

Stephan Spahn
Dr. med.

Functional characterization of the chloride channel SLC26A9 in epithelial cells

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde

Doktorvater: Prof Dr. med. Marcus A. Mall

Einleitung

Aufbauend auf verschiedensten Experimenten, von genomweiten Assoziationsstudien bis hin zu *in vivo* Ergebnissen in *Slc26a9* Knockoutmäusen, lässt sich schlussfolgern, dass der alternative Cl^- Kanal SLC26A9 ein wichtiger Modulator und ein vielversprechendes neues pharmakologisches Ziel in der Behandlung von Mukoviszidose und anderen mukobstruktiven Lungenerkrankungen darstellt.

Trotz dieser überzeugenden Ergebnisse, ist jedoch wenig über die Funktion und Regulierung von SLC26A9 bekannt, da keine epithelialen Zellmodelle mit stabiler SLC26A9 Expression existieren, welche biochemische und funktionelle Experimente über SLC26A9 erlauben würden. Daher wurden neue epitheliale Zelllinien mit stabiler SLC26A9 Überexpression im Detail durch Immunhistochemie, Western Blots und elektrophysiologische Ussing Kammer Experimente charakterisiert.

Ergebnisse

Um die Funktion und Regulation von SLC26A9 im Epithelium besser zu verstehen, wurden die neu generierten epithelialen FRT und CFBE wtCFTR Zelllinien mit stabiler SLC26A9 charakterisiert. Immunhistochemisch ließ sich in den neuen Zelllinien eine stabile und vorwiegend intrazelluläre Expression von SLC26A9 nachweisen. Biotinylierungs- und Glykosylierungsanalysen in den neu etablierten SLC26A9-FRT Zelllinien demonstrierten, dass SLC26A9 die Qualitätskontrolle des ER passiert, post-translational modifiziert wird und in die apikale Membran transportiert wird. Elektrophysiologische Untersuchungen validierten, dass in den neuen Zelllinien die Überexpression des Cl^- Kanal SLC26A9 den basalen I_{sc} erhöht. Funktionell zeigte sich, dass Hyperosmolalität SLC26A9 inhibiert. Auch der siRNA vermittelter Knockdown der Osmo-sensitiven WNK1-Kinase führte zur einer Reduktion der Cl^- Sekretion durch SLC26A9.

Diskussion und Schlussfolgerungen

Die detaillierte Charakterisierung der neuen SLC26A9 stabil überexprimierenden Zelllinien wird in Zukunft die Untersuchung der Funktion und Regulation von SLC26A9 vereinfachen. Die vorwiegend intrazelluläre Lokalisation von SLC26A9 unterstützt die Hypothese, dass ein verstärkter SLC26A9 Transport einen vielversprechenden Ansatz zur pharmakologischen Aktivierung von SLC26A9 darstellt. Da FRT-Zellen endogen kein CFTR exprimieren, SLC26A9 Überexpression aber zu einer erhöhten basalen Cl^- Sekretion führte, konnte gezeigt werden, dass SLC26A9 auch in Abwesenheit von CFTR die Cl^- Sekretion erhöhen kann, wodurch der Pathomechanismus von Mukoviszidose nachgeahmt wird.

Das Potenzial mit Hilfe der neuen Ziellinien neue Mechanismen der SLC26A9 Regulation zu identifizieren, zeigte sich unter anderem darin, dass erstmals gezeigt werden konnte, dass SLC26A9 ein Cl^- Kanal ist, der durch Osmolarität reguliert wird. Auch konnte mittels siRNA vermitteltem Knockout von verschiedensten osmosensitiven Kinasen gezeigt werden, dass die Modifizierung von WNK1 einen vielversprechenden Ansatz zur Aktivierung von SLC26A9 darstellt.

Die detaillierte biochemische und funktionelle Analyse der neuen Zelllinien validierte, dass sich die neuen Zelllinien für high-throughput Screenings mit großen chemischen Compounds- oder siRNA Bibliotheken eignen. Wie beispielhaft an den mittlerweile zugelassenen CFTR Potentioren und Korrektoren gezeigt wurde, haben diese high-throughput Screenings großes Potenzial zur Entdeckung von SLC26A9 Aktivoren zu führen, welche die verminderte Cl^- Sekretion durch defektes CFTR kompensieren und als Konsequenz das Mukusplugging bei Patienten mit Mukoviszidose und andere muco-obstruktiven Lungenerkrankungen reduzieren.