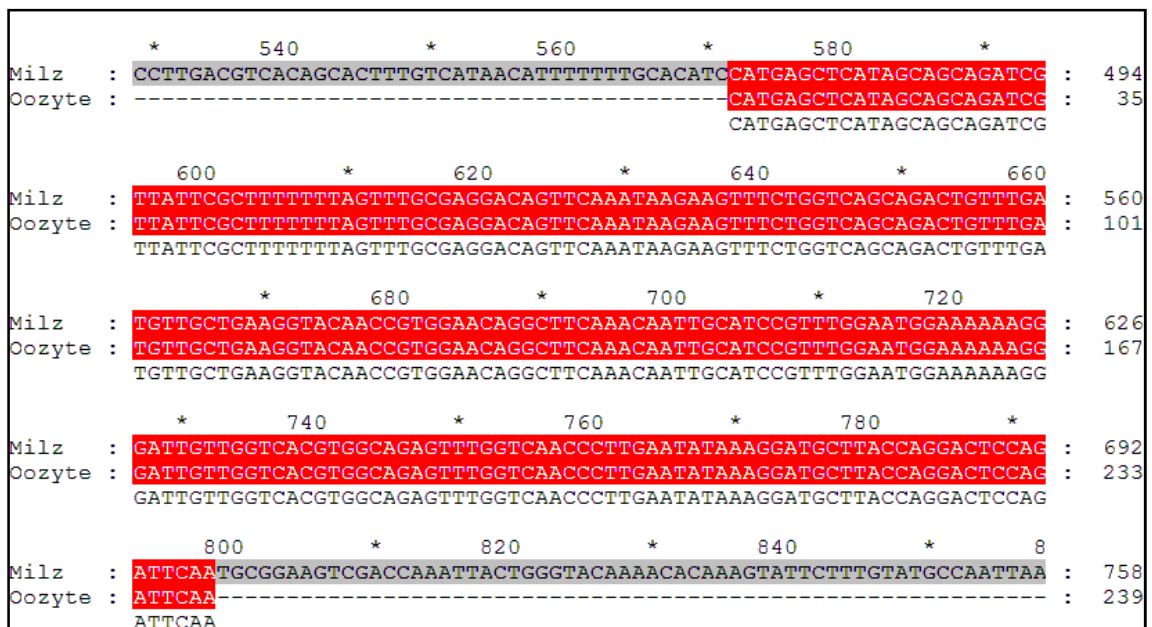
Im Vorfeld der SL-Experimente in den *X. laevis* Oozyten wurde die Expression der PDE-5 in den Oozyten untersucht. Für den Nachweis wurde zunächst die Gesamt-RNA der Oozyten isoliert. Anschließend wurde diese mittels einer RT-PCR in cDNA umgewandelt. Die Amplifikation der PDE-5 erfolgte in einer PCR-Reaktion mit der cDNA als *template* sowie mit *X. laevis* spezifischen PDE-5-Primern. Diese wurden anhand der veröffentlichten Sequenz der PDE-5-mRNA aus der *X. laevis* Milz (*accession number*: NM\_001094802; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ausgewählt (siehe Anhang; Tabelle 50). Zusätzlich wurde die *X. laevis* GAP-DH als externe Kontrolle amplifiziert. Ein Agarosegel mit dem *X. laevis* PDE-5- (243 bp) und dem Gap-DH-Fragment (242 bp) ist in Abbildung 31 gezeigt.



**Abbildung 31: Agarosegel**

Bei der PCR wurde ein 243 bp Fragment der *X. laevis* (Xen.) PDE-5 sowie ein 242 bp Fragment der *X. laevis* GAP-DH als externe Kontrolle amplifiziert. Die Fragmente wurden in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Als Marker diente der GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas).

Das entstandene PDE-5-Fragment konnte anschließend erfolgreich in einen Vektor kloniert und sequenziert werden. Die so erhaltene PDE-5-Nukleotidsequenz wurde mit der bereits veröffentlichten PDE-5-Sequenz aus der NCBI Sequenzdatenbank verglichen. Dazu wurde die Sequenz aus der Oozyte mit der Sequenz der PDE-5 aus der *X. laevis* Milz aligniert. Es konnte eine 100%-ige Übereinstimmung der Sequenzen nachgewiesen werden (Abb. 32). Die PDE-5 wird somit auf mRNA-Ebene endogen in den *X. laevis* Oozyten exprimiert.



**Abbildung 32: Alignment der *X. laevis* Sequenzen**

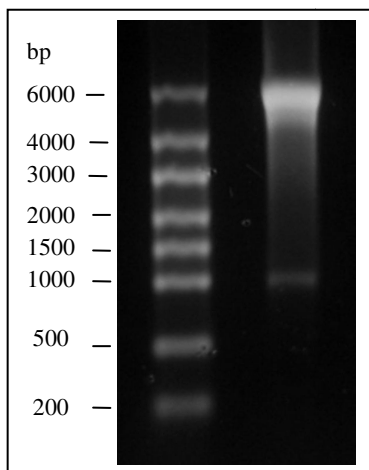
Vergleich der klonierten PDE-5 aus der *X. laevis* Oozyte mit der bereits veröffentlichten PDE-5-Sequenz aus der *X. laevis* Milz. Dabei ist erkennbar, dass die Sequenzen identisch sind.

### 3.3 Einfluss von SL auf die CFTR-Expression in *X. laevis* Oozyten

Um den Effekt des PDE-5-Inhibitors SL auf den wt-CFTR sowie den  $\Delta F508$ -CFTR zu analysieren, wurden der wt-CFTR und der  $\Delta F508$ -CFTR im heterologen Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten exprimiert. Anschließend wurde die SL-Wirkung durch elektrophysiologische Messungen mittels VC analysiert. Dazu wurde in einen Teil der Oozyten zwei Stunden vor der VC-Messung 60  $\mu\text{M}$  SL injiziert. Der Messverlauf gliederte sich wie zuvor in eine anfängliche Stabilisierungsphase (ORi), sowie dem Klemmen des Membranpotentials auf -60 mV. Daran schloss sich die Applikation des aktivierenden cAMP/IBMX-Cocktails und die erneute Zugabe von ORi an. Um die SL-Wirkung auf den CFTR zu verdeutlichen, wurden die einzelnen durch cAMP-vermittelten Erhöhungen in Relation zu den initialen Werten unter ORi-Bedingungen bestimmt, und als Mittelwerte graphisch dargestellt. Die so erhaltenen Daten werden in den folgenden Punkten dargelegt.

#### 3.3.1 Einfluss von SL auf den $\Delta F508$ -CFTR

Für die Expression des  $\Delta F508$ -CFTR wurde zunächst mRNA generiert, welche dann in die Oozyten injiziert wurde. Nach der Linearisierung des Expressionsvektors wurde die  $\Delta F508$ -CFTR-cDNA in einer IVT-Reaktion in mRNA transkribiert. Das folgende denaturierende Agarosegel zeigte zwei Banden: Eine starke Bande bei ca. 6000 bp ( $\Delta F508$ -CFTR-mRNA) und eine unspezifische, schwache Bande auf der Höhe von 1000 bp (Abb. 33).



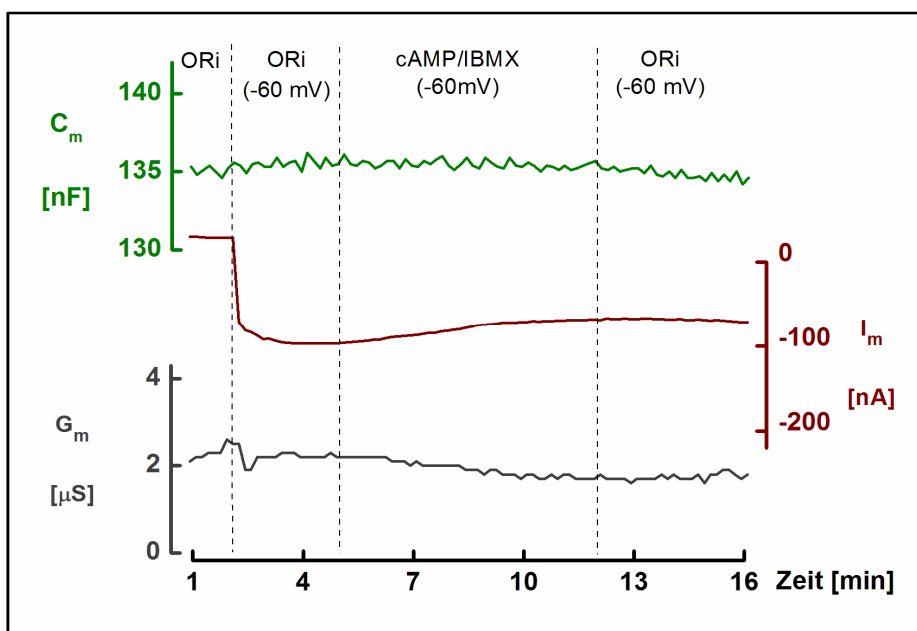
**Abbildung 33: Denaturierendes Agarosegel der  $\Delta F508$ -CFTR-mRNA**

*Es wurden 0,5  $\mu\text{g}$  der  $\Delta F508$ -CFTR-mRNA in einem 1%-igem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Es konnten zwei Banden detektiert werden. Die starke Bande befand sich auf der Höhe von  $\sim 6000$  bp, während die schwache, unspezifische Bande bei  $\sim 1000$  bp erkennbar war. Als Marker diente für dieses Agarosegel der RiboRuler™ High Range RNA Ladder (Fermentas).*

In der folgenden Abbildung ist ein typischer Messverlauf einer  $\Delta F508$ -CFTR-exprimierenden Oozyte gezeigt (Abb. 34). Nach der Applikation des aktivierenden cAMP/IBMX-Cocktails konnte kein Anstieg der drei Parameter gemessen werden. Dies bedeutet, dass der  $\Delta F508$ -CFTR in diesen Messungen nicht aktiviert werden konnte.

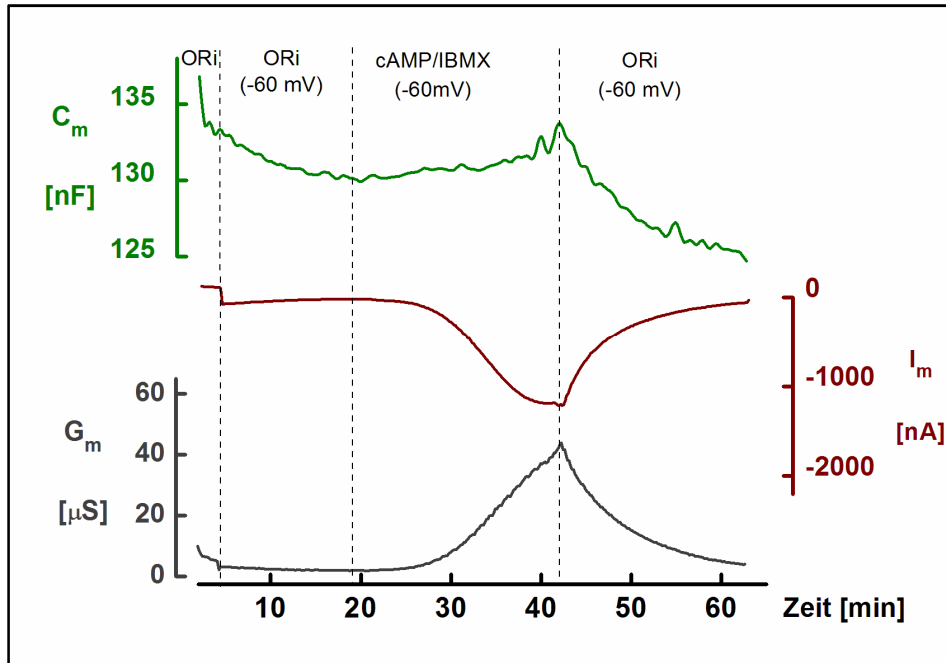
Im zweiten Ansatz wurde in  $\Delta F508$ -CFTR-exprimierende Oozyten SL injiziert. In den zugehörigen VC-Messungen stiegen die Messparameter Strom, Leitfähigkeit und Membrankapazität nach Zugabe des cAMP/IBMX-Cocktails an (Abb. 35). Dabei konnte eine durchschnittliche Stromerhöhung nach cAMP-Aktivierung von  $285 \pm 106$  nA gemessen werden.

In der statistischen Auswertung konnte für die SL-injizierten Oozyten eine signifikante  $\sim 13$ -fache Stromerhöhung und ein  $\sim 14$ -facher Anstieg der Leitfähigkeit ermittelt werden (Abb. 36). Dies entspricht einer Wiederherstellung der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit im Vergleich zur cAMP-Aktivierung des wt-CFTR (siehe 3.3.2) um 21,7%. Die Kapazität der SL-injizierten Oozyten wurde jedoch nicht signifikant erhöht. In diesen Messungen konnte somit gezeigt werden, dass SL die Aktivierung des  $\Delta F508$ -CFTR durch cAMP/IBMX ermöglicht und damit eine messbare  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit des fehlgefalteten  $\Delta F508$ -CFTR erreicht werden konnte.



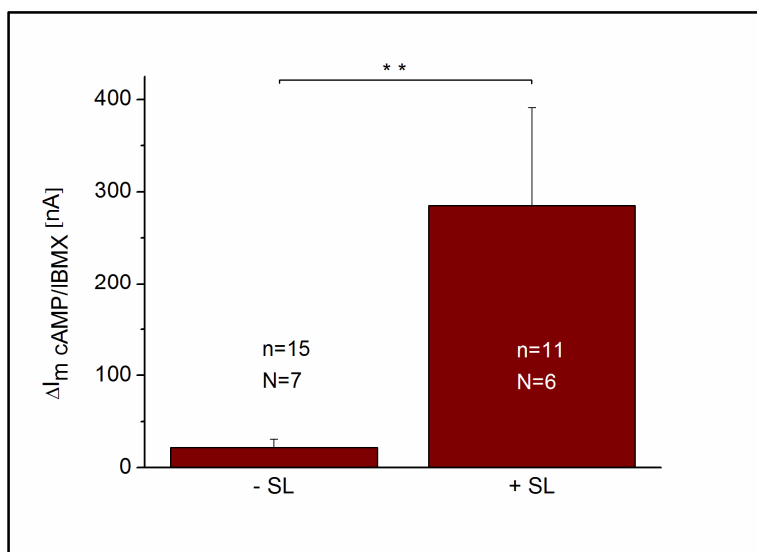
**Abbildung 34:** VC-Messung einer  $\Delta F508$ -CFTR-exprimierenden Oozyte

In den Parametern Strom ( $I_m$ ), Leitfähigkeit ( $G_m$ ) und Kapazität ( $C_m$ ) konnte nach der Stabilisierungsphase und dem Erreichen des Klemmpotentials bei  $-60$  mV keine Aktivierung des  $\Delta F508$ -CFTR durch die Applikation des cAMP/IBMX-Cocktails gemessen werden.



**Abbildung 35:** VC-Messung einer  $\Delta F508$ -CFTR-exprimierenden Oozyte nach Injektion von  $60 \mu\text{M}$  SL

Während der Messung wurden die drei Parameter Strom ( $I_m$ ), Leitfähigkeit ( $G_m$ ) und Kapazität ( $C_m$ ) gemessen. Nach einer anfänglichen Stabilisierungsphase und dem Klemmen des Membranpotentials der Oozyte auf  $-60 \text{ mV}$ , erfolgte die Applikation des cAMP/IBMX-Cocktails. Durch diesen konnte ein Anstieg aller drei Parameter gezeigt werden, welcher durch die erneute Applikation von Ori rückgängig gemacht werden konnte.

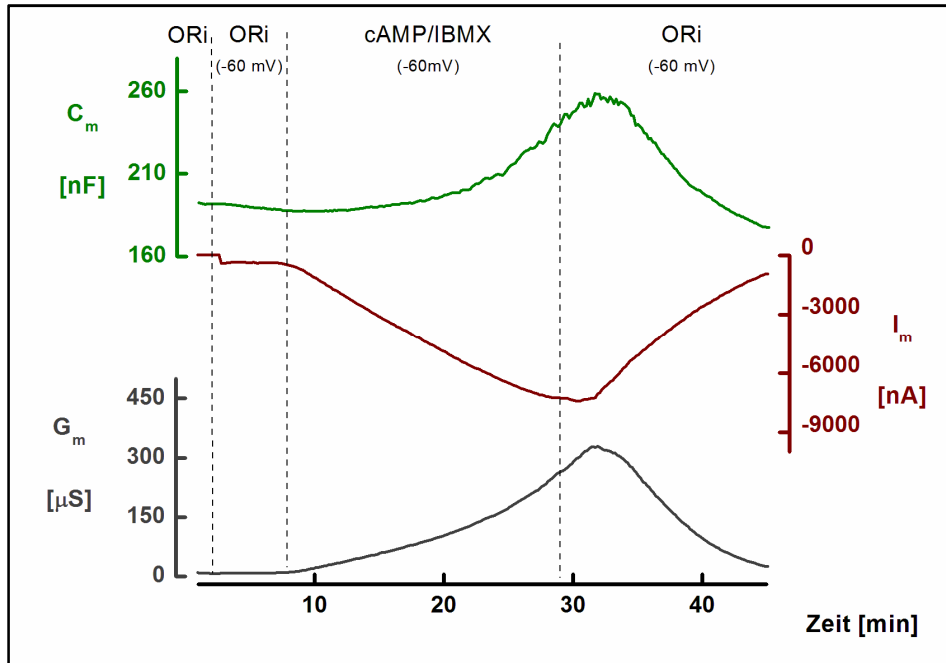


**Abbildung 36:** SL-Wirkung auf den  $\Delta F508$ -CFTR-Strom

Aufgrund der SL-Injektion stieg der cAMP-vermittelte Strom ( $\Delta I_{m \text{ cAMP/IBMX}}$ ) durchschnittlich um das  $\sim 13$ -fache ( $p \leq 0,01$ ).

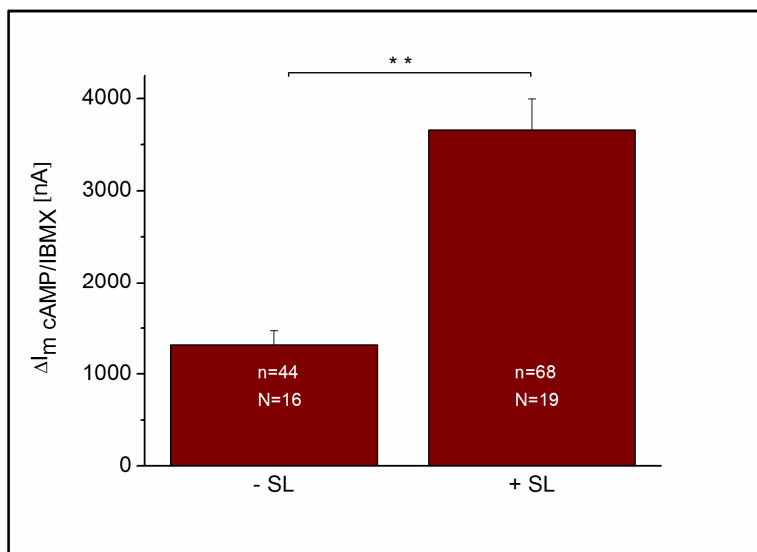
### 3.3.2 Einfluss von SL auf den wt-CFTR

Bisher werden sehr unterschiedliche Aussagen zum Effekt von SL auf den wt-CFTR diskutiert. Zum einen konnte kein Effekt von SL auf den wt-CFTR nachgewiesen werden (Dormer et al. 2005), wo hingegen eine andere Arbeitsgruppe eine aktivitätssteigernde Wirkung ermittelte (Cobb et al. 2003). Aus diesem Grund sollte in diesem Experiment der Effekt von SL auf den wt-CFTR genauer untersucht werden. Für diese Analyse wurde der wt-CFTR (CFTR-A120-mRNA) in *X. laevis* Oozyten exprimiert und elektrophysiologisch gemessen. In Abb. 37 ist eine repräsentative VC-Messung einer wt-CFTR-exprimierenden Oozyte gezeigt, in welche zuvor 60  $\mu$ M SL injiziert wurde. Die Applikation von cAMP/IBMX erhöhte alle drei gemessenen Parameter signifikant. In der statistischen Auswertung konnte eine signifikante 2,8-fache Stromerhöhung (Abb. 38) und eine Steigerung der Leitfähigkeit um das 2,4-fache nach der Injektion von SL ermittelt werden. Für die Membrankapazität der SL-injizierten Oozyten konnte ein 3,1-facher Anstieg gemessen werden (Abb. 39). SL erhöht somit die cAMP-abhängige Aktivierung des wt-CFTR in den *X. laevis* Oozyten signifikant. Besonders interessant ist außerdem der Anstieg der Membrankapazität, da dies zusätzlich auf eine SL-vermittelte Exozytose des wt-CFTR hindeutet.



**Abbildung 37: VC-Messung einer wt-CFTR-exprimierenden Oozyte nach SL-Injektion**

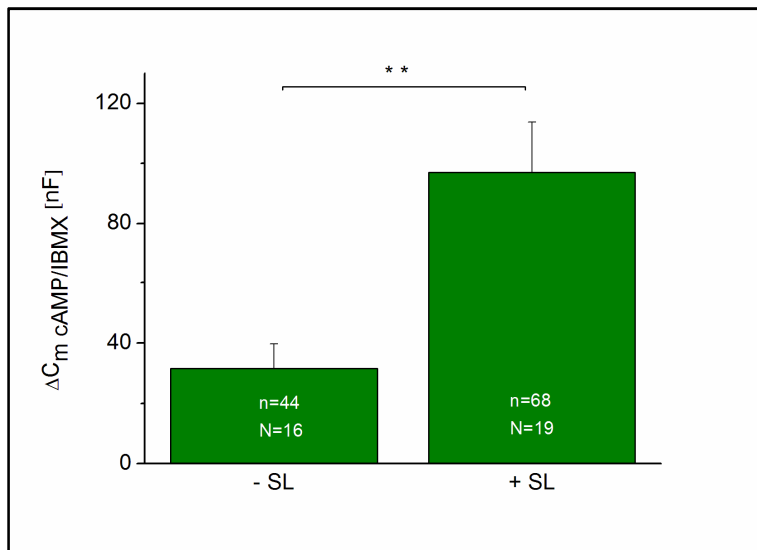
Verlauf einer typischen VC-Messung nach Injektion von SL in die wt-CFTR-exprimierende Oozyte. Nach der anfänglichen Stabilisierung der Parameter unter ORi wurde das Membranpotential der Oozyte auf -60 mV geklemmt. Der zugefügte cAMP/IBMX-Cocktail verursachte einen Anstieg der gemessenen Parameter Strom ( $I_m$ ), Leitfähigkeit ( $G_m$ ) und Kapazität ( $C_m$ ), welcher reversibel war.



**Abbildung 38: Wirkung von SL auf den cAMP/IBMX-vermittelten wt-CFTR-Strom**

Vergleich des cAMP/IBMX-vermittelten Stroms der Oozyten mit und ohne SL-Injektion. Dabei zeigte sich, dass SL eine signifikante 2,8-fache Stromerhöhung verursachte ( $p \leq 0,01$ ).





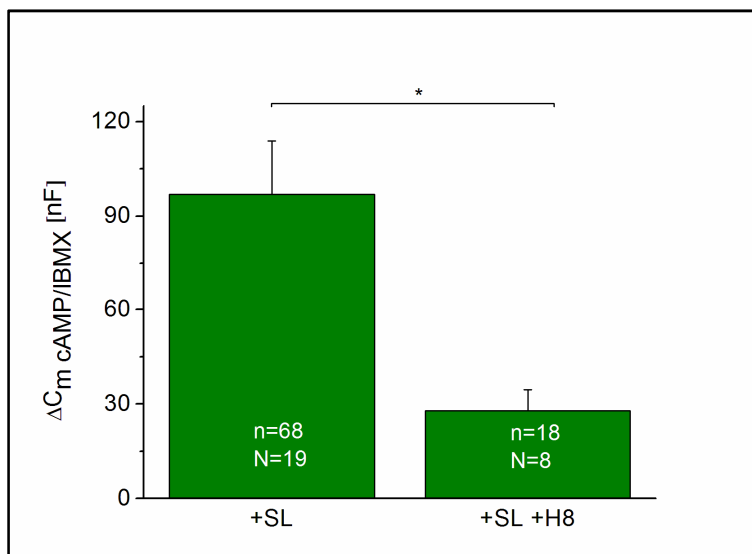
**Abbildung 39: Wirkung von SL auf die Membrankapazität (wt-CFTR)**

*Für die SL-injizierten wt-CFTR-exprimierenden Oozyten wurde eine signifikante 3,1-fache Erhöhung der Kapazität nach cAMP-Aktivierung gemessen ( $p \leq 0,01$ ).*

### 3.3.3 Inhibition der PKA-abhängigen Exozytose durch H8

Wie zuvor beschrieben, verursacht die Injektion von SL einen Kapazitätsanstieg der wt-CFTR-exprimierenden Oozyten. Um nachzuweisen, dass diese Kapazitätserhöhung auf die Exozytose von wt-CFTR-Molekülen zurückzuführen ist, wurde die PKA-vermittelte Exozytose durch den PKA-Blocker H8 inhibiert.

Für dieses Experiment wurden wt-CFTR-exprimierende Oozyten 24 Stunden vor der VC-Messung mit 30  $\mu$ M H8 (in ORi) inkubiert. In die Oozyten wurden zusätzlich zwei Stunden vor der VC-Messung 60  $\mu$ M SL injiziert. In der darauffolgenden Messung wurde der wt-CFTR mittels des cAMP/IBMX-Cocktails aktiviert. Die statistische Auswertung dieser Messungen zeigte eine signifikante Reduktion der Membrankapazität um durchschnittliche 54% nach der Inkubation mit dem PKA-Inhibitor H8 (Abb. 40). Durch dieses Experiment kann eine SL-vermittelte Exozytose von wt-CFTR-Molekülen in *X. laevis* Oozyten bestätigt werden.



**Abbildung 40: Wirkung von H8 auf die SL-vermittelte Kapazitätserhöhung**

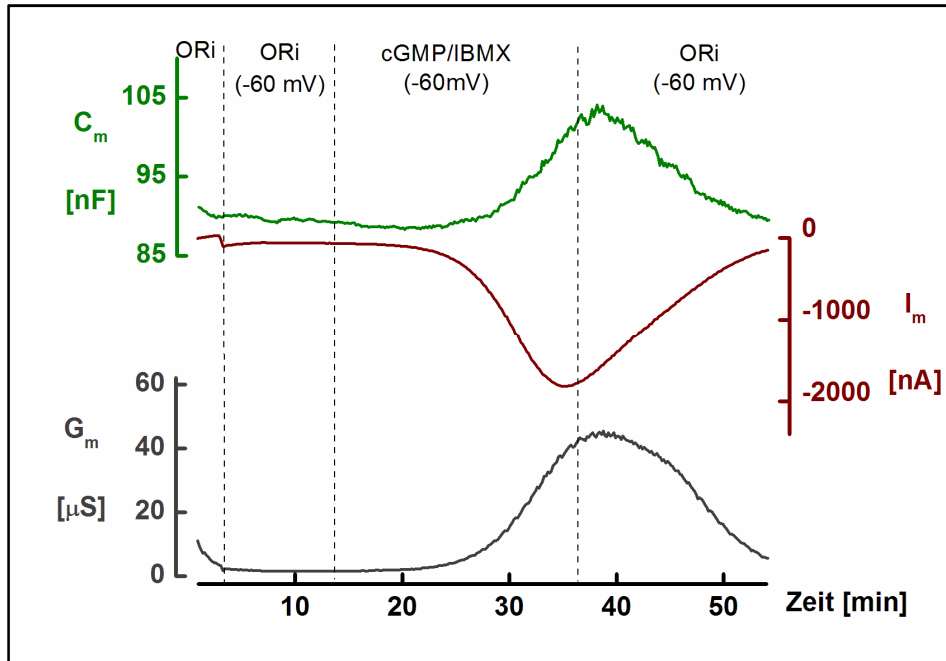
Durch die Inkubation wt-CFTR-exprimierender und SL-injizierter Oozyten mit 30  $\mu$ M H8 reduzierte sich die Zunahme der Membrankapazität um durchschnittlich 54% ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.4 Untersuchung des Wirkmechanismus von SL auf den wt-CFTR

Alle bisherigen Untersuchungen zur Therapie der Mukoviszidose durch den PDE-5-Inhibitor SL haben ausschließlich den Effekt von SL auf den CFTR nachgewiesen. Der Mechanismus, welcher dieser SL-Wirkung zugrunde liegt, wurde jedoch in keiner Studie analysiert. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob SL als PDE-5-Inhibitor über die cGMP-Signalkaskade auf den CFTR wirkt. Dies würde bedeuten, dass SL den Abbau des cGMP inhibiert und so die cGMP-Konzentration steigt, welche dann auf den CFTR wirkt.

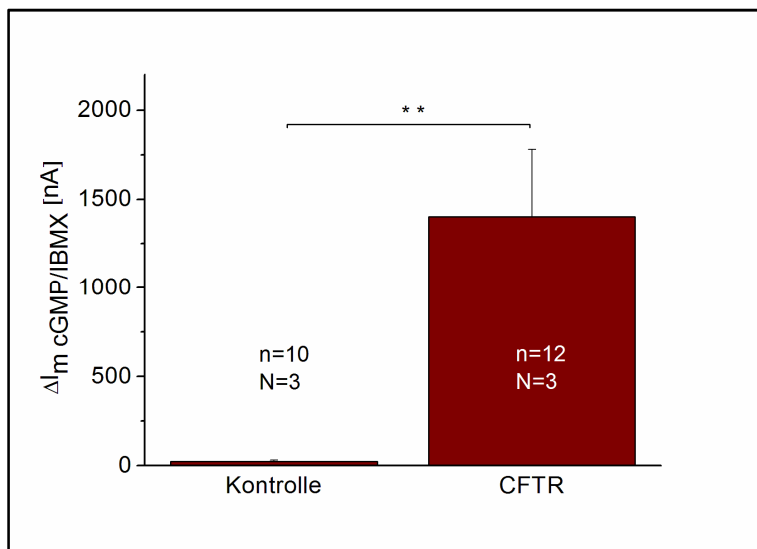
Die Wirkung von SL über die cGMP-Signalkaskade setzt eine Aktivierung des CFTR durch cGMP voraus. Die Frage, ob der CFTR in VC-Messungen durch cGMP aktiviert werden kann, wurde in dieser Arbeit an wt-CFTR-exprimierenden Oozyten analysiert. Hierzu wurde anstatt des cAMP/IBMX-Cocktails ein cGMP/IBMX-Cocktail verwendet. In der abgebildeten repräsentativen Messung einer wt-CFTR-exprimierenden Oozyte stiegen die drei Parameter Strom, Leitfähigkeit und Membrankapazität nach Applikation des cGMP/IBMX-Cocktails an (Abb. 41). Zur Kontrolle wurden die gleichen Messungen zusätzlich mit nicht-injizierten Oozyten durchgeführt. Dabei konnte kein Anstieg der drei Parameter durch cGMP gemessen werden.

Für die statistische Auswertung der Messungen wurde der durchschnittliche cGMP-vermittelte Anstieg der Messparameter bestimmt. Es konnte ein durchschnittlicher Stromanstieg nach der Applikation des cGMP/IBMX-Cocktails von  $1402 \pm 378$  nA festgestellt werden (Abb. 42), während eine durchschnittliche cGMP-vermittelte Leitfähigkeitserhöhung von  $41 \pm 7$   $\mu$ S gemessen werden konnte. Bei dem Vergleich der Kapazität der wt-CFTR-exprimierenden Oozyten mit der Kapazität der Kontrolloozyten konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Dieses Experiment zeigt, dass der sekundäre Botenstoff cGMP den wt-CFTR in VC-Messungen von *X. laevis* Oozyten aktivieren kann. Somit konnte nachgewiesen werden, dass der aktivierende Effekt von SL, welcher in wt-CFTR-exprimierenden Oozyten gezeigt werden konnte, über die cGMP-Signalkaskade möglich sein kann.



**Abbildung 41: Einfluss von cGMP auf die elektrophysiologischen Parameter einer wt-CFTR-exprimierenden Oozyte**

In den Parametern Strom ( $I_m$ ), Leitfähigkeit ( $G_m$ ) und Kapazität ( $C_m$ ) konnte nach der Stabilisierungsphase und dem Erreichen des Klemmpotentials bei  $-60$  mV ein Anstieg der Messparameter nach Applikation des cGMP/IBMX-Cocktails gemessen werden. Dieser Anstieg konnte durch einen erneuten Lösungswechsel (ORI) rückgängig gemacht werden.



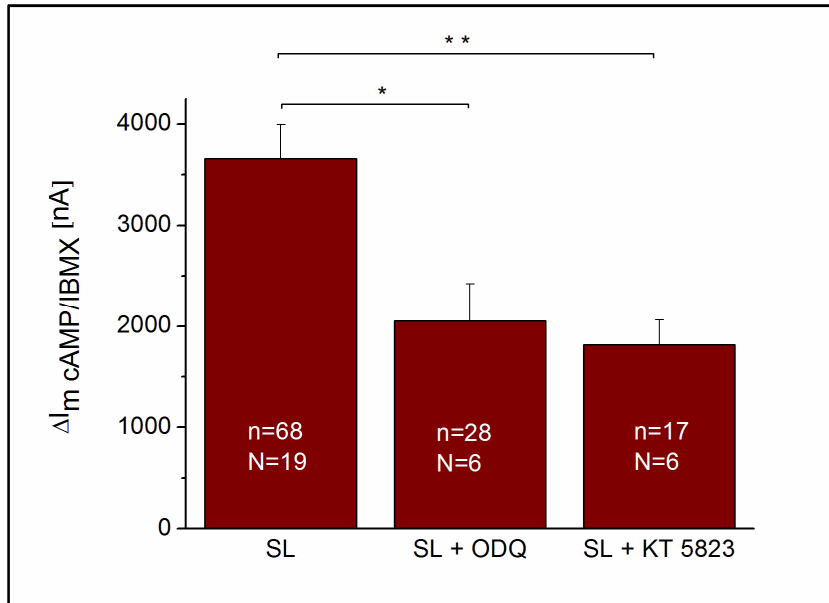
**Abbildung 42: cGMP-vermittelter wt-CFTR-Stromanstieg**

Im Vergleich zu den Kontrolloozyten führte der cGMP/IBMX-Cocktail in wt-CFTR-exprimierenden Oozyten zu einem signifikanten Stromanstieg von durchschnittlich  $1402 \pm 378$  nA ( $p \leq 0,01$ ).

### 3.4.1 Inhibition der cGMP-Signalkaskade

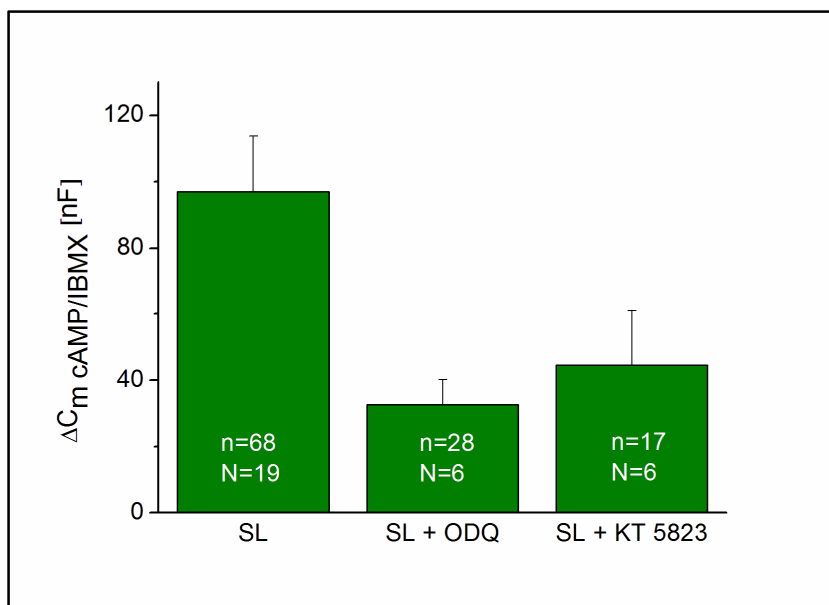
Um genauer zu analysieren, ob SL über die cGMP-Signalkaskade auf den CFTR wirkt, wurden einzelne Komponenten der cGMP-Signalkaskade inhibiert. In einem Ansatz wurde dazu die PKG, welche innerhalb der Signalkaskade von cGMP aktiviert wird, durch den spezifischen Inhibitor KT5823 gehemmt. Außerdem wurde die cGMP-generierende Guanylatzyklase durch den spezifischen Inhibitor ODQ blockiert. Für dieses Experiment wurden wt-CFTR-exprimierende Oozyten eine halbe Stunde vor der SL-Injektion sowie danach entweder mit KT5823 (3  $\mu$ M) oder ODQ (50  $\mu$ M) inkubiert. In der nachfolgenden VC-Messung wurde der jeweilige Inhibitor außerdem zusätzlich zum cAMP/IBMX-Cocktail in die Messkammer gegeben.

Für die Auswertung der Messungen wurde der cAMP-vermittelte Anstieg der Parameter Strom, Leitfähigkeit und Membrankapazität ermittelt. Diese Werte wurden dann mit den festgestellten Werten für die wt-CFTR-Aktivierung nach der Injektion von SL ohne die Inkubation von KT5823 und ODQ verglichen (siehe Punkt 3.3.2). Dabei wurde ersichtlich, dass KT5823 die SL-vermittelte Stromerhöhung signifikant um durchschnittlich 50% reduziert, während für ODQ eine signifikante Reduktion der SL-Wirkung um durchschnittlich 44% ermittelt werden konnte (Abb. 43). Außerdem konnte durchschnittlich eine um 57% signifikant reduzierte Leitfähigkeit durch KT5823, sowie um 69% durch ODQ gemessen werden. Es konnte jedoch kein signifikanter Effekt von ODQ oder KT5823 auf die Membrankapazität der SL-injizierten Oozyten gemessen werden (Abb. 44). Die Ergebnisse der Experimente mit ODQ und der mit KT5823 stimmen sehr gut überein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die aktivitätssteigernde Wirkung von SL auf den CFTR cGMP-abhängig ist. Die SL-stimulierte CFTR-Exozytose konnte dagegen nicht inhibiert werden und wird somit vermutlich nicht über die cGMP-Signalkaskade vermittelt.



**Abbildung 43: Einfluss der Inhibitoren KT5823 und ODQ auf den wt-CFTR-Strom**

Vergleich der cAMP/IBMX-vermittelten Stromerhöhung von KT5823, ODQ und nicht-inkubierten wt-CFTR-exprimierenden Oozyten, welche mit SL injiziert wurden. Die Inkubation mit KT5823 ( $50 \pm 7\%$  ( $p \leq 0,01$ )) und ODQ ( $44 \pm 10\%$  ( $p \leq 0,05$ )) reduziert den Stromanstieg nach SL-Injektion signifikant.

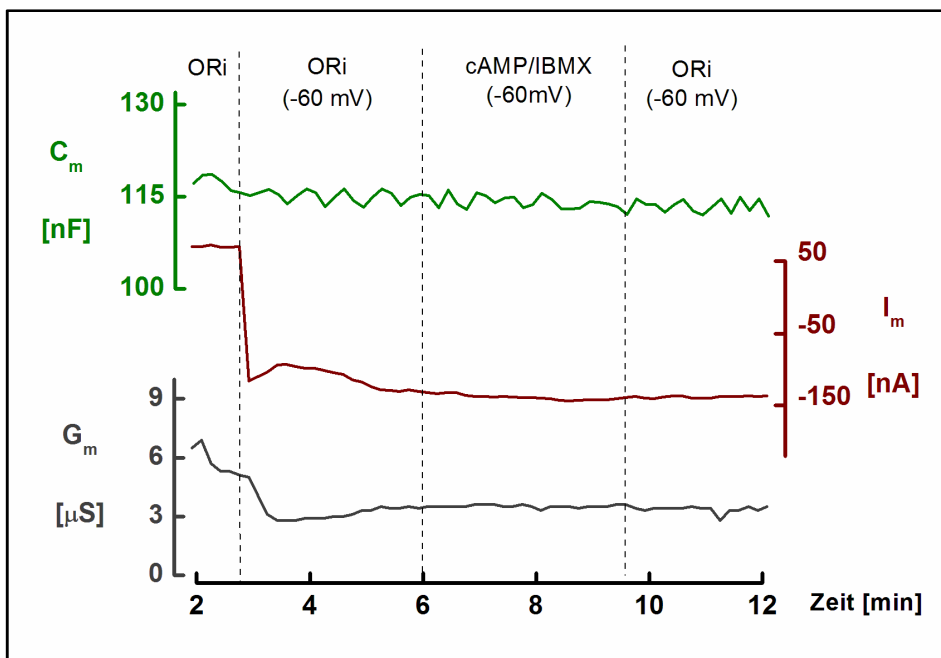


**Abbildung 44: Einfluss der Inhibitoren KT5823 und ODQ auf die wt-CFTR-Membran Kapazität**

Es konnte keine signifikante Reduktion der Kapazität der SL-injizierten wt-CFTR-exprimierenden Oozyten durch KT5823 oder ODQ gemessen werden.

### 3.5 Kontrollexperimente mit *X. laevis* Oozyten

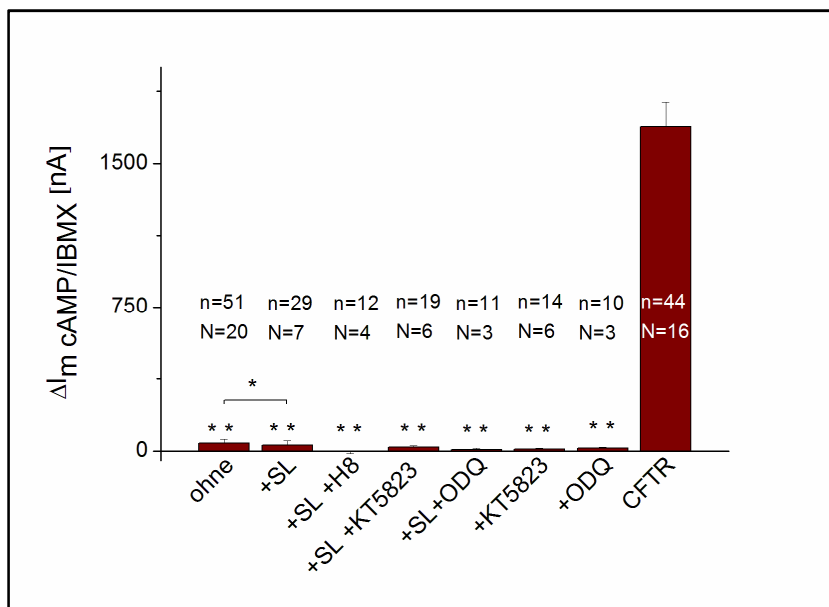
Um auszuschließen, dass die applizierten Substanzen SL, H8, KT5823 und ODQ eine Wirkung auf die endogenen Transportmechanismen der Oozyten haben, wurden zusätzlich nicht-injizierte Oozyten mit diesen Substanzen inkubiert. Dies erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in den Experimenten mit den CFTR-exprimierenden Oozyten in den vorherigen Kapiteln. In den zugehörigen VC-Messungen wurde wie zuvor ein cAMP/IBMX-Cocktail appliziert. Ein Beispiel für eine solche Messung ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Hierbei wurde eine nicht-injizierte Oozyte mit einem cAMP/IBMX-Cocktail umspült. Da keine Erhöhung der Messparameter durch den cAMP/IBMX-Cocktail gemessen werden konnte, wies diese Oozyte keine cAMP-aktivierbaren endogenen Transportmechanismen auf (Abb. 45).



**Abbildung 45: Kontrollmessung einer nicht-injizierten Oozyte**

Während dieser VC-Messung wurden die drei Parameter Strom ( $I_m$ ), Leitfähigkeit ( $G_m$ ) und Kapazität ( $C_m$ ) gemessen. Nach Erreichen des Klemmpotentials der Oozyte von -60 mV wurde ein cAMP/IBMX-Cocktail appliziert. Dieser verursachte keinen Anstieg der drei Messparameter. Schlussendlich erfolgte das Auswaschen des cAMP/IBMX-Cocktails mit ORI.

Für die Auswertung wurde die Änderung der Messparameter nach der Applikation des cAMP/IBMX-Cocktails im Bezug auf die initialen Werte (ORi) bestimmt. Die Werte wurden untereinander verglichen und in Relation zu den ermittelten Werten der wt-CFTR-exprimierenden Oozyten gesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die SL-Injektion die natürlicherweise vorkommende cAMP-Reaktion der nicht-injizierten Oozyten reduziert. Für die Inkubation mit den anderen Substanzen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Verglichen mit den wt-CFTR-exprimierenden Oozyten handelt es sich in jedem der Ansätze um eine hoch signifikant verminderte Reaktion auf cAMP (siehe Abb. 46). Dies trifft auch für die Leitfähigkeit und die Kapazität zu. Die gezeigten Reaktionen in wt-CFTR-exprimierenden Oozyten in den vorherigen Kapiteln sind somit nicht auf endogene Transportmechanismen der *X. laevis* Oozyten zurückzuführen.



**Abbildung 46: Einfluss der verwendeten Substanzen auf den Strom nicht-injizierter Kontrollloozyten**

*Einfluss der verwendeten Substanzen (SL, KT5823, ODQ, H8) auf den cAMP/IBMX-vermittelten Strom ( $I_{m \text{ cAMP/IBMX}}$ ). Als Vergleichswert ist die durchschnittliche Reaktion auf cAMP der wt-CFTR-exprimierenden Oozyten aufgeführt. Alle Kontrollloozyten zeigen eine signifikant stark verminderte Reaktion auf cAMP im Vergleich zu nicht-inkubierten wt-CFTR-exprimierenden Oozyten ( $p \leq 0,01$ ). Zusätzlich konnte für den Strom nach der reinen SL-Injektion eine signifikant reduzierte cAMP-Reaktion im Vergleich zur nicht-inkubierten Kontrolle gemessen werden ( $p \leq 0,05$ ).*



### **3.6 Untersuchung der Wirkung und des Wirkmechanismus von SL auf humane bronchiale Epithelzellen in der Ussing Kammer**

Die in dieser Arbeit bisher beschriebenen Untersuchungen wurden im *X. laevis* Expressionssystem durchgeführt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die SL-Wirkung sowie der Mechanismus zusätzlich in humanen bronchialen Epithelzellen untersucht.

Für diese Experimente wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet, die sich aufgrund ihrer Eigenschaft elektrisch dichte, polarisierte Monolayer zu bilden für eine Messung in der Ussing Kammer gut eignen. Zum einen wurde die immortalisierte humane bronchiale Epithelzelllinie 16HBE14o<sup>-</sup> (wt-CFTR) und zum anderen die humane bronchiale Epithelzelllinie CFBE41o<sup>-</sup>, welche homozygot für den  $\Delta F508$ -CFTR ist, verwandt.

Für die Ussing Kammer Messungen wurden die Zellen bis zur Bildung eines konfluenten Monolayers auf mit Fibronectin beschichteten Filtern kultiviert. Innerhalb der Messungen wurde dann die Wirkung von SL analysiert. In weiteren Versuchsansätzen wurde der Wirkmechanismus von SL durch die Applikation des bereits verwendeten PKG-Inhibitors KT5823 sowie des Guanylatzyklase Inhibitors ODQ untersucht. Um die SL-Wirkung veranschaulicht zu vergleichen, wurde die jeweilige Erhöhung des transepithelialen Kurzschlussstroms ( $I_{SC}$ ), der Leitfähigkeit ( $G_t$ ) und der Membrankapazität ( $C_t$ ) durch die Applikation verschiedener Lösungen im Bezug auf den applizierten ZK-Ringer bestimmt und gemittelt. Außerdem befand sich in einem Teil der SL-Lösungen zur besseren Löslichkeit des SL DMSO. Aus diesem Grund wurde zunächst der Effekt von reinem DMSO, aber auch der Effekt der Inhibitoren KT5823 und ODQ auf die Zellmonolayer in der Ussing Kammer untersucht.

### 3.6.1 Initiale Parameter der humanen bronchialen Epithelzellen

Nach der Kultivierung der Zelllinien CFBE41o<sup>-</sup> und 16HBE14o<sup>-</sup> auf beschichteten Filtern wurden die konfluenten Monolayer in die Ussing Kammer eingespannt. Zu Beginn der Messungen wurden die Zellen apikal und basolateral mit ZK-Ringer umspült bis die Messparameter Kurzschlussstrom, Leitfähigkeit und Membrankapazität stabile Werte erreichten. Diese initialen elektrophysiologischen Parameter geben Auskunft über die Variabilität zwischen den einzelnen Filtern. Außerdem kann der transepitheliale Widerstand ( $R_t$ ) des Monolayers anhand des reziproken Werts der Leitfähigkeit zu Beginn jeder Messung bestimmt werden. Die anfänglichen Werte für die gemessenen CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen lagen durchschnittlich bei  $5,2 \pm 1,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  für den Kurzschlussstrom, bei  $1,22 \pm 0,02 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  für die Membrankapazität und bei  $332,6 \pm 17,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  für den transepithelialen Widerstand (Tab. 44). Die gemessenen 16HBE14o<sup>-</sup>-Monolayer wiesen durchschnittlich einen initialen Kurzschlussstrom von  $9,7 \pm 3,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , eine Membrankapazität von  $1,8 \pm 0,06 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  und einen transepithelialen Widerstand von  $389,3 \pm 43,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$  auf (Tab. 45).

**Tabelle 44: Initiale Parameter konfluenter CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen**

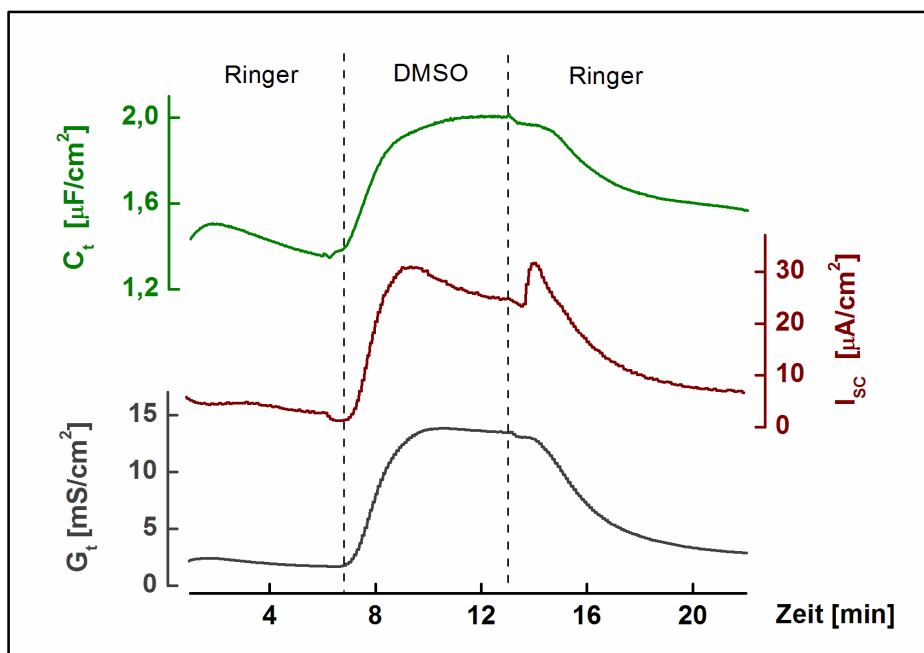
Parameter:	Initialwerte:	n:
$I_{SC}$	$5,2 \pm 1,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$	27
$R_t$	$332,55 \pm 17,44 \Omega \cdot \text{cm}^2$	27
$C_t$	$1,22 \pm 0,02 \mu\text{F}/\text{cm}^2$	27

**Tabelle 45: Initiale Parameter konfluenter 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen**

Parameter:	Initialwerte:	n:
$I_{SC}$	$9,7 \pm 3,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$	20
$R_t$	$389,3 \pm 43,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$	20
$C_t$	$1,8 \pm 0,06 \mu\text{F}/\text{cm}^2$	20

### 3.6.2 Kontrollexperimente in der Ussing Kammer

Um zu untersuchen, ob die Inhibitoren ODQ und KT5823 sowie das Lösungsmittel DMSO einen alleinigen Effekt auf die gemessenen Parameter zeigen, wurden sowohl Zellen der Zelllinie CFBE410<sup>-</sup> als auch 16HBE140<sup>-</sup>-Zellen mit diesen Substanzen ohne SL inkubiert. Nach einer anfänglichen Stabilisierungsphase der Messparameter wurden die Substanzen ODQ (10  $\mu$ M), KT5823 (3  $\mu$ M) oder DMSO (9%) dem ZK-Ringer zugefügt. Abschließend erfolgte eine erneute Applikation von ZK-Ringer. In Abb. 47 ist eine repräsentative Messung eines 16HBE140<sup>-</sup>-Monolayers gezeigt. In dieser Kontrollmessung konnte ein Anstieg der Parameter Kurzschlussstrom, Leitfähigkeit und Kapazität durch die Inkubation mit DMSO gemessen werden. Nach der Applikation von ZK-Ringer fielen die Parameter nahezu auf die Ausgangswerte zurück.



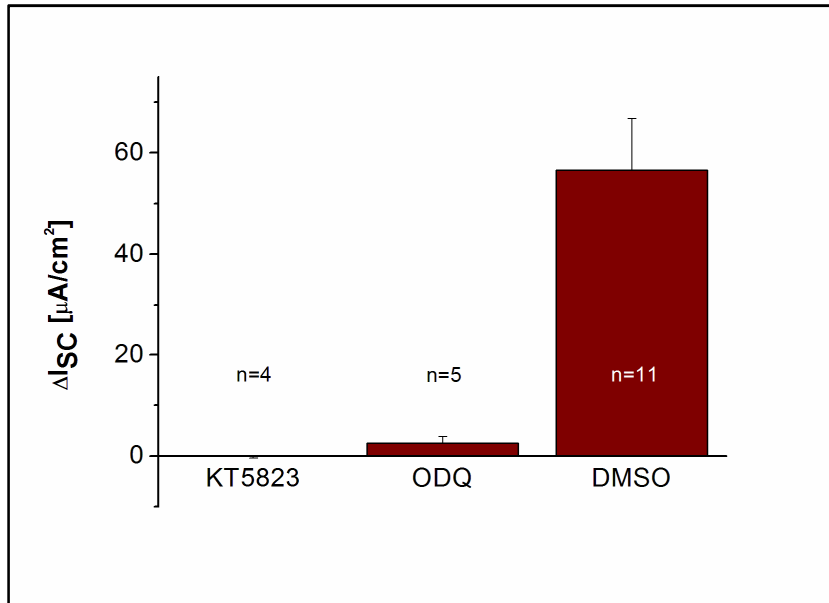
**Abbildung 47: Kontrollmessung eines 16HBE140<sup>-</sup>-Monolayers zur Analyse des Effekts von DMSO**

*Ussing Kammer Messung eines 16HBE140<sup>-</sup>-Monolayers. Nach einer anfänglichen Stabilisierungsphase wurde ZK-Ringer mit 9% DMSO zu den Zellen gegeben. Dabei konnte ein Anstieg aller drei Parameter Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ), Leitfähigkeit ( $G_t$ ) und Membrankapazität ( $C_t$ ) gemessen werden. Dieser Anstieg konnte durch einen erneuten Lösungswechsel (ZK-Ringer) rückgängig gemacht werden.*

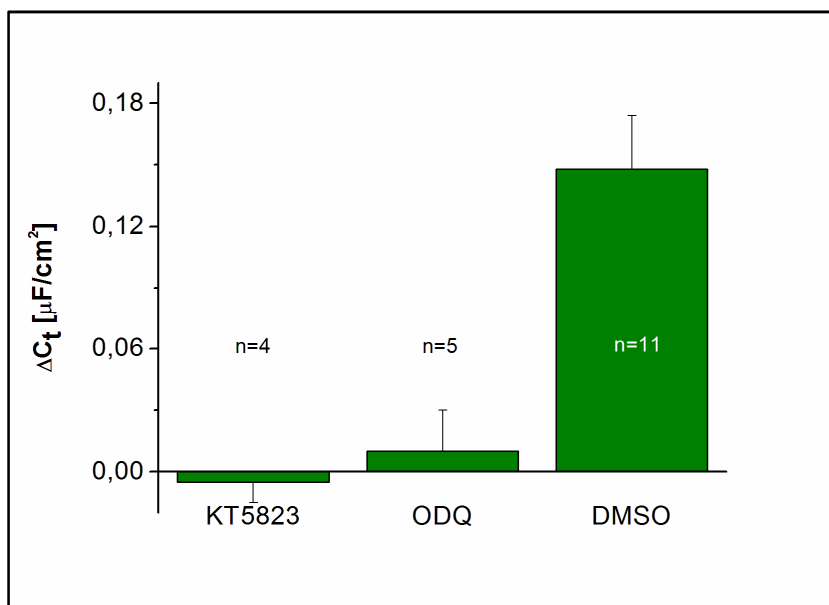
Für die Auswertung der Messungen wurde der Anstieg der Parameter nach der Zugabe der Substanzen in Relation zu den initialen ZK-Ringer Bedingungen bestimmt und gemittelt. Die Mittelwerte sowie die zugehörigen Standardabweichungen des Mittelwerts sind in den Abbildungen 48 bis 51 graphisch dargestellt.

In den durchgeführten Kontrollmessungen der CFBE41o<sup>-</sup>-Monolayer konnte nach der Applikation des PKG-Inhibitors KT5823 keine Änderung gemessen werden ( $-0,04 \pm 0,34 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Durch die Zugabe von ODQ stieg der Strom um durchschnittlich  $2,6 \pm 1,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Abb. 48). Dies trifft auch für die Leitfähigkeit und die Kapazität (Abb. 49) zu. DMSO hingegen führte zu einer Stromerhöhung von  $56,6 \pm 10,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Abb. 48), einem Anstieg der Leitfähigkeit um  $12,4 \pm 2,5 \text{mS}/\text{cm}^2$  und eine Steigerung der Kapazität um  $0,15 \pm 0,03 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (Abb. 49).

Die Applikation von KT5823 zeigte keine Auswirkung auf den transepithelialen Kurzschlussstrom der 16HBE14o<sup>-</sup>-Monolayer (durchschnittliches Absinken von  $-0,19 \pm 0,19 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Nach der Zugabe von ODQ konnte ein geringes Absinken um  $-0,67 \pm 0,07 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  gemessen werden, während für DMSO eine durchschnittliche Stromerhöhung von  $4,9 \pm 8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ermittelt werden konnte (Abb. 50). Diese Tendenzen wurden auch für die Leitfähigkeit sowie die Kapazität (Abb. 51) der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen ermittelt. Da für die Applikation von DMSO ein relativ starker Effekt auf die gemessenen elektrophysiologischen Parameter ermittelt werden konnte, wurden die ermittelten DMSO-Werte im Folgenden von den ermittelten Werten nach Applikation der DMSO enthaltenen SL-Lösungen subtrahiert.

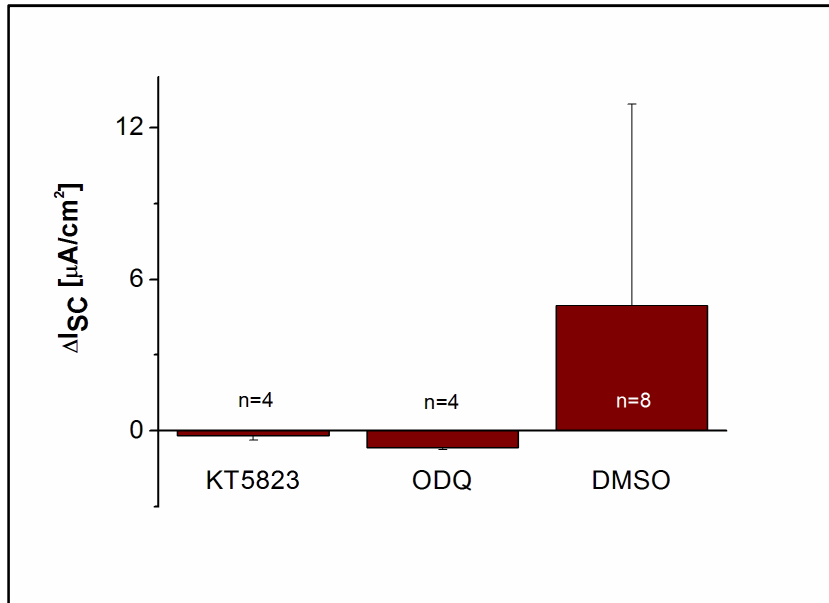


**Abbildung 48: Stromänderung nach ODQ-, KT5823- und DMSO-Applikation (CFBE410<sup>-</sup>)**  
Stromänderung nach der Applikation von KT5823, ODQ und DMSO in Ussing Kammer Messungen von CFBE410<sup>-</sup>-Monolayern. Nach Applikation von DMSO konnte ein Stromanstieg von  $56,6 \pm 10,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  gemessen werden, während nach der Applikation der Inhibitoren KT5823 und ODQ keine ( $-0,04 \pm 0,34 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (KT5823)) bzw. ein geringfügiger Stromanstieg von durchschnittlich  $2,6 \pm 1,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (ODQ) ermittelt werden konnte.



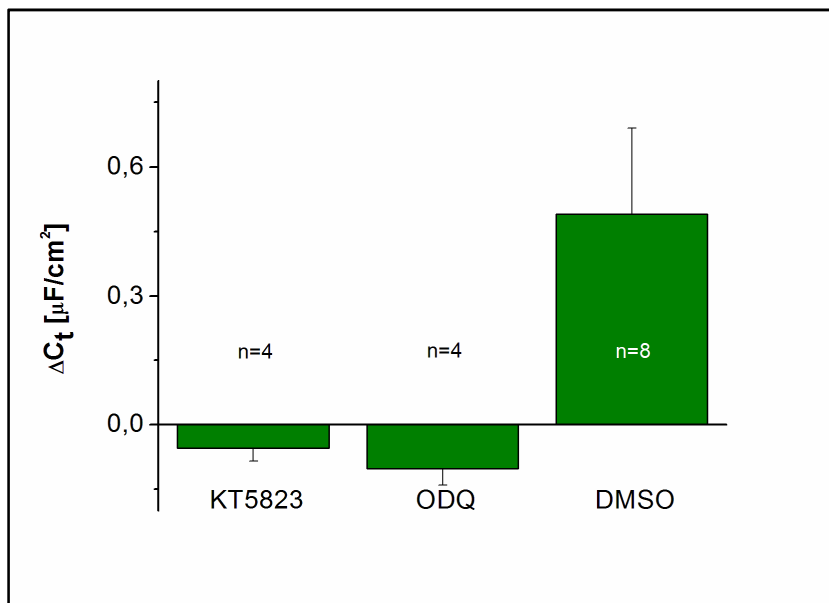
**Abbildung 49: Kapazitätsänderung nach der Applikation von ODQ, KT5823 und DMSO (CFBE410<sup>-</sup>)**

Änderung der Kapazität nach Zugabe der Substanzen ODQ, KT5823 und DMSO. Für KT5823 und ODQ konnte nur eine geringe Kapazitätsänderung gemessen werden, wohingegen nach der Applikation von DMSO ein durchschnittlicher Kapazitätsanstieg von  $0,15 \pm 0,03 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  ermittelt werden konnte.



**Abbildung 50: Stromänderung durch die Applikation von ODQ, KT5823 und DMSO (16HBE14o<sup>-</sup>)**

Effekt der Substanzen ODQ, KT5823 und DMSO auf den gemessenen Kurzschlussstrom ( $I_{SC}$ ). Für die Inhibitoren KT5823 und ODQ konnte ein geringes Absinken des Stroms ermittelt werden, wohingegen nach der Applikation des Lösungsmittels DMSO ein Stromanstieg von  $4,97 \pm 7,95 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  gemessen werden konnte.

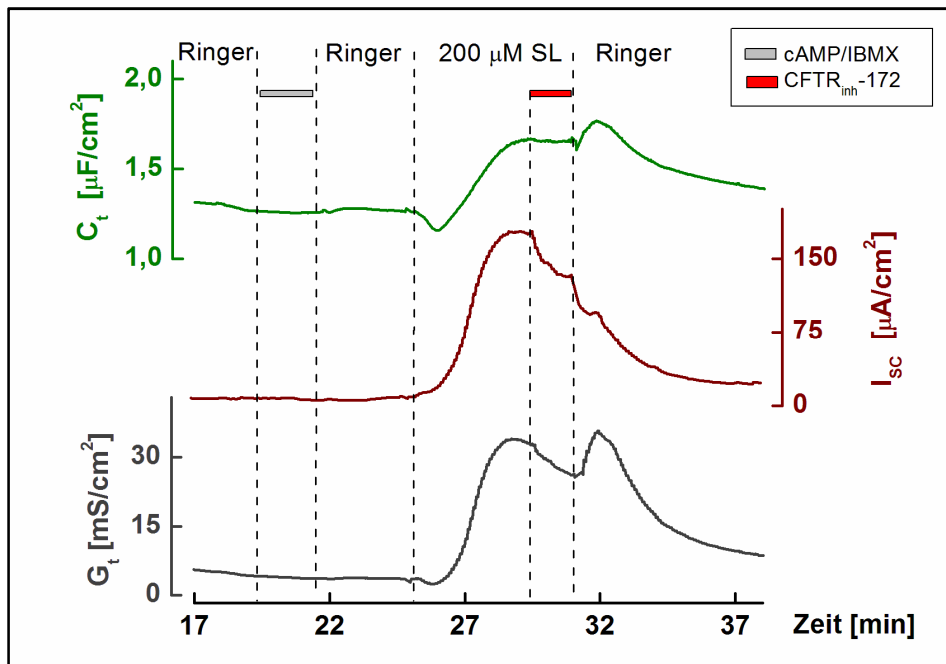


**Abbildung 51: Kapazitätsänderung nach der Applikation von ODQ, KT5823 und DMSO (16HBE14o<sup>-</sup>)**

Wirkung der Inhibitoren ODQ und KT5823 sowie des Lösungsmittels DMSO auf die Kapazität der 16HBE14o<sup>-</sup>-Monolayer. Nach der Zugabe von KT5823 oder ODQ konnte ein geringes Absinken des Stroms gemessen werden. DMSO hingegen erhöhte die Kapazität der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen um  $0,49 \pm 0,2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

### **3.6.3 Funktionale Analyse des Effekts verschiedener SL-Konzentrationen auf den $\Delta F508$ -CFTR in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen**

Um eine mögliche Restleitfähigkeit des  $\Delta F508$ -CFTR in den CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen zu bestimmen, wurde zunächst ein cAMP/IBMX-Cocktail appliziert. Nach einem erneuten Lösungswechsel (ORi) wurde der Effekt verschiedener SL-Konzentrationen auf die elektrophysiologischen Parameter analysiert. Dazu wurde SL basolateral in den Konzentrationen 30  $\mu\text{M}$ , 45  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$  appliziert. In der repräsentativen Messung in Abb. 52 ist ersichtlich, dass die drei gemessenen Parameter durch die Zugabe von SL anstiegen. In dieser Messung wurde SL in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  appliziert. Um zu analysieren, ob der Anstieg auf eine Aktivierung des  $\Delta F508$ -CFTR zurückzuführen war, wurde zusätzlich zum SL der spezifische CFTR-Inhibitor CFTR<sub>inh</sub>-172 (10  $\mu\text{M}$ ) apikal zugegeben. Für den CFTR<sub>inh</sub>-172 konnte eine teilweise Inhibition des durch SL-vermittelten Stromanstiegs, sowie der Leitfähigkeitserhöhung gemessen werden. Abschließend wurde der Monolayer apikal und basolateral mit ZK-Ringer umspült, woraufhin die Parameter größtenteils auf ihre Anfangswerte zurückfielen. Die SL-vermittelten Anstiege aller verwendeten SL-Konzentrationen sind in den Abbildungen 53 und 54 dargestellt.

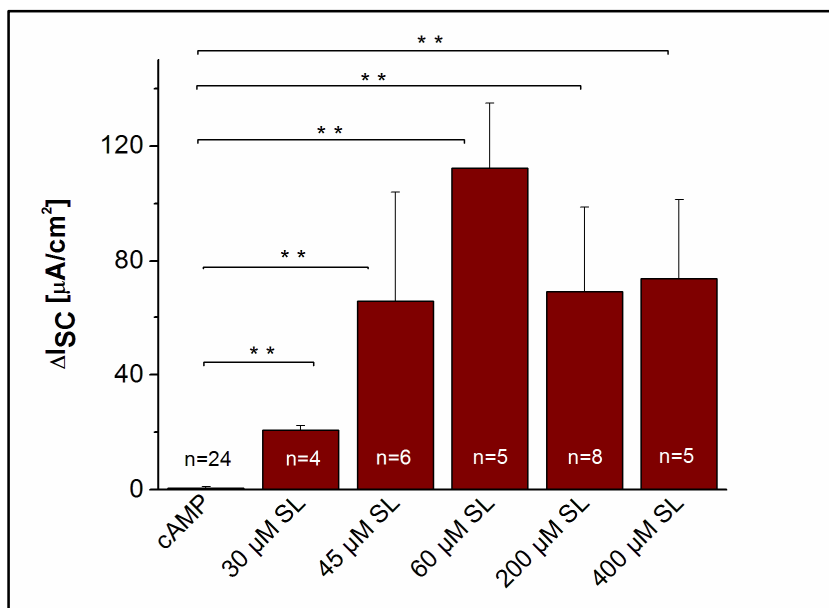


**Abbildung 52: Repräsentative Messung zur Erfassung des SL-Effekts in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen**  
 Typischer Verlauf einer Ussing Kammer Messung eines CFBE41o<sup>-</sup>-Monolayers. Die Applikation des cAMP/IBMX-Cocktails führte in keinem der gemessenen Parameter des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ), der Leitfähigkeit ( $G_t$ ) und der Membrankapazität ( $C_t$ ) zu einer sichtbaren Reaktion. SL (200  $\mu$ M) hingegen verursachte einen Anstieg der drei Messparameter. Durch die Zugabe des CFTR<sub>inh</sub>-172 konnte ein Absinken des Stroms und der Leitfähigkeit gemessen werden.

Für die statistische Analyse wurde die Änderung der Parameter durch cAMP oder SL in Relation zu den initialen Werten unter ZK-Ringer Bedingungen bestimmt. Die ermittelten Werte nach Applikation von SL wurden durch den Abzug des reinen DMSO-Effekts korrigiert. Die so ermittelten Werte wurden gemittelt und graphisch dargestellt. Dabei wurde ersichtlich, dass durch die anfängliche Applikation des cAMP/IBMX-Cocktails durchschnittlich nur ein sehr geringer Stromanstieg von  $0,64 \pm 0,37 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ermittelt werden konnte (Abb. 53). Der  $\Delta$ F508-CFTR weist somit nur eine geringe Restleitfähigkeit auf. Für die Leitfähigkeit ( $-0,67 \pm 0,2 \text{ mS}/\text{cm}^2$ ) und die Kapazität ( $-0,03 \pm 0,01 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) wurde durchschnittlich kein Effekt nach Applikation des cAMP/IBMX-Cocktails gemessen. Für SL konnte dagegen eine signifikante konzentrationsabhängige Stromerhöhung ermittelt werden. Der höchste Stromanstieg mit durchschnittlich  $112,2 \pm 22,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  wurde für eine SL-Konzentration von 60  $\mu$ M gemessen (Abb. 53). Die Stromerhöhung durch SL konnte teilweise durch den CFTR-spezifischen Inhibitor CFTR<sub>inh</sub>-172 gehemmt werden (Abb. 54). Somit zeigen diese Messungen, dass der  $\Delta$ F508-CFTR in den CFBE41o<sup>-</sup>-

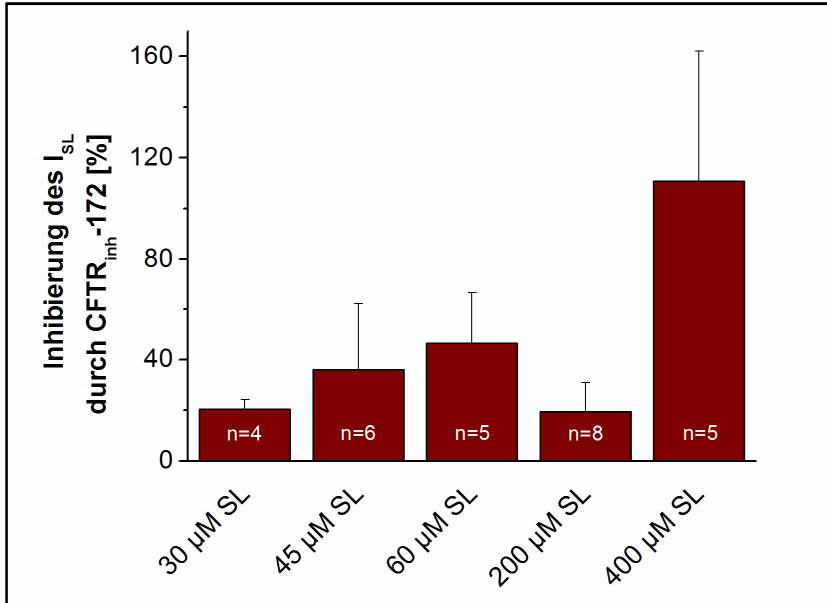


Zellen durch SL aktiviert wird. Außerdem konnte eine SL-vermittelte konzentrationsabhängige Erhöhung der Leitfähigkeit sowie der Kapazität (Abb. 55) gemessen werden. SL stimuliert somit die Exozytose von  $\Delta F508$ -CFTR-Molekülen und führt zu einer Wiederherstellung der  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit in den CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen. Diese Daten stimmen sehr gut mit den ermittelten Werten aus dem heterologen Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten überein.



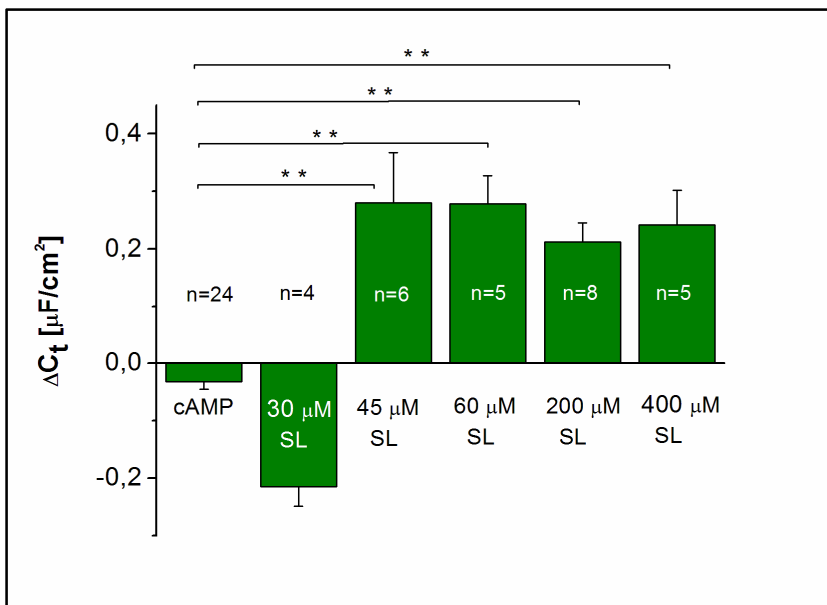
**Abbildung 53: Effekt von SL auf den Kurzschlussstrom in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen**

Die Abbildung zeigt den Anstieg des Kurzschlussstroms, welcher durch die Applikation verschiedener SL-Konzentrationen erreicht wurde. Dabei konnte eine signifikante, konzentrationsabhängige Steigerung des Kurzschlussstroms durch SL ermittelt werden ( $p \leq 0,01$ ). Der höchste Stromanstieg mit durchschnittlich  $112,2 \pm 22,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  konnte für eine SL-Konzentration von  $60 \mu\text{M}$  gemessen werden.



**Abbildung 54: Reduktion der SL-vermittelten Stromerhöhung durch den  $CFTR_{inh-172}$  in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen**

Prozentuale Inhibition des SL-vermittelten Kurzschlussstroms durch den CFTR-spezifischen Inhibitor  $CFTR_{inh-172}$ . Da der Anstieg durch den Inhibitor blockiert werden konnte, kann angenommen werden, dass SL den  $\Delta F508$ -CFTR aktiviert.



**Abbildung 55: Effekt von SL auf die Membrankapazität in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen**

Während für die Applikation von cAMP ein leichtes Absinken der Membrankapazität gemessen werden konnte, konnte für SL eine signifikante Kapazitätserhöhung ab einer Konzentration von 45  $\mu M$  ermittelt werden ( $p \leq 0,01$ ).

### 3.6.4 Untersuchung des Wirkmechanismus von SL auf den $\Delta F508$ -CFTR in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen

Da für die humane Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> ein aktivierender Effekt von SL auf den  $\Delta F508$ -CFTR ermittelt werden konnte, wurde im Anschluss der Mechanismus der Wirkung von SL auf den  $\Delta F508$ -CFTR genauer untersucht. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, verursacht die Applikation von SL eine konzentrationsabhängige Aktivierung des CFTR, sowie die Exozytose von CFTR-Molekülen in die Plasmamembran. In dieser Untersuchung sollte nun analysiert werden, ob diese beiden durch SL verursachten Effekte über die cGMP-Signalkaskade vermittelt werden. Dazu wurde, ähnlich zu den Experimenten im *X. laevis* Expressionssystem, die PKG durch den spezifischen Inhibitor KT5823 und die Guanylatzyklase durch den Inhibitor ODQ blockiert. Die konfluenten Monolayer der CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen wurden 15 Minuten vor dem Einspannen in die Ussing Kammer mit KT5823 (3  $\mu$ M) oder ODQ (10  $\mu$ M) inkubiert.

Nach der anfänglichen Stabilisierungsphase wurden die initialen Parameter ermittelt. Diese initialen Parameter zeigten eine große Variabilität zwischen den einzelnen Messungen der inkubierten Monolayer, da besonders für den transepithelialen Widerstand Schwankungen von bis zu  $\pm 66,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  gemessen wurden. Des Weiteren sind die durchschnittlichen Werte für die gemessenen Parameter Kurzschlussstrom, Leitfähigkeit und Kapazität im Vergleich zu den nicht-inkubierten Zellen sehr unterschiedlich. Besonders die Membrankapazität ist nach der Inkubation mit den Inhibitoren erhöht (Tab. 46).

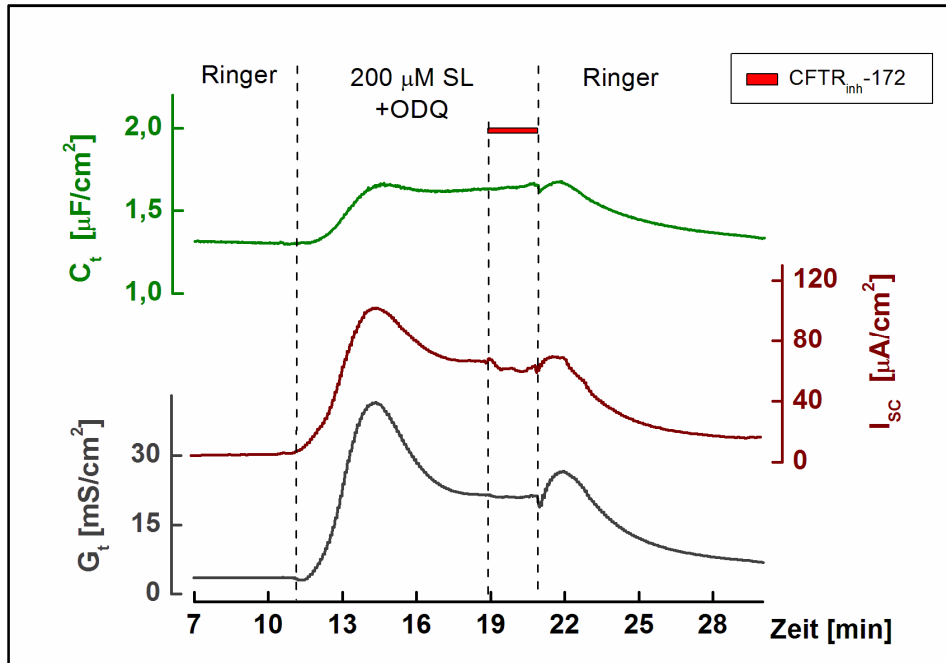
**Tabelle 46: Initiale Parameter konfluenter CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen nach KT5823 oder ODQ Inkubation**

Parameter	Kontrolle	ODQ	KT5823
I <sub>SC</sub> [ $\mu$ A/cm <sup>2</sup> ]	5,2 $\pm$ 1,1	3,1 $\pm$ 2,3	10,4 $\pm$ 1,7
R <sub>t</sub> [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]	332,6 $\pm$ 17,4	407,3 $\pm$ 66,4	311,5 $\pm$ 27,8
C <sub>t</sub> [ $\mu$ F/cm <sup>2</sup> ]	1,22 $\pm$ 0,02	2,87 $\pm$ 0,55	3,34 $\pm$ 0,3
N	27	6	6

Nach der Feststellung der initialen Werte konnte mit der Applikation der unterschiedlichen Lösungen (SL mit KT5823 oder SL mit ODQ) begonnen werden. In der abgebildeten repräsentativen Messung konnte eine Erhöhung der drei Parameter nach der Applikation von SL mit ODQ registriert werden (Abb. 56). Diese Erhöhung konnte jedoch nicht durch den  $CFTR_{inh-172}$  gehemmt werden.

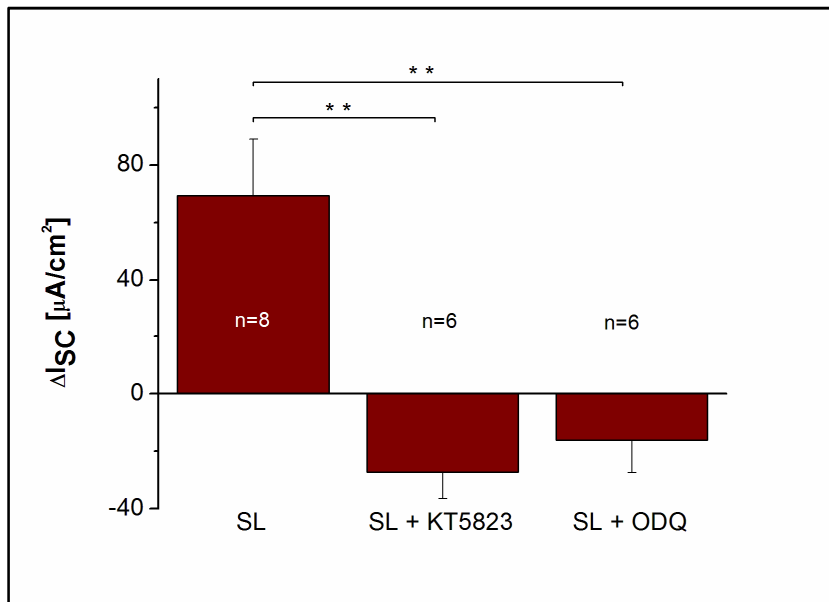
Bei der Auswertung konnte nach Abzug des reinen DMSO-Effekts kein Anstieg des Stroms oder der Leitfähigkeit durch die Kombination aus SL mit den Inhibitoren ermittelt werden. KT5823 und ODQ inhibierten den SL-vermittelten Strom somit vollständig (Abb. 57). Diese signifikante Reduktion durch KT5823 und ODQ traf ebenfalls für die Leitfähigkeit zu.

Die Auswertung der Membrankapazität zeigte keine einheitlichen Effekte. So konnte nach der Applikation von KT5823 mit SL eine signifikante Reduktion des SL-vermittelten Anstiegs um durchschnittlich 94% ermittelt werden, während nach der Zugabe von SL mit ODQ keine signifikante Erniedrigung der Kapazität gemessen werden konnte (Abb. 58). Wie die Ergebnisse mit KT5823 und ODQ zeigen, konnte somit die Wirkung von SL auf den  $\Delta F508$ -CFTR-vermittelten Strom durch die Blockierung der cGMP-Signalkaskade gehemmt werden. Somit scheint die Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit durch SL in der Tat über diese Signalkaskade vermittelt zu werden. Ob die SL-vermittelte Exozytose des  $\Delta F508$ -CFTR cGMP-abhängig ist, konnte mit diesen Untersuchungen jedoch nicht eindeutig geklärt werden. Die Hemmung der cGMP-abhängigen PKG durch KT5823 erniedrigte zwar die SL-vermittelte Kapazität, aber die Inhibierung der cGMP-generierenden Guanylatzyklase verursachte keine signifikante Hemmung der Kapazitätserhöhung durch SL.



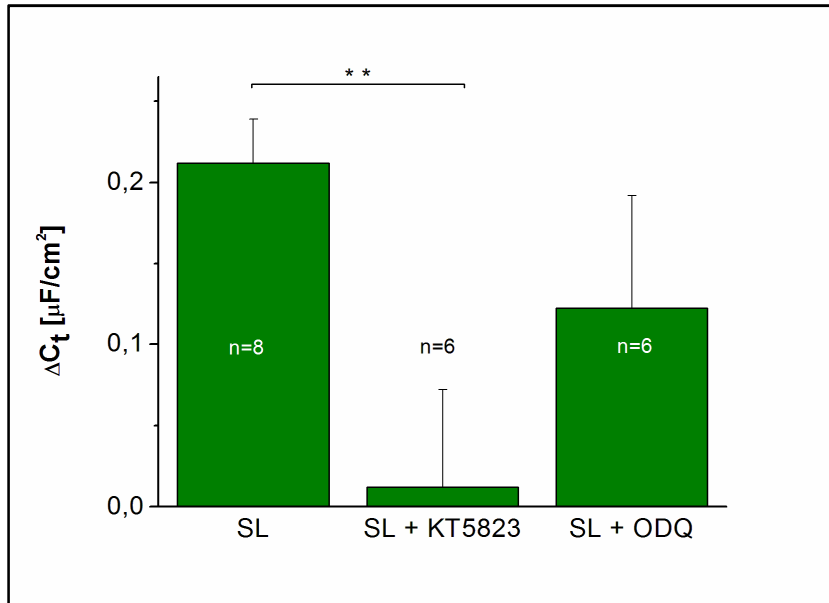
**Abbildung 56: Wirkung von ODQ auf den aktivierenden SL-Effekt in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen**

Nach der anfänglichen Stabilisierungsphase erfolgte die Applikation einer SL (200  $\mu\text{M}$ ) und ODQ (10  $\mu\text{M}$ ) enthaltene Lösung. Diese vermittelte einen Anstieg der Parameter Kurzschlussstrom ( $I_{\text{sc}}$ ), Leitfähigkeit ( $G_i$ ) und Membrankapazität ( $C_i$ ), welcher durch den  $\text{CFTR}_{\text{inh}}-172$  nicht blockierbar war.



**Abbildung 57: Effekt von KT5823 und ODQ auf den SL-vermittelten Kurzschlussstrom in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen**

Änderungen des Kurzschlussstroms ( $I_{\text{sc}}$ ) durch die Inkubation mit den Lösungen SL (200  $\mu\text{M}$ ) mit KT5823 oder SL mit ODQ im Vergleich zur reinen SL-Wirkung nach Abzug des DMSO-Effekts. Der PKG-Inhibitor KT5823 (139%) und der Guanylatzyklase Inhibitor ODQ (123%) blockierten die SL-vermittelte Stromerhöhung signifikant ( $p \leq 0,01$ ).



**Abbildung 58: Effekt von KT5823 und ODQ auf die SL-vermittelte Kapazitätserhöhung in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen**

Kapazitätserhöhungen durch die Applikation von reinem SL oder in Kombination mit KT5823 oder ODQ. Die Erhöhungen wurden außerdem im Vorfeld durch Abzug des reinen DMSO-Effekts korrigiert. Dabei konnte eine durchschnittliche Reduktion der SL-vermittelten Kapazität durch KT5823 um 94% gemessen werden ( $p \leq 0,01$ ). Die Applikation von ODQ verursachte dagegen keine signifikante Reduktion.

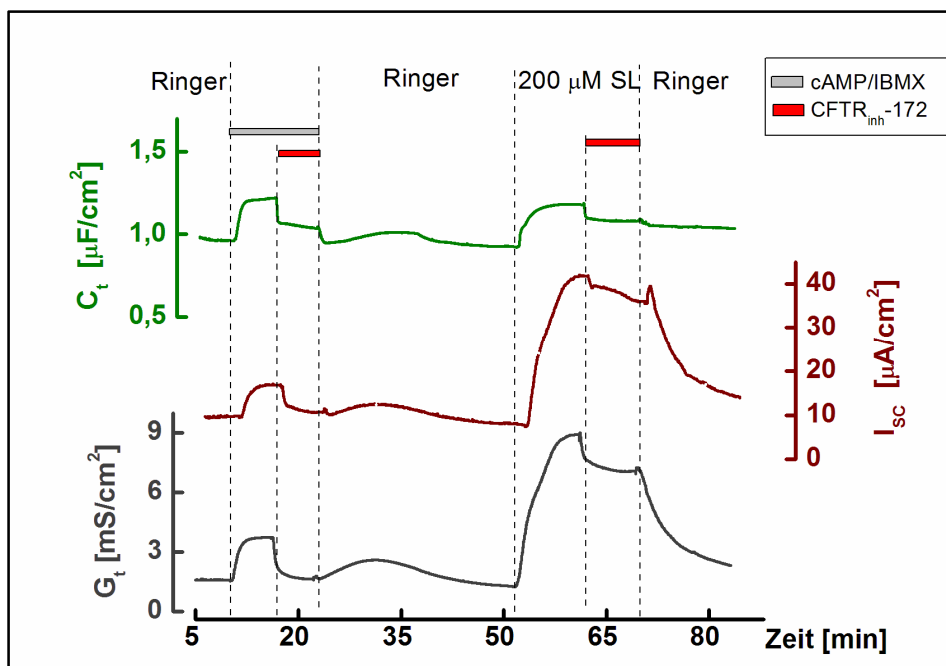
### 3.6.5 Funktionale Analyse des Effekts verschiedener SL-Konzentrationen auf den wt-CFTR in 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen

Um den Effekt verschiedener SL-Konzentrationen auf den wt-CFTR zu untersuchen, wurden konfluente Monolayer der wt-CFTR-Zelllinie 16HBE14o<sup>-</sup> in der Ussing Kammer gemessen. Zu Beginn der Messungen wurde zunächst ein cAMP/IBMX-Cocktail zugegeben, welcher die gemessenen Parameter Kurzschlussstrom, Leitfähigkeit und Kapazität erhöhte (Abb. 59). Dieser Anstieg konnte durch die Zugabe des CFTR<sub>inh</sub>-172 teilweise gehemmt werden.

In den Messungen konnte eine durchschnittliche Stromerhöhung nach der Applikation des cAMP/IBMX-Cocktails von  $3,6 \pm 2,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  gemessen werden (Abb. 60). Nach der Zugabe von SL wurde ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Stromanstieg ermittelt. Durch die Applikation von 200 μM SL wurde durchschnittlich eine 3,9-fache Erhöhung erreicht, während durch 400 μM SL ein Stromanstieg um das 15-fache gemessen werden konnte (Abb. 60). Da die Stromerhöhungen außerdem durch den spezifischen CFTR-Inhibitor CFTR<sub>inh</sub>-172 blockiert werden konnten (Abb. 61), kann

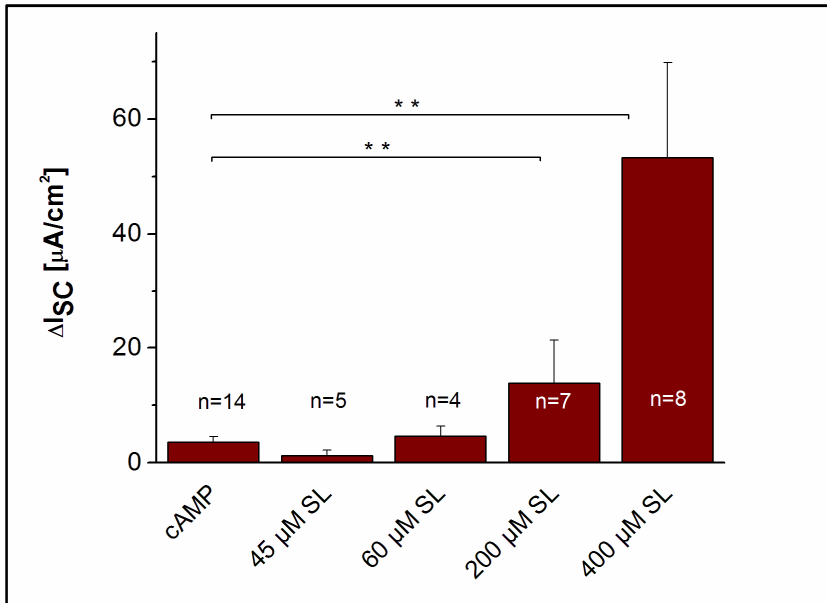
auf eine spezifische Aktivierung des wt-CFTR durch SL geschlossen werden. Die SL-Konzentrationen 200  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$  zeigten somit eine aktivitätssteigernde Wirkung auf den wt-CFTR. Dies trifft auch für die Leitfähigkeit zu. Die Auswertung der Membrankapazität zeigte dagegen keine aussagekräftigen Änderungen.

Insgesamt wurde somit eine aktivitätssteigernde Wirkung von SL (200  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$ ) auf den wt-CFTR nachgewiesen. Auch diese Daten stimmen sehr gut mit den zuvor im heterologen Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten ermittelten Daten überein (siehe Abschnitt 3.3.2).



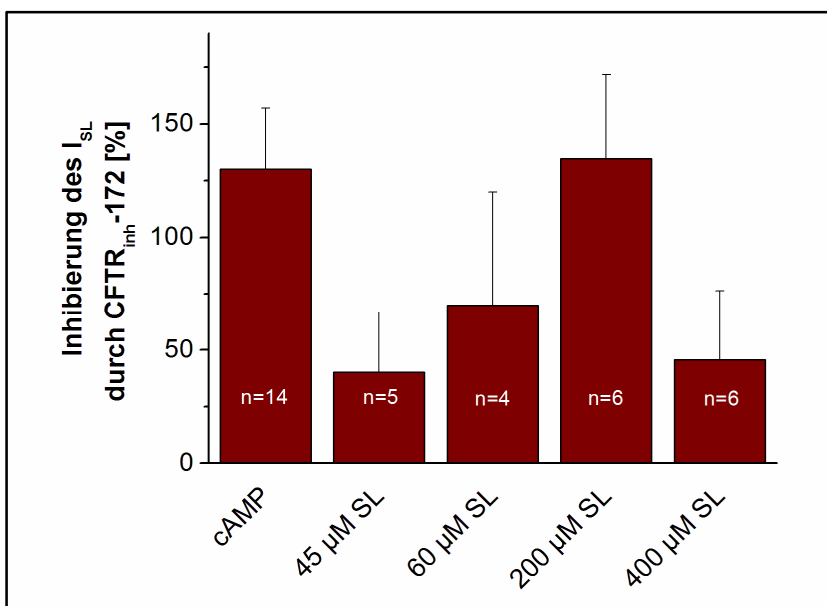
**Abbildung 59: Einfluss von SL auf die elektrophysiologischen Parameter in 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen**

Typischer Verlauf einer Ussing Kammer Messung mit einem 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellmonolayer. Nach dem Erreichen von stabilen Messwerten erfolgte die Applikation eines cAMP/IBMX-Cocktails. Durch diesen konnte ein Anstieg der Parameter Kurzschlussstrom, Leitfähigkeit und Kapazität gemessen werden, welcher durch den CFTR-Inhibitor CFTR<sub>inh</sub>-172 gehemmt werden konnte. Die Applikation von SL (200  $\mu\text{M}$ ) erhöhte alle drei gemessenen Parameter. Die Zugabe des CFTR<sub>inh</sub>-172 verursachte eine teilweise Hemmung der SL-vermittelten Erhöhung.



**Abbildung 60: Effekt von SL auf den transepithelialen Kurzschlussstrom in 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen**

Mittlere Stromerhöhungen nach Applikation der verschiedenen SL-Konzentrationen sowie durch den cAMP/IBMX-Cocktail in Relation zu den Initialwerten. SL (200 μM und 400 μM) vermittelte einen signifikant höheren Stromanstieg als die Applikation von cAMP ( $p \leq 0,01$ ).



**Abbildung 61: Inhibition der SL-vermittelten Stromerhöhung durch den CFTR<sub>inh</sub>-172 in 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen**

Prozentuale Hemmung des SL-vermittelten Stromanstiegs durch den CFTR-spezifischen Inhibitor CFTR<sub>inh</sub>-172. Da eine Blockierung des SL-vermittelten Stromanstiegs nachgewiesen werden konnte, scheint der Stromanstieg spezifisch über den CFTR vermittelt zu werden.



### 3.6.6 Untersuchung des Wirkmechanismus von SL auf den wt-CFTR in 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass SL auch in den humanen 16HBE14o<sup>-</sup>-Epithelzellen eine aktivitätssteigernde Wirkung auf den wt-CFTR hat, wurde auch für diesen Effekt der zugrunde liegende Mechanismus genauer untersucht. Für diese Experimente wurde wie zuvor die cGMP-Signalkaskade mittels KT5823 oder ODQ inhibiert. Der Messverlauf und die vorherige Inkubation der Monolayer sind identisch zu den Experimenten mit den CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen. Die Monolayer wurden somit zunächst 15 Minuten mit jeweils einem Inhibitor inkubiert und dann in der Ussing Kammer mit einer Lösung aus SL (200 µM) und KT5823 (3 µM) oder SL (200 µM) und ODQ (10 µM) umspült.

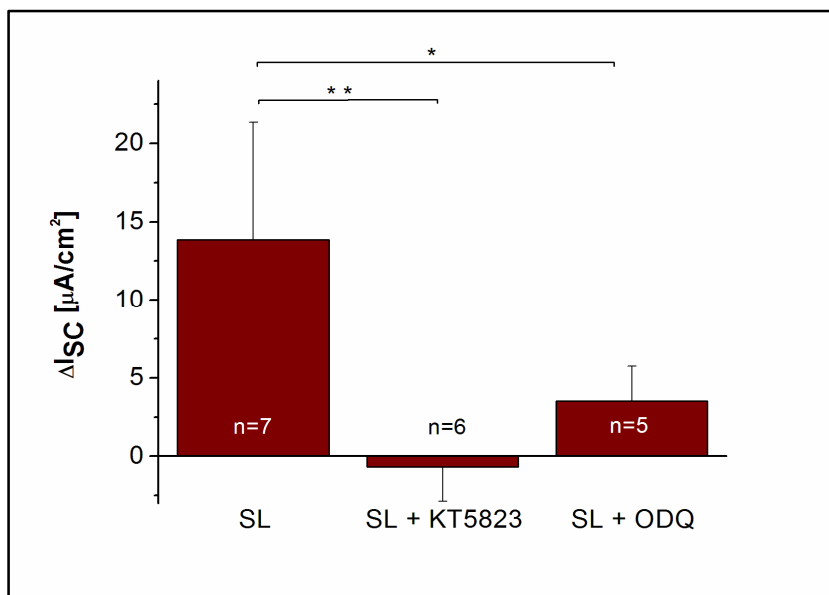
Die initialen Parameter der zugehörigen Ussing Kammer Messungen waren sehr variabel. So konnte z.B. ein initialer Kurzschlussstrom nach KT5823-Inkubation von durchschnittlich  $3,9 \pm 3,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  gemessen werden. Die Inkubation mit den Inhibitoren verursachte auch einen Unterschied zwischen den Initialwerten der verschiedenen inkubierten Monolayer. So war der initiale Kurzschlussstrom nach der Inkubation der Monolayer mit ODQ ( $4,2 \pm 1,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) im Vergleich mit den nicht-inkubierten Monolayern ( $9,7 \pm 3,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) geringer. Die Initialwerte der inkubierten und nicht-inkubierten Monolayer sind in Tabelle 47 aufgeführt.

**Tabelle 47: Initiale Parameter konfluenter 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen nach KT5823 oder ODQ Inkubation**

Parameter	Kontrolle	ODQ	KT5823
I <sub>SC</sub> [ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ]	$9,7 \pm 3,1$	$4,2 \pm 1,2$	$3,9 \pm 3,1$
R <sub>t</sub> [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]	$389,3 \pm 43,3$	$351,3 \pm 50,8$	$427,4 \pm 135,9$
C <sub>t</sub> [ $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ]	$1,8 \pm 0,06$	$1,5 \pm 0,1$	$1,36 \pm 0,05$
N	20	5	6

Für die Auswertung wurden die Änderungen der Parameter nach der Applikation von SL und den Inhibitoren in Relation zu den initialen Werten unter ZK-Ringer Bedingungen berechnet und durch Abzug des reinen DMSO-Effekts korrigiert. Die Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichung des Stroms sind in der Abb. 62 graphisch dargestellt.

Der PKG-Inhibitor KT5823 reduzierte den SL-vermittelten Stromanstieg vollständig, während für den Guanylatzyklase Inhibitor ODQ eine Hemmung um durchschnittlich 75% ermittelt werden konnte (Abb. 62). Dabei ist sowohl die Inhibition durch ODQ sowie die Blockierung durch KT5823 signifikant.



**Abbildung 62: Effekt von KT5823 und ODQ auf den SL-vermittelten Stromanstieg in 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen**

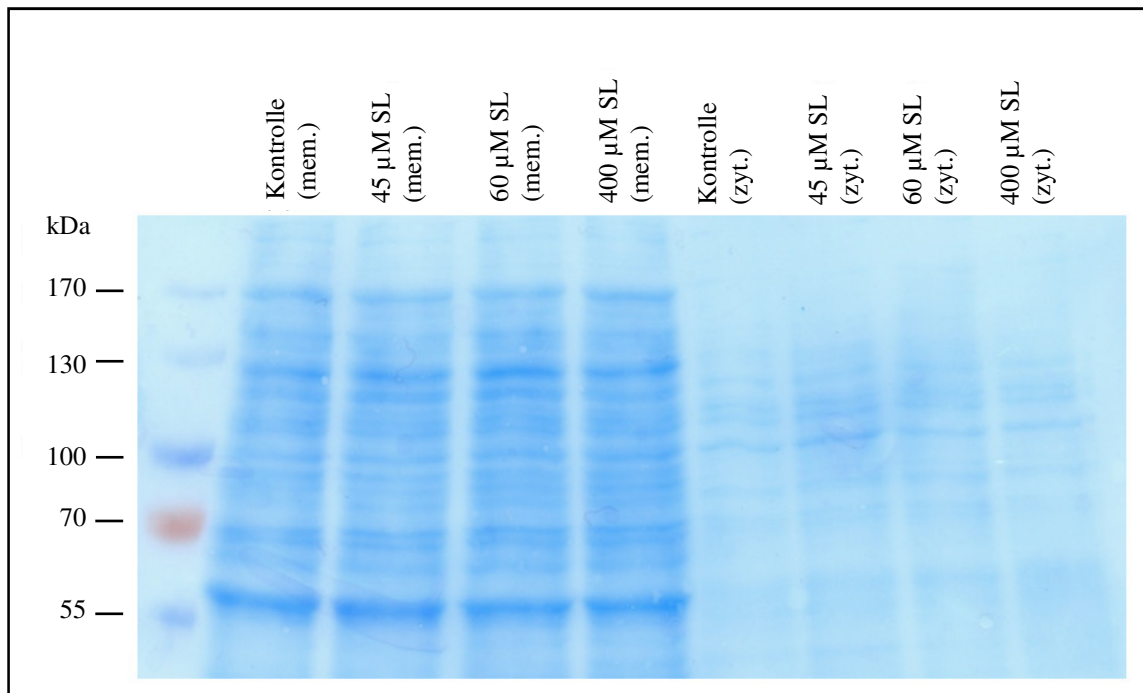
*Stromänderung nach der Applikation der SL-Lösungen (200 μM) mit KT5823 oder ODQ im Vergleich zum Effekt durch die alleinige Zugabe von SL. Die einzelnen Messwerte wurden durch Abzug des reinen DMSO-Effekts korrigiert und dann gemittelt. Der PKG-Inhibitor KT5823 (105%;  $p \leq 0,01$ ) und der Guanylatzyklase Inhibitor ODQ (75%;  $p \leq 0,05$ ) blockierten die SL-vermittelte Stromerhöhung signifikant.*

### 3.7 Western Blot Analysen

Um den Effekt und den Wirkmechanismus von SL auf den  $\Delta F508$ - und den wt-CFTR zusätzlich auf proteinbiochemischer Ebene zu untersuchen, wurden semi-quantitative Western Blot Analysen durchgeführt. Da das genutzte Proteinisolutions-Kit eine Trennung der Plasmamembranproteine von den zytosolischen Proteinen ermöglicht, kann so beurteilt werden, ob SL den Einbau des CFTR-Proteins in der Plasmamembran fördert.

Innerhalb dieser Untersuchungen wurden zunächst 16HBE14o<sup>-</sup>- und CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen für zwei Stunden mit den SL-Konzentrationen 45  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$  oder zur Kontrolle ohne SL inkubiert. In einem weiteren Versuch wurde eine Lösung aus SL (60  $\mu\text{M}$ ) und dem Guanylatzyklase Inhibitor ODQ (10  $\mu\text{M}$ ) appliziert.

Nach der Bestimmung der Proteinmengen wurden 40  $\mu\text{g}$  der Membranproteine und 10  $\mu\text{g}$  der zytosolischen Proteine durch eine SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Abb. 63 zeigt anhand der Coomassie Färbung der PVDF-Membran, dass innerhalb der Membranfraktionen der einzelnen Proben (mem.) sowie in den zytosolischen Fraktionen (zyt.) eine vergleichbare Proteinmenge aufgetrennt und übertragen wurde, wodurch eine densitometrische Auswertung möglich war.



**Abbildung 63: Färbung der PVDF-Membran mit Coomassie blau**

Mit Coomassie Färbelösung angefärbte PVDF-Membran. Dabei sind in den ersten vier Spuren die Membranproteine (mem.) der mit verschiedenen SL-Konzentrationen sowie ohne SL inkubierten 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen gezeigt, während in den vier letzten Spuren die zytosolischen Proteine (zyt.) der Ansätze aufgetragen sind. Die Proteine wurden zunächst in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und dann auf die PVDF-Membran übertragen. Als Größenmarker wurde in der SDS-PAGE der PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Anhand der Coomassie Färbung war ersichtlich, dass die Proteinmengen innerhalb der Membranproteine und der zytosolischen Proteine vergleichbar waren und so eine densitometrische Auswertung möglich war.

### 3.7.1 Wirkung verschiedener SL-Konzentrationen auf den wt-CFTR in 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen sowie den ΔF508-CFTR in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen

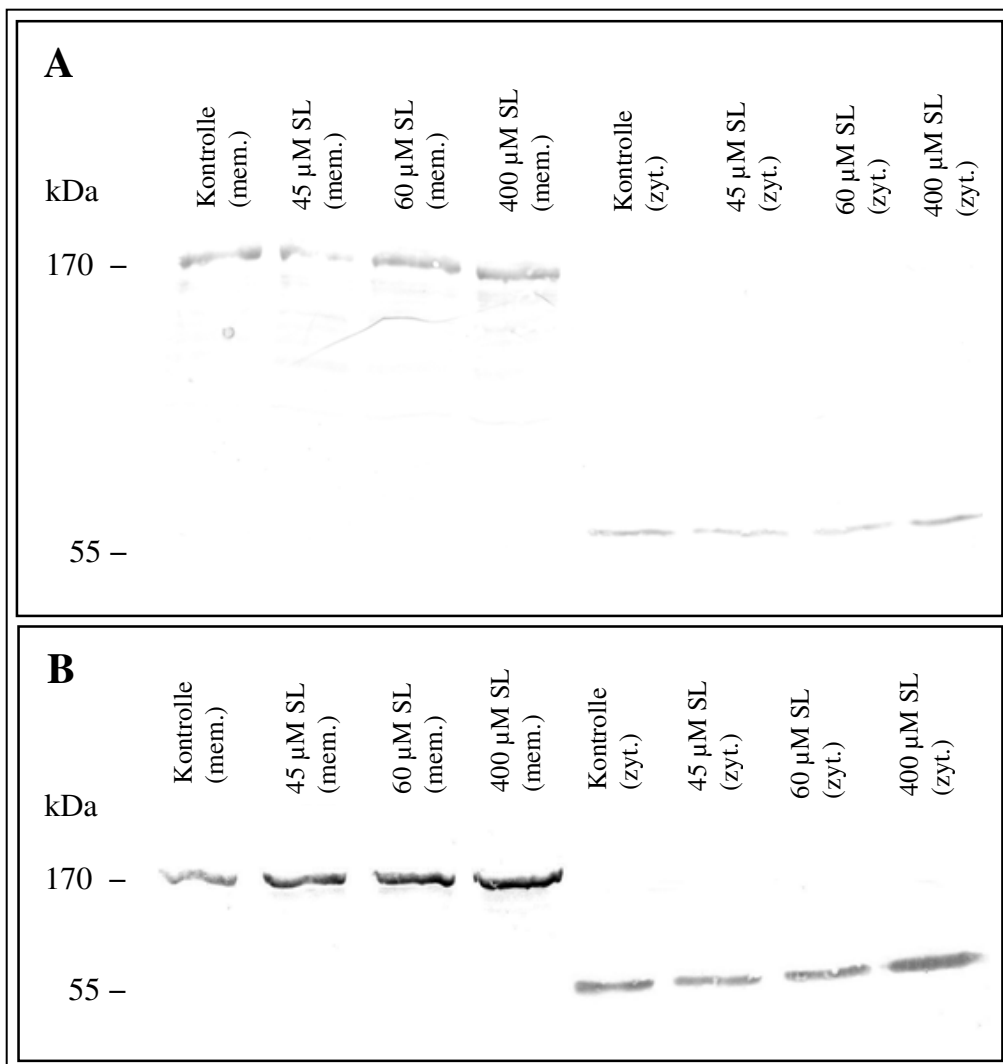
In den Western Blot Untersuchungen erfolgte eine Inkubation der 16HBE14o<sup>-</sup>- und CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen mit den SL-Konzentrationen 45 µM, 60 µM und 400 µM. Der im Verlauf der Immunodetektion verwendete spezifische CFTR-Antikörper detektierte in den Membranprotein Ansätzen jeweils eine Bande bei ca. 170 kDa. Des Weiteren konnte in den zytoplasmatischen Proteinfractionen eine Bande bei ca. 55 kDa nachgewiesen werden, welche dem Molekulargewicht des α-Tubulin entspricht (siehe Abb. 64).

Nach der Digitalisierung der Blots wurden die Proteinmengen mit dem Programm *ImageJ* bestimmt und anhand der α-Tubulin Proteinmenge korrigiert. In einem weiteren Schritt wurde die relative Proteinmenge der in der Membranproteinfraction detektierten

CFTR-Bande normalisiert. Dazu wurde die nicht-inkubierte Kontrollprobe auf den Wert 1,0 gesetzt und die Proteinexpressionen der SL-inkubierten Proben in Relation dazu angegeben. Durch die normalisierte Darstellung der Proteinmengen wurde ersichtlich, dass die Inkubation mit SL die Exozytose von wt- und  $\Delta F508$ -CFTR-Molekülen in die Plasmamembran vermittelt. So konnte durchschnittlich eine um 2,5 signifikant erhöhte  $\Delta F508$ -CFTR-Proteinmenge nach der Inkubation mit 60  $\mu\text{M}$  SL ermittelt werden, während für 400  $\mu\text{M}$  SL eine 1,7-fache Erhöhung der  $\Delta F508$ -CFTR-Proteinmenge beobachtet werden konnte (Abb. 65).

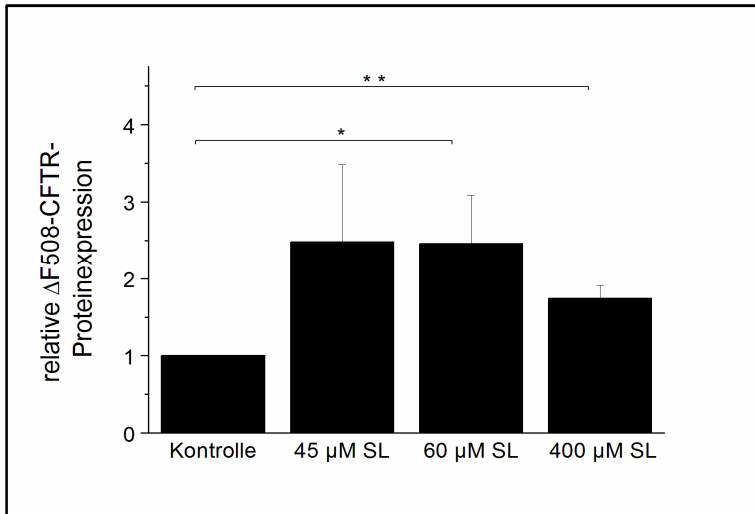
Auch für den wt-CFTR in den 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen konnte diese konzentrationsabhängige Wirkung von SL gezeigt werden. 60  $\mu\text{M}$  SL verursachte eine 2,9-fache Erhöhung der wt-CFTR-Proteinmenge, während nach der Inkubation mit 400  $\mu\text{M}$  SL eine 2,0-fache Proteinmenge im Vergleich zur nicht-inkubierten Kontrolle detektiert werden konnte (Abb. 66). Für die Inkubation mit 45  $\mu\text{M}$  SL wurde dagegen in keiner der beiden Zelllinien ein signifikanter Anstieg der CFTR-Proteinmenge ermittelt.

Es konnte außerdem festgestellt werden, dass 60  $\mu\text{M}$  SL die  $\Delta F508$ -CFTR-Proteinmenge in den CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen im Vergleich zu der Proteinmenge der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen um durchschnittlich 264% überstieg. 400  $\mu\text{M}$  SL konnte die  $\Delta F508$ -CFTR-Proteinmenge mit 88% nahezu auf das Niveau der wt-CFTR-Zellen steigern (n=3). Dies bedeutet, dass SL die Exozytose des  $\Delta F508$ -CFTR in den CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen sowie des wt-CFTR in den 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen stimuliert und bei 60  $\mu\text{M}$  ein Maximum erreicht zu sein scheint.



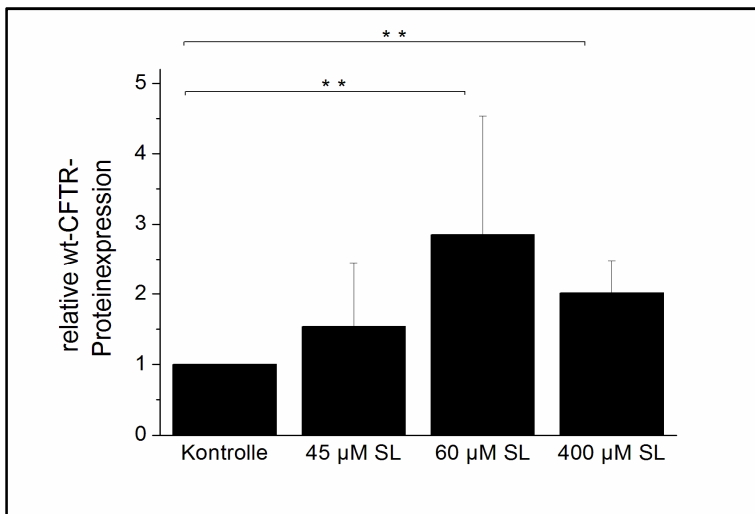
**Abbildung 64: Western Blot Analysen zur Untersuchung des SL-Effekts**

Die isolierten Membranproteine und zytosolischen Proteine der CFBE41o<sup>-</sup>-(A) und 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen (B) wurden in einem 7,5%-igen SDS-Acrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der verwendete spezifische CFTR-Antikörper detektierte je eine Bande bei ~170 kDa in den Membranproteinfraktionen. In den zytosomatischen Proteinen konnte dagegen eine  $\alpha$ -Tubulin spezifische Bande bei ~55 kDa nachgewiesen werden. Die Detektion erfolgte in diesem Fall bei den 16HBE14o<sup>-</sup>-Proteinen mittels ECL, während die Proteine der CFBE41o<sup>-</sup>-Zelllinie kolorimetrisch mittels NBT/BCIP detektiert wurden.



**Abbildung 65: Semi-quantitative  $\Delta$ F508-CFTR-Proteinexpression nach SL-Inkubation**

Densitometrische Quantifizierung der  $\Delta$ F508-CFTR-Proteinmenge in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen. Dabei wurde die nicht-inkubierte Probe auf den Wert 1,0 gesetzt und die anderen Proben in Relation dazu angegeben. Es konnte eine signifikante Erhöhung der  $\Delta$ F508-CFTR-Proteinexpression nach Inkubation mit 60  $\mu$ M SL um das 2,5-fache ( $p \leq 0,05$ ) beobachtet werden, während nach der Applikation von 400  $\mu$ M SL eine 1,7-fache Steigerung ( $p \leq 0,01$ ) der Proteinexpression ermittelt werden konnte ( $n=6$ ;  $N=2$ ).

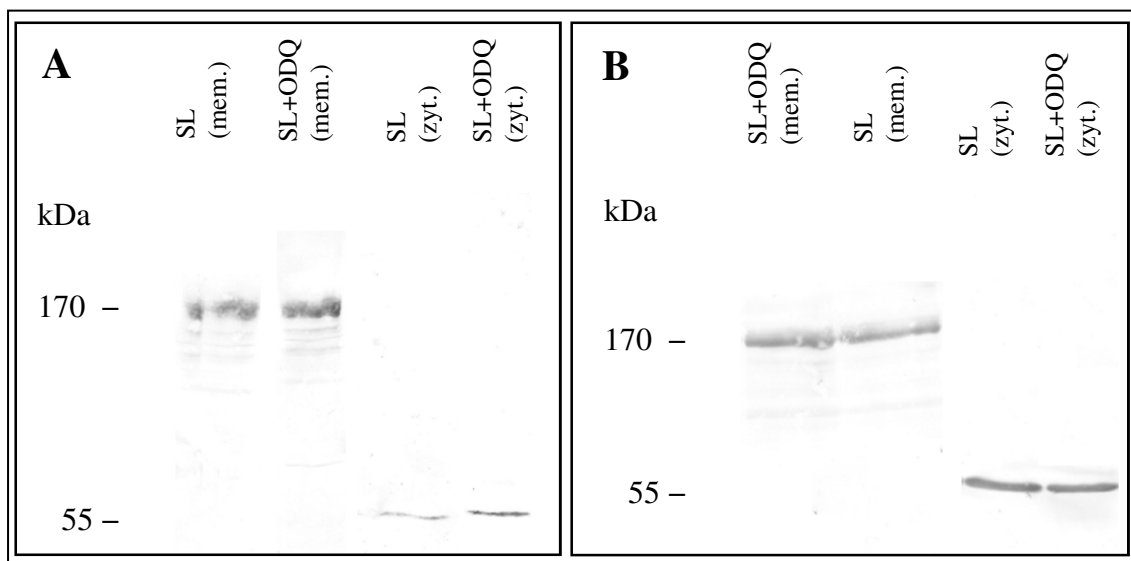


**Abbildung 66: Semi-quantitative wt-CFTR-Proteinexpression nach SL-Inkubation in 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen**

Im Anschluss an die Western Blot Detektion wurden die Proteinmengen mittels des Programms ImageJ ausgewertet. Die Schwankungen der einzelnen Proteinproben wurden unter Einbezug der  $\alpha$ -Tubulin Proteinmenge angeglichen. Weiterhin wurde die wt-CFTR-Proteinexpression normalisiert. Dazu wurde die Proteinmenge der nicht-inkubierten Kontrolle auf den Wert 1,0 gesetzt und die Expressionen der anderen Proteine in Relation dazu angegeben. Es ist ersichtlich, dass die Inkubation mit SL in den 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen eine Erhöhung der wt-CFTR-Proteinexpression verursachte. So konnte durch 60  $\mu$ M SL eine signifikante 2,9-fache Erhöhung und nach der Inkubation mit 400  $\mu$ M SL eine 2,0-fache Steigerung der Proteinexpression gemessen werden ( $p \leq 0,01$ ) ( $n=9$ ;  $N=3$ ).

### 3.7.2 Analyse des Wirkmechanismus von SL mittels des Guanylatzyklase Inhibitors ODQ

Das Ziel dieser weiterführenden Untersuchungen war es zu analysieren, ob die SL-stimulierte Exozytose der CFTR-Moleküle durch die cGMP-Signalkaskade vermittelt wird. Für diese Untersuchungen wurde der Guanylatzyklase Inhibitor ODQ verwendet. Die Inkubation der CFBE41o<sup>-</sup>- und 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen mit einer Lösung aus SL (60 µM) und ODQ (10 µM), sowie nur mit SL (60 µM) erfolgte für zwei Stunden. Die Proteinisolierung sowie die Durchführung des Western Blots erfolgten wie zuvor beschrieben. Es konnte wiederum eine CFTR-spezifische Bande in der Fraktion der Membranproteine bei ca. 170 kDa identifiziert werden. Der α-Tubulin Antikörper erkannte eine Bande bei ca. 55 kDa in den zytosolischen Proteinfraktionen. In der folgenden Abbildung ist je ein exemplarischer Western Blot mit Proteinen der Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> (Abb. 67; A) und der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zelllinie (Abb. 67; B) gezeigt.

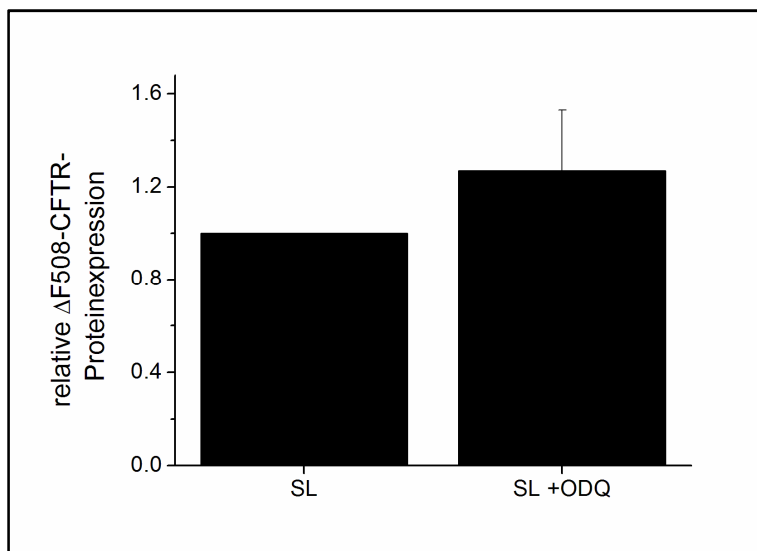


**Abbildung 67: Western Blot Analysen zur Untersuchung der Inhibition durch ODQ**

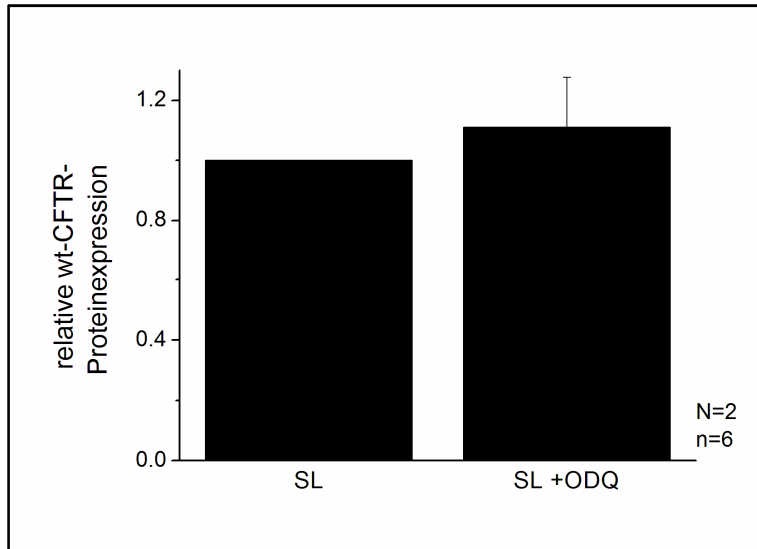
Zellen der Zelllinien CFBE41o<sup>-</sup> (A) und 16HBE14o<sup>-</sup> (B) wurden mit SL (60 µM) oder SL (60 µM) und ODQ (10 µM) inkubiert. Nach der Isolation der Proteine erfolgte eine Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE und der Transfer auf eine PVDF-Membran. Durch den verwendeten spezifischen CFTR-Antikörper konnte in der Immunoreaktion je eine Bande bei ~170 kDa in der Membranproteinfraktion (mem.) detektiert werden. In den zytosolischen Proben (zyt.) konnte eine α-Tubulin spezifische Bande bei ~55 kDa identifiziert werden. Die Detektion dieser Untersuchungen erfolgte kolorimetrisch mit NBT/BCIP.



Anhand der Intensität der Banden wurde die relative Proteinexpression densitometrisch mit dem Programm *ImageJ* bestimmt. Die relative Proteinexpression der nur mit SL inkubierten Probe wurde auf den Wert 1,0 gesetzt und die Proteinexpression der SL- und ODQ-inkubierten Zellen in Relation dazu angegeben. Anhand dieser Betrachtungsweise zeigte sich, dass nach der Inkubation mit dem Guanylatzyklase Inhibitor ODQ keine Reduktion des SL-Effekts ermittelt werden konnte. Wie das folgende Diagramm zeigt, erhöhte ODQ die  $\Delta F508$ -CFTR-Expression in den CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen um durchschnittlich 27% im Vergleich zu der nur mit SL inkubierten Probe (Abb. 68). Ebenso konnte nach der Inkubation der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen mit ODQ und SL eine signifikante Erhöhung der  $\Delta F508$ -CFTR-Proteinexpression um durchschnittlich 11% ermittelt werden (Abb. 69). Die SL-vermittelte Exozytose von wt-CFTR- und  $\Delta F508$ -CFTR-Molekülen scheint somit nicht über die cGMP-Signalkaskade vermittelt zu werden, sondern stellt sich eher als cGMP-unabhängig dar.



**Abbildung 68: Semi-quantitative  $\Delta F508$ -CFTR-Proteinexpression in den CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen**  
*Densitometrische Quantifizierung der  $\Delta F508$ -CFTR-Proteinmenge in den CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen. Die Zellen wurden zuvor entweder mit SL oder SL in Kombination mit ODQ inkubiert. Nach der densitometrischen Auswertung wurde die CFTR-Proteinmenge der SL-inkubierten Probe auf den Wert 1,0 gesetzt. Dabei zeigte sich, dass ODQ die  $\Delta F508$ -CFTR-Proteinexpression um durchschnittlich 27% erhöhte (n=6; N=2).*



**Abbildung 69: Semi-quantitative wt-CFTR-Proteinexpression der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen**

Densitometrische Auswertung der wt-CFTR-Proteinmenge der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen, welche mit SL und ODQ oder nur mit SL inkubiert wurden. Die Proteinexpression nach reiner SL-Inkubation wurde auf den Wert 1,0 gesetzt und die Proteinexpression nach der Inkubation mit SL und ODQ in Relation dazu dargestellt. Es ist ersichtlich, dass der SL-Effekt auf den wt-CFTR nicht durch ODQ gehemmt werden konnte (n=6; N=2).

### 3.8 Immunofluoreszenzoptische Untersuchungen

Zur weiteren Analyse der Wirkung von SL auf die Anzahl der wt- und  $\Delta F508$ -CFTR-Moleküle in der Plasmamembran wurden zusätzlich immunofluoreszenzoptische Analysen durchgeführt. Auch hier wurde durch die Applikation des PKG-Inhibitors KT5823 die cGMP-Abhängigkeit der SL-vermittelten CFTR-Exozytose untersucht.

Für diese Untersuchungen wurden Zellen der Zelllinien CFBE41o<sup>-</sup> und 16HBE14o<sup>-</sup> auf Deckgläsern kultiviert und mit den verschiedenen SL-Konzentrationen 45  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , KT5823 (3  $\mu\text{M}$ ) oder einer Lösung aus SL (60  $\mu\text{M}$ ) mit KT5823 (3  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Weiterhin wurden Zellen zur Kontrolle ohne SL inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurden die Zellen mit 0,05% Glutaraldehyd fixiert. Die Fixierung mit Glutaraldehyd führt zu keiner Permeabilisierung der Zellmembran, so dass der applizierte CFTR-Antikörper nur die Proteine in der Plasmamembran detektieren kann. Die ermittelte Anzahl der CFTR-Moleküle pro  $\mu\text{m}^2$  (*Qdots* pro  $\mu\text{m}^2$ ) der nicht-inkubierten Probe wurde auf den Wert 1,0 gesetzt und die Anzahl der CFTR-Moleküle der SL-inkubierten Zellen in Relation dazu angegeben. Im Falle der Applikation des Guanylatzyklase Inhibitors KT5823 in Kombination mit SL wurden die ermittelten Werte der nur mit SL (60  $\mu\text{M}$ ) inkubierten Zellen auf den Wert 1,0 gesetzt und die Werte für die SL (60  $\mu\text{M}$ ) mit KT5823 (3  $\mu\text{M}$ ) inkubierten Zellen in Relation dazu angegeben.

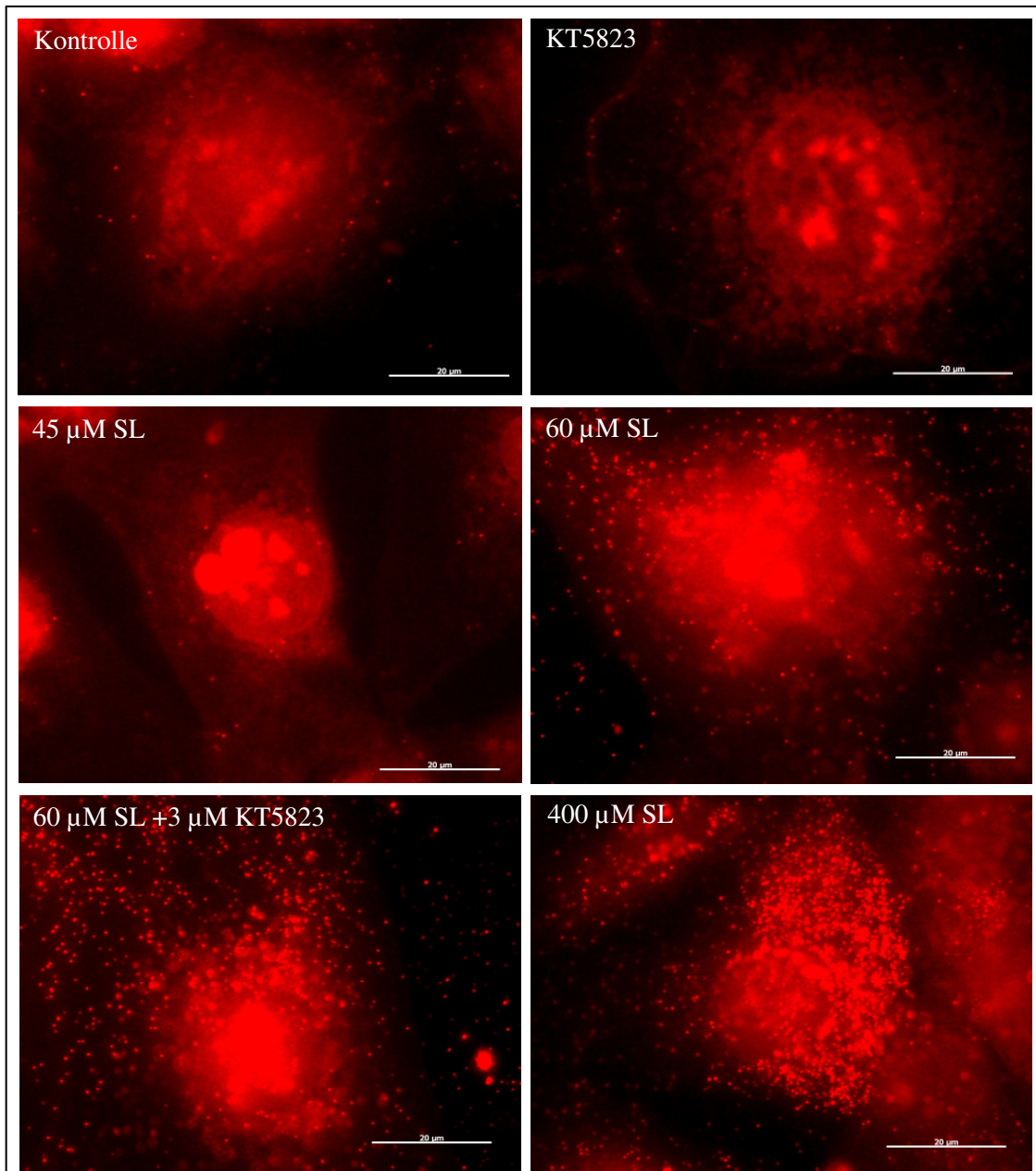
#### 3.8.1 Untersuchung des Effekts sowie des Mechanismus von SL auf den $\Delta F508$ -CFTR

Die folgende Abbildung zeigt Aufnahmen der CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen, bei denen die  $\Delta F508$ -CFTR-Moleküle in der Membran durch *Qdots* detektiert wurden. Dabei ist eine Korrelation zwischen der Anzahl der  $\Delta F508$ -CFTR-Moleküle und der SL-Konzentration ersichtlich. Je höher die SL-Konzentration ist, desto mehr  $\Delta F508$ -CFTR-Moleküle konnten in der Zelle detektiert werden (Abb. 70).

Diese Tendenz ist in der statistischen Auswertung gezeigt. Der zur Kontrolle ohne SL applizierte PKG-Inhibitor KT5823 verursachte keinen signifikanten Effekt auf die Menge der  $\Delta F508$ -CFTR-Moleküle in der apikalen Plasmamembran. Des Weiteren zeigte eine Applikation von 45  $\mu\text{M}$  SL keinen signifikanten Unterschied der  $\Delta F508$ -CFTR-Anzahl im Vergleich zur nicht-inkubierten Kontrolle. Durch 60  $\mu\text{M}$  SL konnte

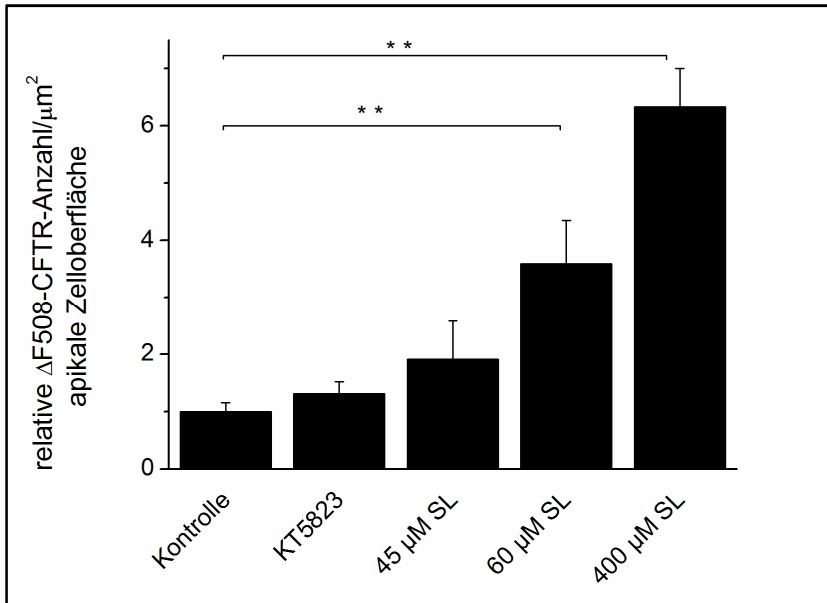
durchschnittlich eine 3,6-fache und durch 400  $\mu\text{M}$  SL eine 6,3-fache Erhöhung der  $\Delta\text{F508-CFTR}$ -Anzahl in der apikalen Plasmamembran nachgewiesen werden (Abb. 71). Diese Auswertungen zeigen, dass SL zu einer Zunahme der  $\Delta\text{F508-CFTR}$ -Moleküle in der Plasmamembran führte. Weiterhin konnten nach der Inkubation mit 60  $\mu\text{M}$  SL durchschnittlich  $0,074 \pm 0,011$   $\Delta\text{F508-CFTR}$ -Moleküle pro  $\mu\text{m}^2$  bestimmt werden. Somit übersteigt die Menge an  $\Delta\text{F508-CFTR}$ -Molekülen in der Zellmembran der CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen nach der Inkubation mit 60  $\mu\text{M}$  SL die wt-CFTR-Anzahl in den 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen um 131% ( $0,032 \pm 0,005$   $\Delta\text{F508-CFTR}$ -Anzahl/ $\mu\text{m}^2$ ). Für die SL-Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  SL konnte eine mittlere  $\Delta\text{F508-CFTR}$ -Anzahl von  $0,13 \pm 0,015$   $\Delta\text{F508-CFTR}$ -Molekülen pro  $\mu\text{m}^2$  gemessen werden. Dies bedeutet, dass die  $\Delta\text{F508-CFTR}$ -Menge mit 406% nach der Inkubation mit 400  $\mu\text{M}$  SL ebenfalls die wt-CFTR-Menge der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen übersteigt.

In einem weiterführenden Versuch wurde der PKG-Inhibitor KT5823 zusammen mit SL appliziert, um die cGMP-Abhängigkeit des SL-Effekts zu untersuchen. Wie in der Abb. 72 ersichtlich ist, konnte für die Inkubation von SL mit KT5823 zwar eine durchschnittliche Inhibition um 25% bestimmt werden, welche aber nicht signifikant ist. Daher weist auch diese Untersuchung darauf hin, dass die SL-vermittelte Erhöhung der Anzahl der  $\Delta\text{F508-CFTR}$ -Moleküle in der Plasmamembran cGMP-unabhängig ist.



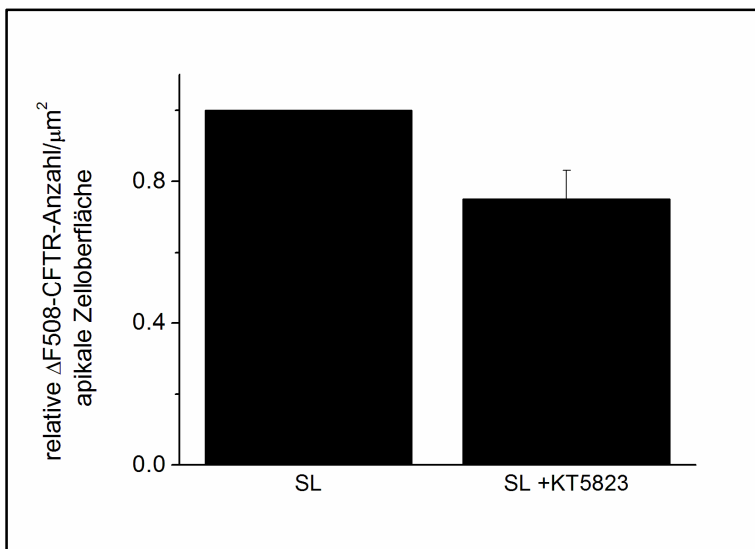
**Abbildung 70: Nachweis der  $\Delta F508$ -CFTR-Moleküle in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen**

Die Bilder zeigen Qdots, welche an die  $\Delta F508$ -CFTR-Moleküle in der Plasmamembran gebunden sind. Die auf Deckgläsern kultivierten Zellen wurden zunächst mit verschiedenen SL-Konzentrationen, dem PKG-Inhibitor KT5823 sowie SL mit KT5823 inkubiert. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit wurden die Zellen mit 0,05% Glutaraldehyd fixiert und mittels eines CFTR-spezifischen primären Antikörpers sowie einem Qdot-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 71: Menge der *Qdot*-gekoppelten  $\Delta F508$ -CFTR-Moleküle in den CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen**

Nach der Immunofluoreszenzfärbung wurden die *Qdots* innerhalb einer Zelle manuell gezählt und anhand des Flächeninhalts der Zelle die Anzahl der  $\Delta F508$ -CFTR-Moleküle pro  $\mu\text{m}^2$  bestimmt. Die so ermittelte Anzahl der  $\Delta F508$ -CFTR-Moleküle nach der Inkubation mit dem PKG-Inhibitor KT5823 (3  $\mu\text{M}$ ) sowie den verschiedenen SL-Konzentrationen wurden in Relation zur nicht mit SL inkubierten Kontrolle gesetzt. In dieser Abbildung zeigt sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der  $\Delta F508$ -CFTR-Anzahl durch die Inkubation mit SL. 60  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$  SL vermittelten eine signifikante Erhöhung der  $\Delta F508$ -CFTR-Molekülanzahl pro  $\mu\text{m}^2$  apikale Zelloberfläche ( $p \leq 0,01$ ) ( $n=18$ ;  $N=3$ ).

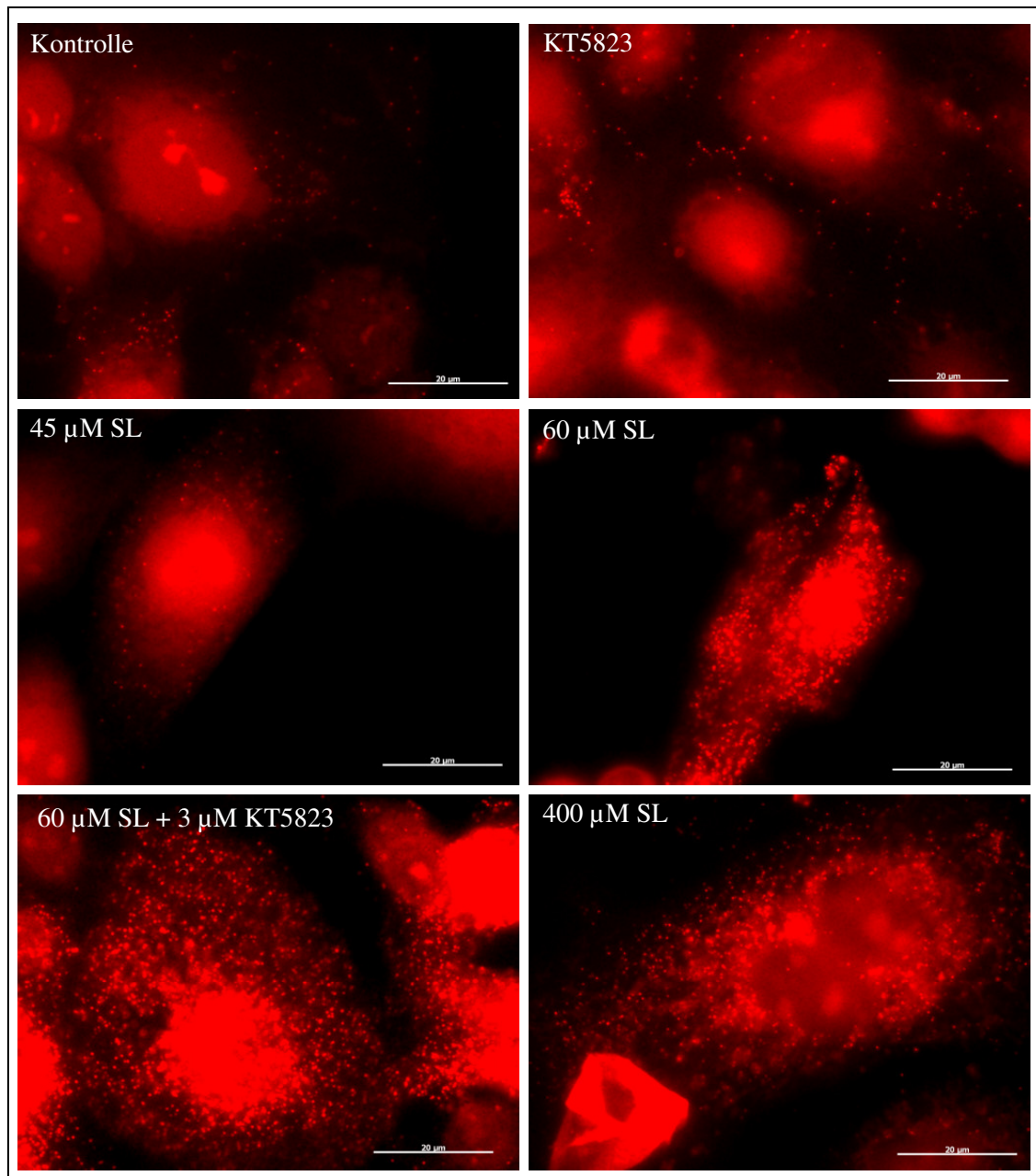


**Abbildung 72: Effekt von KT5823 auf die SL-vermittelte  $\Delta F508$ -CFTR-Molekülanzahl**

Quantifizierung der *Qdot*-gekoppelten  $\Delta F508$ -CFTR-Moleküle nach der Inkubation von CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen mit 60  $\mu\text{M}$  SL und 3  $\mu\text{M}$  KT5823 im Vergleich zur reinen SL-Inkubation. Es ist eine nicht signifikante Inhibition um 25% bestimmt worden ( $n=18$ ;  $N=3$ ).

### 3.8.2 Untersuchung des Effekts und des Wirkmechanismus von SL auf den wt-CFTR in 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen

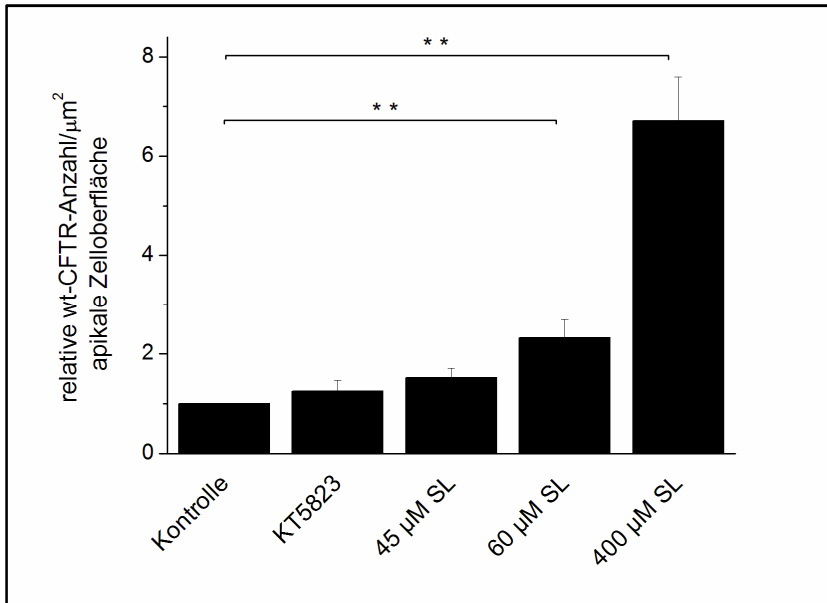
Auf den Bildern der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zelllinie ist eine konzentrationsabhängige Zunahme der Anzahl *Qdot*-gekoppelter wt-CFTR-Moleküle nach der Inkubation mit SL erkennbar. Somit vermittelt SL eine Erhöhung der wt-CFTR-Molekülmenge in der Plasmamembran dieser Zellen (siehe Abb. 73). Bei den 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen, welche zur Kontrolle nur mit KT5823 ohne SL inkubiert wurden, konnte keine signifikante Erhöhung der wt-CFTR-Anzahl im Vergleich zur nicht-inkubierten Kontrolle beobachtet werden (Abb. 74). In der Auswertung der SL-inkubierten Zellen wird ersichtlich, dass nach der Inkubation mit 45  $\mu\text{M}$  SL kein signifikanter Anstieg der Anzahl von wt-CFTR-Molekülen in der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte. Die Inkubation mit 60  $\mu\text{M}$  SL vermittelte dagegen durchschnittlich eine 2,3-fache Erhöhung der wt-CFTR-Menge in der apikalen Plasmamembran. Für die SL-Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  konnte ein 6,7-facher Anstieg der CFTR-Anzahl dokumentiert werden. Die konzentrationsabhängige Zunahme der wt-CFTR-Menge in der Plasmamembran ist bei den Konzentrationen 60  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$  signifikant unterschiedlich zu der wt-CFTR-Molekülmenge der nicht-inkubierten Zellen (Abb. 74). Um den Mechanismus der Erhöhung der wt-CFTR-Menge in der Plasmamembran durch SL zu untersuchen, wurde weiterhin der PKG-Inhibitor KT5823 in Kombination mit SL appliziert. In der Auswertung dieser Untersuchungen zeigte sich, dass die Inkubation von SL mit KT5823 eine Erhöhung der wt-CFTR-Menge in der Plasmamembran um durchschnittlich 6% verursachte (Abb. 75). Dies bedeutet, dass auch in diesen Untersuchungen die Exozytose von wt-CFTR-Molekülen durch SL scheinbar nicht über die cGMP-Signalkaskade vermittelt wird.



**Abbildung 73: Nachweis der wt-CFTR-Moleküle in 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen**

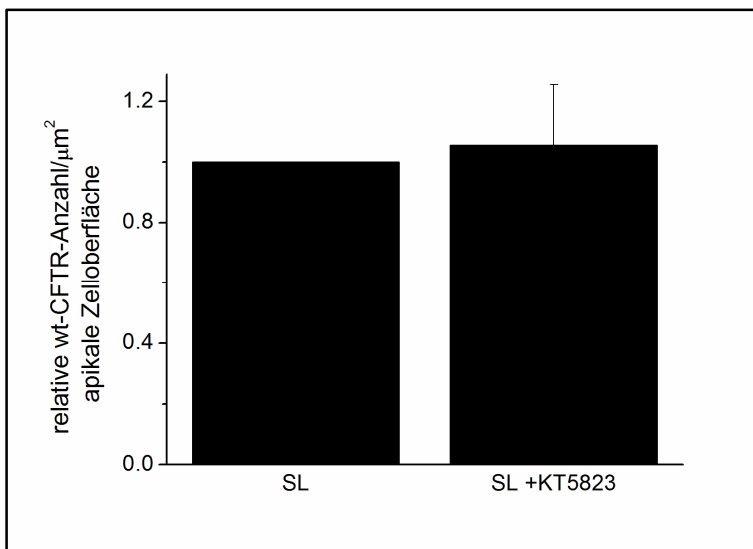
Die Bilder zeigen Qdots, welche an die wt-CFTR-Moleküle in der Plasmamembran gebunden sind. Dazu wurden 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen mit verschiedenen SL-Konzentrationen, dem PKG-Inhibitor KT5823 sowie SL mit KT5823 inkubiert. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit wurden die Zellen mit 0,05% Glutaraldehyd fixiert und mittels eines CFTR-spezifischen primären Antikörpers sowie einem Qdot-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert. Der eingezeichnete Größenbalken entspricht 20  $\mu$ m.





**Abbildung 74: Menge der Qdot-gekoppelten wt-CFTR-Moleküle in den 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen**

Nach der Immunofluoreszenzfärbung wurden die wt-CFTR-Moleküle innerhalb einer Zelle manuell gezählt und anhand des Flächeninhalts der Zelle die Anzahl der wt-CFTR-Moleküle pro  $\mu\text{m}^2$  apikale Zelloberfläche bestimmt. Die wt-CFTR-Menge nach der Inkubation mit dem PKG-Inhibitor KT5823 ( $3 \mu\text{M}$ ) sowie den verschiedenen SL-Konzentrationen wurde in Relation zur nicht mit SL inkubierten Kontrolle gesetzt. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der wt-CFTR-Anzahl durch die Inkubation mit SL. Die SL-Konzentrationen  $60 \mu\text{M}$  und  $400 \mu\text{M}$  verursachten einen signifikanten Anstieg der Anzahl von wt-CFTR Molekülen pro  $\mu\text{m}^2$  apikale Zelloberfläche im Vergleich zur nicht mit SL inkubierten Probe ( $p \leq 0,01$ ) ( $n=18$ ;  $N=3$ ).



**Abbildung 75: Effekt von KT5823 auf die SL-vermittelte wt-CFTR-Anzahl**

Der PKG-Inhibitor KT5823 reduzierte die SL-vermittelte Anzahl von wt-CFTR-Molekülen in der Plasmamembran der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen nicht signifikant ( $n=18$ ;  $N=3$ ).

## 4 Diskussion

Bei der häufigsten CFTR-Mutation  $\Delta F508$  wird das Protein aufgrund der Fehlfaltung im ER degradiert (Cheng et al. 1990). Wenn das  $\Delta F508$ -CFTR-Protein jedoch in die Plasmamembran inseriert werden kann, weist dieses eine Restleitfähigkeit auf (Denning et al. 1992). Da gezeigt werden konnte, dass bedingt durch die Restleitfähigkeit des  $\Delta F508$ -CFTR eine Insertion von 10-20% die Mukoviszidose Symptome lindern könnte, ist die Korrektur des Transportdefekts des fehlgefalteten  $\Delta F508$ -CFTR in das Interesse der Mukoviszidoseforschung gerückt (Johnson et al. 1992; Farmen et al. 2005). Diese niedermolekularen Substanzen, welche die Insertion des defekten  $\Delta F508$ -CFTR in die Membran fördern, werden auch als Korrektoren bezeichnet (Varga et al. 2008; Kreindler 2010). Zusätzlich wird nach Substanzen, auch Potentioren genannt, gesucht, welche die Restleitfähigkeit des  $\Delta F508$ -CFTR erhöhen, und so zur Linderung der CF-Symptome beitragen (Kreindler 2010).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist der PDE-5-Inhibitor SL ein Beispiel für einen Korrektor des  $\Delta F508$ -CFTR-Defekts (Dormer et al. 2005; Carlile et al. 2007; Robert et al. 2008). Darüber hinaus konnte durch nasale PD-Messungen an homozygoten  $\Delta F508$ -CFTR-Mäusen eine Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit durch eine klinische Dosis von 0,7 mg/kg (1 $\mu$ M) nachgewiesen werden. Lubamba et al. vertreten die Auffassung, dass diese SL-Wirkung durch eine Erhöhung der Restleitfähigkeit verursacht wird. Aus diesem Grund ordnen sie SL den Potentioren und nicht den Korrektoren zu (Lubamba et al. 2008). Die genaue Wirkung von SL auf den CFTR sowie die Einordnung von SL als Korrektor oder Potentiator ist somit noch Gegenstand der Diskussion. Aus diesem Grund sollte der Effekt von SL auf den wt-CFTR und  $\Delta F508$ -CFTR in zwei weiteren Modellsystemen, dem *X. laevis* Expressionssystem und humaner bronchialer Zelllinien, analysiert werden. Anhand der ermittelten Wirkung von SL könnte darauffolgend eine klare Einordnung von SL erfolgen.

Weiterhin sind bisher keine Untersuchungen zum Wirkmechanismus von SL auf den CFTR durchgeführt worden. Es wird jedoch vermutet, dass SL entweder direkt mit dem CFTR interagiert, oder wie für die Behandlung der erektilen Dysfunktion beschrieben,

über die cGMP-Signalkaskade wirkt (Dormer et al. 2005; Lubamba et al. 2008). In dieser Arbeit wurde aus diesem Grund die cGMP-Abhängigkeit des Wirkmechanismus von SL auf den CFTR untersucht.

#### **4.1 Optimierung der wt-CFTR-Expression in *X. laevis* Oozyten in Abhängigkeit von der Polyadenylierung der mRNA**

Um den Effekt von SL im *X. laevis* System zu untersuchen, waren einige Voruntersuchungen notwendig. So wurde zunächst die Expression des humanen wt-CFTR optimiert. Für die heterologe Expression exogener Proteine in den Oozyten des Krallenfrosches *X. laevis* wurde in dieser Arbeit CFTR-mRNA verwendet. Dabei ist es wie bei der natürlichen mRNA für die Expression essentiell, dass die mRNA sowohl eine Cap-Struktur als auch einen Poly(A)-Schwanz enthält. Diese Strukturen sind wichtig bei der Translation der mRNA in das kodierende Protein.

Bei der Initiation der Translation binden zunächst Initiationsfaktoren sowie die Initiator-tRNA an die kleine ribosomale Untereinheit bevor diese an die Cap-Struktur der mRNA binden kann. Im Folgenden beginnt die kleine ribosomale Untereinheit die mRNA, von der Cap-Struktur aus, nach dem mRNA-Startcodon AUG abzusuchen. Dies bedeutet, dass die Cap-Struktur ein wichtiges Element für den Beginn der Translation darstellt (Alberts et al. 2004). Sobald das Startcodon durch das komplementäre Anti-Codon der Initiations-tRNA erkannt wird, bindet die große ribosomale Untereinheit an den Komplex und die Translation der mRNA beginnt. Dabei katalysiert die große Untereinheit die Polypeptidbindung zwischen den einzelnen Aminosäuren, die durch die Anti-Codons der tRNA spezifisch an die mRNA im Ribosom binden. Diese Verlängerung der Polypeptidkette wird fortgesetzt bis das Ende der kodierenden Sequenz der mRNA erreicht ist, welche durch ein Stoppcodon charakterisiert ist. Die Polyadenylierung hat dagegen eine große Funktion bei der Effizienz der Translation. Durch die Bindung des Proteins PABP (Poly(A)-Bindeprotein) an den Poly(A)-Schwanz kommt es zu einer Wechselwirkung des Poly(A)-Schwanzes mit der Cap-Struktur der mRNA, wodurch eine mRNA-Schleife gebildet wird. Aufgrund dessen befindet sich das Ribosom nach der Freisetzung des fertiggestellten Proteins direkt

wieder in einer guten Ausgangsposition, um an die Cap-Struktur zu binden und von neuem mit der Translation dieser mRNA zu beginnen (Yamamoto et al. 2009). Außerdem spielt die Polyadenylierung eine Rolle bei der Regulation der Halbwertszeit der mRNA, da die Polyadenylierung eine Degradierung der mRNA durch Exonukleasen verhindert. (Colgan und Manley 1997). Ein Beispiel für die große Bedeutung der Polyadenylierung gaben Huez et al., die im *X. laevis* Oozyten Expressionssystem die Translationsrate von Globin-mRNA mit und ohne einen Poly(A)-Schwanz verglichen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die mRNA ohne Poly(A)-Schwanz in der ersten Stunde nach der Injektion genau so oft translatiert wird wie die mRNA mit Poly(A)-Schwanz. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden war die Translationsrate jedoch um 76% reduziert (Huez et al. 1974).

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Abhängigkeit der wt-CFTR-Expression von den Polyadenylierungslängen 20, 70 und 120 getestet. Da die ermittelten Werte für die cAMP-Reaktion der CFTR-A20-exprimierenden Oozyten sich nicht signifikant von denen der nicht-injizierten Kontrolloozyten unterschieden, konnte keine Expression der CFTR-A20-mRNA in den Oozyten erreicht werden (Abb. 28-30). Dies ist entweder durch eine zu geringe Länge des Poly(A)-Schwanzes oder durch einen Fehler bei der Herstellung der mRNA erklärbar. Da jedoch die Qualität der mRNA-Varianten vor der Injektion überprüft und nur nicht-degradierte mRNA in die Oozyte injiziert wurde, ist es wahrscheinlich, dass eine Polyadenylierung von 20 Adeninen in den Oozyten nicht ausreichend ist, um eine messbare CFTR-Expression zu erreichen. Ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die gebräuchlichen Plasmidvektoren zur Herstellung der mRNA mindestens einen Poly(A)-Schwanz von 30 Adeninen aufweisen (z.B.(Hoffman und Donaldson 1988)).

Weiterhin konnte für die CFTR-A70-mRNA in den Oozyten eine durchschnittliche Stromerhöhung nach der Applikation von cAMP von 1048 nA gemessen werden, während für die CFTR-A120-exprimierenden Oozyten ein signifikant höherer cAMP-vermittelter Stromanstieg von 1999 nA ermittelt werden konnte (siehe Abb. 28). Ähnliche Tendenzen konnten auch für die Leitfähigkeit und die Kapazität gemessen werden (Abb. 29 und 30). Daraus kann geschlossen werden, dass je länger die Polyadenylierung der CFTR-mRNA ist, desto höher ist auch die Expression des wt-

CFTR in den *X. laevis* Oozyten. Diese Daten stehen im guten Einklang mit Untersuchungen von Holtkamp et al., welche GFP-gekoppelte mRNA mit unterschiedlichen Poly(A)-Schwänzen von 16-120 Adeninen in dendritische Zellen einbrachten. Dabei konnte die höchste Fluoreszenz und damit die höchste Expression bei einer Polyadenylierung von 120 Adeninen nachgewiesen werden (Holtkamp et al. 2006). Wie bereits erwähnt, ist die Abhängigkeit der Proteinexpression von der Polyadenylierungslänge mit einer Verzögerung der Degradierung des zu translatierenden Bereichs der mRNA erklärbar (Holtkamp et al. 2006). Die Degradierung dieses Bereichs wird erst initialisiert, wenn der Poly(A)-Schwanz durch Deadenylasen auf eine Länge von 12 Adeninen verkürzt wurde (Yamamoto et al. 2009). Eine in dieser Arbeit nicht untersuchte Frage ist jedoch, ob die Expressionsstärke des wt-CFTR in den Oozyten mit einem Poly(A)-Schwanz von mehr als 120 Adeninen weiterhin ansteigt. Für eukaryotische mRNA wurde meist eine Länge des Poly(A)-Schwanzes von 100-250 Nukleotiden nachgewiesen (Yamamoto et al. 2009). Ein Poly(A)-Schwanz von ca. 250 Adeninen würde jedoch zu einem sehr langen kodierenden Bereich der CFTR-mRNA führen, da es sich bei dem CFTR mit 4443 bp um ein sehr großes Transkript handelt. Dies könnte möglicherweise zu einem verfrühten Ablösen der Polymerase während der *in vitro*-Transkription (IVT) führen und ist daher kaum umsetzbar. Bei der IVT wird aufgereinigte Plasmid-DNA als Matrize zur Synthese von mRNA verwendet. Die genutzte T7-RNA-Polymerase bindet dabei an eine spezifische T7-Promotorsequenz und transkribiert darauffolgend den Bereich der linearisierten DNA 5'-wärts von der Promotorbindestelle.

Aufgrund dieser möglichen Problematik war das Ziel dieser Untersuchung eine maximale Expression bei minimaler Transkriptlänge zu erreichen. Da die in dieser Arbeit verwendete CFTR-A120-mRNA sowohl im *X. laevis* Expressionssystem als auch in ersten Transfektionsexperimenten dieser CFTR-mRNA in humanen bronchialen Epithelzellen (Bangel-Ruland et al. 2010) eine starke wt-CFTR-Expression zeigte, wurde dieses Ziel erreicht und die CFTR-A120-mRNA genutzt.

## 4.2 Nachweis der PDE-5 in *X. laevis* Oozyten

Im Krallenfrosch *X. laevis* erfolgte der Nachweis der endogenen Expression der PDE-5 bisher nur in der Milz (*accession number* NM\_001094802; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Klein et al. 2002). In den *X. laevis* Oozyten ist dagegen nur die PDE-3 nachgewiesen worden (Sadler 1991). Um zu untersuchen, ob die PDE-5 ebenfalls endogen in der Oozyte exprimiert wird, wurde die PDE-5 anhand von Gesamt-RNA der Oozyten zunächst amplifiziert (RT-PCR), dann kloniert und sequenziert. In einem Alignment der erhaltenen Sequenz mit der bereits veröffentlichten Sequenz aus der Milz konnte festgestellt werden, dass die Sequenzen identisch sind (Abb. 32). In dieser Arbeit konnte folglich klar die endogene Expression der PDE-5 in den Oozyten des Krallenfrosches *X. laevis* gezeigt werden. Somit ist die PDE-5 zusätzlich zur Milz auch in den Oozyten des Krallenfrosches exprimiert. Diese endogene Expression der PDE-5 ist die Grundlage der Wirkung von SL in den Oozyten. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die Wirkung von SL im heterologen Expressionssystem der *X. laevis* Oozyte möglich ist, und so im Folgenden der Effekt von SL auf den CFTR in diesem Expressionssystem untersucht werden konnte.

## 4.3 Einfluss von SL auf den CFTR

Durch vorangegangene Studien wurde eine korrigierende Wirkung von SL auf den  $\Delta F508$ -CFTR in primären humanen Nasenepithelzellen von CF-Patienten nachgewiesen (Dorner et al. 2005). Weiterhin wurde eine Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit nach Applikation von SL festgestellt und aufgrund dessen eine potenzierende Wirkung von SL auf den  $\Delta F508$ -CFTR postuliert (Lubamba et al. 2008). In dieser Arbeit wurde nun die Wirkung von SL auf den  $\Delta F508$ -CFTR und den wt-CFTR in zwei weiteren Modellsystemen genauer untersucht. Zum einen wurde das heterologe Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten und zum anderen immortalisierte humane bronchiale Epithelzellen verwendet. Dies kann Aufschluss darüber geben, ob SL in diesen Modellsystemen als Korrektor, Potentiator oder beides agiert. Da es sich um sehr unterschiedliche Modellsysteme handelt, werden die Effekte von SL auf den CFTR in den beiden Modellsystemen zunächst getrennt voneinander diskutiert und abschließend zusammengefasst.

### 4.3.1 Wirkung von SL auf den CFTR im heterologen Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten

Im Modellsystem der *X. laevis* Oozyten erfolgte die Untersuchung der SL-Wirkung auf den exprimierten CFTR durch die Aktivierung mittels eines cAMP/IBMX-Cocktails in VC-Messungen nach der Injektion von SL. Die Möglichkeit der Aktivierung des wt-CFTR durch den sekundären Botenstoff cAMP und dem PDE-4-Inhibitor IBMX wurde in VC-Messungen bereits hinreichend gezeigt (Weber et al. 1999; Weber et al. 2001). In den durchgeführten Studien konnten zwei unterschiedliche Effekte von cAMP auf den wt-CFTR nachgewiesen werden. Zum einen aktiviert cAMP den bereits in der Plasmamembran inserierten wt-CFTR durch die Phosphorylierung der R-Domäne (Anderson et al. 1991). Darüber hinaus vermittelt cAMP den Einbau des CFTR in die Plasmamembran durch die PKA-abhängige Verschmelzung von Vesikeln mit der Plasmamembran (Weber et al. 1999; Ameen et al. 2003). Dies ist in VC-Messungen der Oozyten anhand einer Kapazitätserhöhung messbar, da die Membrankapazität ein Maß für die Größe der Membranoberfläche der Oozyte ist (Weber et al. 1999).

Unter anderem wurde in dieser Arbeit nun untersucht, ob SL die cAMP-Reaktion sowie die cAMP-vermittelte Insertion des  $\Delta F508$ -CFTR beeinflusst. Vor der Injektion von SL konnte für den exprimierten  $\Delta F508$ -CFTR keine Aktivierung durch cAMP/IBMX ermittelt werden (Abb. 34 und 36). Der  $\Delta F508$ -CFTR wies in diesem System somit keine Restleitfähigkeit auf. Dies stimmt mit den Daten von Weber et al. überein, die in VC-Messungen von  $\Delta F508$ -CFTR-exprimierenden Oozyten ebenfalls keinen cAMP/IBMX-vermittelten Anstieg der Messparameter Strom, Leitfähigkeit und Membrankapazität messen konnten (Weber et al. 1999). Ebenso konnte auch an bronchialen, primären CF-Zellen mittels Einzelkanalmessungen gezeigt werden, dass die Applikation von cAMP keine Reaktion und damit keine Aktivierung des  $\Delta F508$ -CFTR vermittelt (Frizzell et al. 1986). Der  $\Delta F508$ -CFTR wird in den *X. laevis* Oozyten somit wahrscheinlich ebenfalls durch die ER assoziierte Degradierung (ERAD) abgebaut, anstatt in die Plasmamembran exozytiert zu werden (Cheng et al. 1990), wodurch kein messbarer, cAMP-abhängiger  $\text{Cl}^-$ -Strom erreicht wird. Die Expression des  $\Delta F508$ -CFTR in *X. laevis* Oozyten stellt somit ein gut geeignetes Modellsystem für die Untersuchung des SL-Effekts dar.

Nach der Injektion von SL konnte ein ~13-fach erhöhter cAMP-vermittelter Strom (Abb. 36) und ein ~14-facher Anstieg der Leitfähigkeit ermittelt werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass SL eine messbare Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit des ΔF508-CFTR ermöglicht. Die Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit beträgt dabei 21,7% verglichen mit der Aktivierung des wt-CFTR durch cAMP. Diese Ergebnisse stehen im guten Einklang mit der Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit im ΔF508-CFTR-Mausmodell durch SL, welche eine Stunde nach der Applikation von 1 μM SL durch nasale PD-Messungen, ermittelt werden konnte (Lubamba et al. 2008).

Für die ΔF508-CFTR-exprimierenden Oozyten konnte durchschnittlich kein Kapazitätsanstieg nach der Applikation des cAMP/IBMX-Cocktails gemessen werden. Somit konnte innerhalb der VC-Messungen keine Exozytose von ΔF508-CFTR-Molekülen nachgewiesen werden. Die ermittelte Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit durch SL kann somit über eine Nutzung der Restleitfähigkeit bereits inserierter Kanäle oder durch die Exozytose des ΔF508-CFTR im Zeitraum nach der SL-Injektion bis zur VC-Messung hervorgerufen werden. Die Erhöhung der Restleitfähigkeit erscheint allerdings eher unwahrscheinlich, da in den ΔF508-CFTR-exprimierenden Oozyten kein Unterschied zu den Kontrolloozyten und somit keine Restleitfähigkeit nachgewiesen wurde, welche durch SL potenzierbar wäre. Aus diesem Grund wurde versucht, die Kapazität der ΔF508-CFTR-exprimierenden Oozyten direkt nach der SL-Injektion zu messen. Dies war jedoch nicht erfolgreich, da die Oozyten entweder nach der zweistündigen Kapazitätsmessung oder aber nach dem darauffolgenden Klemmen des Membranpotentials auf -60 mV nicht mehr verwendbar waren. Somit konnte mit dieser Methode keine abschließende Aussage getroffen werden, ob SL eine Exozytose des ΔF508-CFTR fördert. Die Analyse, ob die Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit durch die SL-vermittelte Exozytose erlangt wird, sollte somit in zukünftigen Untersuchungen beleuchtet werden.

In einer weiteren Untersuchung wurde der Effekt von SL auf den wt-CFTR analysiert. Dabei konnte in den VC-Messungen der wt-CFTR-exprimierenden Oozyten durchschnittlich eine Stromerhöhung um das 2,8-fache, sowie ein Anstieg der Leitfähigkeit um das 2,4-fache registriert werden. SL erhöht somit ebenfalls die



Aktivierung des wt-CFTR in diesem System um ein Vielfaches. Diese Daten stehen im guten Einklang mit einer vorangegangenen Studie an wt-Mäusen. Diesen Mäusen wurde zunächst intraperitoneal SL (1  $\mu\text{M}$ ) injiziert. Bereits nach einer Stunde konnte eine aktivitätssteigernde Wirkung von SL auf den wt-CFTR durch die Applikation von Forskolin, welches die cAMP-bildende Adenylatzyklase aktiviert, in nasalen PD-Messungen festgestellt werden (Lubamba et al. 2008). Die in dieser Arbeit ermittelten Befunde für den wt-CFTR im heterologen Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten und die Daten von Lubamba et al. weisen somit darauf hin, dass SL als Potentiator des wt-CFTR wirkt.

Zusätzlich zu dem aktivitätssteigernden Effekt konnte ein SL-vermittelter 3,1-facher Anstieg der Membrankapazität nach der Applikation des cAMP/IBMX-Cocktails gemessen werden. Dies weist wie bereits beschrieben auf eine Insertion des CFTR in die Plasmamembran hin. In einer vorangegangenen Studie konnte die cAMP-vermittelte Exozytose durch den PKA-Inhibitor H8 gehemmt werden und so spezifisch nachwiesen werden, dass cAMP eine Insertion von CFTR-Molekülen in die Membran verursacht (Weber et al. 1999). Aus diesem Grund wurde der PKA-Inhibitor auch in der vorliegenden Arbeit genutzt, um nachzuweisen, ob der SL-vermittelte Kapazitätsanstieg ebenfalls auf eine Insertion von CFTR-Molekülen in die Membran der Oozyte zurückzuführen ist. Die Inkubation der Oozyten mit 30  $\mu\text{M}$  H8 vor und nach der Injektion von SL führte zu einer 54%-igen Reduktion des SL-Effekts auf die Kapazität. Offensichtlich fördert SL somit den Einbau von wt-CFTR-Molekülen in die Oozytenmembran. Es muss hierbei jedoch angemerkt werden, dass in den durchgeführten Messungen eine H8-Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  angewendet wurde, während Weber et al. nur 20  $\mu\text{M}$  H8 nutzten (Weber et al. 1999). Diese Konzentration war notwendig, da bei 20  $\mu\text{M}$  H8 die Exozytose nicht vollständig gehemmt werden konnte. Da die Oozyten die Inkubation mit 30  $\mu\text{M}$  H8 überlebten (visueller Nachweis) und in anderen Studien bereits erfolgreich eine Konzentration von bis zu 100  $\mu\text{M}$  H8 an *X. laevis* Oozyten angewendet wurde, scheint dies jedoch kein Problem darzustellen (Sullivan et al. 1995). Die in dieser Arbeit gezeigte SL-vermittelte wt-CFTR-Exozytose wurde bisher noch nicht beschrieben. Dieses Ergebnis ist ein starkes Indiz gegen die von Dormer et al. postulierte Vermutung, dass SL spezifisch die Insertion des mutierten

CFTR-Proteins in die Plasmamembran stimuliert (Dormer et al. 2005). SL stimuliert somit nicht nur wie bereits beschrieben das *trafficking* des  $\Delta F508$ -CFTR, sondern fördert auch die Exozytose des wt-CFTR. In humanen embryonalen Nierenzellen konnte durch *pulse chase* Experimente mit radioaktiv markierten CFTR-Molekülen nachgewiesen werden, dass 75% der wt-CFTR-Moleküle ebenso wie 99% der fehlgefalteten  $\Delta F508$ -CFTR-Moleküle im ER verbleibt und dort proteasomal abgebaut wird (Ward und Kopito 1994). Eine Vermutung ist nun, dass SL ebenso wie für den  $\Delta F508$ -CFTR beschrieben, den Abbau des wt-CFTR-Proteins verhindert, dessen Transport aus dem ER ermöglicht, und so die erhöhte Exozytose des wt-CFTR in die Plasmamembran stimuliert.

Dass die Applikation der Substanzen H8 und SL, aber auch der Inhibitoren KT5823 und ODQ, welche in nachfolgenden Experimenten verwandt wurden, die ermittelten Daten und die daraus resultierenden Aussagen nicht verfälschen, wurde in Kontrollexperimenten nachgewiesen. Es wäre prinzipiell möglich, dass die nachgewiesenen Effekte der Substanzen nicht durch eine Wirkung auf den CFTR, sondern durch einen Effekt auf die endogenen Transportmechanismen der Oozyte verursacht wurden. Aus diesem Grund wurden nicht-injizierte Kontrolloozyten ebenfalls mit den Substanzen inkubiert, oder im Falle des SL mit diesen injiziert. Da die ermittelten Änderungen der elektrophysiologischen Parameter keinen signifikanten Unterschied zu den nicht-inkubierten Kontrolloozyten zeigten und außerdem signifikant unterschiedlich zu den wt-CFTR-exprimierenden Oozyten sind, ist wie erwartet kein Effekt der Substanzen auf die endogenen Transporteigenschaften der Oozyte nachweisbar (Abb.46). Die so erhaltenen Ergebnisse zeigen somit deutlich, dass die zuvor beschriebenen Daten der CFTR-exprimierenden Oozyten spezifisch für den CFTR sind.

### 4.3.2 Wirkung von SL auf den CFTR in funktionalen Messungen von humanen bronchialen Epithelzellen

Um den Effekt von SL zusätzlich zu den Experimenten im *X. laevis* Expressionssystem in einem für Mukoviszidose relevanteren Modellsystem zu untersuchen, wurden humane Epithelzellen genutzt. Da Mukoviszidose besonders im respiratorischen Trakt schwerwiegende Symptome verursacht, wurden die Zellen der 16HBE14o<sup>-</sup> und CFBE41o<sup>-</sup>-Zelllinien verwandt, welche die Situation in dem jeweiligen Gewebe widerspiegeln. Die Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> wurde aus den Bronchien eines einjährigen CF-Patienten generiert und auch die 16HBE14o<sup>-</sup>-Zelllinie entstammt der menschlichen Lunge, jedoch der eines nicht CF-Betroffenen (Gruenert et al. 2004). Aufgrund dieser Eigenschaften wird die Zelllinie 16HBE14o<sup>-</sup> oft als Kontrolle für die CFBE41o<sup>-</sup>-Zelllinie genutzt. Beide Zelllinien werden seit Jahren zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Mukoviszidose sowie möglicher Therapiemöglichkeiten verwendet (Dragomir et al. 2004; Ehrhardt et al. 2006). Weiterhin eignen sich diese beiden Zelllinien besonders für elektrophysiologische Untersuchungen, da beide *in vitro* polarisierte und durch die Ausbildung von *tight junctions* dichte Epithelstrukturen bilden (Gruenert et al. 2004).

Die initialen Widerstände für die in dieser Arbeit kultivierten Monolayer der Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> lagen bei 333  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Dies stimmt mit den in der Literatur angegebenen Werten von ca. 100-500  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  sehr gut überein (Gruenert et al. 2004). Auch der initiale Widerstand der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen lag mit 389  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  im Bereich des Literaturwertes von 200-1000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Gruenert et al. 2004). Diese hohen initialen Widerstände bestätigen somit, dass die Zellen auf den Filtern dichte Monolayer bilden und die Ionen Transporte somit wahrscheinlich vorwiegend transzellulär erfolgen, was auf eine Ausbildung von funktionellen Zellkontakten durch *tight junctions* zurückzuführen ist (Ehrhardt et al. 2006). Es ist somit ersichtlich, dass auch die im Rahmen dieser Arbeit kultivierten Monolayer sich gut für elektrophysiologische Messungen in der Ussing Kammer eignen.

Vor der Untersuchung der Wirkung von SL auf den  $\Delta F508$ -CFTR in CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen mittels Ussing Kammer Messungen wurde analysiert, ob der  $\Delta F508$ -CFTR in diesem Modellsystem eine Restleitfähigkeit aufweist, bzw. der  $\Delta F508$ -CFTR in die Membran

inseriert wird. Dazu wurde ein Cocktail aus cAMP/IBMX appliziert. Nach dessen Applikation konnte ein minimaler Stromanstieg von durchschnittlich  $0,64 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ermittelt werden (Abb. 52).

Der  $\Delta\text{F508}$ -CFTR wies somit in den kultivierten CFBE410<sup>-</sup>-Zellen eine geringe Cl<sup>-</sup>-Restleitfähigkeit auf, da der Stromanstieg durch den spezifischen CFTR-Inhibitor CFTR<sub>inh</sub>-172 blockierbar war. Dies bedeutet, dass ein geringer Teil der fehlgefalteten Proteine nicht im ER durch das Proteasom degradiert wird, sondern die Plasmamembran erreicht. Dort vermittelt der fehlgefaltete CFTR-Kanal eine geringe Cl<sup>-</sup>-Sekretion (Denning et al. 1992), welche gerade noch elektrophysiologisch messbar ist. Schlussfolgernd lässt sich somit festhalten, dass cAMP zu einem sehr geringen Anstieg des Stroms und damit der Aktivität des  $\Delta\text{F508}$ -CFTR führt.

Die Applikation von SL in den Konzentrationen  $45 \mu\text{M}$ ,  $60 \mu\text{M}$ ,  $200 \mu\text{M}$  und  $400 \mu\text{M}$  resultierte in einem konzentrationsabhängigen Anstieg des Stroms, der Leitfähigkeit und der Kapazität in den CFBE410<sup>-</sup>-Messungen (Abb. 53 und 55). Dabei konnte die größte Stromerhöhung mit  $112 \pm 22,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  bei  $60 \mu\text{M}$  SL gemessen werden. Somit scheint bei der SL-Konzentration von  $60 \mu\text{M}$  SL ein Maximum erreicht zu sein. Eine andere Möglichkeit ist, dass die niedrigere Wirkung von  $200 \mu\text{M}$  und  $400 \mu\text{M}$  SL auf die leicht reduzierte Löslichkeit zurückzuführen ist. Ab einer Konzentration von  $200 \mu\text{M}$  war die Löslichkeit des SL in ZK-Ringer verringert, so dass ein weißer Niederschlag ausfiel. Die Zugabe von 9% DMSO zu diesen Lösungen verringerte den Niederschlag zwar, jedoch konnte dieser nicht vollständig vermieden werden. Da aber in den Western Blot Untersuchungen (vollständige Löslichkeit des SL, da sich dieser Niederschlag nur im ZK-Ringer bildete) ebenfalls ein Maximum bei  $60 \mu\text{M}$  SL erreicht wurde, könnte es sich bei  $60 \mu\text{M}$  tatsächlich um ein Wirkmaximum von SL in den CFBE410<sup>-</sup>-Zellen handeln.

Ob der durch SL vermittelte Anstieg der elektrophysiologischen Parameter Strom und Leitfähigkeit auf eine Aktivierung des  $\Delta\text{F508}$ -CFTR zurückzuführen ist, wurde durch die Applikation des CFTR<sub>inh</sub>-172 untersucht. Dies ist ein in *high throughput screenings* identifizierter spezifischer Inhibitor für den CFTR (Ma et al. 2002). Die Wirkung des

Inhibitors beruht auf einer Verlängerung des geschlossenen Zustands des CFTR. Der genaue Mechanismus und die Bindestelle des CFTR<sub>inh</sub>-172 wurden bisher jedoch noch nicht identifiziert. Es ist nur bekannt, dass die Aminosäure Arginin an der Position 347 (Arg<sup>347</sup>) eine wichtige Rolle bei der Bindung des Inhibitors an den CFTR spielt (Caci et al. 2008). Entweder interagiert diese Aminosäure direkt mit dem CFTR<sub>inh</sub>-172 oder es kommt durch die Wechselwirkung zu einem allosterischen Effekt, wodurch eine Bindung des CFTR<sub>inh</sub>-172 an den CFTR erreicht wird (Caci et al. 2008). In dieser Arbeit blockierte dieser CFTR-spezifische Inhibitor (10 µM) je nach SL-Konzentration zwischen 20% (200 µM SL) und 111% (400 µM SL) der Stromerhöhung in den CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen (Abb. 54). Die sehr unterschiedlich starken und vor allem zum Teil sehr geringen Inhibitionen erlauben keine endgültige Aussage, ob der Anstieg auf eine Aktivierung des CFTR zurückzuführen ist. Es ist somit möglich, dass ein Teil des SL-vermittelten Anstiegs auf einen CFTR-unabhängigen Effekt zurückzuführen ist. Es erscheint jedoch sehr wahrscheinlich, dass SL eine Aktivierung des ΔF508-CFTR verursacht, da in einer vorangegangenen Studie ebenfalls mit CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen die Aktivierung des ΔF508-CFTR durch den CFTR<sub>inh</sub>-172 in einer höheren Konzentration (100 µM anstatt 10 µM) ebenfalls nicht zu 100% inhibiert werden konnte (Jurkuvenaite et al. 2010). Zusätzlich konnte in weiteren Experimenten in unserem Labor in VC-Messungen mit *X. laevis* Oozyten (W.-M. Weber; *personal communication*), in *patch clamp* Studien mit humanen Darmzellen (HT29/B6) (Semmler et al. 2009) sowie in funktionalen Ussing Kammer Messungen mit 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen (W.-M. Weber; *personal communication*), nicht annähernd eine 100%-ige Inhibierung des CFTR mit dem CFTR<sub>inh</sub>-172 erreicht werden.

Somit scheint die Stromerhöhung sowie der Anstieg der Leitfähigkeit darauf hinzuweisen, dass SL den ΔF508-CFTR aktiviert und so die ermittelte Restleitfähigkeit durch den PDE-5-Inhibitor SL um ein Vielfaches erhöht wurde. Dabei übersteigt die Aktivierung des ΔF508-CFTR durch 30 µM SL bereits die cAMP-vermittelte Aktivierung des wt-CFTR in den 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen, welche wie bereits erwähnt, als Kontrolle dienen. Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass SL die Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit der CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen wiederherstellt.

Diese Ergebnisse stehen im guten Einklang mit Untersuchungen an humanen ΔF508-CFTR-Nasenepithelzellen sowie an Hamsternierenzellen (BHK-Zellen). Dort konnte

mithilfe von radioaktiv markierten Iodionen, welche ebenfalls durch die CFTR-Pore geleitet werden, eine signifikante Wiederherstellung des Iodid Stroms über den  $\Delta F508$ -CFTR nach einer zweistündigen bzw. 24 h Inkubation mit 1 mM SL nachgewiesen werden (Dormer et al. 2005; Carlile et al. 2007). Somit agiert SL in den humanen bronchialen Epithelzellen als Potentiator des  $\Delta F508$ -CFTR.

In dieser Arbeit konnte ein SL-vermittelter Kapazitätsanstieg ab einer Konzentration von 45  $\mu\text{M}$  gemessen werden. Wie bereits für die VC-Messungen beschrieben, weist dies auf eine Insertion des  $\Delta F508$ -CFTR in die Plasmamembran hin. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass SL auch in diesem Modell als Korrektor agiert.

Darüber hinaus wurde der Effekt von SL auf den wt-CFTR bisher nur in wenigen Studien untersucht. Cobb et al. konnten in funktionalen Ussing Kammer Messungen mit der bronchialen Epithelzelllinie Calu-3 eine Aktivierung des wt-CFTR durch SL nachweisen. Nach der Applikation von 20 und 200  $\mu\text{g/ml}$  (umgerechnet 29 und 290  $\mu\text{M}$ ) SL konnte eine Stromerhöhung gemessen werden, welche bis zu 35% der Aktivierung des wt-CFTR durch Forskolin entspricht (Cobb et al. 2003). Somit konnte in funktionalen Messungen bereits ein Effekt von SL auf den wt-CFTR ermittelt werden. Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit mit der wt-CFTR-Zelllinie 16HBE14o<sup>-</sup> ebenfalls in funktionalen Messungen in der Ussing Kammer genauer untersucht und so die SL-Wirkung auf den wt-CFTR eingegrenzt, indem der Effekt verschiedener SL-Konzentrationen (45  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$ ) gemessen wurde. Auch in diesen Messungen konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Messparameter Strom, Leitfähigkeit und Kapazität ermittelt werden (Abb. 59). Besonders auffällig war dabei, dass die SL-Konzentrationen 200  $\mu\text{M}$  SL (3,9-fache Erhöhung) und 400  $\mu\text{M}$  (15-fache Steigerung) eine signifikant höheren Stromanstieg hervorriefen als cAMP (Abb. 60). Durch die spezifische Inhibition (40% (45  $\mu\text{M}$  SL) - 134% (200  $\mu\text{M}$  SL); Abb. 61) des Stromanstiegs mittels des CFTR<sub>inh</sub>-172 wurde auch in diesen Messungen sichergestellt, dass die SL-vermittelte Stromerhöhung auf eine Aktivierung des wt-CFTR zurückzuführen ist. Die in dieser Arbeit ermittelte Aktivierung des wt-CFTR scheint somit tendenziell mit dem bereits beschriebenen

aktivierenden Effekt von SL auf den wt-CFTR in Calu-3-Zellen übereinzustimmen (Cobb et al. 2003). Jedoch scheint die Applikation von SL in der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zelllinie eine höhere Aktivierung des wt-CFTR hervorzurufen als in den Calu-3-Zellen. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf eine zelltypabhängige Wirkung von SL zurückzuführen. So konnte für einige Potentioren (P8-10) eine sehr unterschiedliche Effizienz in zwei verschiedenen Zelllinien (FRT- und A549-Zellen) nachgewiesen werden, die von den Autoren auf den Einfluss des zellulären Hintergrunds zurückgeführt wurden (Pedemonte et al. 2010). So zeigte sich, dass der Potentiator P9 in den durchgeführten *pulse chase* Experimenten sehr effizient in den Ratten Schilddrüsenzellen (FRT; *Fischer rat thyroid*) wirkte, während diese Substanz in der humanen Lungenzelllinie (A549) keinen signifikanten Effekt zeigte. Somit kann möglicherweise auch der Unterschied in der Wirkung von SL in den 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen und den Calu-3-Zellen auf den zellulären Hintergrund zurückgeführt werden. Eine mögliche Erklärung könnte dabei sein, dass die Calu-3-Zellen unter *air liquid interface* Bedingungen kultiviert wurden. Unter diesen Bedingungen befindet sich auf der apikalen Plasmamembran kein Medium. Aufgrund dessen bilden die Zellen einen Mukus aus, welcher der apikalen Membran aufliegt. Da auch im respiratorischen Trakt ein Mukus ausgebildet wird, entspricht diese Kultivierung der physiologischen Situation. Jedoch könnte die Ausbildung des Mukus einen Effekt auf die Aufnahme des SL haben, so dass intrazellulär nicht so hohe SL-Konzentrationen erreicht werden und so der SL-Effekt in den Calu-3-Zellen geringer ist als in den 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen. Insgesamt legen die hier ermittelten Ergebnisse sowie die bereits veröffentlichten Daten von Cobb et al. nahe, dass SL die Aktivität des wt-CFTR erhöht und SL somit zusätzlich als ein Potentiator des wt-CFTR fungiert (Cobb et al. 2003). Außerdem konnte keine Erhöhung der Kapazität gemessen werden, so dass zumindest in dieser kurzen Inkubationszeit der Zellen mit SL keine Exozytose von wt-CFTR-Molekülen erfolgte.

In Kontrollmessungen wurde der Effekt des zur SL-Löslichkeit zugefügten DMSO (9%) untersucht. Dabei konnte ein Anstieg aller drei Messparameter sowohl in den CFBE41o<sup>-</sup>, aber auch in den 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen, ermittelt werden. DMSO scheint somit einen Effekt auf den Kurzschlussstrom, die Leitfähigkeit und die Kapazität zu haben.

Der reziproke Wert der Leitfähigkeit spiegelt nach dem Ohmschen Gesetz den Widerstand des Epithels wieder. Es konnte somit ein Absinken des transepithelialen Widerstandes nach der Zugabe von DMSO ermittelt werden. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass 9% DMSO zelltoxisch auf die Zellen wirkte und so die Dichtigkeit des Monolayers nicht mehr gegeben war. In einer Studie mit einer humanen Darmzelllinie (Caco2/TC7) konnte jedoch ein DMSO-vermittelter Zelltod erst ab einer Konzentration von 20% DMSO nachgewiesen werden (Da et al. 2002). Zusätzlich zu den Ergebnissen dieser Studie konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der DMSO-Effekt reversibel ist, und die Zellen nach dem Auswaschen des DMSO wieder höhere transepitheliale Widerstände ausbildeten. Somit spricht dies gegen eine mögliche Zelltoxizität des DMSO, zumindest in diesen geringen Konzentrationen. Diese direkten reversiblen Reaktionen des Kurzschlussstroms, der Leitfähigkeit und der Kapazität auf die Zugabe von DMSO sind bisher noch nicht beschrieben worden. Das Phänomen wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt, sondern in der Auswertung berücksichtigt, indem der DMSO-vermittelte Anstieg der Parameter von den SL-vermittelten Messwerten subtrahiert wurde. Welchen genauen Effekt DMSO nun auf die elektrophysiologischen Parameter der verwendeten Zelllinien hat, sollte somit in nachfolgenden Experimenten näher untersucht werden.

### **4.3.3 Untersuchung der SL-Wirkung auf den CFTR in humanen bronchialen Epithelzellen durch Western Blot Analysen**

Inwiefern SL die wt-CFTR- (16HBE14o<sup>-</sup>) und die  $\Delta$ F508-CFTR-Proteinexpression (CFBE41o<sup>-</sup>) beeinflusst, wurde unter anderem in semi-quantitativen Western Blot Analysen untersucht. Dabei ermöglichte das genutzte Proteinisolutions-Kit die Plasmamembranproteine getrennt von den zytosolischen Proteinen zu isolieren. Somit kann eine Aussage getroffen werden, ob SL die Exozytose der beiden CFTR-Varianten stimuliert. Nur die in die Plasmamembran inserierten CFTR-Moleküle werden in der Membranproteinfraction detektiert. Durch die Immunodetektion mit dem spezifischen CFTR-Antikörper konnte in den Membranproteinfractionen beider Zelllinien eine distinkte Bande auf einer Höhe von ca. 170 kDa detektiert werden (Abb. 64). Dies stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Größe für das glykolisierte CFTR-Protein (168 kDa) überein (Riordan et al. 1989). Da auch in den CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen eine geringe



CFTR-Proteinmenge detektiert werden konnte, zeigt auch diese Methode, dass ein Teil der  $\Delta F508$ -CFTR-Proteine das ER verlassen können und somit in die Plasmamembran inseriert werden. Durch die densitometrische Auswertung der  $\Delta F508$ -CFTR-Proteinmengen der CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen konnte eine 2,5-fache Proteinexpression nach der Inkubation mit 60  $\mu\text{M}$  SL und eine lediglich 1,7-fache Erhöhung nach der Inkubation mit 400  $\mu\text{M}$  SL im Vergleich zu den nicht-inkubierten Zellen bestimmt werden (Abb.65). SL stimulierte somit eine Insertion des  $\Delta F508$ -CFTR in die Plasmamembran. Bezieht man an dieser Stelle den Effekt der unterschiedlichen SL-Konzentrationen in den in dieser Arbeit durchgeführten Ussing Kammer Messungen mit ein, scheint von den in dieser Arbeit verwendeten SL-Konzentrationen 60  $\mu\text{M}$  ein Wirkmaximum darzustellen.

Diese Ergebnisse zeigen klar, dass SL den Transportdefekt des  $\Delta F508$ -CFTR korrigiert und somit ein Korrektor des  $\Delta F508$ -CFTR in der humanen bronchialen Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> ist. Um zu ermitteln inwiefern SL die Proteinmenge in der Membran der CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen normalisiert, wurde die Proteinmenge der SL-inkubierten  $\Delta F508$ -CFTR CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen in Relation zu der wt-CFTR-Proteinmenge der uninkubierten Kontrollzelllinie 16HBE14o<sup>-</sup> gesetzt. Dabei übersteigt die  $\Delta F508$ -CFTR-Proteinmenge nach Inkubation mit 60  $\mu\text{M}$  SL die wt-CFTR-Proteinmenge um 264%. Dieser Unterschied in der Proteinexpression ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass 75% der wt-CFTR-Proteine im ER degradiert werden (Ward und Kopito 1994). Geht man nun davon aus, dass SL den Transport der translatierten  $\Delta F508$ -CFTR-Proteine in der Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> zur Plasmamembran vermittelt, würde bei gleicher Ausgangsmenge im ER die Anzahl der exozytierten  $\Delta F508$ -CFTR-Proteine höher sein als die exozytierte wt-CFTR-Proteinmenge der nicht-inkubierten 16HBE14o<sup>-</sup>-Zelllinie. Nimmt man an dieser Stelle vorweg, dass SL auch die Insertion der wt-CFTR-Proteine der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zelllinie fördert, scheint es sich hierbei somit um einen generellen Mechanismus zu handeln.

Der Effekt von SL auf den  $\Delta F508$ -CFTR konnte in einer weiteren Studie bereits aufgezeigt werden. In BHK-Zellen konnte gezeigt werden, dass nach einer Inkubation (24 h) mit 10  $\mu\text{M}$  SL erstmals die komplex glykolysierte Form des  $\Delta F508$ -CFTR detektiert werden konnte. Vor der Inkubation mit SL wurden alle  $\Delta F508$ -CFTR-Proteine im ER degradiert, so dass kein Protein den Golgi Apparat erreichte, in dem die

komplexe Glykolisierung durchgeführt wird. Erst die Inkubation mit SL ermöglichte das Verlassen des ER und folglich auch die komplexe Glykolisierung. Anhand der Detektion des komplex glykolisierten  $\Delta F508$ -CFTR-Proteins, wurde von den Autoren geschlussfolgert, dass SL in den BHK-Zellen ebenfalls den Transportdefekt des  $\Delta F508$ -CFTR korrigiert (Carlile et al. 2007). Somit konnte sowohl anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, aber auch in der Studie von Carlile et al. gezeigt werden, dass SL als Korrektor des  $\Delta F508$ -CFTR agiert (Carlile et al. 2007).

Auch für den wt-CFTR konnte nach der Inkubation mit SL eine erhöhte Proteinexpression in den 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen bestimmt werden. Die densitometrische Auswertung zeigte eine 2,9-fache wt-CFTR-Proteinexpression nach der Inkubation mit 60  $\mu\text{M}$  SL und eine 2,0-fache Erhöhung nach der Inkubation mit 400  $\mu\text{M}$  SL (Abb.66). Offensichtlich konnte mit diesen Methoden somit klar belegt werden, dass SL eine Insertion von wt-CFTR-Molekülen in die Plasmamembran vermittelt. Dies könnte wie bereits beschrieben auf eine erhöhte wt-CFTR-Proteinmenge zurückzuführen sein, da jene zum Abbau markierten wt-CFTR-Moleküle anstatt degradiert zu werden aus dem ER in den Golgi Apparat und dann zur Plasmamembran transportiert werden.

#### **4.3.4 Untersuchung der SL-Wirkung auf den CFTR in humanen bronchialen Epithelzellen durch Immunfluoreszenzen**

Zusätzlich zu der Untersuchung des Effekts von SL auf der proteinbiochemischen Ebene mittels Western Blot wurden immunfluoreszenzoptische Untersuchungen durchgeführt. Diese Methode ermöglicht durch *Qdots*, welche an den sekundären Antikörper gekoppelt sind, die Anzahl der CFTR-Moleküle in der Plasmamembran der Zellen zu detektieren und zu quantifizieren (Lange et al. 2006). Für diese Untersuchungen wurden CFBE41o<sup>-</sup>- und 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen auf Glasdeckgläsern kultiviert und mittels des primären CFTR-Antikörpers sowie des *Qdot*-gekoppelten sekundären Antikörpers detektiert und mit Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Somit konnte eine erhöhte Anzahl von  $\Delta F508$ -CFTR-Molekülen nach der Inkubation der Zellen mit SL beobachtet werden (Abb. 70 und 71). In der Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> konnte nach der Inkubation von 60  $\mu\text{M}$  SL eine 3,6-fach erhöhte  $\Delta F508$ -CFTR-Proteinmenge bestimmt werden, während für 400  $\mu\text{M}$  SL eine 6,3-fach erhöhte

Proteinmenge im Vergleich zur nicht mit SL inkubierten Probe ermittelt werden konnte (Abb. 71). Somit wurde mit Hilfe dieser Methode ebenfalls festgestellt, dass SL die Insertion des  $\Delta F508$ -CFTR stimuliert und somit den Transportdefekt des fehlgefalteten CFTR behebt. Weiterhin übersteigt die Proteinmenge der 60  $\mu\text{M}$  und 400  $\mu\text{M}$  SL-inkubierten CFBE410<sup>-</sup>-Zellen die Menge an wt-CFTR-Molekülen in den 16HBE140<sup>-</sup>-Zellen um 131% bzw. 406% (Abschnitt 3.8.1). Die Daten der Immunofluoreszenz stimmen somit sehr gut mit den Daten aus den Western Blot Analysen überein, jedoch ist das Wirkmaximum von SL in den beiden Ansätzen unterschiedlich. So zeigte 60  $\mu\text{M}$  SL die höchste Wirkung in den Western Blot Untersuchungen, während 400  $\mu\text{M}$  SL den größten Effekt in den Immunofluoreszenzen verursachte. Ein Grund für diese Abweichung kann nicht genannt werden. Unterschiedliche Inkubations- oder Regenerationszeiten sind hierbei jedoch nicht ausschlaggebend, da in beiden Anwendungsfällen eine zweistündige Inkubation mit SL im Brutschrank erfolgte und die Zellen danach entweder direkt fixiert oder die Proteine isoliert wurden. Auch die SL-Löslichkeit ist in beiden Anwendungsfällen keine Erklärungsmöglichkeit, da SL im verwendeten Zellkulturmedium vollständig gelöst werden konnte. Der ermittelte korrigierende Effekt von SL in den Immunofluoreszenzen stimmt mit den Ergebnissen der bereits des Öfteren zitierten Studie von Dormer et al. überein (Dormer et al. 2005). Durch immunofluoreszenzoptische Untersuchungen an primären CF-Nasenepithelzellen konnte nachgewiesen werden, dass 150  $\mu\text{M}$  SL die Lokalisation des  $\Delta F508$ -CFTR in der Plasmamembran fördert. Vor der Inkubation mit SL wurde nur in ca. 10% der Zellen eine Lokalisation des  $\Delta F508$ -CFTR in der Plasmamembran detektiert, wohingegen der Prozentsatz nach der Inkubation der Zellen mit SL auf 32% stieg. Aufgrund dieser erhöhten  $\Delta F508$ -CFTR-Expression in der Plasmamembran postulierten die Autoren, dass es sich bei SL um einen CFTR-Korrektor handelt (Dormer et al. 2005). Es ist jedoch auch ersichtlich, dass bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie CFBE410<sup>-</sup> bereits eine Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  SL einen stärkeren Effekt zeigte. Die Höhe des SL-Effekts scheint somit wiederum zelltypabhängig zu sein.

Dormer et al. konnten in der beschriebenen Studie keinen Effekt von SL auf die Anzahl der in der Plasmamembran lokalisierten wt-CFTR-Moleküle detektieren. Aus diesem Grund vermuteten sie eine spezifische Wirkung von SL auf den mutierten CFTR. Dies steht im starken Kontrast zu den in dieser Arbeit ermittelten Daten. Zusätzlich zu den

Daten aus den Western Blot Analysen konnte in immunfluoreszenzoptischen Analysen ebenfalls eine Erhöhung der wt-CFTR-Proteinmenge in der Plasmamembran nach Inkubation mit SL ermittelt werden. Die Inkubation mit 60  $\mu\text{M}$  SL bewirkt eine 2,3-fache Erhöhung der wt-CFTR-Molekülmenge in der Plasmamembran (Abb. 74). 400  $\mu\text{M}$  SL erzielte sogar eine 6,7-fach erhöhte wt-CFTR-Molekülmenge. In dieser Arbeit konnte somit der Beweis erbracht werden, dass SL nach einer zweistündigen Inkubation in der wt-CFTR-Zelllinie 16HBE14o<sup>-</sup> einen stimulierenden Effekt auf die wt-CFTR-Exozytose aufweist.

#### 4.3.5 Zusammenfassung der Wirkung von SL

Sowohl im *X. laevis* Expressionssystem als auch in der humanen bronchialen Epithelzelllinie CFBE41o<sup>-</sup> konnte in funktionalen Messungen eine SL-vermittelte Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit über den  $\Delta\text{F508}$ -CFTR gemessen werden. Der Effekt in den beiden in dieser Arbeit genutzten Modellen stimmt somit sehr gut untereinander überein. Somit konnte der zunächst in *X. laevis* Oozyten ermittelte SL-Effekt auch in einem für Mukoviszidose relevanteren humanen Modellsystem nachgewiesen werden. Dies stimmt wie bereits beschrieben mit vorangegangenen Studien überein, die in verschiedenen Zelllinien sowie im  $\Delta\text{F508}$ -CFTR-Mausmodell ebenfalls eine Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit zeigen konnten (Dormer et al. 2005; Carlile et al. 2007; Lubamba et al. 2008; Lubamba et al. 2010). Somit stehen die in dieser Arbeit ermittelten Daten in guten Einklang mit der Literatur.

Weiterhin konnte sowohl in den funktionalen VC-Messungen des exprimierten wt-CFTR, als auch in den Ussing Kammer Messungen mit der wt-CFTR-Zelllinie 16HBE14o<sup>-</sup> eine aktivitätssteigernde Wirkung von SL auf den wt-CFTR ermittelt werden. Auch in diesem Fall stehen die Daten im guten Einklang mit vorangegangenen Studien (Cobb et al. 2003; Lubamba et al. 2008). Zusammengefasst zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen deutlich, dass SL als eine Substanz, welche die CFTR-Aktivität erhöht, per Definition als ein Potentiator wirkt.

Anhand der Kapazitätsmessungen der CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen in der Ussing Kammer, der Western Blot Untersuchungen und der immunfluoreszenzoptischen Analysen konnte festgestellt werden, dass SL außerdem eine Insertion von  $\Delta\text{F508}$ -CFTR-Molekülen in die Plasmamembran bewirkt. Somit stellt SL das *trafficking* des fehlgefalteten  $\Delta\text{F508}$ -

CFTR wieder her. Daher konnte in den durchgeführten Untersuchungen klar gezeigt werden, dass es sich bei SL zusätzlich auch um einen Korrektor des CFTR handelt. Bezieht man weitere vorangegangene Studien mit ein, in denen der korrigierende Effekt von SL in einer weiteren Zelllinie (BHK) sowie in primären Nasenepithelzellen bereits gezeigt werden konnte, wirkt SL in zahlreichen Modellen als CFTR-Korrektor (Dormer et al. 2005; Carlile et al. 2007). Die Wirkung eines Korrektors in verschiedenen Modellsystemen steht im Kontrast zu einer Studie von Pedemonte et al., bei der die Autoren anhand von verschiedenen Korrektoren (wie z.B. VRT-325 oder corr-4a) nachweisen konnten, dass eine mögliche Wirkung der Korrektoren vom zellulären Hintergrund abhängt. Aus diesen Daten schlossen die Autoren, dass die verwendeten Korrektoren indirekt über Proteininteraktionen auf den CFTR wirken. Für eine indirekte Wirkung der Korrektoren muss in der genutzten Zelllinie jede Komponente der zugrunde liegenden Signalkaskade exprimiert werden. Ist dies nicht der Fall zeigt der Korrektor in der Zelllinie keine Wirkung. Der Wirkmechanismus von SL wurde bis dato noch nicht untersucht. Eine Vermutung ist jedoch, dass SL direkt mit dem CFTR interagiert (Dormer et al. 2005; Lubamba et al. 2008). Somit könnte die korrigierende Wirkung von SL in verschiedenen Zelllinien auf eine direkte Interaktion mit dem CFTR hindeuten, da in diesem Fall die Wirkung unabhängig von dem zellulären Hintergrund ist.

An diesem Punkt muss jedoch auch erwähnt werden, dass SL in den verwendeten Modellsystemen nicht immer die gleiche Effektivität zeigte. So konnte die  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit des in *X. laevis* Oozyten exprimierten  $\Delta\text{F508}$ -CFTR nur zu 21,7% wiederhergestellt werden, während in den humanen Zelllinien die  $\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit und die Proteinexpression nach der Inkubation mit SL höher war, als in der nicht-inkubierten wt-CFTR-Zelllinie (16HBE14o<sup>-</sup>). Dies könnte wiederum ein Indiz für eine zelltypabhängige SL-Wirkung sein. Wenn SL wie für die Behandlung der erektilen Dysfunktion aufgezeigt über die cGMP-Signalkaskade wirkt, könnte dies z.B. über die unterschiedlichen Expressionslevel der Komponenten dieses Signalwegs erklärbar sein. So hätte z.B. eine geringe Expression der cGMP-generierenden Guanylatzyklase einen inhibierenden Einfluss auf den Effekt von SL.

Von einigen Arbeitsgruppen wurde postuliert, dass eine Wiederherstellung von 10-20% eine Linderung der Symptome der Mukoviszidose herbeiführen würde (Johnson et al.

1992; Farmen et al. 2005). Da in den durchgeführten Experimenten immer mindestens eine 21,7%-ige Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit durch SL erzielt werden konnte, scheint SL somit einen vielversprechenden Therapieansatz für die Behandlung der Mukoviszidose darzustellen, welcher unter Umständen eine Linderung der Symptome erzielen könnte.

Anhand der Kapazitätsmessungen der wt-CFTR-exprimierenden Oozyten sowie den Western Blot und immunfluoreszenzoptischen Untersuchungen mit der wt-CFTR-Zelllinie (16HBE14o<sup>-</sup>) konnte eine Stimulation der wt-CFTR-Exozytose durch SL nachgewiesen werden. Interessant ist an dieser Stelle, dass die Exozytose nicht bei den Kapazitätsmessungen der 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen jedoch in der Western Blot und immunfluoreszenzoptischen Analysen durch SL stimuliert wurde. Da die SL-Lösungen in den Ussing Kammer Messungen nur ca. 10 min appliziert wurden, handelt es sich bei der Stimulation der wt-CFTR-Exozytose somit allem Anschein nach um einen langsamen Prozess, der erst nach ca. zwei Stunden nachweisbar ist. Insgesamt konnte in dieser Arbeit in zwei verschiedenen Modellsystemen zum ersten Mal eindeutig belegt werden, dass SL eine Insertion von wt-CFTR-Molekülen in die Plasmamembran bewirkt.

Zusammengefasst zeigen die erhaltenen Daten der beiden verwendeten Modelle klar, dass SL sowohl als Potentiator aber auch als Korrektor des CFTR wirkt. Somit konnte in dieser Arbeit erstmals eine korrigierende und potenzierende Wirkung von SL innerhalb eines Modellsystems nachgewiesen werden. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, konnte eine solche doppelte Wirkung als Potentiator und Korrektor des CFTR auch für Curcumin nachgewiesen werden. Curcumin erhöht in *inside-out* Membran *patches* die Offenzeit des  $\Delta F508$ -CFTR-Kanals (Berger et al. 2005) und bewirkte eine Normalisierung der nasalen PD in  $\Delta F508$ -CFTR-Mäusen (Egan et al. 2004). Außerdem konnte eine erhöhte Menge von CFTR-Molekülen in der Plasmamembran von  $\Delta F508$ -CFTR-exprimierenden BHK-Zellen durch Curcumin Inkubation nachgewiesen werden (Egan et al. 2004). Diese Effekte von SL konnten allerdings in einer weiterführenden Studie mit primären Nasenepithelzellen nicht bestätigt werden (C. Rückes-Nilges; *personal communication*).

Einige Arbeitsgruppen postulierten, dass eine Kombination aus einem Korrektor und einem Potentiator, der die Kanalaktivität und bestenfalls auch die Stabilität des Proteins erhöht, am sinnvollsten für die Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit in der Mukoviszidose-therapie zu sein scheint (Schmidt et al. 2008; Jurkuvenaite et al. 2010). Die in dieser Arbeit beschriebenen SL-Wirkungen als Potentiator und Korrektor stellen somit ein weiteres Mal heraus, dass SL einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie der Mukoviszidose darstellt. Ein weiterer Vorteil von SL besteht darin, dass es bereits als Arzneimittel (Viagra<sup>®</sup>; Revatio<sup>®</sup>) zugelassen ist und somit eine Anwendung als Therapeutikum für die Mukoviszidose schneller erfolgen könnte. Durch die zuvor nachgewiesenen korrigierenden Effekte von SL auf den  $\Delta F508$ -CFTR wird SL in der klinisch eingesetzten Dosis bereits in einer klinischen Studie im respiratorischen Trakt der Mukoviszidosepatienten getestet ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov); NCT01132482). Weiterhin wurde eine Studie für die Untersuchung des Effekts von Vardenafil, einem SL-Analog, durch nasale PD-Messungen an Mukoviszidose Patienten begonnen (Lubamba et al. 2010).

An dieser Stelle muss jedoch angemerkt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten SL-Konzentrationen von 30 - 400  $\mu\text{M}$  um ein Vielfaches höher sind als die zur Behandlung der erektilen Dysfunktion eingesetzte Konzentration von ca. 1  $\mu\text{M}$ . Die Anwendung einer solch hohen SL-Konzentration würde beim Patienten wahrscheinlich zu einer erheblichen Verstärkung der Nebenwirkungen führen. Für die Behandlung der erektilen Dysfunktion durch Viagra<sup>®</sup> sind als Nebenwirkungen Gesichtsrötungen, Kopfschmerzen, Herzrasen, Übelkeit und visuelle Störungen beschrieben (Schwartz und Kloner 2010). Gleichzeitig würde SL gemäß der Behandlung des Bluthochdrucks (Revatio<sup>®</sup>) einen sinkenden Blutdruck verursachen. Die Verstärkung der Nebenwirkungen durch eine erhöhte Dosis SL konnte bereits in einer Studie des Viagra Herstellers Pfizer nachgewiesen werden (Schwartz und Kloner 2010). Somit könnten die Probanden, welche mit den in dieser Arbeit eingesetzten SL-Konzentrationen behandelt würden, sehr starke Nebenwirkungen erleiden, wobei besonders eine starke Hypotonie schwerwiegende Folgen haben könnte. Die bekannten Nebenwirkungen werden durch die Inhibition des cGMP-Abbaus durch SL als PDE-5-Inhibitor hervorgerufen. Aus diesem Grund ist es von fundamentalem Interesse den Wirkmechanismus von SL auf den CFTR zu identifizieren.

#### 4.4 Untersuchung des SL-Wirkmechanismus auf den CFTR

Die beschriebenen Effekte von SL auf den CFTR sind sicherlich stark mit der Frage assoziiert, was für ein zugrunde liegender Wirkmechanismus von SL auf den Cl<sup>-</sup>-Kanal CFTR vorliegt. Bisher wurden dazu nur Vermutungen angestellt, da in keiner Studie dieser Mechanismus näher untersucht wurde. Eine Möglichkeit ist, dass SL direkt mit dem CFTR interagiert. Eine direkte Interaktion der synthetischen Korrektoren corr-4a, VRT-325 und VRT-532 mit dem CFTR wurde bereits von Wang et al. postuliert (Wang et al. 2007). In Interaktionsstudien konnten die Autoren nachweisen, dass die Bindung der genannten Korrektoren an den CFTR die Ausbildung von Disulfidbrücken blockierten, welche sich zwischen den spezifisch im CFTR-Protein inserierten Cysteinen bildeten (Wang et al. 2007). Eine zweite Vermutung ist, dass SL als PDE-5-Inhibitor über die cGMP-Signalkaskade auf den CFTR wirken könnte. Dieser Wirkmechanismus von SL liegt der Behandlung der erektilen Dysfunktion durch Viagra<sup>®</sup> sowie der Therapie des pulmonalen Bluthochdrucks durch Revatio<sup>®</sup> zugrunde. Wie bereits in der Einleitung unter Punkt 1.6.2 beschrieben, verhindert SL in diesen Anwendungsfällen den Abbau des sekundären Botenstoffes cGMP, welcher durch die Guanylatzyklase generiert wird, und erhöht so dessen Konzentration. Dies wiederum führt zu einer Aktivierung der cGMP-abhängigen PKG (Corbin et al. 2002). Bezogen auf den CFTR könnte dieser im Folgenden von der PKG beeinflusst werden. Ob SL über diesen möglichen Wirkmechanismus auf den CFTR wirkt, wurde in dieser Arbeit sowohl im Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten, aber auch auf verschiedenen Ebenen in den bereits zuvor beschriebenen humanen bronchialen Epithelzellen untersucht.

Die Wirkung von SL über die cGMP-Signalkaskade setzt eine Aktivierung des CFTR durch cGMP voraus. So können die beschriebenen Effekte (Aktivitätssteigerung und Stimulation der CFTR-Exozytose) im *X. laevis* Oozyten Expressionssystem nur über die cGMP-Signalkaskade vermittelt werden, wenn der CFTR in VC-Messungen durch cGMP aktiviert werden kann. Bisher wurde in VC-Messungen an *X. laevis* Oozyten aber nur eine Aktivierung durch cAMP gezeigt (Rich et al. 1990; Drumm et al. 1991; Weber et al. 1999; Weber et al. 2001). Der Effekt des sekundären Botenstoffes cGMP auf den CFTR in den *X. laevis* Oozyten ist dagegen bisher nur auf Einzelkanalebene nachgewiesen worden. So konnte in *patch clamp* Analysen von wt-CFTR-



exprimierenden Oozyten eine Aktivierung des wt-CFTR anhand einer cGMP-vermittelten Stromerhöhung gemessen werden (Sullivan et al. 1995). Die theoretische Aktivierung des CFTR durch cGMP in VC-Messungen der gesamten Zelle wurde in dieser Arbeit zur Sicherheit zusätzlich untersucht. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit in VC-Messungen mit wt-CFTR-exprimierenden Oozyten ein cGMP/IBMX-Cocktail appliziert. Nach der Zugabe dieses Cocktails konnte eine cGMP-vermittelte Stromerhöhung von durchschnittlich 1402 nA gemessen werden (Abb. 42). Diese cGMP-vermittelte Stromerhöhung ist annähernd so hoch wie die Stromerhöhung durch cAMP (1318 nA; Punkt 3.3.2; Abb. 38) bei der gleichen in die Oozyten injizierten mRNA-Menge. Anhand dieser Untersuchung konnte somit erstmals bestätigt werden, dass der CFTR nicht nur auf Einzelkanalebene (Sullivan et al. 1995), sondern auch auf der Ebene der gesamten Zelle in VC-Messungen durch cGMP aktiviert werden kann. Darüber hinaus ist durch diese Untersuchung der Beweis erbracht worden, dass der ermittelte aktivitätssteigernde Effekt von SL auf den CFTR durch die cGMP-Signalkaskade vermittelt werden könnte, da der CFTR durch cGMP aktiviert wird. Die gemessene Kapazität konnte dagegen nicht durch cGMP erhöht werden (Punkt 3.4). Somit vermittelt cGMP in diesem Fall nicht wie für cAMP gezeigt eine Verschmelzung von CFTR-enhaltenen Vesikeln mit der Plasmamembran (Weber et al. 1999; Weber et al. 2001). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass die Exozytose von CFTR-Molekülen durch SL möglicherweise nicht über die cGMP-Signalkaskade vermittelt wird, da SL die Exozytose bzw. die Kapazität steigert.

Um den Wirkmechanismus von SL über die cGMP-Signalkaskade weiter zu analysieren, wurden zusätzlich einzelne Komponenten dieser Kaskade inhibiert und der Einfluss dieser Blockierung auf die bereits beschriebenen aktivitätssteigernden und Exozytose stimulierenden Effekte von SL auf den CFTR untersucht. Die cGMP-Signalkaskade wurde dazu an zwei Punkten inhibiert. Zum einen wurde die cGMP-generierende Guanylatzyklase durch den spezifischen Inhibitor ODQ und zum anderen die cGMP-aktivierte PKG durch den Hemmer KT5823 blockiert.

Die Erhöhung der Cl<sup>-</sup>-Sekretion durch eine SL-vermittelte Aktivitätserhöhung des CFTR wurde durch VC-Messungen im Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten und durch funktionale Messungen der humanen bronchialen Epithelzellen in der Ussing Kammer nachgewiesen. Die Stimulation der CFTR-Exozytose konnte in den

Kapazitätsmessungen der wt-CFTR-exprimierenden Oozyten, in den Kapazitätsmessungen der CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen in der Ussing Kammer sowie in immunofluoreszenzoptischen und Western Blot Analysen der humanen Zelllinien nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden diese genannten Analysen zusätzlich mit den beiden beschriebenen Inhibitoren (in Kombination mit SL) durchgeführt.

Im *X. laevis* Oozyten Expressionssystem konnte für beide Inhibitoren eine signifikante Blockierung des aktivitätssteigernden Effekts von SL auf den wt-CFTR nachgewiesen werden. Die Inkubation der Oozyten vor und nach der SL-Injektion mit ODQ verursachte eine Inhibition der SL-vermittelten Stromerhöhung der wt-CFTR-exprimierenden Oozyten um durchschnittlich 44%, während die SL-vermittelte Leitfähigkeitserhöhung um 69% reduziert wurde. Auch KT5823 inhibierte den aktivitätssteigernden Effekt von SL im Strom um durchschnittlich 50%, sowie um 57% in der Leitfähigkeit (Abb. 43). Interessanterweise konnte der Anstieg der Kapazität nach der SL-Injektion dagegen nicht signifikant durch die Inkubation mit den Inhibitoren gehemmt werden (Abb. 44).

Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Untersuchungen mit den humanen Zelllinien in funktionalen Messungen ermittelt. In den Ussing Kammer Messungen der  $\Delta$ F508-CFTR-Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> inhibierten KT5823 und ODQ den SL-vermittelten Strom vollständig (Abb. 57). Die gleichen Untersuchungen wurden auch für die wt-CFTR-Zelllinie 16HBE14o<sup>-</sup> durchgeführt. Dort konnte ebenfalls eine vollständige Reduktion des SL-vermittelten Stromanstiegs durch KT5823 gemessen werden (Abb. 62). Durch die Inkubation von 16HBE14o<sup>-</sup>-Monolayern mit SL und ODQ konnte der SL-vermittelte Stromanstieg außerdem durchschnittlich um 75% reduziert werden. Dass der applizierte CFTR<sub>inh</sub>-172 keine Wirkung auf die gemessenen Parameter hatte, ist eine zusätzliche Absicherung, dass die SL-vermittelte CFTR-Aktivierung durch die Inhibitoren KT5823 und ODQ gehemmt werden konnte (Abb. 56).

Die Daten aus dem *X. laevis* Expressionssystem und den humanen bronchialen Epithelzellen zeigen klar, dass der aktivitätssteigernde Effekt von SL auf den wt-CFTR, aber auch auf den  $\Delta$ F508-CFTR, durch die Inhibitoren KT5823 und ODQ gehemmt

werden konnte. Dies bedeutet, dass dieser Effekt von SL auf den CFTR cGMP-abhängig ist und somit über die cGMP-Signalkaskade vermittelt wird.

Anhand der Kapazitätsmessungen der CFBE41o<sup>-</sup>-Monolayer nach der Applikation der SL-Lösungen in Kombination mit jeweils einem der beiden Inhibitoren ist es außerdem möglich eine Aussage zu treffen, ob die SL-vermittelte CFTR-Exozytose über die cGMP-Signalkaskade stimuliert wird. Dabei wurde eine signifikante Reduktion der SL-vermittelten Kapazitätserhöhung nach der Inkubation der CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen ( $\Delta F508$ -CFTR) mit KT5823 festgestellt (Abb. 58). Die Inkubation mit ODQ verursachte dagegen keine signifikante Reduktion (Abb. 58). Somit ist allein anhand der Kapazitätsmessungen keine einheitliche Aussage möglich, ob die Exozytose des CFTR durch SL cGMP-abhängig ist.

An dieser Stelle sollte jedoch bedacht werden, dass die initialen Kapazitätswerte der CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen nach der Inkubation (15 min) mit den beiden Inhibitoren KT5823 (3,34  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) oder ODQ (2,87  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) im Vergleich zu den nicht-inkubierten Zellen (1,22  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ) stark erhöht sind (Tab. 46). Dies könnte möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass sich die Inhibitoren auf der Membran ablagern und so die gemessene transepitheliale Membrankapazität der Zellen erhöht ist. Im Folgenden könnte die Kapazitätsmessung der Monolayer durch diese Ablagerung beeinträchtigt sein. Dass die Inhibitoren membrangängig sind, ist jedoch ein Argument gegen diese Erklärungsmöglichkeit. Außerdem könnte auch das zur Lösung der Inhibitoren verwendete DMSO einen Effekt auf die initiale Kapazität der CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen haben.

Um die cGMP-Abhängigkeit der SL-stimulierten CFTR-Exozytose jedoch weiter zu beleuchten, wurden zusätzlich Western Blot und immunfluoreszenzoptische Untersuchungen mit 16HBE14o<sup>-</sup>- und CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen durchgeführt, in denen die Zellen zusätzlich zum SL (60  $\mu\text{M}$ ) ebenfalls mit den Inhibitoren KT5823 und ODQ inkubiert wurden. In den Western Blot Untersuchungen der Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> konnte nach der Inkubation mit ODQ und SL keine Reduktion, sondern eine um 27% erhöhte  $\Delta F508$ -CFTR-Proteinexpression detektiert werden (Abb. 68), während bei den 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen eine um 11% erhöhte Proteinexpression bestimmt werden konnte (Abb. 69).

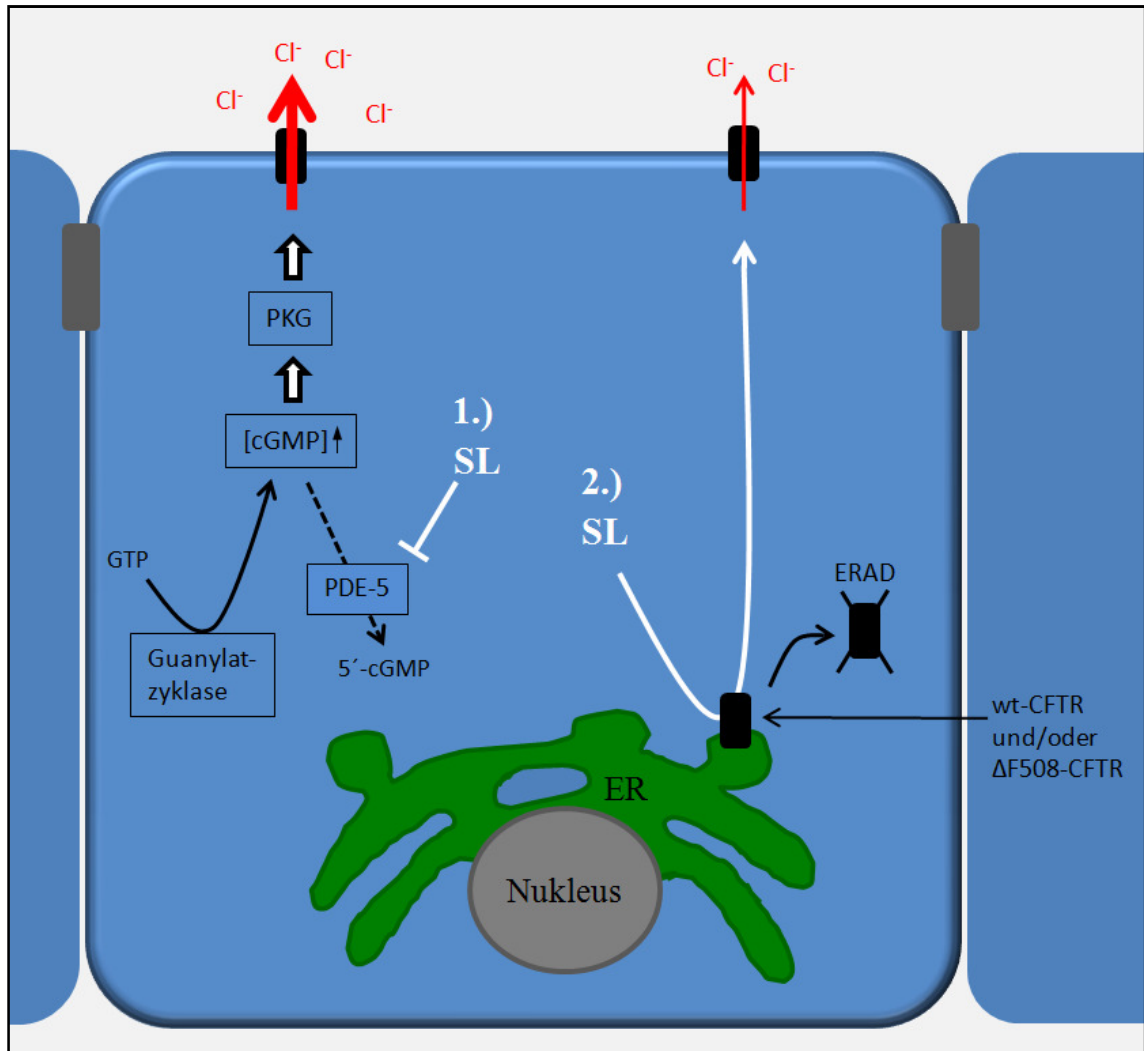
In den immunfluoreszenzoptischen Untersuchungen konnte durch KT5823 und SL in den CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen keine signifikante Reduktion der ΔF508-CFTR-Molekülanzahl in der apikalen Plasmamembran nachgewiesen werden (Abb. 72). Auch in den 16HBE14o<sup>-</sup>-Zellen wurde die wt-CFTR-Molekülanzahl in der apikalen Plasmamembran nicht reduziert, sondern scheinbar um 6% erhöht (Abb. 75). Fasst man diese Ergebnisse sowie die Daten der Kapazitätsmessungen der wt-CFTR-exprimierenden Oozyten nach KT5823 und ODQ Inkubation zusammen, zeigt sich bis auf die Kapazitätsmessung in der Ussing Kammer der CFBE41o<sup>-</sup>-Zellen das einheitliche Bild, dass die Exozytose von CFTR-Molekülen und damit die SL-vermittelte CFTR-Exozytose nicht durch die Applikation der Inhibitoren KT5823 und ODQ gehemmt werden kann. Dies ist einerseits durch einen cGMP-unabhängigen SL-Wirkmechanismus auf den CFTR und zum anderen durch ein Ausbleiben der Blockierung der cGMP-Signalkaskade durch die beiden genutzten Inhibitoren erklärbar. Die Wirksamkeit des PKG-Inhibitor KT5823 konnte jedoch in einer Studie bestätigt werden, in welcher die Inkubation der *X. laevis* Oozyten mit KT5823, in der auch in dieser Arbeit verwendeten Konzentration von 3 μM, eine Reduktion der cGMP-vermittelten Inhibition von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen nachgewiesen werden konnte (Jiang et al. 2000). Der Guanylatzyklase Inhibitor ODQ wurde ebenfalls erfolgreich bei der Untersuchung des Wirkmechanismus von SL bei der erektilen Dysfunktion verwandt. Die Applikation von SL in Kombination mit ODQ (3 μM) führte zu einer 95% reduzierten Relaxierung des Penisschwellkörpergewebes *in vitro* verglichen mit der Relaxierung nach alleiniger SL-Applikation (Ballard et al. 1998). Bezieht man an dieser Stelle mit ein, dass die Inhibitoren in dieser Arbeit den aktivitätssteigernden Effekt in den durchgeführten Untersuchungen blockierten, weißt dies darauf hin, dass die Inhibition der cGMP-Signalkaskade durch KT5823 und ODQ gehemmt werden konnte. Obwohl die in dieser Arbeit ermittelten Daten nicht ausnahmslos auf einen cGMP-unabhängigen Mechanismus der CFTR-Exozytose durch SL hindeuten, erscheint es anhand der Fülle der Daten sehr wahrscheinlich, dass SL in der Tat die CFTR-Exozytose nicht über die cGMP-Signalkaskade vermittelt. Schließt man die Möglichkeit der Wirkung über die cGMP-Signalkaskade aus, erscheint es sehr realistisch, dass SL wie z.B. für die Korrektoren corr-4a, VRT-325 und VRT-532 nachgewiesen (Wang et al. 2007) direkt mit dem CFTR interagiert. Diese direkte Wechselwirkung bedarf natürlich einer Überprüfung durch ergänzende Experimente.

#### **4.4.1 Modell des potentiellen SL-Wirkmechanismus auf den $\Delta$ F508- sowie den wt-CFTR**

Wie genau könnte nun die Wirkung von SL auf den CFTR aussehen? Durch die ermittelten Ergebnisse ist zunächst einmal klar gezeigt worden, dass SL über zwei verschiedene Mechanismen auf den  $\Delta$ F508-CFTR, aber auch den wt-CFTR wirkt. Zum einen vermittelt SL über die cGMP-Signalkaskade einen aktivitätssteigernden Effekt auf den CFTR und zum anderen erscheint die Stimulation der Exozytose von CFTR-Molekülen cGMP-unabhängig. Ein Schema der beiden unterschiedlichen SL-Wirkmechanismen auf den CFTR ist in Abb. 76 gezeigt.

Der Wirkungsmechanismus von SL als Potentiator des  $\Delta$ F508-CFTR und des wt-CFTR ist sehr wahrscheinlich folgendermaßen gestaltet: In einem ersten Schritt inhibiert SL als PDE-5-Inhibitor den Abbau des durch die Guanylatzyklase generierten sekundären Botenstoffes cGMP (Ballard et al. 1998; Corbin und Francis 1999). Das heißt, die cGMP-Konzentration in der Zelle steigt an und verursacht im Anschluss daran eine Aktivierung der PKG (French et al. 1995). Die PKG phosphoryliert weiterhin die R-Domäne des CFTR-Proteins (Picciotto et al. 1992). In Anwesenheit von ATP führt diese Phosphorylierung der R-Domäne zu einer Aktivierung des CFTR, wodurch folglich die Kanalpore geöffnet und  $\text{Cl}^-$  aus der Zelle sekretiert wird (Gadsby et al. 2006). Dabei steigt mit höherer Phosphorylierung auch die Aktivität des CFTR an, da gezeigt werden konnte, dass eine höhere Phosphorylierung die Affinität von ATP an die beiden NBD des CFTR steigert (Ostedgaard et al. 2001). Zusammengefasst bedeutet dies, dass SL über eine vermehrte Phosphorylierung des Proteins eine Aktivitätssteigerung des CFTR verursacht. Diese SL-Wirkung als Potentiator des CFTR kann aufgrund des Wirkmechanismus über die cGMP-Signalkaskade somit nur in Geweben und Organismen erfolgen, welche die PDE-5 exprimieren. Da aber durch verschiedenste Studien gezeigt wurde, dass die PDE-5 in vielen Geweben, wie z.B. den humanen Blutplättchen (Wallis et al. 1999), dem Penisschwellkörper (Gopal et al. 2001), der glatten Muskulatur (Bender und Beavo 2006), im Pankreas (Kotera et al. 2000) sowie in humanen, primären Atemwegsepithelzellen (Fuhrmann et al. 1999; Poschet et al. 2007) exprimiert wird, scheint die Wirkung von SL über diesen Mechanismus nicht sehr selten zu sein. Hervorzuheben ist hierbei besonders die Expression der PDE-5 in der humanen Lunge, da die Mukoviszidosesymptome

aufgrund der fehlenden  $\text{Cl}^-$ -Sekretion über den CFTR in diesem Organ besonders schwerwiegend sind.



**Abbildung 76: Schema der potentiellen Wirkmechanismen von SL auf den CFTR**

Die Wirkung von SL auf den CFTR kann über zwei unabhängige Mechanismen vermittelt werden. 1.): Im Falle der cGMP-abhängigen Wirkung als Potentiator, blockiert SL als PDE-5-Hemmer den Abbau von cGMP, so dass folglich die cGMP-Konzentration, nach der cGMP-Generierung durch die Guanylatzyklase, ansteigt. Die erhöhte cGMP-Konzentration wiederum aktiviert die PKG, welche das CFTR-Protein (durch Phosphorylierung) aktiviert und so zu einer erhöhten  $\text{Cl}^-$ -Sekretion über den CFTR führt. 2.): Im Falle des zweiten, cGMP-unabhängigen SL-Mechanismus auf den CFTR bindet SL vermutlich direkt an das im ER zum proteasomalen Abbau (ERAD) markierten CFTR-Protein und ermöglicht das Verlassen des ER. Daraufhin wird das CFTR-Protein ( $\Delta\text{F508}$ - und/oder wt-CFTR) in die Plasmamembran inseriert, wo es seine Funktion als  $\text{Cl}^-$  sekretierender Kanal ausüben kann.

Die Stimulation der wt-CFTR- und  $\Delta F508$ -CFTR-Exozytose durch SL, und damit die Wirkung von SL als Korrektor des  $\Delta F508$ -CFTR, stellte sich durch unsere Daten als cGMP-unabhängig dar. Dementsprechend wird eine direkte Interaktion von SL mit dem CFTR angenommen. Diese Interaktion findet vermutlich im ER statt, da die Qualitätskontrolle des CFTR und auch die proteasomale Degradierung des  $\Delta F508$ -CFTR, aber auch eines Großteil des wt-CFTR, in diesem Zellkompartiment erfolgt (Ward und Kopito 1994; Younger et al. 2006). SL ermöglicht dem zum Abbau markiertem  $\Delta F508$ -CFTR, aber auch dem wt-CFTR das Verlassen des ER. Wie genau SL diesen Transport des CFTR aus dem ER stimuliert, ist bisher nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre, dass SL die richtige Faltung des CFTR fördert und das Protein im Anschluss aus dem ER transportiert wird, da korrekt gefaltete Proteine mittels COP II Vesikeln aus dem ER in den Golgi Apparat befördert werden (Lee et al. 2004; Younger et al. 2006). Diese Interaktion von Korrektoren mit dem CFTR wurde für corr-4a von Loo et al. postuliert (Loo et al. 2008). Die Autoren generierten ein  $\Delta F508$ -CFTR-Konstrukt, welches durch Mutationen erzeugte Cysteine enthielt, die bei korrekter Faltung des CFTR-Proteins und der Inkubation mit einem *cross-linker* eine Verknüpfung ausbildeten. Nach der Transfektion von humanen embryonalen Nierenzellen mit diesem Konstrukt und der Inkubation mit corr-4a wurde ein verändertes Wanderungsverhalten des Proteins in einem Acrylamidgel ermittelt, wodurch die Autoren auf ein CFTR-Protein mit einer Verknüpfung der inserierten Cysteine und damit auf ein korrekt gefaltetes CFTR-Protein schlossen. Weiterhin vermuten die Autoren, dass Korrektoren die Faltung zwischen den beiden MSD und zwischen diesen und den beiden NBD erhöhen.

Nach dem SL-vermittelten Verlassen des CFTR-Proteins aus dem ER wird der CFTR im Golgi Apparat komplex glykolisiert und dann in die Plasmamembran exozytiert, wo der CFTR seine Funktion als Cl<sup>-</sup>-Kanal erfüllen kann. Auch im Falle des  $\Delta F508$ -CFTR weißt das Protein, wenn es in die Plasmamembran inseriert ist, eine Restleitfähigkeit auf, so dass die Korrektur des Transportdefekts zu einer Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Sekretion über den CFTR führt.

Zusammenfassend wird die CFTR-Aktivierung durch SL und damit der Effekt als Potentiator über die PKG-abhängige Phosphorylierung der R-Domäne mittels der cGMP-Signalkaskade induziert, während die Stimulation der CFTR-Exozytose nicht cGMP-abhängig ist und SL vermutlich im ER direkt mit dem CFTR-Protein interagiert. Gerade diese direkte Wirkung von SL auf den CFTR stellt zukünftig einen interessanten Ansatzpunkt für die Weiterentwicklung von SL als Mukoviszidose-therapeutikum dar. So wäre es unter Umständen möglich, den Wirkstoff SL so zu modifizieren, dass dieser die cGMP-Signalkaskade nicht mehr beeinflusst und so die bekannten Nebenwirkungen nicht mehr auftreten, aber die direkte Interaktion mit dem CFTR noch möglich ist.

Insgesamt konnte anhand dieser Arbeit durch die genauere Kenntnis des Wirkmechanismus und die ermittelte SL-Wirkung als Potentiator und Korrektor des CFTR gezeigt werden, dass SL potentiell einen sehr vielversprechenden Ansatz zur Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit und damit zur Therapie der Mukoviszidose darstellt. Diese Daten unterstützen im Nachhinein die Initiierung einer klinischen Studie zur Ermittlung des Effekts von SL auf die Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit im respiratorischen Trakt von CF-Patienten, welche, wie bereits beschrieben, kürzlich begonnen wurde ([www.clinicalTrials.gov](http://www.clinicalTrials.gov); NCT01132482).

Neben den Effekten von SL auf den CFTR konnte in weiteren Studien eine verminderte Bakterienadhäsion des Bakteriums *P. aeruginosa* im respiratorischen Trakt von Mäusen, sowie eine antiinflammatorische Wirkung durch SL in humanen bronchialen Epithelzelllinien sowie in Meerschweinchen nachgewiesen werden (Toward et al. 2004; Poschet et al. 2007). Da die Besiedlung des respiratorischen Trakts der Mukoviszidose Patienten mit Bakterien wie z.B. *S. aureus* und *P. aeruginosa* häufig als Ursachen für die schwerwiegenden Symptome im respiratorischen Trakt genannt werden (Gibson et al. 2003), ist dieser zusätzliche Effekt von SL ein weiterer Hinweis auf die möglicherweise hohe Bedeutung von SL als Mukoviszidose-therapeutikum. Dass sich die Substanz SL für diese Anwendung ebenfalls bereits in einer klinischen Studie befindet, unterstreicht dies weiterhin (Jones und Helm 2009).



## 5 Ausblick

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Stimulation der CFTR-Exozytose durch SL nicht über die cGMP-Signalkaskade vermittelt wird, sollte in folgenden Experimenten zunächst untersucht werden, ob SL, wie vermutet, direkt mit dem CFTR interagiert. Deshalb sollten Interaktionsstudien mit SL und dem CFTR durchgeführt werden. Zu diesem Zweck könnte in Anlehnung an eine Studie von Wang et al., bei der die direkte Interaktion von CFTR mit dem Korrektor corr-4a gezeigt werden konnte, ein CFTR-cDNA-Konstrukt hergestellt werden, welches anstatt der 18 endogenen Cysteine Alanine kodiert. Im Folgenden wird die Sequenz so modifiziert, dass in das CFTR-Protein kontrolliert Cysteine in die TM 6 und 7 inseriert werden, welche im translatierten CFTR-Protein nach der Zugabe einer verknüpfenden Substanz (*cross-linker*) Disulfidbrückenbindungen ausbilden (Wang et al. 2007). Dabei werden die Cysteine in die TM 6 und 7 inseriert, da für den Korrektor corr-4a gezeigt wurde, dass dieser die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen der TM 6 und 7 blockiert (Wang et al. 2007). Nach der Generierung wird dieses Konstrukt in humane Zelllinien transfiziert, welche endogen keinen CFTR exprimieren. Daran schließt sich eine Inkubation der transfizierten Zellen mit SL, und nach einem angepassten Inkubationszeitraum die Applikation des *cross-linkers* an. Anhand dieser Untersuchungen wird es möglich sein, zu entscheiden, ob SL an den CFTR bindet, da sich die Disulfidbrückenbindungen nur ausbilden können, wenn keine Substanz, in diesem Fall SL, an den CFTR gebunden ist (Wang et al. 2007). Durch die Bildung von Disulfidbrücken verändert sich das Wanderungsverhalten des CFTR in einem Acrylamidgel, so dass dieses CFTR-Wanderungsverhalten Aufschluss über die Interaktion von SL mit dem CFTR gibt. Zusätzlich könnte in Anlehnung an eine Studie von Loo et al., welche nachweisen konnten, dass corr-4a durch die Förderung der Faltung des  $\Delta F508$ -CFTR als Korrektor wirkt, untersucht werden, ob auch SL die Faltung des CFTR und so dessen Transport aus dem ER fördert (Loo et al. 2008). Dies könnte mit der bereits beschriebenen Methodik, jedoch eines anders aufgebauten Konstrukt, bei dem eine Ausbildung der Disulfidbrücken nur möglich ist, wenn das  $\Delta F508$ -CFTR-Protein korrekt gefaltet ist, analysiert werden (Loo et al. 2008).

Der mögliche direkte Wirkmechanismus von SL auf den CFTR bietet einen sehr guten Ansatzpunkt für die Therapie der Mukoviszidose durch SL. Wenn es in Zukunft gelänge, die genaue Bindestelle von SL an den CFTR zu identifizieren, könnte man die Substanz SL so modifizieren, dass zwar die direkte Interaktion von SL an den CFTR möglich ist und damit die korrigierende Funktion des SL erhalten bleibt, gleichzeitig SL aber nicht mehr als PDE-5-Inhibitor agiert und so die cGMP-Signalkaskade nicht mehr beeinflusst. Diese Signalkaskade ist wie bereits beschrieben, für die Nebenwirkungen durch SL (z.B. bei Viagra<sup>®</sup> und Revatio<sup>®</sup>) verantwortlich, so dass bei der beschriebenen Modifikation die bekannten Nebenwirkungen wahrscheinlich nicht auftreten würden.

Neben SL konnte auch für dessen Analoga Vardenafil und Tadalafil ein sehr ähnlicher Effekt auf den CFTR nachgewiesen werden (Lubamba et al. 2008; Lubamba et al. 2010). Da für diese Substanzen eine höhere Wirksamkeit nachgewiesen werden konnte als für SL, erscheint es sinnvoll, zu untersuchen, ob diese Analoga ebenfalls über zwei Mechanismen, einen cGMP-abhängigen und einen cGMP-unabhängigen, auf den CFTR wirken. Dabei ist besonders die Wirkung von Vardenafil interessant, da sich dieses zum einen neben SL bereits in einer klinischen Studie für die Behandlung von Mukoviszidose Patienten befindet (Lubamba et al. 2010), und sich zum anderen dessen Struktur nur in zwei Stickstoffatomen von der Struktur des SL unterscheidet (Lubamba et al. 2008). Aus diesem Grund sollten die in dieser Arbeit für SL durchgeführten funktionalen und proteinbiochemischen Forschungen mit CFTR-exprimierenden Oozyten und den humanen bronchialen Zelllinien 16HBE14o<sup>-</sup> und CFBE41o<sup>-</sup> zusätzlich mit Vardenafil erfolgen. Durch die Inkubation mit dem PKG-Inhibitor KT5823 und dem Guanylatzyklase Hemmer ODQ wäre auch in diesem Anwendungsfall eine Aussage möglich, ob das Analogon über die cGMP-Signalkaskade auf den CFTR wirkt.

In zusätzlichen Experimenten sollte außerdem untersucht werden, ob die Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit des  $\Delta F508$ -CFTR im *X. laevis* Expressionssystem durch die Insertion von  $\Delta F508$ -CFTR-Molekülen vermittelt wird. Bisher konnte nur nachgewiesen werden, dass während der VC-Messung keine Exozytose von  $\Delta F508$ -CFTR-Molekülen in die Oozytenmembran stattfindet, über die Exozytose nach der SL-Injektion aber vor der VC-Messung kann keine Aussage

getroffen werden. Aus diesem Grund sollte analog zum wt-CFTR der PKA-Hemmer H8 appliziert werden, um zu analysieren, ob die Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit durch SL trotz Blockierung der Exozytose nachgewiesen werden kann.

Da bisher die therapeutische Wirkung von SL und vielen anderen niedermolekularen Substanzen im Bezug auf die Erbkrankheit Mukoviszidose in klinischen Studien jedoch noch nicht nachgewiesen wurde, sollte weiter nach Substanzen geforscht werden, die als Korrektor des CFTR-Transportdefekts oder auch als Potentiator der Restleitfähigkeit des  $\Delta$ F508-CFTR agieren.

Durch die beschriebenen Therapien mit einem Korrektor und/oder Potentiator wird jedoch nicht die Ursache der Mukoviszidose behoben. Um die Mukoviszidose ursächlich zu therapieren, wird in der Mukoviszidoseforschung seit vielen Jahren vor allem die CFTR-Gentherapie analysiert. Die Einbringung der CFTR-cDNA in den Nukleus ist aber mit vielen Problemen, wie z.B. einer geringen Effizienz und einer starken entzündlichen Reaktion des Immunsystems durch die oftmals verwendeten viralen Transportvehikel verbunden (Mueller und Flotte 2008). Aus diesem Grund wird von unserer Arbeitsgruppe eine Transfektion von mRNA als Alternative untersucht. Dazu werden Zellen der  $\Delta$ F508-CFTR-Zelllinie CFBE41o<sup>-</sup> mit der in dieser Arbeit im Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten optimierten CFTR-A120-mRNA transfiziert. Die Charakterisierung der Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit erfolgt im Anschluss an die Transfektion auf funktionaler und proteinbiochemischer Ebene. Wie auch in dieser Arbeit werden dazu Ussing Kammer Messungen durchgeführt, in denen die Funktionalität des CFTR durch cAMP analysiert wird. Nach ersten Erfolgen der Wiederherstellung der CFTR-Funktion durch eine messbare Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit in den transfizierten Zellen müssen in Zukunft die optimale CFTR-A120-mRNA-Konzentration sowie der Zeitpunkt nach der Transfektion ermittelt werden, bei der die Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit maximal ist (Bangel-Ruland et al. 2010). Darüber hinaus erfolgen Western Blot und immunofluoreszenzoptische Untersuchungen in denen zusätzlich bestimmt werden kann, ob die Transfektion und somit die Translation und Exozytose des wt-CFTR erfolgreich ist.

Um die Erbkrankheit Mukoviszidose in der Zukunft ganzheitlich zu therapieren, sollte neben der Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit, z.B. durch den in dieser Arbeit

---

charakterisierten Wirkstoff SL, jedoch auch die Blockierung der Na<sup>+</sup>-Hyperabsorption über den ENaC z.B. durch die Verfolgung der Zulassung der in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Antisense Oligonukleotide (AON), weiter erforscht werden (Sobczak et al. 2009).

## 6 Zusammenfassung

Die drastisch verminderte Cl<sup>-</sup>-Sekretion, durch welche die Erbkrankheit Mukoviszidose charakterisiert ist, wird durch eine Mutation im Cl<sup>-</sup>-Kanal CFTR verursacht. Bei der häufigsten Mutation  $\Delta$ F508-CFTR wird das fehlgefaltete Protein im ER erkannt und proteasomal degradiert, anstatt in die Plasmamembran inseriert zu werden. Aus diesem Grund zielen viele aktuelle Forschungsvorhaben auf eine Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit durch die Erhöhung der Restleitfähigkeit des  $\Delta$ F508-CFTR durch Potentioren oder auf die Korrektur des Transportdefekts dieses Proteins durch Korrektoren ab. Aufgrund der in diesem Zusammenhang anhaltenden Diskussion zum genauen Effekt des PDE-5-Inhibitors SL auf den CFTR sowie dessen Einordnung als Korrektor oder Potentiator, wurde die SL-Wirkung in zwei unterschiedlichen Modellsystemen untersucht: dem heterologen Expressionssystem der *X. laevis* Oozyten und in humanen bronchialen Zelllinien. Im Vorfeld wurde anhand von unterschiedlich langen Polyadenylierungen (20-120), der in die Oozyten injizierten wt-CFTR-mRNA gezeigt, dass eine 120 Adenin enthaltene wt-CFTR-mRNA die höchste Expression des CFTR generierte. Außerdem erfolgte in dieser Arbeit erstmals der Nachweis der endogenen PDE-5 in den *X. laevis* Oozyten, wodurch eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung der SL-Wirkung in diesem System aufgezeigt werden konnte. Weiterhin konnte in beiden Modellen ein aktivitätssteigernder Effekt von SL, sowie eine SL-vermittelte Exozytose des wt-CFTR und des  $\Delta$ F508-CFTR ermittelt werden. Nachgewiesen wurde hierbei in VC-Messungen eine Steigerung der cAMP-Aktivierung der wt-CFTR-exprimierenden Oozyten und eine Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit in den  $\Delta$ F508-CFTR-exprimierenden Oozyten nach SL-Injektion. In den wt-CFTR-exprimierenden Oozyten wurde zusätzlich eine SL-stimulierte wt-CFTR-Exozytose gemessen. Für die bronchialen Epithelzellen konnte in funktionalen Messungen ebenfalls eine Aktivitätssteigerung des wt- und  $\Delta$ F508-CFTR durch die Applikation von SL registriert werden. Funktional zeigte sich außerdem ein Einbau von  $\Delta$ F508-CFTR-Molekülen durch SL. Diese Exozytose von  $\Delta$ F508-CFTR durch SL konnte durch proteinbiochemische und immunfluoreszenzoptische Analysen bestätigt werden. Erstmals konnte in proteinbiochemischen und immunfluoreszenzoptischen Untersuchungen auch eine SL-vermittelte wt-CFTR-Exozytose nachgewiesen werden.

Insgesamt wurde in dieser Arbeit in zwei Modellsystemen und auf verschiedenen Ebenen nachgewiesen, dass SL sowohl als Korrektor des Transportdefekts, aber auch als Potentiator der CFTR-Aktivität agiert. Gerade aufgrund dieser doppelten Wirkung und der damit möglicherweise verbundenen Wiederherstellung der Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit und einer effizienten Linderung der Mukoviszidosesymptome, handelt es sich bei SL potentiell um eine sehr interessante Therapiemöglichkeit.

In dieser Arbeit gelang es erstmals den Wirkmechanismus, welcher den beschriebenen Effekten von SL auf den CFTR zugrunde liegt, näher zu untersuchen. Im Vorfeld konnte durch eine cGMP-vermittelte Aktivierung des exprimierten wt-CFTR in *X. laevis* Oozyten nachgewiesen werden, dass eine SL-Wirkung über die cGMP-Signalkaskade möglich ist. Für das Verständnis, ob SL als PDE-5-Inhibitor über den cGMP-Signalweg wirkt, wurde außerdem die an der cGMP-Signalkaskade beteiligte PKG durch KT5823 und die Guanylatzyklase durch den spezifischen Inhibitor ODQ gehemmt. Diese Inhibition der cGMP-Signalkaskade blockierte den aktivitätssteigernden Effekt von SL sowohl in wt-CFTR-exprimierenden *X. laevis* Oozyten als auch in den CFBE41o<sup>-</sup> ( $\Delta$ F508-CFTR) und 16HBE14o<sup>-</sup> (wt-CFTR)-Zellen in funktionalen Ussing Kammer Messungen. Der aktivitätssteigernde Effekt von SL auf den CFTR wird somit wie bei der Behandlung der erektilen Dysfunktion über die cGMP-Signalkaskade vermittelt.

Weiterhin wurde hingegen klar gezeigt, dass die Stimulation der Exozytose durch SL in den wt-CFTR-exprimierenden Oozyten, aber auch in den funktionalen Messungen und proteinbiochemischen Analysen mit den humanen bronchialen Epithelzellen nicht durch die cGMP-Signalweginhibitoren gehemmt werden konnte. Die Stimulation der CFTR-Exozytose durch SL ist somit cGMP-unabhängig. Aufgrund der in diesem Fall ausgeschlossenen Wirkung von SL über die cGMP-Signalkaskade wird eine direkte Interaktion von SL mit dem CFTR angenommen, so dass die Untersuchung, ob SL direkt mit dem CFTR interagiert zukünftig eine interessante Aufgabe darstellt. In dieser Arbeit konnten somit zwei unabhängige Wirkungsmechanismen von SL auf den CFTR nachgewiesen werden. Zum ersten ist die Steigerung der Cl<sup>-</sup>-Sekretion cGMP-abhängig und zum zweiten ist die Stimulation der Exozytose von CFTR-Molekülen durch SL cGMP-unabhängig.

## 7 Abstract

The genetic disease Cystic Fibrosis (CF) is caused by a defective *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) gene. The most common mutation  $\Delta F508$  impairs functional CFTR expression, due to trafficking defects of the protein. In the present study we investigated the effect and mechanism of action of the phosphodiesterase-5 blocker sildenafil (SL). To verify if SL acts through a cGMP-dependent pathway we inhibited the guanyl cyclase by the inhibitor ODQ as well as the protein kinase G by its inhibitor KT5823. Thereby, SL was injected into CFTR expressing *X. laevis* oocytes and cAMP mediated current ( $I_m$ ), conductance ( $G_m$ ), and capacitance ( $C_m$ ) were analyzed. We detected a restored  $I_m$  and  $G_m$  in the  $\Delta F508$ -CFTR expressing oocytes. Additionally, we showed an increased  $I_m$ ,  $G_m$ , and  $C_m$  in wt-CFTR oocytes. The increase in  $I_m$  and  $G_m$  could be inhibited by ODQ and KT5823 significantly, whereas the  $C_m$  increase, which demonstrates exocytosis of wt-CFTR molecules, could not be inhibited. In the forefront of these experiments we showed that a wt-CFTR-mRNA with a poly-A tail of 120 adenine yielded the highest CFTR expression in the oocytes, and that the *X. laevis* oocytes endogenously express the PDE-5, which is inhibited by SL. Using human bronchial epithelial  $\Delta F508$ -CFTR (CFBE41o<sup>-</sup>) and wt-CFTR (16HBE14o<sup>-</sup>) cells, we confirmed the effect of SL. Using chamber experiments revealed an increase (wt-CFTR) and a restoration ( $\Delta F508$ -CFTR) of the channel activity by SL. In Western blot and immunofluorescence approaches SL induced an insertion of  $\Delta F508$ -CFTR and wt-CFTR molecules into the plasma membrane of 16HBE14o<sup>-</sup> and CFBE41o<sup>-</sup> cells. In these experiments with the human bronchial epithelial cells ODQ and KT5823 were able to block the CFTR activity increase but not the insertion of CFTR molecules by SL. Subsequently, these experiments indicate that SL acts as a corrector and a potentiator of CFTR function and thus is a promising CF therapeutic drug. Furthermore, SL acts via two mechanisms to influence CFTR. Firstly, the potentiation of the CFTR activity by SL is mediated through a cGMP dependent pathway. Secondly, the SL mediated wt-CFTR exocytosis as well as the correction of the  $\Delta F508$ -CFTR trafficking defect seems to be cGMP independent, which supports a direct interaction of SL and CFTR.

## 8 Literaturangaben

**Akabas MH.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem* 275: 3729-3732, 2000.

**Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K und Walter P.** Molekularbiologie der Zelle. *Wiley-VCH Verlag* 4. Auflage: 2004.

**Aleksandrov AA, Aleksandrov LA und Riordan JR.** CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel. *Pflugers Arch* 453: 693-702, 2007.

**Amaral MD.** CFTR and chaperones: processing and degradation. *J Mol Neurosci* 23: 41-48, 2004.

**Ameen NA, Marino C und Salas PJ.** cAMP-dependent exocytosis and vesicle traffic regulate CFTR and fluid transport in rat jejunum *in vivo*. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C429-C438, 2003.

**Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE und Welsh MJ.** Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* 251: 679-682, 1991.

**Anderson P.** Emerging therapies in cystic fibrosis. *Ther Adv Respir Dis* 4: 177-185, 2010.

**Ballard SA, Gingell CJ, Tang K, Turner LA, Price ME und Naylor AM.** Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue *in vitro* and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J Urol* 159: 2164-2171, 1998.

**Bangel N, Dahlhoff C, Sobczak K, Weber WM und Kusche-Vihrog K.** Upregulated expression of ENaC in human CF nasal epithelium. *J Cyst Fibros* 7: 197-205, 2008.

**Bangel-Ruland N, Sobczak K, Leier G, Leciejewski B und Weber WM.** Transfer of CFTR-mRNA for the treatment of cystic fibrosis related lung disease. *Pediatr Pulmonol* 45: 245-246, 2010.

**Bender AT und Beavo JA.** Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58: 488-520, 2006.



**Berger AL, Randak CO, Ostedgaard LS, Karp PH, Vermeer DW und Welsh MJ.** Curcumin stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel activity. *J Biol Chem* 280: 5221-5226, 2005.

**Berger HA, Travis SM und Welsh MJ.** Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 268: 2037-2047, 1993.

**Bertrand CA und Frizzell RA.** The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C1-18, 2003.

**Bompadre SG, Li M und Hwang TC.** Mechanism of G551D-CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) potentiation by a high affinity ATP analog. *J Biol Chem* 283: 5364-5369, 2008.

**Caci E, Caputo A, Hinzpeter A, Arous N, Fanen P, Sonawane N, Verkman AS, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O und Galiotta LJ.** Evidence for direct CFTR inhibition by CFTR(inh)-172 based on Arg347 mutagenesis. *Biochem J* 413: 135-142, 2008.

**Caldwell RA, Boucher RC und Stutts MJ.** Neutrophil elastase activates near-silent epithelial Na<sup>+</sup> channels and increases airway epithelial Na<sup>+</sup> transport. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L813-L819, 2005.

**Carlile GW, Robert R, Zhang D, Teske KA, Luo Y, Hanrahan JW und Thomas DY.** Correctors of protein trafficking defects identified by a novel high-throughput screening assay. *ChemBiochem* 8: 1012-1020, 2007.

**Ceriotti A und Colman A.** mRNA translation in *Xenopus* oocytes. *Methods Mol Biol* 37: 151-178, 1995.

**Chen JH, Chang XB, Aleksandrov AA und Riordan JR.** CFTR is a monomer: biochemical and functional evidence. *J Membr Biol* 188: 55-71, 2002.

**Chen JH, Stoltz DA, Karp PH, Ernst SE, Pezzulo AA, Moninger TO, Rector MV, Reznikov LR, Launspach JL, Chaloner K, Zabner J und Welsh MJ.** Loss of anion transport without increased sodium absorption characterizes newborn porcine cystic fibrosis airway epithelia. *Cell* 143: 911-923, 2010.

**Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR und Smith AE.** Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63: 827-834, 1990.

**Cholon DM, O'Neal WK, Randell SH, Riordan JR und Gentsch M.** Modulation of endocytic trafficking and apical stability of CFTR in primary human airway epithelial cultures. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298: L304-L314, 2010.

**Chraibi A, Vallet V, Firsov D, Hess SK und Horisberger JD.** Protease modulation of the activity of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 111: 127-138, 1998.

**Clunes MT und Boucher RC.** Cystic Fibrosis: The Mechanisms of Pathogenesis of an Inherited Lung Disorder. *Drug Discov Today Dis Mech* 4: 63-72, 2007.

**Cobb BR, Fan L, Kovacs TE, Sorscher EJ und Clancy JP.** Adenosine receptors and phosphodiesterase inhibitors stimulate Cl<sup>-</sup> secretion in Calu-3 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29: 410-418, 2003.

**Colgan DF und Manley JL.** Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 11: 2755-2766, 1997.

**Conti M.** Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 14: 1317-1327, 2000.

**Corbin JD und Francis SH.** Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J Biol Chem* 274: 13729-13732, 1999.

**Corbin JD, Francis SH und Webb DJ.** Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction. *Urology* 60: 4-11, 2002.

**Csanády L, Chan KW, Seto-Young D, Kopsco DC, Nairn AC und Gadsby DC.** Severed channels probe regulation of gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by its cytoplasmic domains. *J Gen Physiol* 116: 477-500, 2000.

**Cunningham SA, Worrell RT, Benos DJ und Frizzell RA.** cAMP-stimulated ion currents in *Xenopus* oocytes expressing CFTR cRNA. *Am J Physiol* 262: C783-C788, 1992.

**Da VG, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC und Arnaud P.** Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull* 25: 1600-1603, 2002.

**Dascal N.** The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* 22: 317-387, 1987.

**Davidson DJ und Dorin JR.** A model of the proposed structure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Expert Rev Mol Med* 6: 41-42, 2001.

**Davidson DJ und Porteous DJ.** Genetics and pulmonary medicine. 1. The genetics of cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 53: 389-397, 1998.

**Dean M, Rzhetsky A und Allikmets R.** The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11: 1156-1166, 2001.

**Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE und Welsh MJ.** Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 358: 761-764, 1992.

**Donaldson SH, Hirsh A, Li DC, Holloway G, Chao J, Boucher RC und Gabriel SE.** Regulation of the epithelial sodium channel by serine proteases in human airways. *J Biol Chem* 277: 8338-8345, 2002.

**Dormer RL, Harris CM, Clark Z, Pereira MM, Doull IJ, Norez C, Becq F und McPherson MA.** Sildenafil (Viagra) corrects DeltaF508-CFTR location in nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Thorax* 60: 55-59, 2005.

**Dragomir A, Bjorstad J, Hjelte L und Roomans GM.** Curcumin does not stimulate cAMP-mediated chloride transport in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 447-451, 2004.

**Drumm ML, Wilkinson DJ, Smit LS, Worrell RT, Strong TV, Frizzell RA, Dawson DC und Collins FS.** Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science* 254: 1797-1799, 1991.

**Du K, Sharma M und Lukacs GL.** The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat Struct Mol Biol* 12: 17-25, 2005.

**Egan ME, Pearson M, Weiner SA, Rajendran V, Rubin D, Glockner-Pagel J, Canny S, Du K, Lukacs GL und Caplan MJ.** Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* 304: 600-602, 2004.

**Eggermont E und De Boeck K.** Small-intestinal abnormalities in cystic fibrosis patients. *Eur J Pediatr* 150: 824-828, 1991.

**Ehrhardt C, Collnot EM, Baldes C, Becker U, Laue M, Kim KJ und Lehr CM.** Towards an *in vitro* model of cystic fibrosis small airway epithelium: characterisation of the human bronchial epithelial cell line CFBE41o<sup>-</sup>. *Cell Tissue Res* 323: 405-415, 2006.

**Farmen SL, Karp PH, Ng P, Palmer DJ, Koehler DR, Hu J, Beaudet AL, Zabner J und Welsh MJ.** Gene transfer of CFTR to airway epithelia: low levels of expression are sufficient to correct Cl<sup>-</sup> transport and overexpression can generate basolateral CFTR. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L1123-L1130, 2005.

**Favia M, Fanelli T, Bagorda A, Di SF, Reshkin SJ, Suh PG, Guerra L und Casavola V.** NHE3 inhibits PKA-dependent functional expression of CFTR by NHERF2 PDZ interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 347: 452-459, 2006.

**Fels J.** Fluoreszenzoptische Untersuchung von EGFP-gekoppelten Ionenkanälen. *Diplomarbeit* 2006.

**French PJ, Bijman J, Edixhoven M, Vaandrager AB, Scholte BJ, Lohmann SM, Nairn AC und de Jonge HR.** Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 270: 26626-26631, 1995.

**Frizzell RA, Rechkemmer G und Shoemaker RL.** Altered regulation of airway epithelial cell chloride channels in cystic fibrosis. *Science* 233: 558-560, 1986.

**Fuhrmann M, Jahn HU, Seybold J, Neurohr C, Barnes PJ, Hippenstiel S, Kraemer HJ und Suttorp N.** Identification and function of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 292-302, 1999.

**Gadsby DC und Nairn AC.** Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev* 79: S77-S107, 1999.

**Gadsby DC, Vergani P und Csanady L.** The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440: 477-483, 2006.

**Galili G, Kawata EE, Smith LD und Larkins BA.** Role of the 3'-poly(A) sequence in translational regulation of mRNAs in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 263: 5764-5770, 1988.

**Gibson RL, Burns JL und Ramsey BW.** Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 918-951, 2003.

**Gold R.** The axon guide for electrophysiology and biophysics: Laboratory techniques. *Axon Instruments, Inc* 1993.

**Goldenberg MM.** Safety and efficacy of sildenafil citrate in the treatment of male erectile dysfunction. *Clin Ther* 20: 1033-1048, 1998.

**Gopal VK, Francis SH und Corbin JD.** Allosteric sites of phosphodiesterase-5 (PDE5). A potential role in negative feedback regulation of cGMP signaling in corpus cavernosum. *Eur J Biochem* 268: 3304-3312, 2001.

**Goralski JL, Boucher RC und Button B.** Osmolytes and ion transport modulators: new strategies for airway surface rehydration. *Curr Opin Pharmacol* 10: 294-299, 2010.

**Grubb BR und Boucher RC.** Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. *Physiol Rev* 79: S193-S214, 1999.

**Gruenert DC, Willems M, Cassiman JJ und Frizzell RA.** Established cell lines used in cystic fibrosis research. *J Cyst Fibros* 3 Suppl 2: 191-196, 2004.

**Guggino WB und Stanton BA.** New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 426-436, 2006.

**Gupta M, Kovar A und Meibohm B.** The clinical pharmacokinetics of phosphodiesterase-5 inhibitors for erectile dysfunction. *J Clin Pharmacol* 45: 987-1003, 2005.

**Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR und Marbaix G.** Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233: 177-182, 1971.

**Hamosh A, Trapnell BC, Zeitlin PL, Montrose-Rafizadeh C, Rosenstein BJ, Crystal RG und Cutting GR.** Severe deficiency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator messenger RNA carrying nonsense mutations R553X and W1316X in respiratory epithelial cells of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 88: 1880-1885, 1991.

**Harris M, Firsov D, Vuagniaux G, Stutts MJ und Rossier BC.** A novel neutrophil elastase inhibitor prevents elastase activation and surface cleavage of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 282: 58-64, 2007.

**Higgins CF, Haag PD, Nikaido K, Ardeshir F, Garcia G und Ames GF.** Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature* 298: 723-727, 1982.

**Hirche TO, Loitsch S, Smaczny C und Wagner TO.** [New concepts of pathophysiology and therapy in cystic fibrosis]. *Pneumologie* 59: 811-818, 2005.

**Hoffman LM und Donaldson DD.** Vectors for *in vitro* synthesis of poly(A)-RNA transcripts. *Gene* 67: 137-140, 1988.

**Hofmann T, Stutts MJ, Ziersch A, Rückes C, Weber WM, Knowles MR, Lindemann H und Boucher RC.** Effects of topically delivered benzamil and amiloride on nasal potential difference in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1844-1849, 1998.

**Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, Simon P, Koslowski M, Huber C, Tureci O und Sahin U.** Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* 108: 4009-4017, 2006.

**Huez G, Marbaix G, Hubert E, Leclercq M, Nudel U, Soreq H, Salomon R, Lebleu B, Revel M und Littauer UZ.** Role of the polyadenylate segment in the translation of globin messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 3143-3146, 1974.

**Hughey RP, Bruns JB, Kinlough CL, Harkleroad KL, Tong Q, Carattino MD, Johnson JP, Stockand JD und Kleyman TR.** Epithelial sodium channels are activated by furin-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 279: 18111-18114, 2004.

**Illek B und Fischer H.** Flavonoids stimulate Cl conductance of human airway epithelium *in vitro* and *in vivo*. *Am J Physiol* 275: L902-L910, 1998.

**Jiang LH, Gawler DJ, Hodson N, Milligan CJ, Pearson HA, Porter V und Wray D.** Regulation of cloned cardiac L-type calcium channels by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275: 6135-6143, 2000.

**Johnson LG, Olsen JC, Sarkadi B, Moore KL, Swanstrom R und Boucher RC.** Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat Genet* 2: 21-25, 1992.

**Jones AM und Helm JM.** Emerging treatments in cystic fibrosis. *Drugs* 69: 1903-1910, 2009.

**Jurkuvenaite A, Chen L, Bartoszewski R, Goldstein R, Bebok Z, Matalon S und Collawn JF.** Functional stability of rescued delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42: 363-372, 2010.

**Klein SL, Strausberg RL, Wagner L, Pontius J, Clifton SW und Richardson P.** Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev Dyn* 225: 384-391, 2002.

**Kleizen B, van Vlijmen T, de Jonge HR und Braakman I.** Folding of CFTR is predominantly cotranslational. *Mol Cell* 20: 277-287, 2005.

**Knowles MR und Boucher RC.** Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 109: 571-577, 2002.

**Knowles MR, Gatzky J und Boucher RC.** Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 305: 1489-1495, 1981.

**Knowlton RG, Cohen-Haguenaer O, Van Cong N, Frezal J, Brown VA, Barker D, Braman JC, Schumm JW, Tsui LC und Buchwald M.** A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 318: 380-382, 1985.

**Koesling D, Mullershausen F, Lange A, Friebe A, Mergia E, Wagner C und Russwurm M.** Negative feedback in NO/cGMP signalling. *Biochem Soc Trans* 33: 1119-1122, 2005.

**Kotera J, Fujishige K und Omori K.** Immunohistochemical localization of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in rat tissues. *J Histochem Cytochem* 48: 685-693, 2000.

**Kreindler JL.** Cystic fibrosis: exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies. *Pharmacol Ther* 125: 219-229, 2010.

**Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

**Lange T, Jungmann P, Haberle J, Falk S, Duebbers A, Bruns R, Ebner A, Hinterdorfer P, Oberleithner H und Schillers H.** Reduced number of CFTR molecules in erythrocyte plasma membrane of cystic fibrosis patients. *Mol Membr Biol* 23: 317-323, 2006.

**Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L und Schekman R.** Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 87-123, 2004.

**Letz B und Korbmacher C.** cAMP stimulates CFTR-like Cl<sup>-</sup> channels and inhibits amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channels in mouse CCD cells. *Am J Physiol* 272: C657-C666, 1997.

**Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK, Connors K, Dickey M, Dorwart M, Fowler R, Gao X, Guggino WB, Hendrickson WA, Hunt JF, Kearins MC, Lorimer D, Maloney PC, Post KW, Rajashankar KR, Rutter ME, Sauder JM, Shriver S, Thibodeau PH, Thomas PJ, Zhang M, Zhao X und Emtage S.** Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J* 23: 282-293, 2004.

**Li C, Ramjeesingh M, Reyes E, Jensen T, Chang X, Rommens JM und Bear CE.** The cystic fibrosis mutation (delta F508) does not influence the chloride channel activity of CFTR. *Nat Genet* 3: 311-316, 1993.

**Lindemann H, Dockter G und Tümmler B.** Mukoviszidose- Zystische Fibrose. *Thieme Verlag* 4. Auflage: 2004.

**Linsdell P.** Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Exp Physiol* 91: 123-129, 2006.

**Loo MA, Jensen TJ, Cui L, Hou Y, Chang XB und Riordan JR.** Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J* 17: 6879-6887, 1998.

**Loo TW, Bartlett MC und Clarke DM.** Correctors promote folding of the CFTR in the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 413: 29-36, 2008.

**Lubamba B, Lebacq J, Reyhler G, Marbaix E, Wallemacq P, Lebecque P und Leal T.** Inhaled PDE5 inhibitors restore chloride transport in cystic fibrosis mice. *Eur Respir J* 2010.

**Lubamba B, Lecourt H, Lebacq J, Lebecque P, De Jonge H, Wallemacq P und Leal T.** Preclinical evidence that sildenafil and vardenafil activate chloride transport in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 506-515, 2008.

**Ma T, Thiagarajah JR, Yang H, Sonawane ND, Folli C, Galiotta LJ und Verkman AS.** Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J Clin Invest* 110: 1651-1658, 2002.

**Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK und Boucher RC.** Increased airway epithelial Na<sup>+</sup> absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* 10: 487-493, 2004.

**Mall M, Hipper A, Greger R und Kunzelmann K.** Wild type but not deltaF508 CFTR inhibits Na<sup>+</sup> conductance when coexpressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 381: 47-52, 1996.

**Marchiando AM, Graham WV und Turner JR.** Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol* 5: 119-144, 2010.

**Marshall J, Fang S, Ostedgaard LS, O'Riordan CR, Ferrara D, Amara JF, Hoppe H, Scheule RK, Welsh MJ und Smith AE.** Stoichiometry of recombinant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cells and its functional reconstitution into cells *in vitro*. *J Biol Chem* 269: 2987-2995, 1994.

**Meacham GC, Lu Z, King S, Sorscher E, Tousson A und Cyr DM.** The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J* 18: 1492-1505, 1999.

**Mense M, Vergani P, White DM, Altberg G, Nairn AC und Gadsby DC.** *In vivo* phosphorylation of CFTR promotes formation of a nucleotide-binding domain heterodimer. *EMBO J* 25: 4728-4739, 2006.



**Mornon JP, Lehn P und Callebaut I.** Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: membrane-spanning domains and coupling interfaces. *Cell Mol Life Sci* 65: 2594-2612, 2008.

**Mueller C und Flotte TR.** Gene therapy for cystic fibrosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 35: 164-178, 2008.

**Mülhardt C.** Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. *Spektrum Akademischer Verlag* 2009.

**Myerburg MM, Butterworth MB, McKenna EE, Peters KW, Frizzell RA, Kleyman TR und Pilewski JM.** Airway surface liquid volume regulates ENaC by altering the serine protease-protease inhibitor balance: a mechanism for sodium hyperabsorption in cystic fibrosis. *J Biol Chem* 281: 27942-27949, 2006.

**Nagel G, Barbry P, Chabot H, Brochiero E, Hartung K und Grygorczyk R.** CFTR fails to inhibit the epithelial sodium channel ENaC expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 564: 671-682, 2005.

**Norez C, Noel S, Wilke M, Bijvelds M, Jorna H, Melin P, DeJonge H und Becq F.** Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett* 580: 2081-2086, 2006.

**O'Grady SM, Jiang X, Maniak PJ, Birmachu W, Scribner LR, Bulbulian B und Gullikson GW.** Cyclic AMP-dependent Cl<sup>-</sup> secretion is regulated by multiple phosphodiesterase subtypes in human colonic epithelial cells. *J Membr Biol* 185: 137-144, 2002.

**Ostedgaard LS, Baldursson O und Welsh MJ.** Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by its R domain. *J Biol Chem* 276: 7689-7692, 2001.

**Passero CJ, Mueller GM, Rondon-Berrios H, Tofovic SP, Hughey RP und Kleyman TR.** Plasmin activates epithelial Na<sup>+</sup> channels by cleaving the gamma subunit. *J Biol Chem* 283: 36586-36591, 2008.

**Pedemonte N, Lukacs GL, Du K, Caci E, Zegarra-Moran O, Galletta LJ und Verkman AS.** Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest* 115: 2564-2571, 2005a.

**Pedemonte N, Sonawane ND, Taddei A, Hu J, Zegarra-Moran O, Suen YF, Robins LI, Dicus CW, Willenbring D, Nantz MH, Kurth MJ, Galiotta LJ und Verkman AS.** Phenylglycine and sulfonamide correctors of defective delta F508 and G551D cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride-channel gating. *Mol Pharmacol* 67: 1797-1807, 2005b.

**Pedemonte N, Tomati V, Sondo E und Galiotta LJ.** Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C866-C874, 2010.

**Picard N, Eladari D, El MS, Planes C, Bourgeois S, Houillier P, Wang Q, Burnier M, Deschenes G, Knepper MA, Meneton P und Chambrey R.** Defective ENaC processing and function in tissue kallikrein-deficient mice. *J Biol Chem* 283: 4602-4611, 2008.

**Picciotto MR, Cohn JA, Bertuzzi G, Greengard P und Nairn AC.** Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 267: 12742-12752, 1992.

**Pind S, Riordan JR und Williams DB.** Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 269: 12784-12788, 1994.

**Pletz MW, Sauer-Heilborn A, Kohnlein T, Seidler U und Lamprecht G.** [Cystic fibrosis in adults]. *Internist* 51 Suppl 1: 277-288, 2010.

**Poschet JF, Timmins GS, Taylor-Cousar JL, Ornatowski W, Fazio J, Perkett E, Wilson KR, Yu HD, de Jonge HR und Deretic V.** Pharmacological modulation of cGMP levels by phosphodiesterase 5 inhibitors as a therapeutic strategy for treatment of respiratory pathology in cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L712-L719, 2007.

**Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW und Balch WE.** Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem* 78: 959-991, 2009.

**Prince LS, Workman RB, Jr. und Marchase RB.** Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5192-5196, 1994.

**Rab A, Bartoszewski R, Jurkuvenaite A, Wakefield J, Collawn JF und Bebok Z.** Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C756-C766, 2007.

**Raghuram V, Mak DO und Foskett JK.** Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1300-1305, 2001.

**Ramsey BW.** What is the role of upper airway bacterial cultures in patients with cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol* 21: 265-266, 1996.

**Ratjen F.** Recent advances in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 9: 144-148, 2008.

**Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, McCann JD, Klinger KW, Smith AE und Welsh MJ.** Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 347: 358-363, 1990.

**Riordan JR.** CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* 77: 701-726, 2008.

**Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N und Chou JL.** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073, 1989.

**Robert R, Carlile GW, Liao J, Balghi H, Lesimple P, Liu N, Kus B, Rotin D, Wilke M, de Jonge HR, Scholte BJ, Thomas DY und Hanrahan JW.** Correction of the Delta phe508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking defect by the bioavailable compound glafenine. *Mol Pharmacol* 77: 922-930, 2010.

**Robert R, Carlile GW, Pavel C, Liu N, Anjos SM, Liao J, Luo Y, Zhang D, Thomas DY und Hanrahan JW.** Structural analog of sildenafil identified as a novel corrector of the F508del-CFTR trafficking defect. *Mol Pharmacol* 73: 478-489, 2008.

**Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray PB, Jr., Zabner J, Prather RS und Welsh MJ.** Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* 321: 1837-1841, 2008.

**Rubenstein RC, Egan ME und Zeitlin PL.** *In vitro* pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J Clin Invest* 100: 2457-2465, 1997.

**Rubenstein RC und Zeitlin PL.** A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 484-490, 1998.

**Rückes-Nilges C, Haus K, Schüler D und Lindemann H.** Einfluss von Sildenafil auf elektrophysiologische Parameter bei respiratorischen Epithelzellen von Mukoviszidose Patienten. *Abstract der 29 Jahrestagung der DPP* 2007.

**Rückes-Nilges C, Weber U, Popp C, Fryen A, Klimek T, Glanz H, Lindemann H, Munker G, Clauss W und Weber WM.** [Ion transport in nasal and paranasal sinus mucosa in mucoviscidosis and chronic sinusitis]. *HNO* 47: 157-166, 1999.

**Sadler SE.** Type III phosphodiesterase plays a necessary role in the growth-promoting actions of insulin, insulin-like growth factor-I, and Ha p21ras in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Endocrinol* 5: 1939-1946, 1991.

**Schmidt A, Hughes LK, Cai Z, Mendes F, Li H, Sheppard DN und Amaral MD.** Prolonged treatment of cells with genistein modulates the expression and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Br J Pharmacol* 153: 1311-1323, 2008.

**Schmidt RF und Lang F.** Physiologie des Menschen. *Springer Medizin Verlag* 30. Auflage: 2007.

**Schmitz S.** Der Experimentator Zellkultur. *Spektrum Akademischer Verlag* 139-140, 2007.

**Schwartz BG und Kloner RA.** Drug interactions with phosphodiesterase-5 inhibitors used for the treatment of erectile dysfunction or pulmonary hypertension. *Circulation* 122: 88-95, 2010.

**Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ und Guggino WB.** CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev* 79: S145-S166, 1999.

**Schwiebert EM, Morales MM, Devidas S, Egan ME und Guggino WB.** Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2674-2679, 1998.

**Semmler J, Sobczak K und Weber WM.** Regulatory influences on CFTR conductance in human HT29/B6 colon cells. *Abstract der 102 Jahrestagung der DZG* 184, 2009.

**Sharma M, Pampinella F, Nemes C, Benharouga M, So J, Du K, Bache KG, Papsin B, Zerangue N, Stenmark H und Lukacs GL.** Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol* 164: 923-933, 2004.

**Shenolikar S, Voltz JW, Cunningham R und Weinman EJ.** Regulation of ion transport by the NHERF family of PDZ proteins. *Physiology (Bethesda)* 19: 362-369, 2004.

**Sheppard DN und Welsh MJ.** Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79: S23-S45, 1999.

**Silverthorn D.U.** Physiologie. *Pearson Verlag* 4. Auflage: 2009.

**Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ und Hunt JF.** ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* 10: 139-149, 2002.

**Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ und Klenk DC.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, 1985.

**Smith SS, Liu X, Zhang ZR, Sun F, Kriewall TE, McCarty NA und Dawson DC.** CFTR: covalent and noncovalent modification suggests a role for fixed charges in anion conduction. *J Gen Physiol* 118: 407-431, 2001.

**Sobczak K, Bangel-Ruland N, Leier G, Semmler J, Fremerey J und Weber WM.** Antisense oligonucleotides as potent molecules for the long-term inhibition of ENaC expression. *Acta Physiologica* 198: 60, 2010a.

**Sobczak K, Bangel-Ruland N, Leier G und Weber WM.** Endogenous transport systems in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Methods* 51: 183-189, 2010b.

**Sobczak K, Segal A, Bangel-Ruland N, Semmler J, Van Driessche W, Lindemann H, Heermann R und Weber WM.** Specific inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> channels by antisense oligonucleotides for the treatment of Na<sup>+</sup> hyperabsorption in cystic fibrosis. *J Gene Med* 11: 813-823, 2009.

**Song Y, Namkung W, Nielson DW, Lee JW, Finkbeiner WE und Verkman AS.** Airway surface liquid depth measured in *ex vivo* fragments of pig and human trachea: dependence on Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channel function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L1131-L1140, 2009.

**Sullivan SK, Agellon LB und Schick R.** Identification and partial characterization of a domain in CFTR that may bind cyclic nucleotides directly. *Curr Biol* 5: 1159-1167, 1995.

**Sun F, Zhang R, Gong X, Geng X, Drain PF und Frizzell RA.** Derlin-1 promotes the efficient degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and CFTR folding mutants. *J Biol Chem* 281: 36856-36863, 2006.

**Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR und Hanrahan JW.** Phosphorylation-regulated Cl<sup>-</sup> channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* 352: 628-631, 1991.

**Taddei A, Folli C, Zegarra-Moran O, Fanen P, Verkman AS und Galiotta LJ.** Altered channel gating mechanism for CFTR inhibition by a high-affinity thiazolidinone blocker. *FEBS Lett* 558: 52-56, 2004.

**Taglialatela M, Pannaccione A, Iossa S, Castaldo P und Annunziato L.** Modulation of the K<sup>(+)</sup> channels encoded by the human ether-a-gogo-related gene-1 (hERG1) by nitric oxide. *Mol Pharmacol* 56: 1298-1308, 1999.

**Thelin WR und Boucher RC.** The epithelium as a target for therapy in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* 7: 290-295, 2007.

**Tiddens HA, Donaldson SH, Rosenfeld M und Pare PD.** Cystic fibrosis lung disease starts in the small airways: can we treat it more effectively? *Pediatr Pulmonol* 45: 107-117, 2010.

**Toward TJ, Smith N und Broadley KJ.** Effect of phosphodiesterase-5 inhibitor, sildenafil (Viagra), in animal models of airways disease. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 227-234, 2004.

**Ussing HH 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.

**Vaandrager AB, Tilly BC, Smolenski A, Schneider-Rasp S, Bot AG, Edixhoven M, Scholte BJ, Jarchau T, Walter U, Lohmann SM, Poller WC und de Jonge HR.** cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type I $\beta$ . *J Biol Chem* 272: 4195-4200, 1997.

**Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD und Rossier BC.** An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 389: 607-610, 1997.

**Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Cao D, Neuberger T, Turnbull A, Singh A, Joubbran J, Hazlewood A, Zhou J, McCartney J, Arumugam V, Decker C, Yang J, Young C, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M und Negulescu P.** Rescue of CF airway epithelial cell function *in vitro* by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18825-18830, 2009.

**Van Goor F, Straley KS, Cao D, Gonzalez J, Hadida S, Hazlewood A, Joubran J, Knapp T, Makings LR, Miller M, Neuberger T, Olson E, Panchenko V, Rader J, Singh A, Stack JH, Tung R, Grootenhuis PD und Negulescu P.** Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L1117-L1130, 2006.

**Varga K, Goldstein RF, Jurkuvenaite A, Chen L, Matalon S, Sorscher EJ, Bebok Z und Collawn JF.** Enhanced cell-surface stability of rescued DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by pharmacological chaperones. *Biochem J* 410: 555-564, 2008.

**Vergani P, Lockless SW, Nairn AC und Gadsby DC.** CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature* 433: 876-880, 2005.

**Wallis RM, Corbin JD, Francis SH und Ellis P.** Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings *in vitro*. *Am J Cardiol* 83: 3C-12C, 1999.

**Wang Y, Bartlett MC, Loo TW und Clarke DM.** Specific rescue of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing mutants using pharmacological chaperones. *Mol Pharmacol* 70: 297-302, 2006.

**Wang Y, Loo TW, Bartlett MC und Clarke DM.** Correctors promote maturation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-processing mutants by binding to the protein. *J Biol Chem* 282: 33247-33251, 2007.

**Ward CL und Kopito RR.** Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem* 269: 25710-25718, 1994.

**Weber WM.** Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta* 1421: 213-233, 1999.

**Weber WM, Cuppens H, Cassiman JJ, Clauss W und Van Driessche W.** Capacitance measurements reveal different pathways for the activation of CFTR. *Pflugers Arch* 438: 561-569, 1999.

**Weber WM, Segal A, Simaels J, Vankeerberghen A, Cassiman JJ und Van Driessche W.** Functional integrity of the vesicle transporting machinery is required for complete activation of cFTR expressed in *xenopus laevis* oocytes. *Pflugers Arch* 441: 850-859, 2001.

**Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrick P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW und Sweeney HL.** PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447: 87-91, 2007.

**Will K, Reiss J, Dean M, Schlosser M, Slomski R, Schmidtke J und Stuhmann M.** CFTR transcripts are undetectable in lymphocytes and respiratory epithelial cells of a CF patient homozygous for the nonsense mutation R553X. *J Med Genet* 30: 833-837, 1993.

**Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebok Z, Shushi L, Kerem B und Kerem E.** Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med* 349: 1433-1441, 2003.

**Yamamoto A, Kormann M, Rosenecker J und Rudolph C.** Current prospects for mRNA gene delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 71: 484-489, 2009.

**Yang Y, Janich S, Cohn JA und Wilson JM.** The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9480-9484, 1993.

**Younger JM, Chen L, Ren HY, Rosser MF, Turnbull EL, Fan CY, Patterson C und Cyr DM.** Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* 126: 571-582, 2006.

**Zhang L, Aleksandrov LA, Zhao Z, Birtley JR, Riordan JR und Ford RC.** Architecture of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein and structural changes associated with phosphorylation and nucleotide binding. *J Struct Biol* 167: 242-251, 2009.

**Zielenski J und Tsui LC.** Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 29: 777-807, 1995.



## 9 Anhang

### 9.1 Chemikalien und Zusätze

**Tabelle 48: Chemikalien und Zusätze**

Substanz	Firma	Firmensitz
1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ)	Enzo Lifescience	Lörrach; Deutschland
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma	Taufkirchen; Deutschland
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyphosphate p-Toluidin Salz (BCIP)	Fermentas	St. Leon-Roth; Deutschland
8-CTP-cAMP	Biolog	Bremen; Deutschland
8-CTP-cGMP	Biolog	Bremen; Deutschland
Aceton	Applichem	Darmstadt; Deutschland
Acrylamid Gel 30	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Agar	Applichem	Darmstadt; Deutschland
Agarose Seakem LE	Segenetic	Borken; Deutschland
Ammoniumacetat (5M)	Ambion	Texas; USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Ampicillin	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Borsäure	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt; Deutschland

---

Calciumchlorid	Roth	Karlsruhe; Deutschland
CFTR <sub>inh</sub> -172	Tocris Cookson	Ellisville; USA
Chloroform	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Coomassie Brilliant Blau R-250	Roth	Karlsruhe; Deutschland
<i>Dako Fluorescent Mounting</i>	Dako	Glostrup; Dänemark
Medium		
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	Karlsruhe; Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Dithiotreitol (DTT)	Roth	Karlsruhe; Deutschland
dNTPs	Fermentas	St. Leon-Roth; Deutschland
EDTA	Serva	Heidelberg; Deutschland
EGTA	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Essigsäure (96%)	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Ethanol p.a. (99,8%)	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Ethidiumbromid	Roth	Karlsruhe; Deutschland
FKS ( <i>FCS superior</i> )	Biochrom	Berlin; Deutschland
Formaldehyd (37%)	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Glukose	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Glutaraldehyd	Serva	Heidelberg; Deutschland
Glycerin	Merck	Darmstadt; Deutschland
GNS ( <i>goat normal serum</i> )	Sigma	Taufkirchen; Deutschland
H8	Cayman Chemical	Michigan, USA

---

---

Hefe Extrakt	Roth	Karlsruhe; Deutschland
HEPES	Roth	Karlsruhe; Deutschland
humanes Fibronectin	Biochrom	Berlin; Deutschland
Isopropanol	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Kaliumchlorid	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Kollagenase NB8 aus	Serva	Heidelberg; Deutschland
<i>Chlostridium histolyticum</i>		
KT5823	Enzo Lifescience	Lörrach; Deutschland
L-Glutamin	Biochrom	Berlin; Deutschland
LHC Basalmedium	Invitrogen	Karlsruhe; Deutschland
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Methanol p. a.	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Milchpulver	Roth	Karlsruhe; Deutschland
<i>Minimum Essential Medium</i>	PAA Laboratories	Pasching; Österreich
<i>Eagle (MEM)</i>		
MOPS	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Natriumacetat	Fermentas	St. Leon-Roth; Deutschland
Natriumacetat	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Natriumcarbonat	Merck	Darmstadt; Deutschland
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Natriumhydroxid	Roth	Karlsruhe; Deutschland

---

---

Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Fermentas	St. Leon-Roth; Deutschland
nukleasefreies Wasser	Fermentas	St. Leon-Roth; Deutschland
p-Cumarsäure	Sigma	Taufkirchen; Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories	Pasching; Österreich
Phenol-Chloroform	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Rinderkollagenase	Biochrom	Berlin; Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Biochrom	Berlin; Deutschland
RNase Inhibitor Ribolock	Fermentas	St. Leon-Roth; Deutschland
Salzsäure	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Sildenafil	Molekular	Taufkirchen; Deutschland
$\beta$ -Aminophthalhydrazid	Sigma	Taufkirchen; Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Tricaine (MS222)	Sigma	Taufkirchen; Deutschland
Tris	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Trypsin-/EDTA-Lösung	Biochrom	Berlin; Deutschland
Trypton Medium	Fluka	München; Deutschland
Tween	Roth	Karlsruhe; Deutschland
Wasserstoffperoxid	Roth	Karlsruhe; Deutschland
X-Gal	Roth	Karlsruhe; Deutschland

---

## 9.2 Verwendete Geräte

**Tabelle 49: Verwendete Geräte**

Gerät	Name	Hersteller
Verstärker	OC-725C	Warner Instruments Inc. ; Hamden; USA
Ag <sup>+</sup> /AgCl-Pellets		A-M Systems, Inc.; Carlsborg; USA
Joysticks	Digital Scope STM3	Lang GmbH & Co KG; Hüttenberg; Deutschland
DSP-boards		Dalano Spry; Rochester; USA
Elektrodenhalter		BioMedical Instruments; Zöllnitz; Deutschland
Kaltlichtlampe	KL 1500 LCD	Schott Glas; Mainz; Deutschland
Kapillar-Puller	PC-10	Narishige International Inc.; New York; USA
	P97	Sutter Instrument Co.; Novota; USA
Mikroinjektor	Nanoliter 2000	World Precision Instruments Inc.; Sarasota; USA
Mikromanipulator	DC 3 KS	Merzhäuser; Wetzlar; Deutschland
Vakuumpumpe	Mini-Laborpumpe N86	KNF Neuberger GmbH; Freiburg; Deutschland
	K.N. 18	
Binokular	Askamania	Mikroskop Technik; Rathenau; Deutschland

---

Osmometer	Osmomat 030	Gonotec GmbH; Berlin; Deutschland
Chlorieranlage		Werkstatt Institut für Tierphysiologie; Münster; Deutschland
Oszilloskop	HM 507 analog	HAMEG Instruments; Frankfurt; Deutschland
Ussing Kammer	UC-65-CP	Prof. W. van Driessche; KU Leuven; Belgien
Mikroskope	LSM 510 META	Zeiss; Jena; Deutschland
	inverses Mikroskop (Zellkultur)	Zeiss; Jena; Deutschland
Lampe	HBO 100	Zeiss; Jena; Deutschland
Kamera	AxioCam MRc5	Zeiss; Jena; Deutschland
Filtersatz	F31-118Q	AHF Analysetechnik AG; Tübingen; Deutschland
Objektiv	alpha Plan-Fluar 100x/1,45 <i>Oil</i>	Zeiss; Jena; Deutschland
Zentrifugen	Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
	Tischzentrifuge 5414D	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
	Tischzentrifuge 5702	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
	Tischzentrifuge 5804	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
	MiniSpin	Eppendorf; Hamburg; Deutschland
	Concentrator 5301	Eppendorf; Hamburg; Deutschland

---

---

Blot Apparatur	Fastblot semi-dry B43	Biometra; Göttingen; Deutschland
	Standard Power Pack P25	Biometra; Göttingen; Deutschland
Thermocycler	Biometra T Personal	Biometra; Göttingen; Deutschland
	Biometra T Gradient	Biometra; Göttingen; Deutschland
Geldokumentation	BioDocAnalyse	Biometra; Göttingen; Deutschland
Wasserbad	Isotemp 210 (Zellkultur)	Thermo Fisher Scientific; Schwerte; Deutschland
	Thermo Haake DC10/P5	Thermo Electron; Karlsruhe; Deutschland
Zellkultur- Werkbank	Heraeus HERASafe HS15	Kendro; Hanau; Deutschland
Zellkultur-Inkubator	Heraeus BBD 6220	Kendro; Hanau; Deutschland
Wärmeschrank	WTC Binder (Zellkultur)	WTC; Tuttlingen; Deutschland
	Heraeus function line T12	Kendro; Hanau; Deutschland
pH-Meter	inolab pH Level 2	WTW; Weilheim; Deutschland
Wasseraufbereitung	Milli-Q-Water Biocel	Millipore; Bedford; USA
Autoklav	3850 EL	Systec; Wettengel; Deutschland
Heizblock	Blockthermostat BT 200	Kleinfeld Labortechnik; Gehrden; Deutschland
Magnetrührer	RCT basic	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG; Staufen; Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex RK100H	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG; Berlin; Deutschland

---

---

Photometer	S2100 Diode Array	WPA Biowave; Cambridge; UK
	Spectrophotometer	
	Nanodrop 1000	Peq Lab, Biotechnologie GmbH; Erlangen; Deutschland
Schüttler	Typ 3005	GFL <sup>®</sup> ; Burgwedel; Deutschland
	Inova 4000	New Brunswick Scientific; Edison; USA
Rollinkubator	RM5	Karl Hecht KG; Sondheim; Deutschland

---



### 9.3 Verwendete Primer

**Tabelle 50: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer**

Gen	Sequenzen 5`-3`	Fragmentlänge	Tm
<i>Xenopus</i> PDE-5			
sense	CATGAGCTCATAGCAGATC	243 bp	64°C
<i>Xenopus</i> PDE-5			
antisense	GAATCTGGAGTCCTGGTAAGCATC		67°C
<i>Xenopus</i> Gap-DH			
sense	GTGGGGAGATGCTGGTGCCGTG	242 bp	67°C
<i>Xenopus</i> Gap-DH			
antisense	GCGAGAGGAGCCAGACAGTTTG		64°C
T3-Promotor			
Primer	ATTAACCCTCACTAAAGGGA		

*T<sub>m</sub>, Schmelztemperatur; Die Primer haben eine Konzentration von 100 pmol/μl und wurden von der Firma Metabion (Martinsried; Deutschland) hergestellt.*

## 9.4 Verwendete Antikörper

**Tabelle 51: Nukleotidsequenzen der verwendeten Antikörper**

Antikörper		Verdünnung	Hersteller, Firmensitz
anti-CFTR	MA1-935; monoklonal (Wirtsspezies: Maus)	1: 500	Dianova; Hamburg; Deutschland
anti-Tubulin	$\alpha$ -AB-2 (Klon DM1A), monoklonal (Wirtsspezies: Maus)	1:200	Dianova; Hamburg; Deutschland
anti-Maus	IgG Peroxidase <i>conjugate</i> (115-035-062)	1:10000	Dianova; Hamburg; Deutschland
anti-Maus	<i>Alkaline Phosphatase</i> <i>conjugated AffiniPure</i> (115-055-062); polyklonal	1:10000	Dianova; Hamburg; Deutschland
anti-Maus ( <i>Qdots</i> )	<i>655 goat F(ab') IgG</i> <i>conjugate</i> (1 $\mu$ M)	1:200	Invitrogen; Karlsruhe; Deutschland

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. W.-M. Weber für die Vergabe des wirklich sehr interessanten Projekts meiner Arbeit, sowie für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die gesamte Unterstützung während meiner Arbeit.

Frau Prof. Dr. E. Liebau möchte ich für die Bereitschaft danken, meine Arbeit als Zweitgutachterin zu bewerten.

Weiterhin möchte ich besonders Frau Dr. Nadine Bangel-Ruland und Frau Dr. Katja Sobczak für die wunderbare Unterstützung bei dieser Arbeit, den vielen nützlichen, praktischen Tipps und der Hilfe in schweren Zeiten danken.

Allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, besonders aber Conny, Katja, Nadine, Yvonne, Knut und Benno danke ich für die vielen schönen Stunden in den letzten Jahren. An dieser Stelle denke ich besonders gerne an die vielen lustigen Stunden mit Conny vor den Oozyten Mesständen zurück. Vielen lieben Dank auch für diese Erlebnisse, Conny.

Darüber hinaus gilt mein Dank Conny Rohe, Yvonne Knieper und den ehemaligen Bachelorstudentinnen Magdalena Adamczyk, Jennifer Antfang, Katharina Bender und Johanna Solbach für die Hilfe bei den Untersuchungen zu dieser Arbeit.

Claudia Rückes-Nilges danke ich für die gute Zusammenarbeit, die Ratschläge und die Voruntersuchungen zu diesem Projekt. Weiterhin möchte ich Prof. Dr. med. J. Rosenecker und Prof. Dr. med. K. Kunzelmann für die zur Verfügung gestellten Plasmide danken.

Für die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums danke ich Herrn Prof. Dr. Lindemann und dem Mukoviszidose Förderverein Gießen e.V. recht herzlich. Darüber hinaus danke ich herzlich Herrn Kegelmann und der Deutschen Förderungsgesellschaft zur Mukoviszidoseforschung e.V. für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts und unserer gesamten Forschung.

Meinen Freunden und Freundinnen, im besonderen Julia und Nicole danke ich für die Ablenkung, die vielen aufmunternden Worte und dafür, dass ihr immer für mich da seid, wenn ich euch brauche.

Ein sehr besonderer und lieber Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Jennifer, weil ihr mich immer und in allem unterstützt und mich immer glauben macht, dass ich alles schaffen kann, was ich mir vornehme.

Abschließend möchte ich mich liebevoll bei meinem Freund Sascha bedanken, denn ohne seine Liebe, Geduld und Unterstützung wäre so vieles, unter anderem auch diese Arbeit, nicht möglich gewesen.

DANKE!

# Lebenslauf

