



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Effekt von TIP-Peptiden auf die Expression
einzelner ENaC-Untereinheiten in A549-Zellen“

verfasst von / submitted by

Lucie Marie Soucek

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the
degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2019 / Vienna, 2019

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Rosa Lemmens-Gruber

Danksagung

Zunächst gebührt mein Dank Frau ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Rosa Lemmens-Gruber, die mir das Erstellen dieser Diplomarbeit ermöglichte und diese begutachtete. Ich möchte mich für ihre mir entgegengebrachte Geduld und ihr Verständnis herzlich bedanken. Weiters danke ich Herrn Dr. Mohammed Aufy für seine geduldige Betreuung und Mühe mir stets mit Rat und Tat während des experimentellen Teils der Arbeit zur Seite zu stehen, sowie der gesamten Arbeitsgruppe am Department für Pharmakologie und Toxikologie, auf deren Hilfsbereitschaft ich immer zählen konnte.

Ein besonders großes Danke gilt meinen Eltern, die in jeder Phase des Studiums an mich glaubten und bedingungslos unterstützten. Gleiches gilt für meine Freunde und Wegbegleiter.

Nicht zu vergessen sind meine Studienkollegen, von denen einige mittlerweile zu meinen engen Freunden zählen. Ohne gegenseitiger Hilfe, Motivation und Unterstützung in schwierigen Zeiten, die uns teilweise an unsere Grenzen brachten, hätte sich der Abschluss dieses Studiums um vieles schwieriger gestaltet.

Abstract

Das Permeabilitätsödem und dessen klinisches Korrelat *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) ist, entgegen aller Fortschritte der Intensivmedizin, mit einer seit Jahrzehnten anhaltend hohen Mortalitätsrate beschrieben und erfordert umgehende ärztliche Behandlung. Bei Patienten mit pathologisch pulmonaler Flüssigkeitsansammlung korreliert die Überlebenschance mit dem transepithelialen Natrium-Transport. Hierbei spielt die Aktivität des epithelialen Natriumkanals (ENaC) eine zentrale Rolle.

Bislang galten Beatmungsstrategien als wichtigste Pfeiler der Behandlung da sich keine wirksame pharmakologische Interventionsmöglichkeit für das ätiologisch heterogene und komplexe Syndrom etablierte. Daher ist es von Relevanz therapeutische Strategien für dieses schwere Krankheitsbild zu entwickeln, die in der Lage sind über bekannte transepitheliale Wege den Natrium- und Wassertransport und folglich die alveoläre Flüssigkeits-Clearance (AFC) auch in der geschädigten Lunge dahingehend zu beeinflussen, dass eine effiziente Behandlung des Lungenödems möglich und eine signifikante Verringerung der Letalität erreicht wird.

TIP-Peptide – von der Lektin-ähnlichen Domäne des TNF- α -Moleküls abgeleitet – stellen hierfür vielversprechende und innovative therapeutische Mittel dar und ermöglichen eine neue Perspektive zur Reduktion der Mortalität. Sie aktivieren die ENaC-vermittelte Natriumaufnahme in Typ-II-Alveolarepithelzellen und bewirken einen Anstieg der Flüssigkeits-Clearance, wodurch sich die klinischen Resultate deutlich verbessern und deren Wirksamkeit einen positiven Effekt im Krankheitsverlauf von ARDS-Patienten erwarten lässt.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die experimentelle, proteinchemische Untersuchung einiger ausgewählter TIP-Peptide (AP303, AP309, AP310, AP318, AP314) auf das Expressionsmuster von ENaC-Untereinheiten in der humanen A549-Zelllinie. Deren direkter Vergleich erfolgte nach jeweils 5-, 10- und 30minütiger Inkubation mit Hilfe der Western Blot-Methodik. Die Ergebnisse zeigen eine signifikant gesteigerte Expression aller vier Untereinheiten des Kanals in der Membran durch Stimulation mit AP303, AP310 und AP318. Demgegenüber ist durch AP309 sowie durch die inaktive Kontrollsubstanz AP314 keine vermehrte Expression des Kanals zu verzeichnen.

Abstract

Permeability edema and its clinical correlate *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) is, contrary to all advances in intensive care medicine, described with a high mortality rate that has persisted for decades and requires immediate medical treatment. In patients with pathological pulmonary fluid accumulation, the probability of survival correlates with transepithelial sodium transport. The activity of the epithelial sodium channel (ENaC) plays a central role here.

As measures for this etiologically heterogeneous and complex syndrome, ventilation strategies have been the most important pillars of treatment up until now. It is of utmost importance to develop therapeutic strategies which are able to modulate the sodium- and water transport via transepithelial pathways and with this the alveolar fluid clearance (AFC) of the damaged lung, so that an effective pulmonary edema treatment is possible which leads to a significant reduction in lethality.

TIP-peptides – derived from the lectin-like domain of the TNF- α molecule – represent promising and innovative therapeutic agents and provide a new perspective to reduce mortality. They activate ENaC-mediated sodium uptake in alveolar type II epithelial cells and cause an increase in fluid clearance, which significantly improves clinical results and whose efficacy is expected to have a positive impact on the progression of ARDS-disease.

Thesis of this diploma was the experimental, proteochemical investigation of some selected TIP-peptides (AP303, AP309, AP310, AP318, AP314) on the expression pattern of ENaC-subunits in the human A549 cell line.

To compare the aforementioned peptides, samples were evaluated after 5, 10 and 30 minutes of incubation using the Western blot method. As a result a significantly increased expression of all four subunits of the channel was observable. In contrast, AP309 and the inactive control agent AP314 did not increase the expression of the channel.

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT	II
INHALTSVERZEICHNIS.....	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
 1 EINLEITUNG.....	 1
1.1 Ionenkanäle	1
1.2 ENaC.....	2
1.2.1 Molekularer Aufbau.....	3
1.2.2 Stellenwert.....	8
1.2.3 Funktion	9
1.2.4 Natrium – Substrat des ENaC.....	9
1.2.5 Transkriptionelle Regulation.....	10
1.2.6 Eigenschaften.....	14
1.2.7 Mutationen	14
1.3 Lunge.....	15
1.3.1 Lungenphysiologie	15
1.3.2 Lungenzellen.....	17
1.3.3 Alveolarepithelzellen vom Typ I.....	19
1.3.4 Alveolarepithelzellen vom Typ II.....	20
1.3.5 Alveolarmakrophagen	22
1.3.6 AFC - Alveoläre Flüssigkeitsclearance.....	23
1.4 Lungenödem.....	26
1.4.1 Physiologische Grundlagen der Flüssigkeitshomöostase	27

1.5 Permeabilitätsödem und dessen klinisches Korrelat ARDS	28
1.5.1 Klinisches Erscheinungsbild	29
1.5.2 Ätiologie	30
1.5.2.1 Pneumonie	31
1.5.3 Pathogenese	32
1.5.4 Zytokine	34
1.5.4.1 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	35
1.5.5 Pathomechanismen der Entzündungskaskade und Ödembildung	35
1.5.5.1 Entzündungsreaktion und Aktivierung von PMN	37
1.5.5.2 Entstehung eines interstitiellen Ödems	38
1.5.5.3 Entstehung eines alveolären Ödems	38
1.6 Therapeutische Ansätze	40
1.6.1 TIP-Peptide	43
1.6.1.1 Aktivierung – Wirkweise – molekularer Wirkmechanismus	47
1.6.1.2 Aerosol	48
2 MATERIAL UND METHODEN	50
2.1 Zellkultur	50
2.1.1 Zelllinie	50
2.1.2 Kultivierung	50
2.1.3 Passagierung	51
2.1.4 Behandlung	51
2.2 Isolierung und Quantifizierung	52
2.2.1 Zellyse	52
2.2.2 Bradford-Assay	53
2.3 Western Blot	54
2.3.1 SDS-PAGE	54
2.3.2 Blotting/Transfer	56
2.3.3 Immundetektion	57
2.3.4 Quantifizierung und Datenanalyse	59

3 ERGEBNISSE	60
3.1 ENaC-Aktivierung in A549-Zellen mittels AP303.....	62
3.2 ENaC-Aktivierung in A549-Zellen mittels AP309.....	64
3.3 ENaC-Aktivierung in A549-Zellen mittels AP310.....	66
3.4 ENaC-Aktivierung in A549-Zellen mittels AP318.....	68
3.5 ENaC-Aktivierung in A549-Zellen mittels AP314.....	70
3.6 α -ENaC-Aktivierung untersuchter TIP-Peptide.....	72
4 DISKUSSION	73
5 LITERATURVERZEICHNIS	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Strukturmodelle von α -ENaC und ASIC.....	4
Abbildung 2 Schematische Darstellung funktioneller Domänen des epithelialen Natriumkanals (ENaC).....	5
Abbildung 3 Schematische Darstellung der Lokalisation einzelner Segmente einer humanen α -Untereinheit des ENaC.....	6
Abbildung 4 Regulation der Nedd4-2-Aktivität durch Phosphorylierung.	7
Abbildung 5 Extrinsische und intrinsische Mechanismen der ENaC-Regulation	11
Abbildung 6 Aldosteron-kontrollierter Natriumtransport im Sammelrohr	12
Abbildung 7 Gasaustausch zwischen Alveole und Blut	16
Abbildung 8 Morphologie der Luftwege	18
Abbildung 9 Schematische Darstellung der durch tight junctions verbundenen Fortsätze der Epithelzellen	19
Abbildung 10 Bronchoalveoläre Region.....	20
Abbildung 11 Produktion und Resorption von Surfactant in AT II-Zellen.	21
Abbildung 12 Generierung einer transepithelialen, lumennegativen Potentialdifferenz.....	23
Abbildung 13 Alveoläre Flüssigkeits-Clearance (AFC)	24
Abbildung 14 Signaltransduktion der Stimulierung β -adrenerger Rezeptoren.	25
Abbildung 15 Flüssigkeitsresorption einer AT II-Zelle.....	26
Abbildung 16 Pathophysiologische Abläufe des ARDS	33
Abbildung 17 Gegenüberstellung eines gesunden Alveolus versus eines geschädigten während der Akutphase des ARDS.....	36
Abbildung 18 Leukozyten-Rekrutierung: durch Adhäsionsmoleküle induzierte Migration neutrophiler Granulozyten in entzündetes Gewebe.	37

Abbildung 19 Zusammenfassende schematische Darstellung der Entstehung eines Lungenödems und des ARDS	39
Abbildung 20 Tumornekrose Faktor (TNF).	44
Abbildung 21 Schematische Darstellung des TNF-Moleküls in Form eines Dreiecks.	44
Abbildung 22 2D-Struktur von AP301 (Solnatide).....	45
Abbildung 23 Bindung eines TIP-Peptids an ENaC	47
Abbildung 24 Zellen der epithelialen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 im Lichtmikroskop.	50
Abbildung 25 Zeitabhängige Behandlung mit 200nM AP303.....	63
Abbildung 26 Zeitabhängige Behandlung mit 200nM AP309.....	65
Abbildung 27 Zeitabhängige Behandlung mit 200nM AP310.....	67
Abbildung 28 Zeitabhängige Behandlung mit 200nM AP318.....	69
Abbildung 29 Zeitabhängige Behandlung mit 200nM AP314.....	71
Abbildung 30 Zusammenfassung von α -ENaC untersuchter TIP-Peptide	72

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Testsubstanzen	46
Tabelle 2 Materialien für die Zellkultur	52
Tabelle 3 Zusammensetzung von PBS pH 7,4	52
Tabelle 4 Zusammensetzung des Trenngels 7,5%	54
Tabelle 5 Zusammensetzung des Sammelgels 4%	55
Tabelle 6 Zusammensetzung des Probepuffers	56
Tabelle 7 Zusammensetzung des Laufpuffers	56
Tabelle 8 Zusammensetzung des Blottinpuffers	57
Tabelle 9 Primäre Antikörper	58
Tabelle 10 Sekundäre Antikörper	58

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretisches Hormon
AFC	alveoläre Flüssigkeits-Clearance
APS	Ammoniumpersulfat
AQP5	Aquaporin 5
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ASDN	Aldosteron-sensitiver distaler Nephron
ASIC	Acid-sensing Ion Channel
ASL	Apical Surface Liquid
AT II-Zellen	Alveolarepithelzellen Typ II
AT I-Zellen	Alveolarepithelzellen Typ I
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CFTR	Cystic Fibrosis transmembrane conductance Regulator
CSF	koloniestimulierender Faktor
DEG	Degenerine
ENaC	Epithelial Na ⁺ Channel, epithelialer Natriumkanal
EVLWI	Extravaskulärer Lungenwasserindex
FBS	Fetal Bovine Serum
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HRP	Horseradish Peroxidase
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN	Interferon
MR	Mineralcorticoid-Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PaO ₂	arterieller Sauerstoff-Partialdruck
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
PGE ₂	Prostaglandin E ₂

PHA-1	Pseudohypoaldosteronismus Typ 1
PKA	Proteinkinase A
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
Po	Offenwahrscheinlichkeit
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
SCNN	Sodium Channel Non-Neuronal
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat – Polyacrylamid Gelelektrophorese
SGK	Serum- und Glucocorticoid regulierte Kinase
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
VILI	Ventilator Induced Lung Injury

1 Einleitung

1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle sind Kanalproteine die dem Transport kleiner anorganischer Ionen wie Natrium, Kalium, Chlorid oder Calcium durch die Membran dienen.

Mittels Selektivitätsfilter wird gewährleistet, dass die Ionenkanäle jeweils nur für bestimmte Ionen – entsprechend ihrer Ladung und dem Radius der Hydrathülle – durchlässig sind. Sie bilden durch Zusammenlagerung ihrer Untereinheiten wassergefüllte, hydrophile Poren durch welche die gelösten Ionen die Membran passieren und in die Zelle diffundieren können. Triebkraft für die passive Diffusion der geladenen Teilchen durch ihre Kanäle in die Zelle hinein beziehungsweise hinaus ist der für das jeweilige Ion geltende elektrochemische Konzentrationsgradient.¹

Die Kanäle werden in ligandengesteuerte, spannungsabhängige, rezeptorgekoppelte sowie konstitutiv aktive unterschieden. Konstitutiv aktive Kanäle sind im Grundzustand offene Membranporen deren Aktivität den jeweils erforderlichen physiologischen Gegebenheiten angepasst werden.² Zu diesen zählt der epitheliale Natriumkanal (*epithelial Na⁺ channel*, ENaC) auf den im Folgenden näher eingegangen wird.

¹ Principles of Animal Physiology, Moyes & Schulte 2008

² Physiologie, Pape et al. 2018

1.2 ENaC

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC, SCNN1) gehört zur Ende der 1980er Jahre entdeckten Superfamilie der Amilorid-sensitiven, nicht spannungsabhängigen ENaC/DEG-Ionenkanäle (Kellenberger & Schild 2002). Den Mitgliedern dieser Ionenkanalfamilie sind unter anderem die namensgebenden Degenerine zugehörig. Sie wurden im Zusammenhang mit der Mechanotransduktion in neuronalen Zellen des Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Chalfie & Wolinsky 1990; Tavernarakis & Driscoll 1997). Ebenso zur ENaC/DEG-Superfamilie zählen durch Protonen aktivierbare *Acid-sensing Ion Channels* (ASICs), die an Detektion und Transduktion sensorischer Information im Nervensystem von Säugetieren beteiligt sind und Neuronen auf extrazelluläres Absinken des pH-Wertes zur Induktion entsprechender Signalwege veranlassen (Kellenberger & Schild 2002).

ENaC als weiterer prominenter Vertreter wird vorwiegend in der apikalen Zellmembran zahlreicher zur Natrium-Resorption befähigter Epithelien exprimiert. Sein Vorkommen wurde im Aldosteron-sensitiven distalen Nephron (ASDN) (Palmer & Frindt 1986), im distalen Kolon (Duc et al. 1994; Renard et al. 1995), in den Ausführungsgängen der Schweiß- und Speicheldrüsen (Duc et al. 1994; Reddy et al. 1999) sowie im respiratorischen Epithel (Renard et al. 1995; Farman et al. 1997) verifiziert.

Er ist der zentrale Faktor des transepithelialen Transports von Natrium – damit einhergehend von Wasser – und nimmt eine tragende Rolle bei der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes, des Blutdrucks sowie des Wassergehaltes der Lunge ein (Loffing & Korbmacher 2009). Dieser Kanal ist Angriffspunkt für das kaliumsparende Diuretikum Amilorid und wird bei einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 100 nM blockiert (Kellenberger & Schild 2002).

1.2.1 Molekularer Aufbau

In Hinblick auf die stöchiometrische Zusammensetzung des Kanals gilt, dass ENaC als heterotrimerer Komplex – bestehend aus den drei Untereinheiten α , β , γ – vorliegt, die untereinander eine Homologie in den Aminosäuresequenzen von 30-40% aufweisen (Bhalla & Hallows 2008). Grund zu dieser Annahme lieferte die durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärte Kristallstruktur des mit dem ENaC verwandten Ionenkanals ASIC-1A des Huhns (*Acid-sensing Ion Channel 1A*), worauf sich bislang die Hypothese der entsprechenden Stöchiometrie des ENaC stützte (Jasti et al. 2007; Stockand et al. 2008).

Grundlegende Voraussetzung für das Verständnis der Funktion eines Proteins ist die Kenntnis über dessen dreidimensionalen Aufbau. Für die Vorhersage der Tertiär- und Quartärstruktur des Target-Proteins kristallographisch nicht geklärter Struktur hat sich das Homologie-Modelling bewährt. Für verwandte Proteine ähnlicher Funktion gilt in den meisten Fällen, dass eine homologe Aminosäuresequenz mit einer analogen 3D-Struktur korreliert. Die Vergleichssequenzen und das unbekannte Protein müssen also einen gewissen Grad an Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, damit diese Sequenzen miteinander vergleichbar sind. Hierzu werden mit Hilfe entsprechender Datenbanken Bereiche auf eine hohe Sequenzidentität beziehungsweise -ähnlichkeit untersucht. Ein homologes Protein bekannter Kristallstruktur diene hierfür als Template (ASIC-1A) (**Abb. 1**). Seine Proteinkoordinaten übereinstimmender Aminosäuresequenzen wurden auf das Protein nicht geklärter Struktur (ENaC) übertragen und so dessen theoretische räumliche Struktur mittels geeigneter Software simuliert und anschließend über ein Graphik-Programm visualisiert (Zhang & Skolnick 2005; Biasini et al. 2014).

2018 gelang nun auch die Strukturaufklärung des ENaC mit Hilfe der Kryoelektronenmikroskopie. Der Kanal setzt sich aus einer 1:1:1 Stöchiometrie von $\alpha:\beta:\gamma$ zusammen. Die Untereinheiten sind gegen den Uhrzeigersinn angeordnet (Noreng et al. 2018).

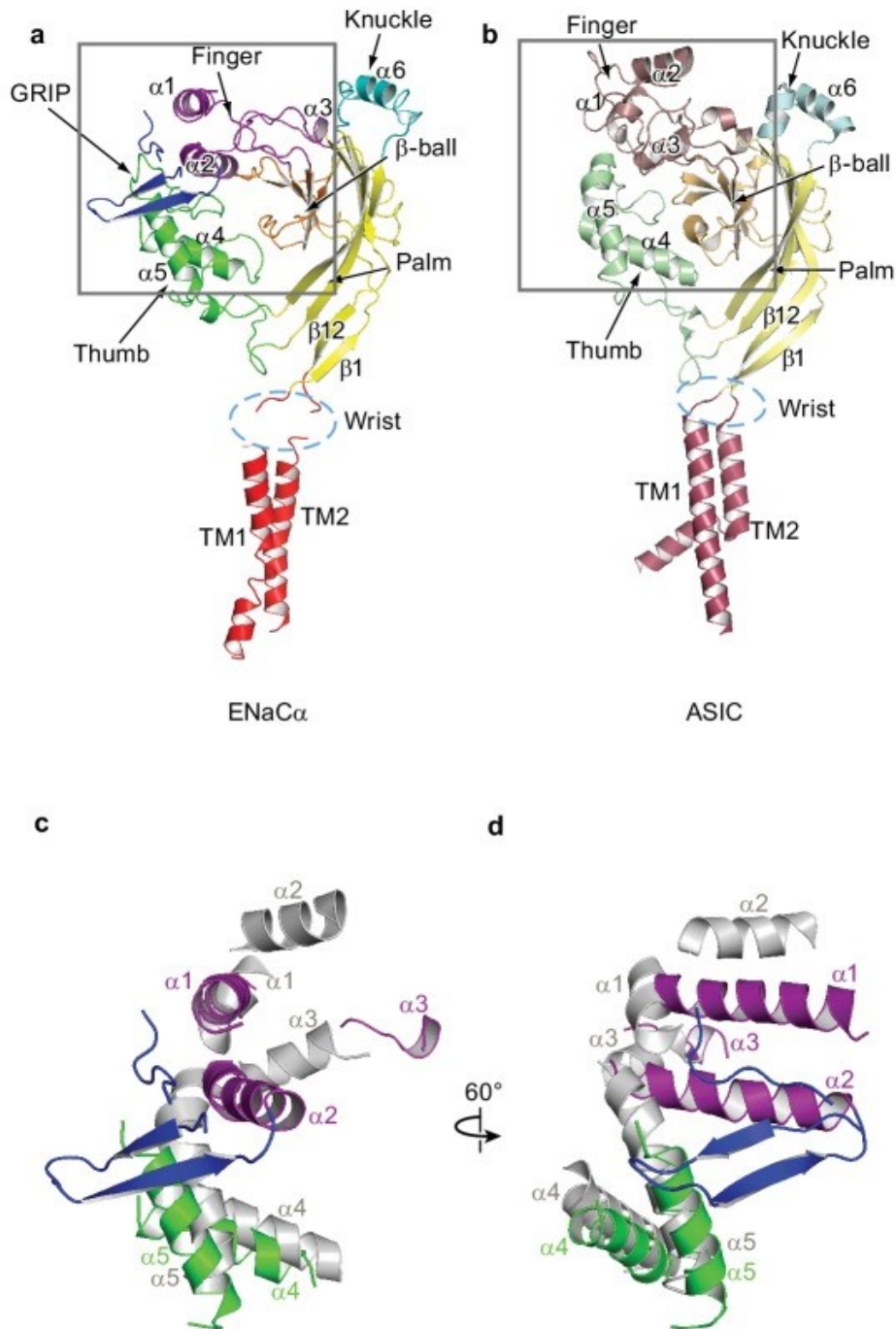


Abbildung 1 Strukturmodelle von α -ENaC und ASIC. Die verschiedenen Domänen sind entsprechend der von Stockand et al. verwendeten Terminologie benannt und farblich hervorgehoben (Stockand et al. 2008). **a** Organisation der extrazellulären und der Transmembrandomäne (TM1, TM2) der jüngst aufgeklärten ENaC-Untereinheit. **b** Zum Vergleich die ENaC-homologe ASIC-Untereinheit. **c/d** Ansicht des umrahmten Bereichs in **a/b**. Veranschaulichung der Strukturunterschiede zwischen farbig dargestelltem ENaC und grau dargestelltem ASIC durch Überlagerung von Finger, Daumen und GRIP-Domäne (Noreng et al. 2018).

α -ENaC wurde im Jahr 1993 kloniert (Canessa et al. 1993), β - und γ -ENaC 1994 (Canessa et al. 1994). Die für die jeweiligen ENaC-Untereinheiten codierenden Gene werden als SCNN1A, SCNN1B und SCNN1G deklariert. Überdies wurde eine in verschiedenen epithelialen und nicht-epithelialen Geweben des menschlichen Organismus exprimierte δ -Untereinheit identifiziert (Giraldez et al. 2012; Wesch et al. 2012).

Die ebenfalls porenbildende δ -Untereinheit kann im Expressionssystem die sonst vorhandene α -Untereinheit funktionell ersetzen; der vorliegende ENaC besteht dann aus einem $\delta\beta\gamma$ -Komplex, dessen Kanaleigenschaften sich jedoch etwas vom $\alpha\beta\gamma$ -ENaC unterscheiden (Waldmann et al. 1995; Haerteis et al. 2009; Giraldez et al. 2012).

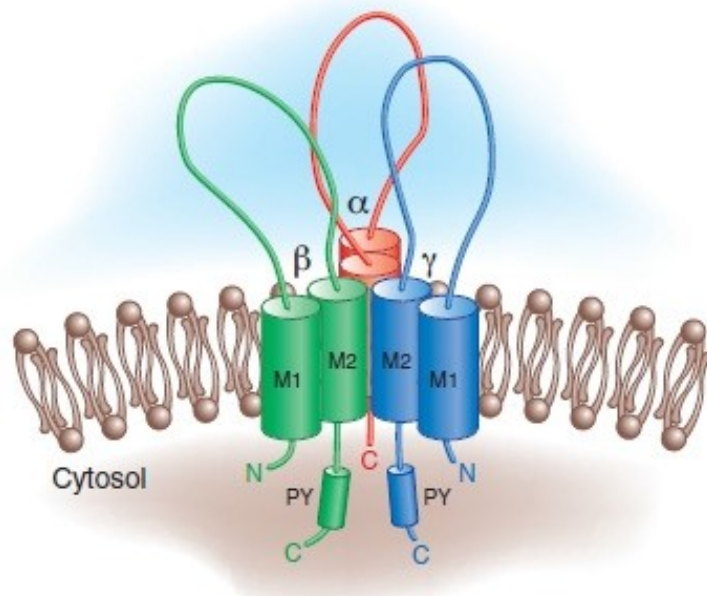


Abbildung 2 Schematische Darstellung funktioneller Domänen des epithelialen Natriumkanals (ENaC) (Bhalla & Hallows 2008). In die Zellmembran integrierte drei homologe Untereinheiten, deren cysteinreiche extrazelluläre Region etwa 70% der Aminosäuresequenz einer Untereinheit umfasst (Kashlan & Kleyman 2011).

Die Peptide der humanen ENaC-Untereinheiten besitzen eine Sequenzlänge von 669 (α), 638 (β) und 649 (γ) Aminosäuren (Benos & Stanton 1999). Das Molekulargewicht der jeweiligen Untereinheit liegt aufgrund zusätzlicher Glykosylierung bei 85-95 kDa (Garty & Palmer 1997).

Jede Untereinheit besitzt zwei hydrophobe Transmembrandomänen (TM1, TM2), die durch eine große hydrophile, extrazelluläre Schleife von etwa 50 kDa verbunden werden (**Abb. 3**). Dieser wird mit etwa 500 Aminosäuren der größte Anteil am Kanalprotein zugeschrieben (Garty & Palmer 1997). In der extrazellulären Region weisen die Untereinheiten in großen Abschnitten eine signifikante Sequenzähnlichkeit auf (Bhalla & Hallows 2008).

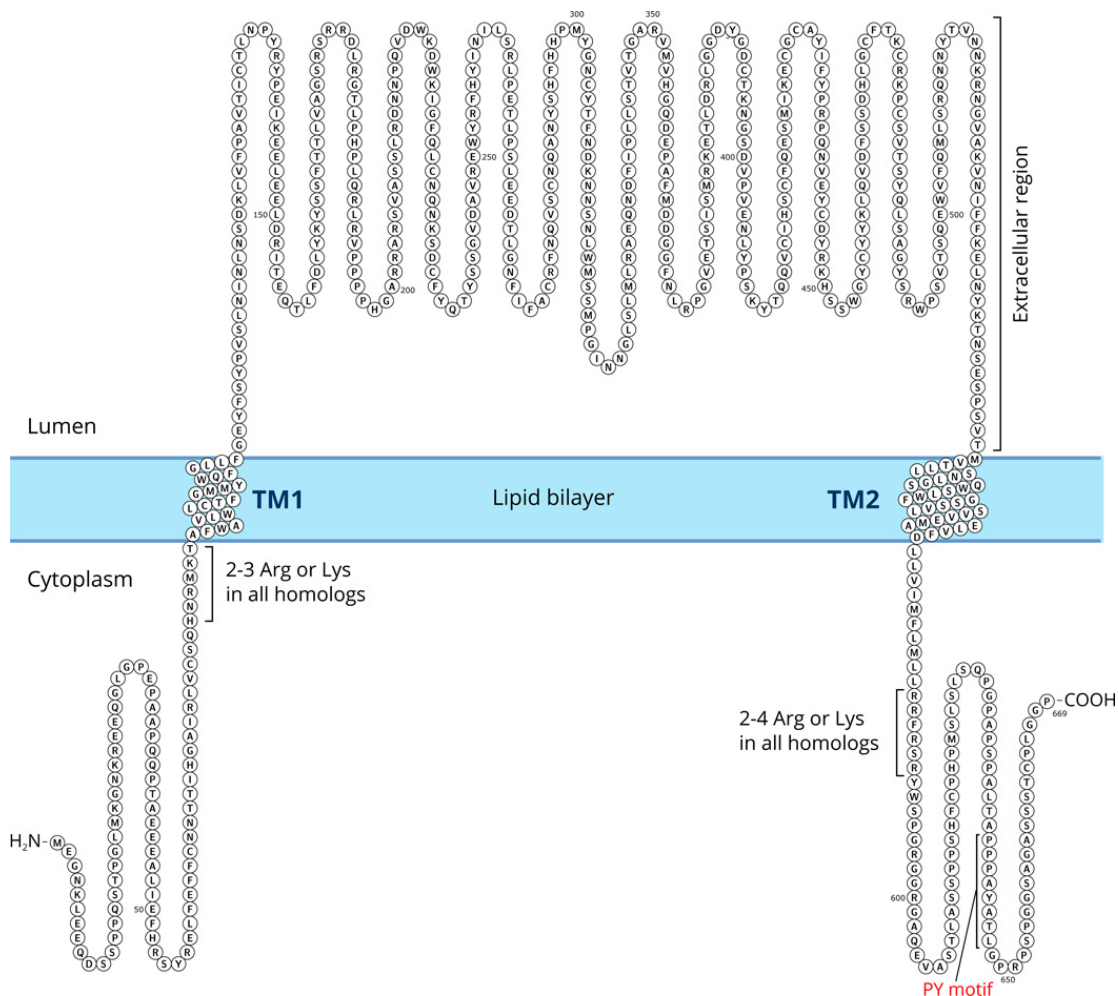


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Lokalisation einzelner Segmente einer humanen α -Untereinheit des ENaC (Hanukoglu & Hanukoglu 2016). Während die Position von TM1 unter Verwendung der Phobius-Software vorhergesagt wurde (Käll et al. 2004), basiert die Position von TM2 auf einer Homologie der bereits aufgeklärten ASIC1-Struktur (Jasti et al. 2007).

N- und C-Terminus liegen intrazellulär vor. Im C-terminalen Bereich befindet sich eine konservierte Prolin-reiche Sequenz (PY-Motiv), welche eine Interaktion mit der Ubiquitin-Proteinligase Nedd4-2 vermittelt (**Abb. 4**). Dieses Ubiquitinationsprotein ist in phosphoryliertem Zustand an der Regulation der Endozytose des Kanals beteiligt und supprimiert somit den Natriumtransport (Snyder 2002; Schild et al. 1996; Staub et al. 1996). Eine Phosphorylierung von Nedd4-2 durch SGK1 inhibiert hingegen dessen Affinität zum ENaC und reduziert die supprimierende Einflussnahme (Debonneville et al. 2001).

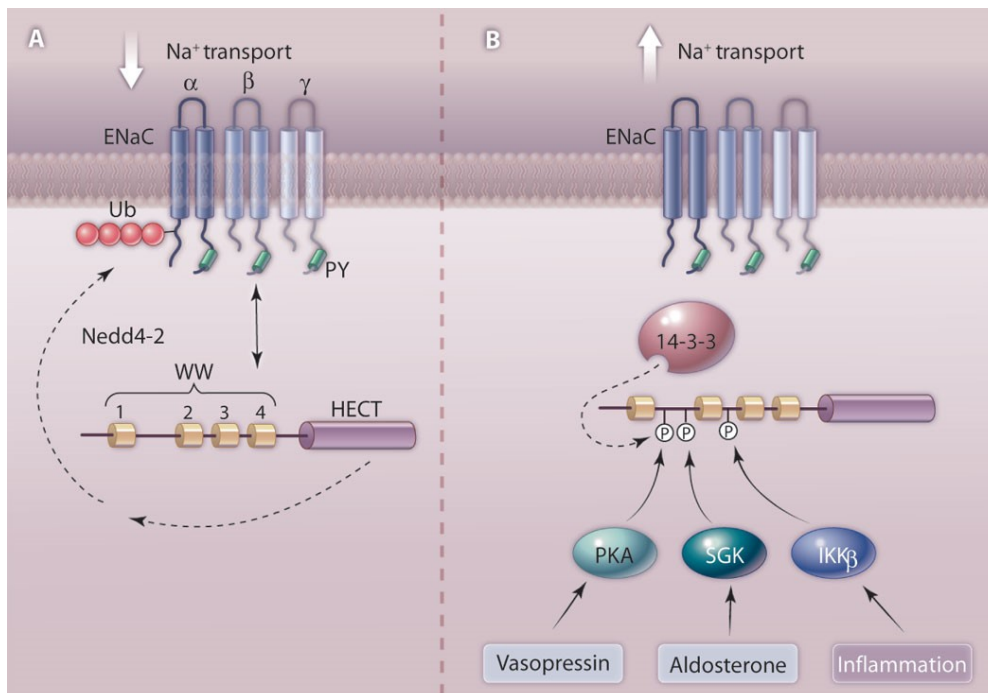


Abbildung 4 Regulation der Nedd4-2-Aktivität durch Phosphorylierung.³

A Um den epithelialen Natrium-Transport zu verringern, bindet Nedd4-2 an die PY-Motive des ENaC und katalysiert dessen Ubiquitinierung. Dies führt zur Endozytose und lysosomalem Abbau des Kanals und resultiert in einer verminderten Anzahl an der Membranoberfläche. **B** Um den Natrium-Transport zu steigern, wird Nedd4-2 durch die Kinasen PKA, SGK und IKK-β phosphoryliert. Die Phosphorylierung induziert die Bindung von 14-3-3-Dimeren, wodurch die Bindung von Nedd4-2 an ENaC verhindert wird. Die erhöhte ENaC-Abundanz an der Membranoberfläche verstärkt folglich den epithelialen Natrium-Transport.

³ <http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/2/79/pe41/F1.large.jpg?width=800&height=600&carousel=1>

Die äußere Kanalpore bildet einen negativ geladenen Trichter, der sich in zytoplasmatischer Richtung verjüngt. Durch diesen Selektivitätsfilter gelangen lediglich die sehr kleinen, positiv geladenden Ionen Natrium, Lithium und Protonen hindurch (Alvarez de la Rosa et al. 2000; Smith & Benos 1991; Sheng et al. 2000). Auf der extrazellulären Domäne in naher räumlicher Konstellation zur äußeren Kanalpore ist die Amiloridbindungsstelle lokalisiert (Schild et al. 1997). Die Blockade des ENaC durch Amilorid ist zwar hochsensitiv, doch ist die Inhibition aufgrund rascher Dissoziation des Amilorid-Kanal-Komplexes leicht reversibel (Garty & Palmer 1997).

Im Gegensatz zur β - und γ -Untereinheit ist die α -Untereinheit isoliert exprimiert in der Lage, einen Natrium-Transport aufrecht zu erhalten, wenn auch nur von geringem Ausmaß. Werden hingegen β - oder γ -ENaC allein exprimiert, ist kein Natrium-Transport nachweisbar, jedoch potenzieren sie den Natrium-Fluss, wenn sie mit dem porenbildenden α -ENaC koexprimiert werden. Um eine maximale Kanalaktivität zu erreichen, ist also die Zusammensetzung aller drei Untereinheiten α -, β - und γ von Nöten (Canessa et al. 1994; Bhalla & Hallows 2008; Helve et al. 2009; Smith et al. 2000).

1.2.2 Stellenwert

Anhand von Knockout-Mausmodellen wurde durch Studien von Hummler et al. die Lebensnotwendigkeit der drei Untereinheiten des funktionellen Natriumkanals dargelegt. Die α -Untereinheit hat postnatal einen großen Stellenwert bei der pulmonalen Flüssigkeitsresorption. Die Inaktivierung des Gens für den essentiellen α -ENaC führte innerhalb von 40h nach ihrer Geburt zum Tod der Tiere durch respiratorische Insuffizienz, da sie die fetale Lungenflüssigkeit nicht resorbieren konnten. Beim genetischen Knockout einer der beiden anderen Untereinheiten war dagegen die pulmonale Flüssigkeitsresorption im Vergleich zu gesunden Mäusen lediglich verlangsamt. Die β - oder γ -ENaC-Defizienz bewirkte jedoch eine Störung der renalen Elektrolyt-Homöostase und führte zu Nierenfunktionsstörungen mit Entwicklung einer Hyperkaliämie und innerhalb von 48h nach der Geburt zum Tod (Hummler et al. 1996).

1.2.3 Funktion

Für die lebensnotwendige Elektrolyt- und Osmoregulation, die eine wesentliche Voraussetzung einer Vielzahl zellulärer Prozesse ist, nimmt ENaC eine zentrale Position ein. Während seine Aufgabe in Nieren, Kolon, Schweiß- und Speicheldrüsen besonders in der Gewährleistung eines ausgeglichenen Natrium- und Wasserhaushaltes liegt, ist der Natriumkanal in der Lunge primär für die alveoläre Flüssigkeits-Clearance und die Regulierung der Mukus-Viskosität verantwortlich.⁴

Dass die ENaC-Aktivität einer präzisen Kontrolle unterliegen muss um die osmotische und Wasser-Homöostase aufrecht zu erhalten und somit seiner essentiellen Funktion im menschlichen Organismus gerecht zu werden, erweist sich allen voran in pathophysiologischen Situationen.

1.2.4 Natrium – Substrat des ENaC

In Bezug auf die Regulation des Elektrolythaushalts sowie verschiedener Transportprozesse nimmt Natrium als dritthäufigstes anorganisches Ion im menschlichen Organismus einen wichtigen Rang ein. Trotz schwankender Salzzufuhr bleibt seine Serumkonzentration durch eine akkurate Justierung der renalen und intestinalen Resorption konstant.⁴

Natrium ist unter Partizipation von Kalium und Chlorid für die Generierung eines elektrochemischen Gradienten über die Zellmembran bedeutend und damit hauptverantwortlich für Osmolalität und Volumen des Extrazellularraumes. Als Leitkation des extrazellulären Raumes bildet es ein Konzentrationsgefälle von 140 mM extrazellulär zu 10 mM intrazellulär aus. Diese elektrische Potenzialdifferenz ist die Triebkraft für Ionenbewegung.⁴

⁴ Physiologie des Menschen, Schmidt & Thews 2013

1.2.5 Transkriptionelle Regulation

Die Aktivität des epithelialen Natriumkanals kann durch vielfältige Mechanismen beeinflusst werden. In Abhängigkeit des Gewebetyps werden die jeweiligen ENaC-Untereinheiten transkriptionell unterschiedlich reguliert. Da es sich beim ENaC um einen konstitutiv aktiven Kanal mit hoher Offenwahrscheinlichkeit P_o handelt, unterliegt die Anzahl N in der apikalen Membran exprimierter und zur Natrium-Resorption befähigter Kanäle einer strengen Kontrolle über komplexe Regulationsmechanismen und Signalwege. Die zu Grunde liegende Kontrolle seiner Abundanz in der Zellmembran betrifft zum Einen die Induktion der Genexpression und zum Anderen den Einfluss auf apikales Targeting und die Aufenthaltsdauer des Kanals in der Membran (Palmer 1986).

Diese Regulationen verlaufen über hormonell- oder β -adrenerg-vermittelte Kaskaden (Blazer-Yost et al. 1998; Rossier 2002; Fronius 2013). In Hinblick auf die Regulation seiner Offenwahrscheinlichkeit wird auf die ENaC-Aktivität zusätzlich durch unterschiedliche Faktoren direkt Einfluss genommen, wie beispielsweise durch Proteasen und Kinasen (Vallet et al. 1997; Diakov & Korbmacher 2004; Rossier et al. 2009), den pH-Wert (Collier & Snyder 2009) sowie durch intrinsische Regulation mittels Natrium (Turnheim 1991) (**Abb. 5**).

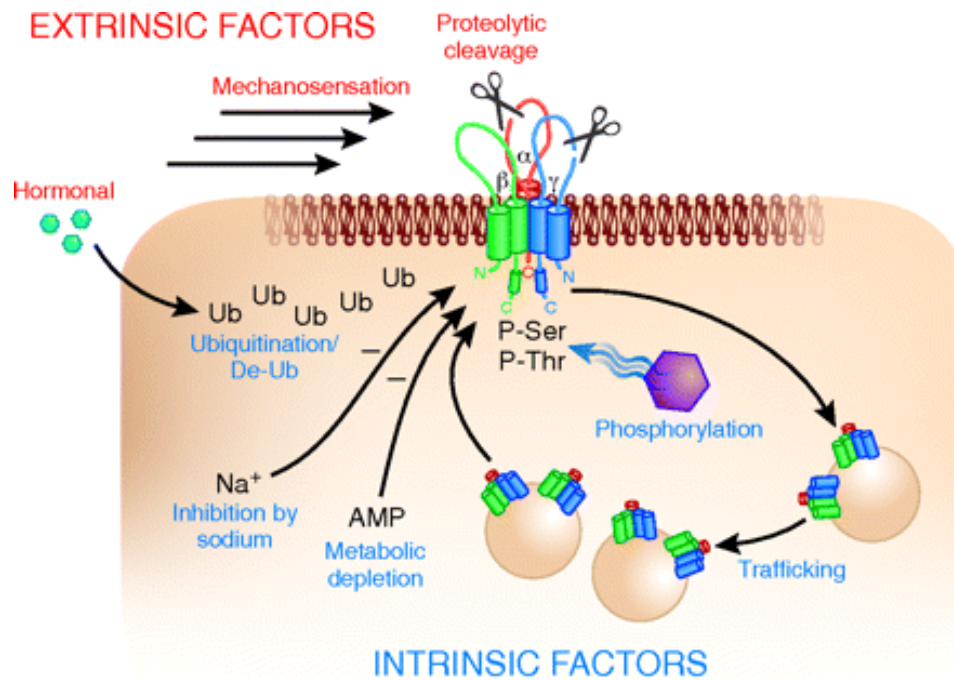


Abbildung 5 Extrinsische und intrinsische Mechanismen der ENaC-Regulation. (Bhalla & Hallows 2008). Extrinsische Regulation des Kanals kann auf hormonelle Aktivierung, proteolytische Spaltung sowie mechanische Scherkräfte zurückzuführen sein, intrinsische Regulation auf Ubiquitinierung, Kinasen, Natrium, intrazellulären Transport und Stoffwechselsubstrate.

Gesteigerte Genexpression von α -, β - und γ -ENaC und Induktion der Protein-de-novo-Synthese wird überwiegend durch das Steroidhormon Aldosteron über eine Aktivierung des Mineralcorticoid-Rezeptors reguliert (Kellenberger & Schild 2002), dessen Wirkung zum Teil über SGK1 vermittelt wird (Garty & Palmer 1997) (**Abb. 6**). Die Expression einzelner Untereinheiten durch das Mineralcorticoid ist jedoch organspezifisch. Im distalen Nephron wird unter Aldosteron-Einfluss die Transkription von α -ENaC verstärkt induziert, im distalen Kolon hingegen kommt es zu einem Anstieg von β - und γ -ENaC, während die α -Untereinheit konstitutiv exprimiert wird (Eppele et al. 2000).

In allen Mineralocorticoid-sensitiven Epithelien wie dem distalen Kolon und dem distalen Nephron ist der epitheliale Natriumkanal in die Kontrolle und Regulation des Gesamt-Salzhaushaltes involviert und hat eine essentielle Funktion zu dessen Aufrechterhaltung (Feraille & Dizin 2016).

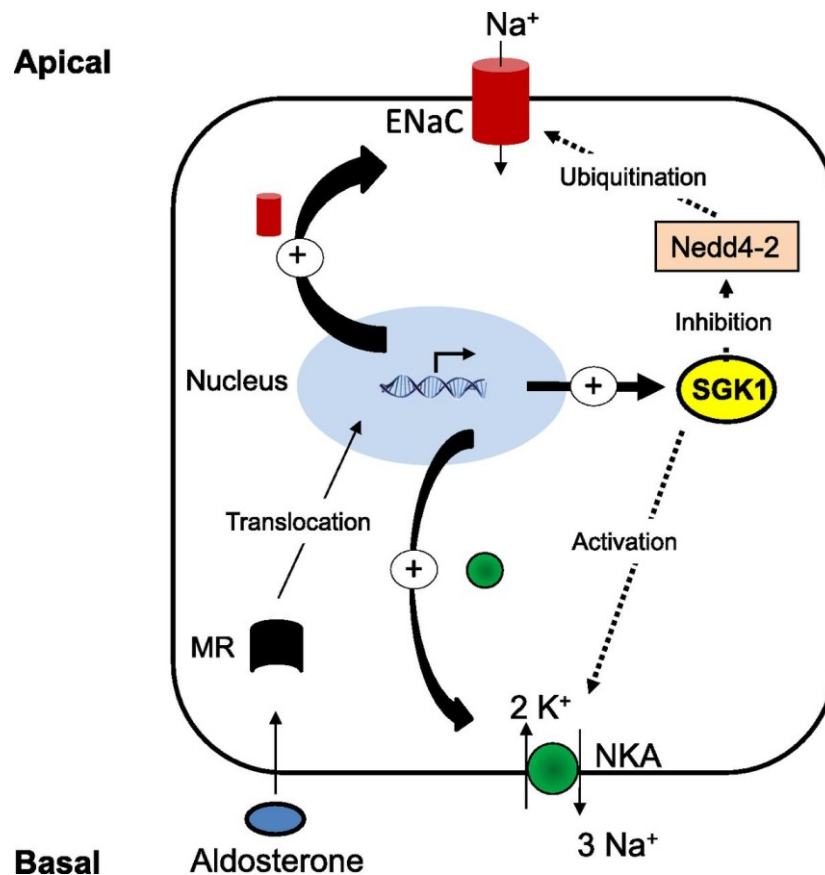


Abbildung 6 Aldosteron-kontrollierter Natriumtransport im Sammelrohr (Feraille & Dizin 2016). Das Steroidhormon Aldosteron diffundiert durch die Zellmembran und bindet an den intrazellulär gelegenen Mineralcorticoid-Rezeptor (MR). Dessen Aktivierung veranlasst eine Translokation des Hormon-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern wo nach DNA-Bindung die Transkription bestimmter Zielgene beeinflusst wird. Die Expression von SGK1 (Serum/Glucocorticoid-regulierte Kinase 1) wird induziert und in weiterer Folge nimmt die Expression und Aktivität epithelialer Natriumkanäle und der Natrium/Kalium-ATPase zu.⁵ Ferner ist SGK1 im Stande Nedd4-2 durch Phosphorylierung zu inhibieren und somit seine Interaktion mit ENaC. Dadurch wird dessen Ubiquitinierung, Internalisierung und Abbau verringert, was zu einer erhöhten Anzahl aktiver epithelialer Natriumkanäle an der apikalen Zellmembran führt und der elektrogene Natrium-Transport verstärkt wird (Debonneville et al. 2001; Snyder et al. 2004).

Da ASDN das Gewebe mit höchster ENaC-Expressionsdichte ist, trägt die Niere bezogen auf den Gesamtorganismus die Hauptlast zur Regulation der

⁵ Physiologie.cc/XII.8.htm

Elektrolytbilanz und damit des Extrazellulärvolumens und des arteriellen Blutdrucks (Asher et al. 1996). Die renale ENaC-Aktivität spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Natrium-Homöostase, dessen wichtigster Regulator durch AT II (Angiotensin II) stimuliertes Aldosteron ist, welches am Ende der RAAS-Kaskade entsteht (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System). Darüber hinaus induziert AT II die Freisetzung von ADH (Antidiuretisches Hormon) und verursacht eine vermehrte Resorption von Wasser im Sammelrohr.⁶

Auch in der Lunge ist der Kanal maßgeblich an der transepithelialen Salz- und Flüssigkeitsresorption beteiligt. Der aktive Natriumtransport über das respiratorische Epithel via ENaC gilt als wichtigster Mechanismus für die Resorption intrapulmonaler Flüssigkeit (Hummler et al. 1996). Er wird sowohl im respiratorischen, als auch im Alveolarepithel exprimiert (Eaton et al. 2009). Im Gegensatz zur Niere wird eine Steigerung der ENaC-Aktivität und folglich eine erhöhte alveoläre Flüssigkeitsclearance nicht durch Aldosteron, sondern durch eine cAMP vermittelte β -adrenerge Stimulation (Planès et al. 2002; Minakata et al. 1998) oder durch Glucocorticoide bewirkt, deren Wirkung die der Mineralcorticoide vergleichbar ist (Itani et al. 2002; Dagenais et al. 2001; Nakamura et al. 2002).

Die induzierten Untereinheiten werden nach erfolgter Stimulation im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Im Golgi-Apparat werden sie anschließend zu funktionellen Kanälen modifiziert, in Vesikeln an ihren Bestimmungsort transportiert und mittels Exozytose in die apikale Membran eingebaut (Valentijn et al. 1998). Ein beträchtlicher Anteil neusynthetisierter Proteine bleibt jedoch in prä-Golgi Transportintermediären und wird wieder abgebaut. Deren Halbwertszeit beträgt 2 Stunden. Es verlassen etwa nur 20% funktionsfähiger Kanalproteine das endoplasmatische Retikulum und erreichen die Membran. Die Halbwertszeit an der Zelloberfläche beträgt für β -ENaC in etwa 6 Stunden, während für α - und γ -ENaC mehr als 24 Stunden nachgewiesen werden konnten (Weisz et al. 2000).

⁶ Physiologie, Pape et al. 2018

1.2.6 Eigenschaften

ENaC kann in der apikalen Zellmembran in einem sogenannten *near-silent*-Zustand vorliegen. In diesem Fall weist er nur eine geringe Permeabilität für Natrium-Ionen auf (Diakov et al. 2008).

Eine besondere Eigenschaft des Kanals ist jedoch seine rasche Aktivierbarkeit durch proteolytische Spaltung mittels Serinproteasen (Kleyman et al. 2009; Rossier & Stutts 2009). Die Enzyme mit der Aminosäure Serin im katalytischen Zentrum steigern die Kanalaktivität durch deren Bindung an bestimmte Schnittstellen der extrazellulären Domänen der α - und γ - Untereinheit. Die proteolytische Freisetzung von Peptiden bedingt dann vermutlich eine kanalaktivierende Konformationsänderung (Haerteis et al. 2012).

1.2.7 Mutationen

Neben Erkrankungen wie Bluthochdruck oder Lungenödemen lassen sich die Erbkrankheiten Liddle-Syndrom und Pseudohypoaldosteronismus Typ 1 (PHA-1) auf eine irreguläre Funktion dieses natrium- und wasserleitenden Ionenkanals zurückführen. Genetisch bedingte Fehlfunktionen der ENaC-Aktivität sind mit der Entstehung dieser Krankheitsbilder assoziiert.

Dem autosomal dominanten Liddle-Syndrom (Liddle et al. 1963) liegt eine Mutation im PY-Motiv des zytosolischen C-Terminus der ENaC-Untereinheiten β oder γ zugrunde. Ubiquitin-Proteinligasen wie Nedd4-2, welche – wie bereits erwähnt – mit dem PY-Motiv interagieren und für eine funktionelle Inaktivierung des ENaC verantwortlich sind, werden gehemmt (Goulet et al., 1998; Shimkets et al. 1994). Diese *gain of function*-Mutation führt zu einer Überfunktion des Natriumkanals und somit zur Natriumretention, was in einer schweren Form der salzsensitiven arteriellen Hypertonie resultiert, einhergehend mit Hypokaliämie und metabolischer Alkalose (Rossier & Schild 2008).

Der autosomal rezessive PHA-1 zeichnet sich hingegen durch Basendeletion oder Mutationen im SCNN1A-, SCNN1B- oder SCNN1G-Gen aus, wodurch ein Funktionsverlust des Kanals zustande kommt und demzufolge eine Mineralcorticoid-Resistenz durch verminderte Responsivität der Nieren auf Aldosteron bedingt. Diese *loss-of-function*-Mutationen verursachen eine gesteigerte renale Natrium- und Flüssigkeitsausscheidung, was schwere Hypovolämie zur Folge hat und dadurch bedingte arterielle Hypotonie, assoziiert mit Hyperkaliämie und metabolischer Azidose (Gründer et al. 1997; Kerem et al. 1999).

1.3 Lunge

1.3.1 Lungenphysiologie

Zur Aufrechterhaltung lebensnotwendiger Stoffwechselprozesse in Körperzellen sind diese auf genügende Sauerstoffzufuhr über die Atmung angewiesen. Als eines der wenigen Organsysteme nimmt die Lunge ihre Funktion erst postnatal auf. *In Utero* wird Flüssigkeit in Atemwege und den Alveolarraum sezerniert, daher ist, um nach der Geburt einen adäquaten Gasaustausch zu ermöglichen, die pränatale Umstellung von sekretorischer auf resorptive Aktivität des Epithels zwingend erforderlich. Lebensnotwendiger Sauerstoff wird aus der Inspirationsluft extrahiert und gelangt über die oberen und unteren Atemwege in die Alveolen, wo der Gasaustausch mit dem Blut stattfindet. Hier diffundiert Sauerstoff über die alveolo-kapilläre Membran zu den Erythrozyten und wird über den Blutkreislauf transportiert und in den Zellen verstoffwechselt, während Kohlendioxid als Produkt des oxidativen Stoffwechsels abgegeben und über die Lunge wieder ausgeschieden wird.⁷

⁷ <https://medlexi.de/Gasaustausch>

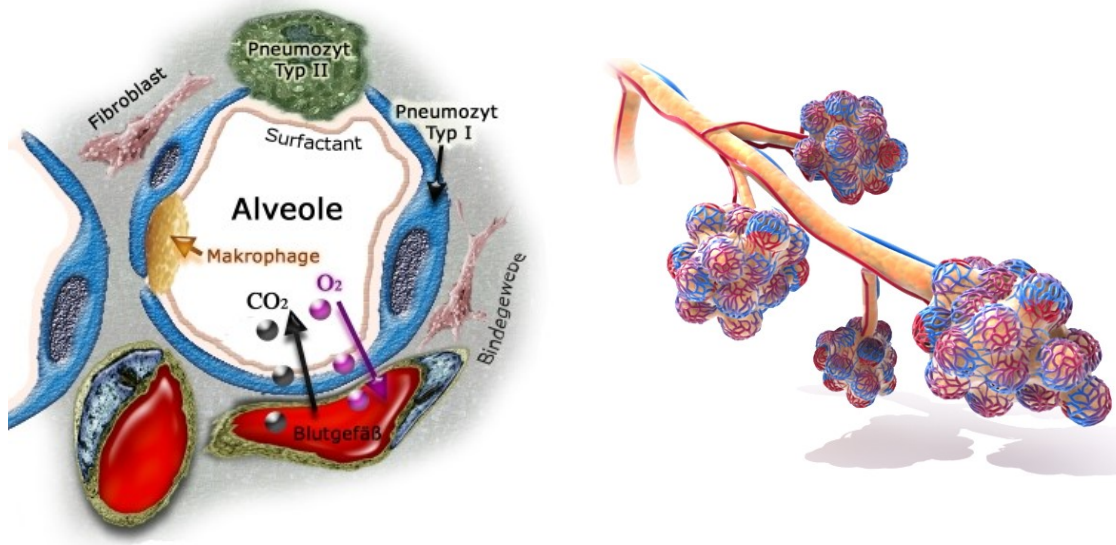


Abbildung 7 Gasaustausch zwischen Alveole und Blut. Diffusion von Atemgasen durch eine Barriere, bestehend aus Alveolar- und Blutgefäßzellen sowie der Basalmembran. Zur Optimierung des Gasaustausches sind die Alveolen von einem dichten Kapillarnetz umgeben.^{8 9}

Alveolarepithel und Kapillarendothel werden durch einen dünnen interstitiellen Spalt getrennt (**Abb. 7**). Dies begünstigt den Gasaustausch und verhindert gleichzeitig den Eintritt von Flüssigkeit in den Alveolarraum. Eine intakte alveolo-kapilläre Barriere ist für eine uneingeschränkte Gasaustauschfunktion von maßgeblicher Bedeutung. Zwischen luftgefülltem Kompartiment der Atemwege und flüssigem Interstitium bildet das Atemwegsepithel eine Barriere. Es wird vom ASL (*apical surface liquid*), bestehend aus einem periziliären Flüssigkeitsfilm dem eine Mukusschicht aufliegt, bedeckt (Tarran et al. 2006; Hummler et al. 1996). Quantität und Zusammensetzung des periziliären Flüssigkeitsfilms werden durch fein balancierte Regulationsmechanismen des respiratorischen Epithels eingestellt. Dies ist für eine optimale Zilien- und Abwehrfunktion und damit für den mukoziliären Schleimtransport unabdingbar (Matsui et al. 1998; Chilvers & O’Callaghan 2000).

⁸ <http://www.pflege-und-medizin.de/Atmung/Anatomie/FeinbauEinerAlveole.jpg>

⁹ <http://www.medicalgraphics.de/en/component/joomgallery/organe/alveolen-lungenblaeschen.html#joomimg>

Die apikale Oberfläche der Alveolen ist ebenso vom ASL bedeckt und bildet eine Grenzfläche zur Atemluft. Es liegt den Lungenepithelzellen auf und ist somit Teil der Sauerstoffdiffusionstrecke. Demnach steht eine inadäquate Expansion des Flüssigkeitsfilms in direktem Zusammenhang mit der Effizienz des alveolären Gasaustausches und kann zu dessen Beeinträchtigung führen (Althaus et al. 2011; Fronius et al. 2012). Induktion proteolytischer ENaC-Aktivierung infolge erhöhtem ASL-Volumens wird als regulatorischer Mechanismus zur Resorptionssteigerung und der Erhaltung der ASL-Volumenhomöostase angesehen. Diese ist von besonderer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Lungenfunktion (Garcia-Caballero et al. 2009; Diakov et al. 2008; Caldwell et al. 2004).

1.3.2 Lungenzellen

Ein mehrreihiges hochprismatisches Epithel kleidet die oberen Atemwege sowie Trachea und die großen Bronchien aus. Bestehend aus Basalzellen – diese stellen Stammzellen für das Epithel dar – zilientragenden Zellen und mukusproduzierenden Becherzellen. Sie gewährleisten die mukoziliäre Clearance. In den distalen Atemwegen wie den Bronchioli terminales finden sich charakteristischerweise zunehmend sekretorische, nicht zilierte Clarazellen.¹⁰

Das einschichtige Alveolarepithel besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen:

- Alveolarepithelzellen/Pneumozyten Typ I (AT I-Zellen)
- Alveolarepithelzellen/Pneumozyten Typ II (AT II-Zellen)

¹⁰ Histologie, Junqueira und Carneiro 2013

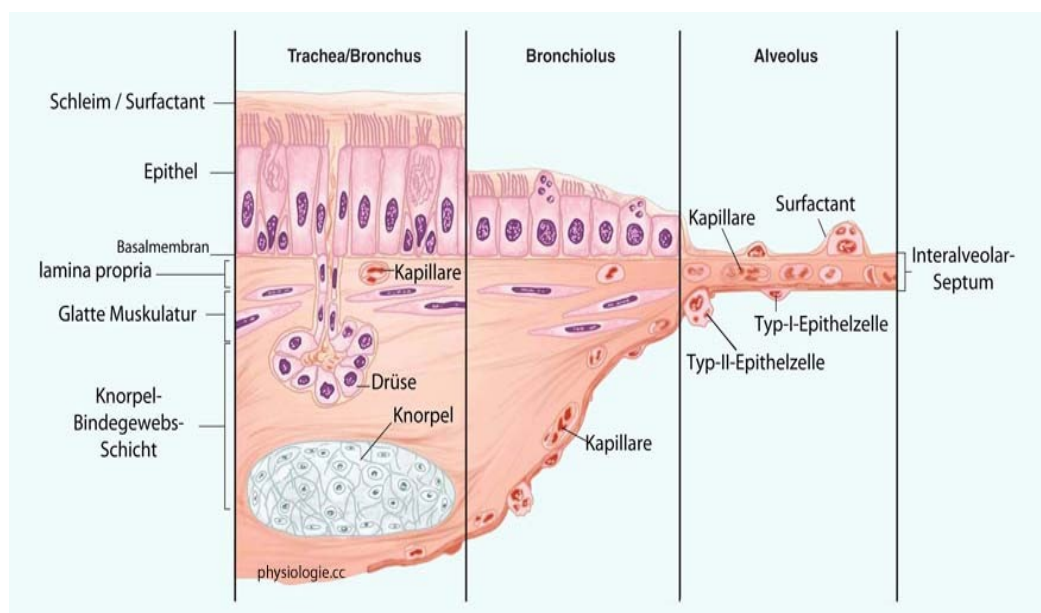
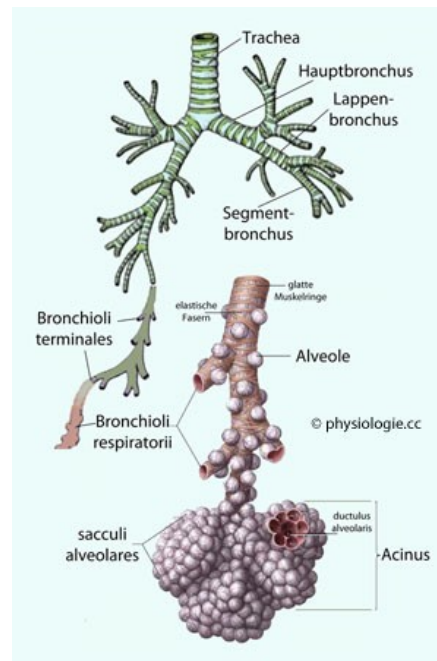


Abbildung 8 Morphologie der Luftwege.^{11 12}

Alle benachbarten Alveolarepithelzellen sind durch tight junctions nahezu dicht

¹¹ http://physiologie.cc/Luftwege_Morphol.jpg

¹² <http://physiologie.cc/BroGro.jpg>

miteinander verbunden (**Abb. 9**). Sie regulieren die parazelluläre Permeabilität und bilden einen wichtigen Bestandteil der alveolären Diffusionsbarriere zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment (Schneeberger & Lynch 2004).

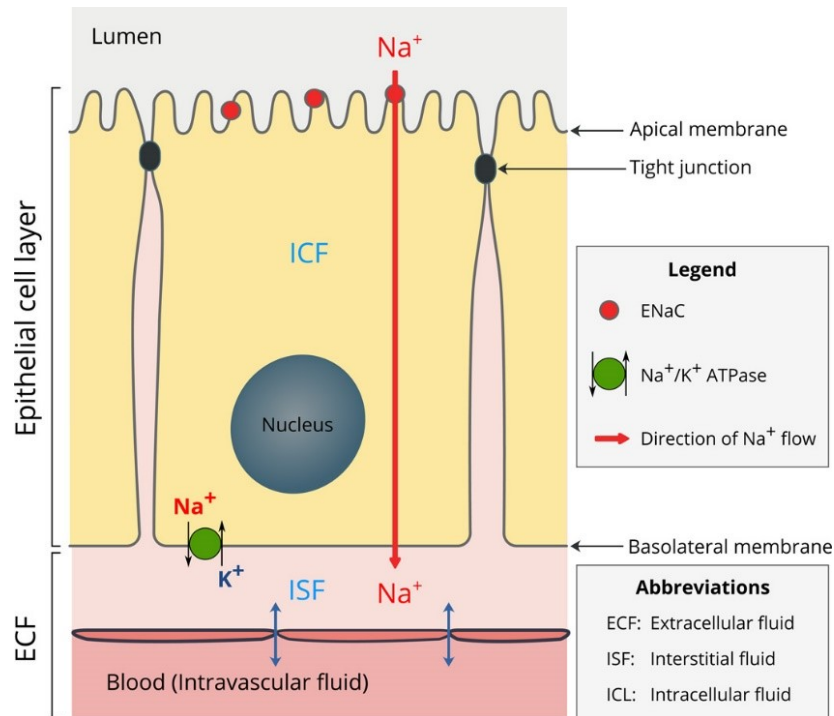


Abbildung 9 Schematische Darstellung der durch tight junctions verbundenen Fortsätze der Epithelzellen (Hanukoglu & Hanukoglu 2016). Apikale (dem Lumen zugewandt) und basolaterale Zellmembran (dem Interstitium zugewandt) haben einen histologisch und physiologisch unterschiedlichen Aufbau. Diese funktionelle Asymmetrie gewährt vektoriellen Transport durch Epithelzellen. Tight junctions dichten den interstitiellen Raum gegen das Alveolarlumen ab und bilden eine gröÙenselektive Gewebeschranke gegenüber Ionen und Molekülen aus.

1.3.3 Alveolarepithelzellen vom Typ I

AT I-Zellen liegen dem apikalen Bindegewebsgerüst auf und kleiden etwa 95 % der Alveolaroberfläche aus. Zusammen mit dem Kapillarendothel der Lunge und der gemeinsamen Basalmembran bilden sie die Blut-Luft-Schranke und gewährleisten den Gasaustausch. Um diesen möglichst effektiv leisten zu können, sind AT I-Zellen lang gestreckt und flach (**Abb. 10**), sodass der

Sauerstoff nur eine kurze Diffusionsstrecke zu überwinden hat (Guillot et al. 2013). Ihre mangelnde Regenerationsfähigkeit macht sie gegenüber schädigenden exogenen Einflüssen äußerst empfindlich (Ward 1984).

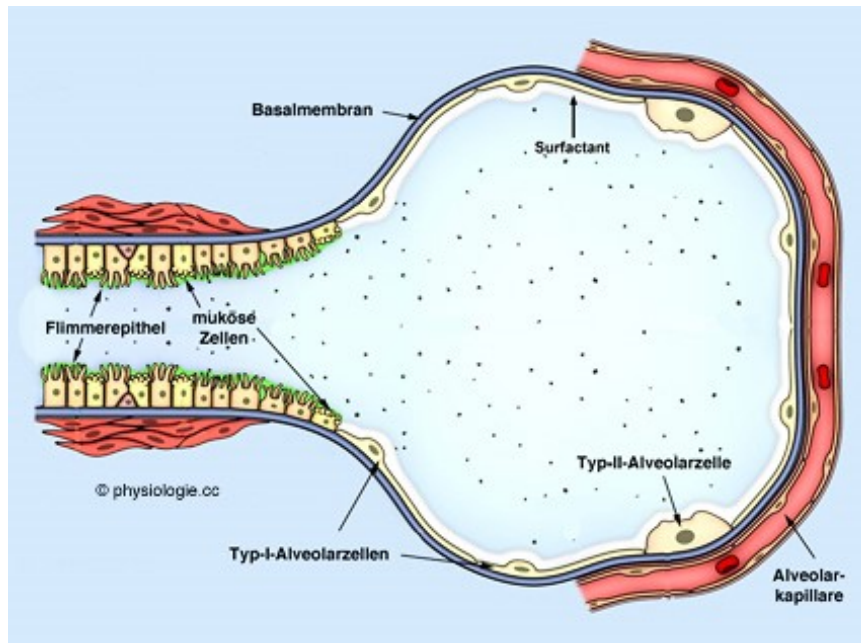


Abbildung 10 Bronchoalveoläre Region.¹³

1.3.4 Alveolarepithelzellen vom Typ II

Der Gasaustausch zwischen Alveolen und Kapillaren kann nur dann effizient stattfinden, wenn keine Flüssigkeit in den Alveolen vorliegt. Dies wird von Ionenkanälen und -pumpen in den AT II-Zellen reguliert, denen nur etwa 5% der Epitheloberfläche zuzuschreiben ist und deren entscheidende Funktion der pulmonalen Flüssigkeitsresorption obliegt (Guillot et al. 2013).

Diese Epithelzellen weisen eine kubische Morphologie auf und ragen in den Alveolarraum hinein (**Abb. 10**). Innerhalb ihres Zytoplasmas findet man Lamellarkörperchen, die der Produktion und Sekretion von oberflächenaktivem Surfactant (*surface active agent*) dienen (Andreeva 2007).

Es handelt sich hierbei um ein lecithinhaltiges, an Globuline gebundenes

¹³ http://physiologie.cc/alv_ganz.jpg

Phospholipid, das sich nach Exozytose aus den AT II-Zellen aufgrund seines amphiphilen Charakters als monomolekulare Schicht an der Luft-Wasser-Grenzfläche verteilt (**Abb. 11**) und durch eine Herabsetzung der Oberflächenspannung dem expiratorischen Kollabieren der Alveolen entgegenwirkt (Fehrenbach 2001). Die Existenz von Surfactant ist somit für eine einwandfreie mechanische Lungenfunktion erforderlich.

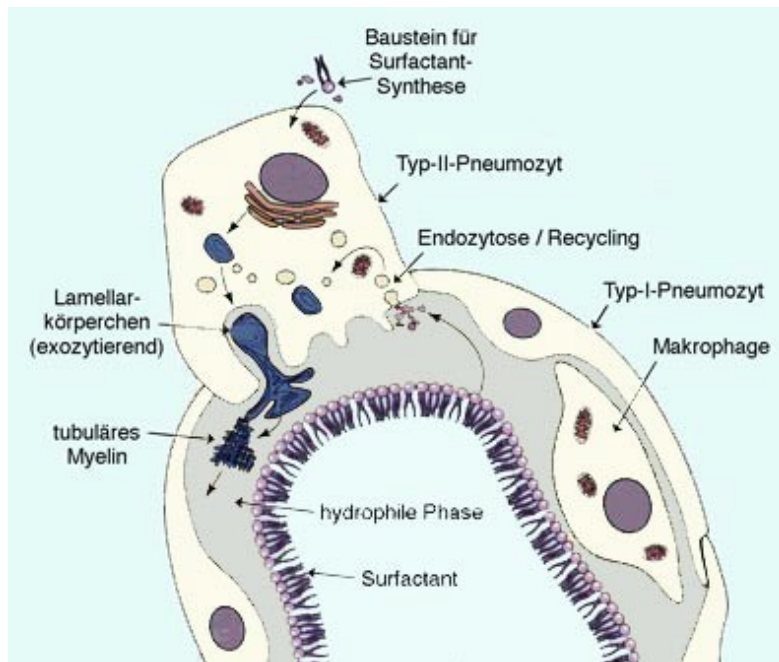


Abbildung 11 Produktion und Resorption von Surfactant in AT II-Zellen.

Surfactant, bestehend in etwa zu 90% aus Lipiden und zu 10% aus Proteinen, wird von Lamellarkörperchen durch Exozytose in den Alveolarraum sezerniert (Clements 1997). Die oberflächenaktive Wirkung wird vor allem durch Dipalmitoylphosphatidylcholin und Cholesterin hervorgerufen. Hydrophile Lipidteile in der wässrigen Schicht verankert, hydrophobe Teile der Gasphase zugewandt. Ihre Produktion erfolgt aus Fettsäuren des Blutes. Surfactant-assoziierte Proteine SP-A und SP-D vermitteln angeborene Immunität während SP-B und SP-C hydrophobe Eigenschaften besitzen und somit die Einlagerung von Lipiden begünstigen.¹⁴

Neben der Surfactant-Produktion und dem Ionen-/Wassertransport wird AT II-Zellen als Vorläuferzellen die Funktion der Regeneration des Alveolarepithels zuteil. Sie haben im Falle einer Schädigung oder Zerstörung von AT I-Zellen die

¹⁴ http://physiologie.cc/Alveo_surfact.jpg

Möglichkeit diese zu ersetzen, indem sie proliferieren und sich zu solchen ausdifferenzieren (Ware & Matthay 2000). Ihre Hauptaufgabe liegt jedoch in der Modulation des Flüssigkeitshaushaltes durch aktiven Natrium-Transport entlang des Alveolarepithels, wodurch die alveoläre Flüssigkeits-Clearance (AFC) geregelt wird (Matthay et al. 2002).

Die Epithelzellen der Lunge differenzieren sich noch während der fetalen Entwicklung zu AT I- und AT II-Zellen. Perinatal kommt es in der Zellmembran von AT II-Zellen bereits zu verstärkter apikaler Expression von ENaC und der Natrium/Kalium-ATPase auf der basolateralen Seite (Smith et al. 2000). In AT II-Zellen wird die heterodimere Form des Ionen-transportierenden Enzyms Natrium/Kalium-ATPase von einer α 1- und β 1-Untereinheit gebildet, wobei beide für die Funktion dieses Enzyms notwendig sind. An der α -Untereinheit wird ATP unter Energieabgabe gespalten, die β -Untereinheit ist kleiner und sichert die Anordnung und Lage des Proteins in der Membran (Mutlu & Sznajder 2005).

1.3.5 Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen zeichnen sich durch eine kugelförmige Morphologie aus. Sie werden als Monozyten im Knochenmark gebildet, sitzen der epithelialen Oberfläche der Atemwege und den AT I-Zellen der Alveolen auf und gehören zum zellulären angeborenen Immunsystem (Landsman & Jung 2007).

Ihre Aufgabe besteht darin, über die Atemluft in die Alveolen gelangte Erreger sowie Staubpartikel aufzunehmen und diese zu phagozytieren. Mikroorganismen werden im Phagolysosom durch antimikrobielle Peptide, Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen unschädlich gemacht. Dieser Vorgang wird als *respiratory burst* bezeichnet (Prokhorova et al. 1994). Aktivierte Makrophagen sind im Verlauf von Infektionen ausschlaggebend an der Ausschüttung einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren beteiligt denen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung bestimmter Lungenerkrankungen zugeschrieben wird (Bakker et al. 1998).

1.3.6 AFC - Alveoläre Flüssigkeitsclearance

Für die Flüssigkeitsresorption aus der Alveole sind Ionen- und Wassertransportprozesse erforderlich. Die AFC wird in erster Linie durch energieabhängigen Natriumtransport aufrechterhalten und moduliert. Der alveoläre Natriumtransport besteht vorwiegend aus zwei Transportsystemen: dem epithelialen Natriumkanal (Matalon & O'Broovich 1999) und der Natrium/Kalium-ATPase (Sznajder et al. 2002). Dem in vielen epithelialen Geweben koexprimierten Chloridkanal CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) wird hingegen an der Beteiligung der AFC eine deutlich untergeordnete Bedeutung zuteil (Chambers et al. 2007).

Transepithelialer Ionentransport baut einen minimal osmotischen Druck auf und führt zur Flüssigkeitsbewegung entlang des Ionengradienten. Für diese Vorgänge ist die Natrium/Kalium-ATPase die treibende Kraft die diesen elektrochemischen Gradienten über die basolaterale Membran generiert (Wang et al. 2014), wodurch folglich die AFC reguliert wird.

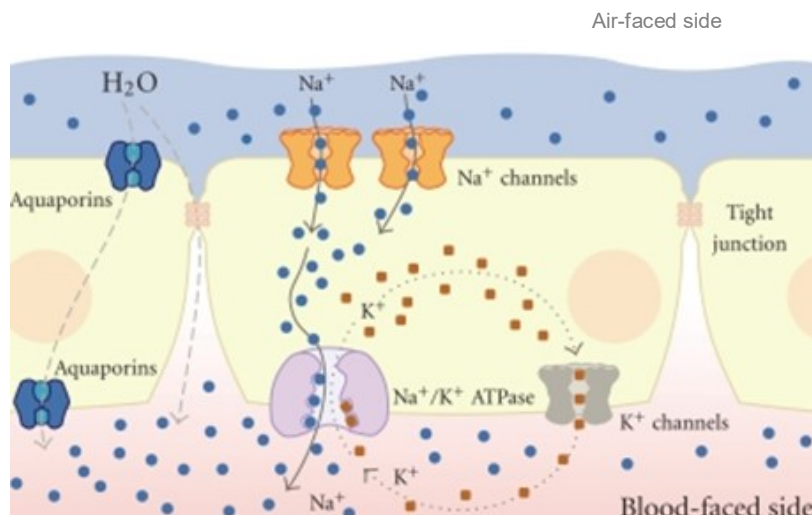


Abbildung 12 Generierung einer transepithelialen, lumen negativen Potentialdifferenz.

Die Natrium/Kalium-ATPase hält den Natriumgradienten über die Membran hinweg aufrecht, indem es gegen den Konzentrationsgradienten unter Hydrolyse von ATP Natrium-Ionen aus der Zelle heraus- und Kalium-Ionen hineinpumpt. Auf diese Weise wird die intrazelluläre Natrium-Konzentration immerzu auf einem niedrigen Niveau gehalten, was ein kontinuierliches, passives Nachströmen von Natrium-Ionen durch den epithelialen Natriumkanal nach sich zieht. Diese osmotische Triebkraft führt zu konsekutivem Nachströmen von Wasser (Althaus et al. 2011).

Der epitheliale Natriumkanal ENaC an der apikalen Zellseite fördert die Natriumzufuhr in die Zelle, während die Natrium/Kalium-ATPase entgegen dem Konzentrationsgefälle unter ATP-Verbrauch drei Natrium-Ionen aktiv über die basolaterale Seite der Membran im Austausch gegen zwei Kalium-Ionen aus der Zelle wieder in den interstitiellen Raum schleust (**Abb. 12**) (Bardou et al. 2009).

Dem aktiven vektoriellen Natriumtransport folgt aufgrund des osmotischen Gradienten eine passive Resorption von Wasser aus der Alveole. Es tritt hauptsächlich parazellulär durch das Alveolarepithel hindurch sowie durch spezielle Wasserkanäle wie dem Aquaporin 5 (AQP5) (**Abb. 13**) (Zemans & Matthay 2004) und wird über Blut- und Lymphgefäße abtransportiert (Matalon & O'Broovich 1999).

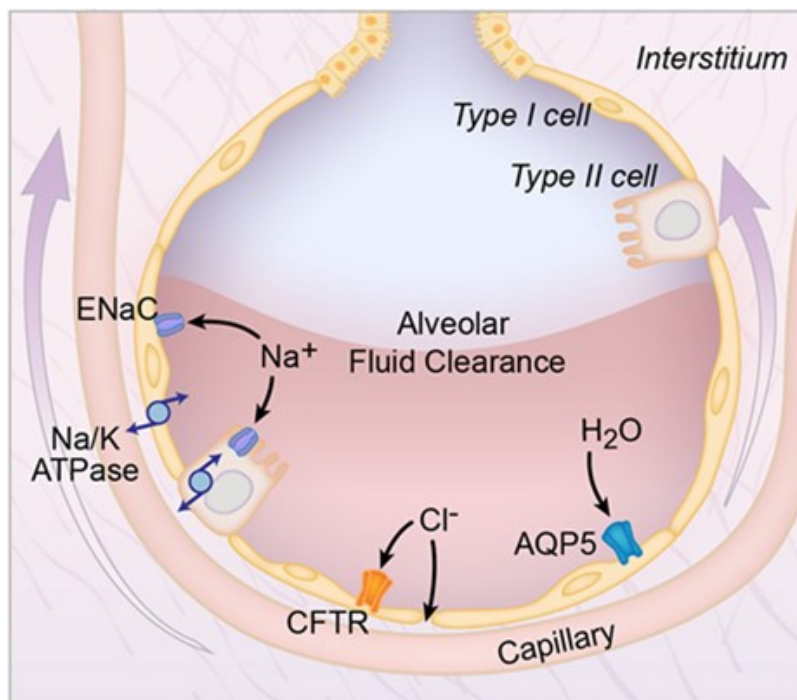


Abbildung 13 Alveoläre Flüssigkeits-Clearance (AFC).

Aktiver Transport von Natrium und Chlorid ist direkt mit der passiven Resorption von Wasser gekoppelt und wird aus Alveolen ins Interstitium befördert.

Die AFC wird über eine Aktivierung von G-Protein-gekoppelten β -Rezeptoren durch Katecholamine stimuliert. Im Respirationstrakt sind die Subtypen β_1 und β_2 der β -adrenergen Rezeptoren lokalisiert (Dumasius et al. 2001).

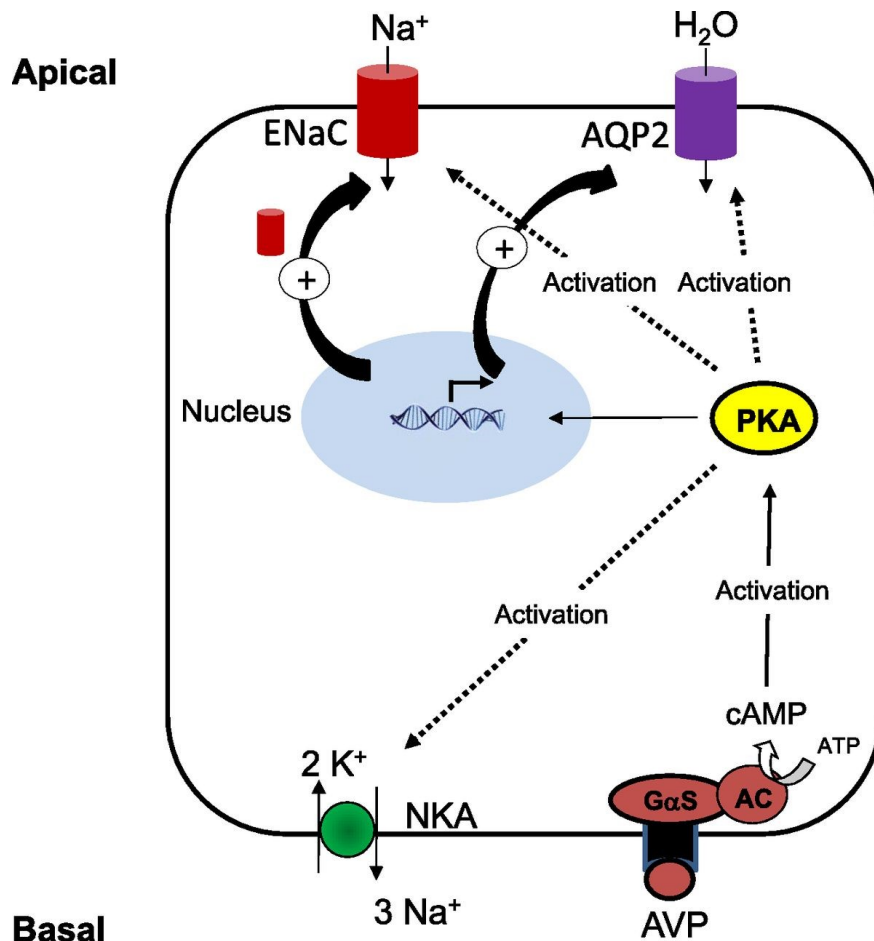


Abbildung 14 Signaltransduktion der Stimulierung β -adrenerger Rezeptoren.

Die G_s -Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) löst eine stimulierende Reaktionskaskade aus. Die Bindung von Katecholaminen an basolateral gelegene, adrenerge β -Rezeptoren ist an die Aktivierung des Adenylatzyklase über die α -Untereinheit des G_s -Proteins gekoppelt. Die Aktivierung dieses an der Zytoplasmamembran lokalisierten Effektorproteins initiiert eine verstärkte Freisetzung des *second messengers* cAMP aus ATP. Generiertes zytosolisches cAMP bewirkt eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die ihrerseits eine verstärkte Regulierung von ENaC und der Natrium/Kalium-ATPase sowie die Translokation von Wasserkanälen AQP5 induziert (Dumasius et al. 2001).

1.4 Lungenödem

Das Lungenödem ist eine pathophysiologische Erscheinung bei der es zum Austritt von Flüssigkeit aus den Lungenkapillaren in das Interstitium und in die Alveolen kommt. Initial ist das Ödem meist nur interstitiell lokalisiert, im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zum Übertritt in den Alveolarraum, da in der Lunge eine geringe extravasale Kapazität für Flüssigkeitsbewegungen besteht. Die pathologische Flüssigkeitsansammlung in der Lunge kann nicht effizient von Typ II alveolären Epithelzellen entfernt werden und behindert somit den Gasaustausch (**Abb. 15**).¹⁵

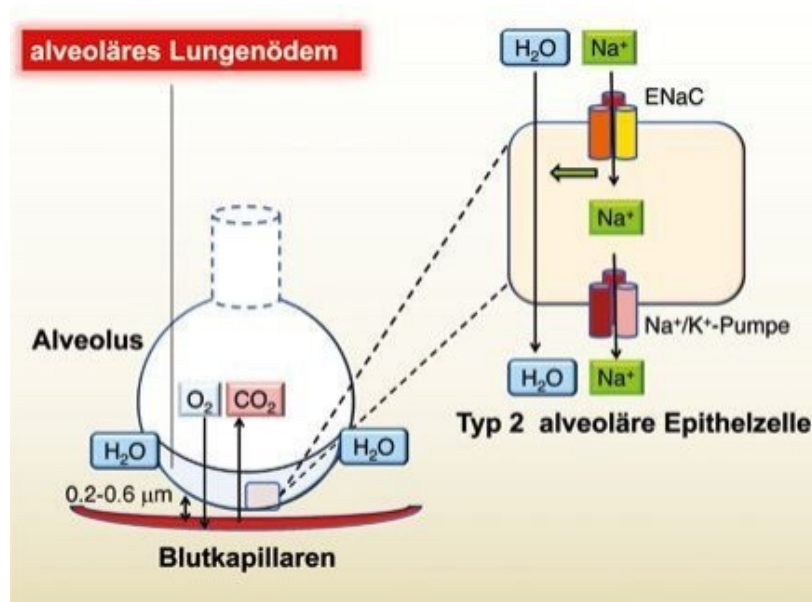


Abbildung 15 Flüssigkeitsresorption einer AT II-Zelle.

Natrium-Ionen gelangen über apikale epitheliale Natrium-Kanäle nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion in die Zelle; in der basolateralen Zellmembran pumpt die Natrium/Kalium-ATPase Natrium aktiv aus und Kalium in die Zelle. Wasser folgt dem Natrium parazellulär sowie zusätzlich über Aquaporine vom Alveolarlumen ins Interstitium. Das Ausmaß der Flüssigkeitsresorption ist abhängig von der Nettodifferenz zwischen hydrostatischem und onkotischem Druck in den Blutkapillaren, dem vektoriiellen Flüssigkeitstransport durch Natriumkanäle, dem konsekutiven Nachfolgen von Wasser und der Permeabilität der Kapillaren (Lucas et al. 2009).

¹⁵ Atmungsorgane, Thomas 1996

Klinisch wird ein Lungenödem hinsichtlich unterschiedlicher Pathogenese in einen kardialen und einen nicht-kardialen Typ unterteilt:

Dem kardialen Lungenödem liegt eine linksventrikuläre Stauungsinsuffizienz mit entsprechender kardialer Grunderkrankung zu Grunde und entsteht infolge eines hydrostatischen Druckanstiegs in den Lungenkapillaren bei intakter alveolo-kapillärer Schranke.

Für die Entstehung eines nicht-kardialen Lungenödems sind verschiedene Pathomechanismen verantwortlich, die eine durchlässige alveolo-kapilläre Schranke bedingen und somit zu einem Permeabilitätsödem führen.

1.4.1 Physiologische Grundlagen der Flüssigkeitshomöostase

Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Flüssigkeitsgleichgewicht zwischen intra- und extravasalem Raum. Zielgerichteter Transport von Ionen, der als osmotische Triebkraft für die Wasser-Resorption genutzt wird, gewährleistet den Erhalt der Elektrolyt- und Wasserhomöostase.¹⁶

Aus dem Gefäßsystem in das Interstitium filtrierte und nachfolgend über das Lymphsystem drainierte Flüssigkeiten werden über transvaskuläre hydrostatische und onkotische Druckgradienten reguliert (Aukland & Reed 1993).

Zusätzlich zu den Druckgradienten ist die Permeabilität der Kapillaren ein weiterer bestimmender Faktor. Ist die semipermeable Endothelmembran intakt, wird der Flüssigkeitseintritt durch deren Barriereigenschaften limitiert und der Flüssigkeitsaustausch ausschließlich anhand der transvaskulären Druckgradienten geregelt (Maniatis et al. 2008). Somit hat das pulmonale Endothel eine wichtige Regulationsfunktion für die Homöostase zwischen vaskulärem Kompartiment und Interstitium.

¹⁶ Principles of Animal Physiology, Moyes & Schulte 2008

Der Flüssigkeitsaustausch über die alveoläre Membran (J_v) wird durch die Starling-Gleichung beschrieben (Mehta & Malik 2006): $J_v = K_{f,c} (\Delta P - \sigma \Delta \Pi)^{17}$

$K_{f,c}$ = kapillärer Filtrationskoeffizient

ΔP = hydrostatische Druckdifferenz zwischen Gefäß und Gewebe

σ = Proteinreflektionskoeffizient

$\Delta \Pi$ = onkotische Druckdifferenz zwischen Gefäß und Interstitium

Ist einer dieser Faktoren in einem nicht kompensierbaren Ausmaß gestört, entsteht eine Imbalance zwischen Flüssigkeitseinstrom und -elimination und Flüssigkeit tritt aus dem Gefäß ins Gewebe über. Beim Permeabilitätsödem kann es zu Veränderungen aller vier Parameter kommen. Es kann beispielsweise im Verlauf einer schweren Lungenentzündung in Form eines *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) auftreten und stellt eine lebensbedrohliche Situation dar (Ware & Matthay 2001).

1.5 Permeabilitätsödem und dessen klinisches Korrelat ARDS

Das *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) ist die Manifestation einer akuten Lungenschädigung infolge einer massiven Inflammationsreaktion des Lungengewebes auf verschiedene schädigende Faktoren dessen Erstbeschreibung 1967 durch Ashbaugh et al. erfolgte. Das klinische Bild des ARDS ist geprägt durch ein nicht-kardial bedingtes Permeabilitätsödem als Leitsymptom, verbunden mit einer rasch progredienten Gasaustauschstörung gefolgt von refraktärer Hypoxämie und charakteristischen bilateralen Infiltraten in der Röntgenthoraxaufnahme bei gleichzeitigem Ausschluss einer Linksherzinsuffizienz (Bernard et al. 1994).

¹⁷ Intensivbuch Lunge und Beatmung, Bein & Pfeifer 2015

1.5.1 Klinisches Erscheinungsbild

Es handelt sich um ein akut auftretendes, lebensbedrohliches Krankheitsbild dessen Mortalität initial bei 40-60% lag (Ware & Matthay 2000), heutzutage noch bei 35-45% liegt (Wheeler & Bernard 2007; Hecker et al. 2012). Die jährliche Inzidenz in Mitteleuropa liegt bei 5 erkrankten Patienten pro 100.000 Einwohner (Linko et al. 2009).

Zugrunde liegt eine multifaktoriell bedingte Schädigung des Lungenparenchyms mit Verlust der physiologischen Barrierefunktion. Dies führt zu endothelialen und epithelialen Permeabilitätsstörungen mit Flüssigkeitsaustritt, dessen Folge ein Lungenödem mit konsekutiver Oxygenierungsstörung ist und schließlich zu respiratorischem Versagen führt. In der überwiegenden Anzahl der Fälle ist ein Multiorganversagen todesursächlich (Hudson & Steinberg 1999; Wheeler & Bernard 2007; Hecker et al. 2008).

ARDS ist ein heterogenes Syndrom mit einer Vielzahl parallel ablaufender, komplexer pathophysiologischer Prozesse (Silversides & Ferguson 2013) und wird über den Oxygenierungsindex nach Horowitz definiert. Er beschreibt das Verhältnis des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks zur inspiratorischen Sauerstofffraktion ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) und dient der Beurteilung inwieweit die Lunge das durch sie fließende Blut mit Sauerstoff aufzusättigen vermag.¹⁸

Die Unspezifität der einzelnen Befunde und der rasch voranschreitende Krankheitsverlauf erschwert die Diagnosestellung. Zwischen pathologischem Röntgenbefund und lebensbedrohlichem Krankheitsbild liegen im Schnitt 12 bis 72 Stunden (Levit et al. 2009).

¹⁸ Beatmung für Einsteiger, Lang 2016

1.5.2 Ätiologie

Lungenschäden können durch diverse Faktoren ausgelöst werden wie etwa biologische, physikalische oder chemische Stimuli. Hinsichtlich Ursachen und Risikofaktoren für die Entwicklung eines ARDS wird eine Differenzierung in direkten und indirekten Lungenschaden vorgenommen (Piantadosi & Schwartz 2004).

So zählen unter anderem Pneumonie, Lungenkontusion, Aspiration von Mageninhalt sowie Inhalation toxischer Gase aufgrund ihrer unmittelbaren Wirkung auf das Lungenparenchym zur Gruppe der direkten Lungenschädigung (Ware & Matthay 2000). Hierbei wird vor allem das alveoläre Epithel angegriffen (Hecker et al. 2012).

Bei einer indirekten Lungenschädigung liegt die Ursache extrapulmonal; hier sind Sepsis, Massentransfusion, Pankreatitis als indirekt wirkende Noxen und mögliche Auslöser für ein ARDS zu nennen, wobei es zur Immunreaktion und nachfolgend zur Schädigung der Lunge kommen kann (Ware & Matthay 2000). Beim indirekten Lungenschaden wird insbesondere das pulmonalvaskuläre Endothel angegriffen (Hecker et al. 2012).

Pulmonalen Ursachen liegen 57-76% der Fälle zugrunde, für 24-43% sind extrapulmonale Ursachen verantwortlich (Frutos-Vivar et al. 2004). Ebenso birgt maschinelle Beatmung mit hohen Spitzendrücken und Tidalvolumina das Risiko einen beatmungsinduzierten Lungenschaden (*ventilator induced lung injury*, VILI) zu verursachen beziehungsweise zu aggravieren, sei es durch Überblähung und daraus resultierende Schäden (Barotrauma) oder durch Induktion der Inflammationskaskade (Biotrauma) (Laudi et al. 2007).

Als häufigste Auslöser dominieren Pneumonie und pneumogene Sepsis, gefolgt von Sepsis anderen Ursprungs (Ware & Matthay 2000).

In einer von 1983 bis 1985 durchgeführten Studie fand sich für die Entwicklung eines ARDS die höchste Erkrankungsrate bei Patienten mit parallel bestehender Sepsis (Hudson et al. 1995).

Durch Rubenfeld et al. wurde nachgewiesen, dass 46% der Sepsis-Patienten mit primärem pulmonalen Fokus ein akutes Lungenversagen erlitten. Bei Patienten, die aufgrund eines anderen Infekt-Fokus an einer Sepsis erkrankten war diese zu 33% ursächlich für ein ARDS (Rubenfeld et al. 2005).

Diesen Erkenntnissen schließt sich die 2 Jahre später durch Ferguson et al. publizierte Studie an. Hier erlitten an einer Pneumonie erkrankte Patienten zu 43,3% - an einer Sepsis erkrankte zu 32,1% ein akutes Lungenversagen (Ferguson et al. 2007).

Im Rahmen einer isländischen Studie, in der Daten von ARDS-Patienten über einen Zeitraum von 23 Jahren gesammelt und ausgewertet wurden, sind ebenfalls Sepsis und Pneumonie als Hauptursachen für ein ARDS angeführt (Sigurdsson et al. 2013).

1.5.2.1 Pneumonie

Pneumonie ist eine entzündliche Erkrankung des Lungenparenchyms, ausgelöst durch eine Infektion mit Bakterien, Viren oder Pilzen. Bakterien stellen jedoch die häufigste Erregergruppe dar – für fast die Hälfte aller Fälle sind grampositive Pneumokokken verantwortlich.

Die durch *Streptococcus pneumoniae* verursachte Pneumokokkenpneumonie gehört weltweit zu einer der häufigsten und klinisch bedeutendsten bakteriellen Infektionskrankheiten und kann bei ungünstigem Verlauf trotz Antibiose in ein ARDS münden, was eine der wesentlichen Komplikationen der schweren Pneumokokkenpneumonie darstellt. Denn sobald die Pneumokokken lysieren, vermögen freigesetzte Toxine die Entzündung des Gewebes zu verstärken und schwere Lungenschäden und Lungenödeme auszulösen. So können

Pneumoniepatienten nach erfolgreicher Antibiotikatherapie versterben obwohl keine Bakterien mehr in der Lunge nachweisbar sind (Vernooy et al. 2002). Zusätzlich wird eine erfolgreiche Therapie aufgrund der Entwicklung bakterieller Resistenzen gegenüber Antibiotika in zunehmendem Maße erschwert.

Eine elementare Rolle bei der Entstehung des akuten Lungenversagens im Rahmen einer Pneumokokkenpneumonie trägt das cholesterolabhängige, zytolytische Toxin Pneumolysin. Es wird von allen klinisch relevanten Pneumokokkenstämmen gebildet und ist als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren der Pneumokokken von essentieller Bedeutung für deren Pathogenität (Witzenrath et al. 2006; Ogunniyi et al. 2007).

1.5.3 Pathogenese

Trotz vielfältiger und heterogener Ursachen des ARDS, münden alle in eine weitgehend einheitliche pathophysiologische Endstrecke mit uniformer Symptomatik die über eine Aktivierung von Inflammations- und Gerinnungskaskaden in letzter Konsequenz in einer Schädigung des Lungengewebes resultiert (Hecker et al. 2012). Ungeachtet dessen, ob die Lungenschädigung nun einer direkten oder indirekten Ursache zugrunde liegt, führt eine unkontrollierte Entzündungsreaktion der Lunge in beiden Fällen zum Verlust der alveolo-kapillären Barriere bestehend aus kapillärem Endothel und alveolärem Epithel (Matthay et al. 2012).

Begleitet wird die überschießende Entzündungsreaktion des Körpers von der Entstehung eines alveolären Permeabilitätsödems als pathogenetisches Kennzeichen der akuten Phase des ARDS sowie von histologischen Umbauvorgängen innerhalb des alveolären Epithels (Piantadosi & Schwartz 2004).

In der akuten Phase des ARDS, auch als exsudative Phase bezeichnet, werden pulmonale Epithelzellen zerstört und das lungeneigene Gefäßendothel geschädigt. Darüber hinaus bilden sich innerhalb der Alveolen fibrinreiche

hyaline Membranen aus (Katzenstein et al. 1976). Diese Störung der alveolo-kapillären Integrität und der physiologischen Flüssigkeitsbarriere bewirkt eine vermehrte Filtration von Flüssigkeit, Makromolekülen, Erythrozyten, Leukozyten und Fibrin ins Interstitium. Es entwickelt sich ein proteinreiches interstitielles Ödem, das auch in den Alveolarraum eindringen kann (Aukland & Reed 1993).

Die Gasaustauschfunktion der Lunge ist dadurch stark beeinträchtigt und es kann nicht mehr ausreichend Sauerstoff in den Blutkreislauf aufgenommen werden. Es kommt zu einer respiratorischen Verschlechterung mit zunehmender Atemnot, die eine maschinelle Beatmung erforderlich macht. Im weiteren Verlauf kann es zu einer schwer therapierbaren Hypoxämie und zum Tod durch Multiorganversagen kommen (Wheeler & Bernard 2007; Hecker et al. 2012).

Die pulmonal initiierte Entzündung kann sich zu einer generalisierten Inflammationsreaktion entwickeln. Die Entzündungsmediatoren treten über systemische Zirkulation in andere Organe über und begünstigen so die Entstehung von Multiorganversagen. Außerdem können Bakterien – beispielsweise im Rahmen einer Lungenentzündung – als Folge der gestörten Barrierefunktion nun leichter in den systemischen Kreislauf gelangen und einen septischen Schock auslösen (Donnelly et al. 1993).

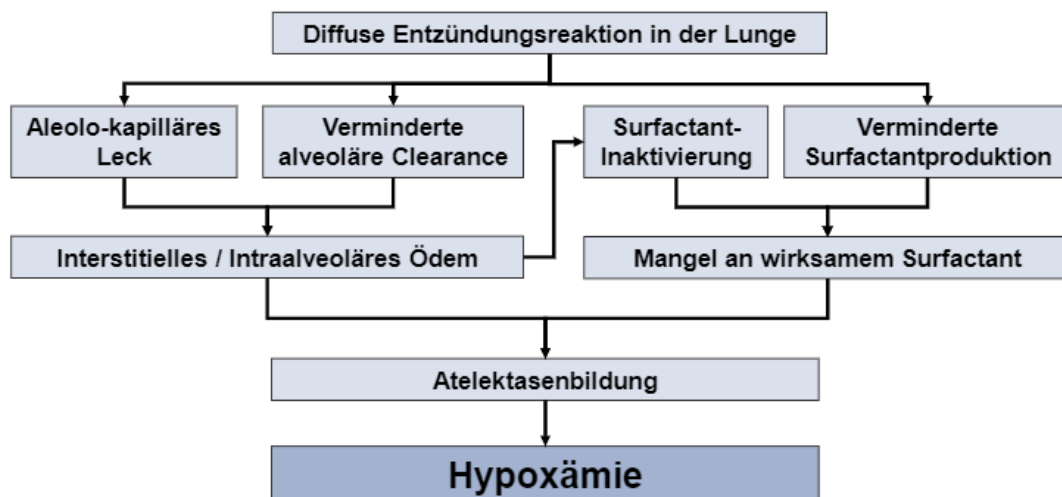


Abbildung 16 Pathophysiologische Abläufe des ARDS.

1.5.4 Zytokine

Als extrazelluläre Botenstoffe vermitteln und steuern Zytokine die Signalübertragung zwischen verschiedenen Zellen. Sie regulieren in erster Linie Wachstumsvorgänge, Zellproliferation und -differenzierung und nehmen wesentlichen Einfluss auf Immunreaktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Zytokine eines Typs können von zahlreichen Zellen gebildet werden und entfalten ihre Wirkung auto- und parakrin, gelegentlich auch endokrin.¹⁹

Zur Klasse der Zytokine zählen folgende Peptide und Proteine: Tumornekrosefaktoren (TNF), Interleukine (IL), Interferone (IFN), koloniestimulierende Faktoren (CSF) und Chemokine.²⁰

Proinflammatorische Zytokine

IL-6, IL-8 und TNF- α sind die hauptverantwortlichen proinflammatorischen Zytokine in der Pathogenese des ARDS. Ihre erhöhten Plasmaspiegel korrelieren mit der Mortalität der Patienten (Rodriguez-Gaspar et al. 2001).

Antiinflammatorischen Zytokine

Zu den wichtigsten antiinflammatorischen Zytokinen in Zusammenhang mit ARDS gehören IL-10 und TGF- β . Sie regulieren die Entzündungsaktivität herab.

Chemokine

Sie bilden eine Untergruppe der Zytokine, die die Wanderungsbewegung (Chemotaxis) von Zellen veranlassen. Sie locken Immunzellen aus dem Gefäßsystem entlang ihres chemotaktischen Konzentrationsgradienten zum Ort der Infektion. Chemokine sind wesentlich an der Rekrutierung von Leukozyten beteiligt.²¹

¹⁹ <https://viamedici.thieme.de/lernmodule/biochemie/zytokine>

²⁰ <https://medlexi.de/Zytokine>

²¹ <https://medlexi.de/Chemokine>

1.5.4.1 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

TNF- α besitzt im Organismus als eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine zahlreiche Funktionen in der Pathogenese von akuten Entzündungsreaktionen, autoimmunen Krankheitsbildern, malignen Geschehen sowie im Rahmen des ARDS. Als Initiator des Entzündungsgeschehens induziert TNF- α die Produktion anderer Mediatoren und ist für Proliferation und Differenzierung von Zellen und deren Apoptose von Bedeutung (Yang et al. 2010; Tracey & Cerami 1993; Micheau & Tschopp 2003).

TNF- α wird überwiegend von aktivierten Makrophagen sezerniert und entfaltet über die Oberflächen-Rezeptoren TNFR-1 und TNFR-2 seine Wirkung. Das Gen für TNFR-1 wird konstitutiv exprimiert, im Gegensatz dazu erfolgt die Expression von TNFR-2 selektiv von Endothel- und Immunzellen. Die Bindungsaffinität von TNF- α zu beiden Rezeptoren ist vergleichbar, die meisten Effekte im Organismus werden jedoch über TNFR-1 vermittelt (Heller & Krönke 1994; Yang et al. 2010; Chen & Goeddel 2002).

Um proinflammatorische Effekte dieses multifunktionalen Botenstoffs – vor allem ARDS betreffend – zu erzielen, stimuliert und aktiviert TNF- α über eine komplexe Kaskade den Transkriptionsfaktor NF- κ B mit nachfolgender Genexpression proinflammatorischer Mediatoren wie Cyclooxygenase 2 (COX-2), Adhäsionsproteine sowie weitere proinflammatorische Zytokine und Chemokine (Chen & Goeddel 2002).

1.5.5 Pathomechanismen der Entzündungskaskade und Ödembildung

Bei der Entstehung von Permeabilitätsödemen wird polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (*polymorphonuclear neutrophils*, PMN) eine tragende Rolle beigemessen (Hecker et al. 2012; Ware 2006; Ware & Matthay 2000).

Sie sind anteilig die häufigsten Leukozyten im menschlichen Organismus. Für die Immunabwehr sind aktivierte neutrophile Granulozyten unerlässlich um

pathogene Erreger zu minimieren und eine inflammatorische Reaktion wenn möglich lokal zu halten. Jedoch können die Immunzellen neben ihrer protektiven Wirkung auch schädlichen Einfluss nehmen, indem sie bei unkontrolliertem, massenhaftem Übertritt ins Gewebe selbiges irreversibel zerstören (Freitas et al. 2011).

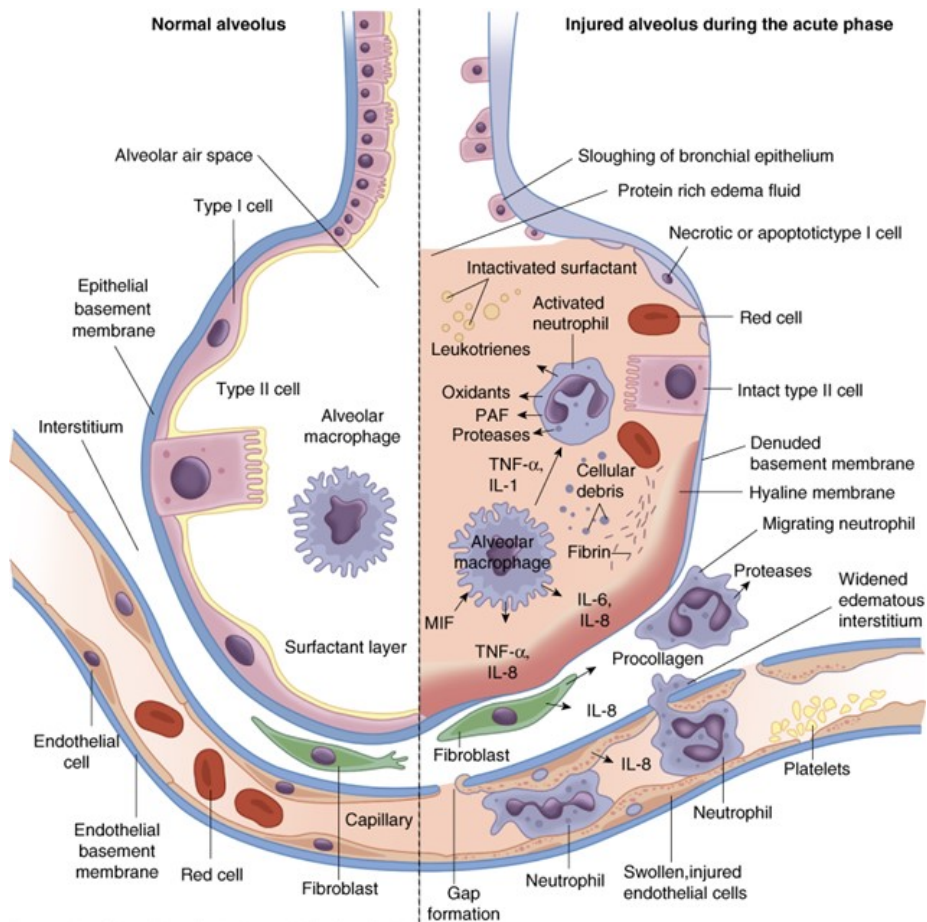


Abbildung 17 Gegenüberstellung eines gesunden Alveolus versus eines geschädigten während der Akutphase des ARDS. (Ware & Matthay 2000)

Diffuse Störung der alveolo-kapillären Barrierefunktion durch Einsetzen entzündlicher Prozesse einhergehend mit der Bildung hyaliner Membranen, dem Einstrom protein- und mediatorreicher Flüssigkeit in den Alveolarraum und der Inaktivierung der Surfactant-Produktion. Aktivierung von Endothelzellen sowie deren Oberflächenrezeptoren und Adhäsionsmoleküle, gefolgt von Aktivierung und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und schlussendlicher Produktion proinflammatorischer Mediatoren, proteolytische Enzyme und reaktiver Sauerstoffspezies.

1.5.5.1 Entzündungsreaktion und Aktivierung von PMN

Aufgrund bereits genannter Ursachen wird durch Freisetzung zellulärer Bestandteile infolge Zellschädigung beziehungsweise apoptotischer Vorgänge oder von Pathogenen sezernierte Toxine eine inflammatorische Kaskade in der Lunge ausgelöst (Winning et al. 2007). Initiiert wird diese durch Makrophagen, die in der Frühphase des Entzündungsprozesses Zytokine (*early response cytokines*) wie TNF- α und IL-1 β sezernieren, die ihrerseits wiederum eine proinflammatorische Stimulation der Immunabwehr bewirken und die Produktion weiterer Zytokine und Chemokine induzieren sowie PMN aktivieren. Chemokine – allen voran IL-8 – rekrutieren PMN zum Ort der Inflammation (**Abb. 18**) (Geiser 1999).

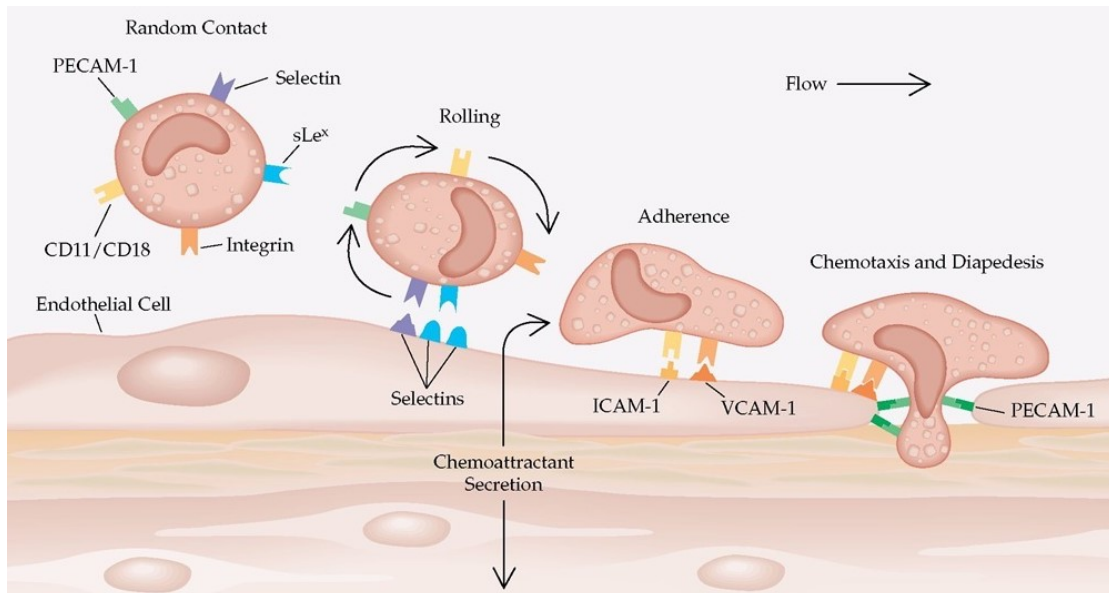


Abbildung 18 Leukozyten-Rekrutierung: durch Adhäsionsmoleküle induzierte Migration neutrophiler Granulozyten in entzündetes Gewebe.²²

Im Rahmen inflammatorischer Prozesse erfolgt die Extravasation initial durch die den Glykoproteinen zugehörigen E-, P- und L-Selektine und deren Rezeptoren. Diese Adhäsionsmoleküle bewirken ein Entlangrollen im Blut zirkulierender Leukozyten an der Oberfläche der Endothelzellen. Der nächste Schritt der Rekrutierungskaskade ist die Bindung der Leukozyten über Integrine an die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1. Sie stellen Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie dar und werden vermehrt durch

²² http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2012/04/tmp4B39_thumb1.jpg

aktivierte Endothelzellen auf deren Oberfläche exprimiert. Die Transmigration der Leukozyten durch das Endothel erfolgt zumeist über die Bindung an PECAM-1, das sowohl von Leukozyten selbst als auch von Endothelzellen exprimiert wird. Der überwiegende Anteil migriert hierbei parazellulär, nur ein geringer Teil der Leukozytenmigration erfolgt transendothelial (Chavakis 2012).

Aktivierte Leukozyten werden unflexibel und können aufgrund ihrer reduzierten Verformbarkeit die Kapillaren nicht mehr passieren, wodurch sie vermehrt an Endothelzellen des pulmonalen Gefäßsystems akkumulieren (Worthen et al. 1989), während auf dem Endothel der Lungenstrombahn exprimierte Adhäsionsmoleküle deren Transmigration aus der Blutbahn durch die Endothelmembran in den Alveolarraum ermöglichen (Wang & Doerschuk 2002; Zemans et al. 2009).

1.5.5.2 Entstehung eines interstitiellen Ödems

Eingewanderte neutrophile Granulozyten bewirken die Freisetzung weiterer Mediatoren. Dazu gehören PAF, PGE₂, Leukotriene, Proteasen und Sauerstoffmetaboliten. Deren vermehrte Expression resultiert in einer Verletzung des Kapillarendothels einhergehend mit einer erhöhten vaskulären Permeabilität. Diese Barrieredysfunktion der durch Endothelzellen gebildeten endothelial-interstitiellen Schranke führt zu vermehrtem Einstrom von Flüssigkeit aus den Kapillaren ins interstitielle Lungengewebe (Matthay et al. 2012).

1.5.5.3 Entstehung eines alveolären Ödems

Es folgt eine weitere Verstärkung der Immunreaktion, die eine unkontrollierte lokale Inflamationsreaktion an der durch Kapillarschäden freigelegten Basalmembran auslöst, was zur diffusen Schädigung des alveolären Epithels führt (Pierrakos et al. 2012). Infolge der nun ebenfalls geschädigten Integrität der überwiegend durch AT I- Zellen gebildeten interstitiell-alveolären Barriere kommt es zur Infiltration von Flüssigkeit in die Alveolen mit der Entstehung eines proteinreichen alveolären Permeabilitätsödems sowie der Inaktivierung von

Surfactant und somit zur Atelektase der Alveolen (Ware 2006; Seeger & Lasch 1987). Die Kapazität, Flüssigkeit aus dem Alveolarraum zu transportieren, wird zunehmend vermindert (Ware 2006). Zudem inhibiert der im Rahmen des ARDS ebenfalls erhöhte TGF- β (*transforming growth factor- β*) die Flüssigkeitsresorption aus der Alveole indem es eine Endozytose des ENaC von der Oberfläche alveolärer Epithelzellen verursacht und somit dessen Aktivität unterdrückt.²³

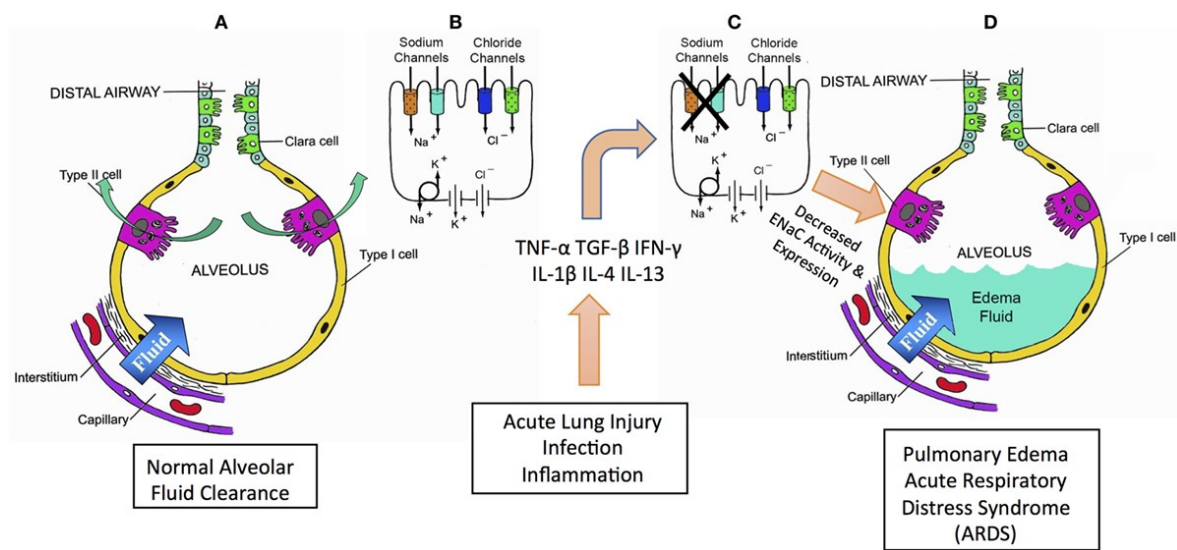


Abbildung 19 Zusammenfassende schematische Darstellung der Entstehung eines Lungenödems und des ARDS. Links im Bild durch ENaC und CFTR-Kanäle vermittelte Aufrechterhaltung der Natriumreabsorption. Demgegenüber steht eine durch entzündliche Zytokine vermittelte Hemmung der ENaC-Funktion mit nachfolgender Flutung der Alveolen und dadurch bedingter Beeinträchtigung des Gasaustausches sowie der Entstehung einer Hypoxämie (Wynne et al. 2017).

²³ Intensivbuch Lunge und Beatmung, Bein & Pfeifer 2015

1.6 Therapeutische Ansätze

Obwohl sowohl Inzidenz als auch Mortalität immer noch hoch sind, beschränkt sich die Therapie des ARDS derzeit darauf, eine möglichst schonende Beatmung der Patienten zu gewährleisten. Im Verlauf des ARDS nimmt die Hypoxie zu und die meisten Patienten benötigen eine Intubation und Beatmung. Der wichtigste Ansatzpunkt bei der Behandlung ist die optimale Oxygenierung. Grundursache oder Schweregrad können eine Kombination aus lungenprotektiver Beatmung mit einem positiven endexpiratorischen Druck (*positive end-expiratory pressure*, PEEP) erforderlich machen (Boyle et al. 2013).

Von Beatmungsstrategien abgesehen, gab es trotz umfangreicher Forschung und vielfältiger experimenteller Ansätze bislang keine kausale Therapie bei Permeabilitätsödemen infolge akuten Lungenschadens.

Sympathomimetika

Für die Prognose des nicht-kardialen Lungenödems ist die alveoläre Resorption des expandierten Volumens von entscheidender Bedeutung (Azzam & Sznajder 2015). Diese wird durch die Effektivität der AFC bestimmt, die hauptsächlich über den vektoriellen aktiven Natrium-Transport reguliert wird – je schneller und effektiver die alveoläre Flüssigkeit resorbiert wird beziehungsweise je höher die maximale alveoläre Flüssigkeits-Clearance ist, umso größer die Überlebenschance (Guidot et al. 2006; Ware & Matthay 2001; Hummler et al. 1996; Matthay et al. 2002).

Die Eigenschaft die alveoläre Flüssigkeitsresorption pharmakologisch zu steigern wird insbesondere Pharmaka zugeschrieben, die β_2 -Rezeptoren zu aktivieren vermögen. Die Behandlung mit β -adrenergen Agonisten wie Salbutamol reduziert die Kapillarpermeabilität, induziert eine anhaltende Stimulation der Flüssigkeitsresorption und verursacht eine deutliche Verbesserung der Lungenfunktion. Doch nach zahlreichen experimentellen und klinischen Studien mit initial positiven Daten musste festgestellt werden, dass β -Stimulation beim Permeabilitätsödem im Rahmen des ARDS schließlich keinen Benefit brachte

und somit negativ ausfiel (Gao Smith et al. 2012).

Antiinflammatorische Therapeutika

Da bei ARDS-Patienten ein pulmonales Ungleichgewicht zwischen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Martin 1999) und ihren antiinflammatorischen Konterparts wie IL-10 und IL-1-Rezeptorantagonist (Donnelly et al. 1996) besteht, ist es naheliegend inflammatorische Prozesse durch Modulation der bestehenden Dysbalance einzudämmen. Obgleich diese zunächst vielversprechende Therapieoption beispielsweise mit Corticoiden oder Statinen positive Resultate im Tierversuch erbrachte, konnte in keiner randomisierten, Placebo-kontrollierten Doppelblind-Studie ein Überlebensvorteil erzielt werden (Tonelli et al. 2014).

TIP-Peptide

Dem Forschungsteam von APEPTICO gelang die Entwicklung einer völlig neuartigen Behandlung gegen ARDS.

Das Leitmolekül AP301 ist ein pharmakologisch aktives Peptid, welches als erste arzneimittelspezifische Behandlungsmöglichkeit ein durch Hyperpermeabilität ausgelöstes Lungenödem ursächlich therapiert. In präklinischen Studien konnte dargelegt werden, dass es unter der Wirkung von AP301 und seiner Analoga zu einer Rückbildung der Wasseransammlung und einem wirksamen Schutz des Lungengewebes kommt. Der als Aerosolformulierung inhalierbare Natriumkanal-Aktivator induziert eine signifikante Verbesserung klinischer Surrogatparameter der Lungenfunktion. Er aktiviert die Reabsorption von Ödemflüssigkeit in der Lunge und wirkt zusätzlich einer Hyperpermeabilität der Blutgefäße entgegen (Hartmann et al. 2013). Neben der Vermeidung und Behandlung des Permeabilitätsödems im Rahmen des ARDS, ist AP301 für weitere klinische Anwendungen bedeutend. Es verbessert die Sauerstoffversorgung nach einer Lungentransplantation mit der Vermeidung eines ischämischen Reperfusionsschadens (Aigner et al. 2017), des Weiteren ist es zur Behandlung bakterieller und viraler Lungenentzündung geeignet (Hartmann et al. 2015).

APEPTICO

APEPTICO *Forschung und Entwicklung GmbH* ist ein privates Biotechnologie-Unternehmen in Österreich unter der Leitung von Univ.-Doz. Dr. Bernhard Fischer, deren klinischer Fokus sich auf die Therapie schwerer Lungenerkrankungen richtet. Sie entwickeln auf Peptiden basierende, synthetisch hergestellte Substanzen, die validierten und pharmakologisch aktiven Strukturen und Domänen von umfassend charakterisierten Proteinen und Protein-Arzneimitteln entsprechen. Mit Hilfe der APEPTICO-eigenen Entwicklungsplattform PEPBASE™ ist es gelungen, das Peptidmolekül AP301 von einem Strukturelement des menschlichen Proteins TNF- α abzuleiten. Diese Datenbank vereint in sich strukturelle, funktionelle und klinische Daten gut charakterisierter Proteine und biologischer Arzneimittel.^{24 25}

AP301 (INN: Solnatide)

Das im Zusammenhang mit der Behandlung von Lungenödemen patentierte Nanopeptid besteht aus insgesamt 17 Aminosäuren. Es gelang, die Leitsubstanz AP301 als trägerfreie inhalierbare Pulverpartikel zu erzeugen. Die Herstellung eines applizierbaren Pulvers, das ausschließlich aus dem therapeutischen Peptid besteht, gilt als großer Durchbruch.^{26 27}

In einer Vielzahl von ARDS-Tiermodellen linderte die pulmonale Verabreichung von AP301 das Lungenödem erheblich. Im Rahmen der Proof-of-Concept Studie an Intensivpatienten ergab sich eine positive Auswirkung auf das Outcome. Die Lunge wurde nach Inhalation eines Solnatide-Aerosols früher und verstärkt von Ödemen bei ARDS befreit (Krenn et al. 2017). In einer weiteren Phase-II-Studie konnte

²⁴ <http://www.apeptico.com>

²⁵ <http://prd.at/newsroom-kunden/medizinischer-durchbruch-fuer-die-behandlung-des-akuten-lungenversagens/>

²⁶ <https://www.sn.at/leben/gesundheit/wiener-forscher-arbeiten-an-arznei-gegen-akutes-lungenversagen-4679431>

²⁷ <http://www.laborundmore.com/archive/983621/Koerpereigene-Peptide-sagen-dem-Lungenoedem-den-Kampf-an.html>

nachgewiesen werden, dass Patienten nach einer Lungentransplantation früher die künstliche Beatmung beenden und die Intensivmedizin verlassen konnten (Aigner et al. 2017; Schwameis et al. 2014)

AP301 hat durch die EMA (*European Medicines Agency*) und die amerikanische FDA (*Food and Drug Agency*) den Orphan Drug Status erhalten.²⁸

1.6.1 TIP-Peptide

Es handelt sich um synthetische, zyklische Peptidmoleküle, die die Lektin-ähnliche (TIP)-Domäne von humanem TNF- α nachahmen (Lucas et al. 1994).

TNF- α ist ein Homotrimer mit zwei räumlich getrennten und biologisch divergenten funktionellen Domänen:

die Rezeptor-Bindungsstellen befinden sich in den basolateralen Bereichen des Moleküls (Lucas et al. 1994); Signalwege und daraus resultierende Effekte des proinflammatorischen Zytokins werden über die beiden TNF-Rezeptoren TNFR-1 und -2 vermittelt;

die Lektin-ähnliche Domäne hingegen ist in der Spitzenregion des pyramidenförmigen Moleküls jeder Untereinheit lokalisiert – daher rührt die Bezeichnung TIP-Peptid (*engl. tip = Spitze*); die Sequenz der TIP-Domäne in humanem TNF- α umfasst die 16 Aminosäurereste C101 bis E116 (CQRETPEGAEAKPWYE) (Lucas et al. 1994).

²⁸ <https://www.lisavienna.at/de/news/apecticos-peptid-ap301-erhaelt-den-orphan-drug-status-durch-die-fda/>

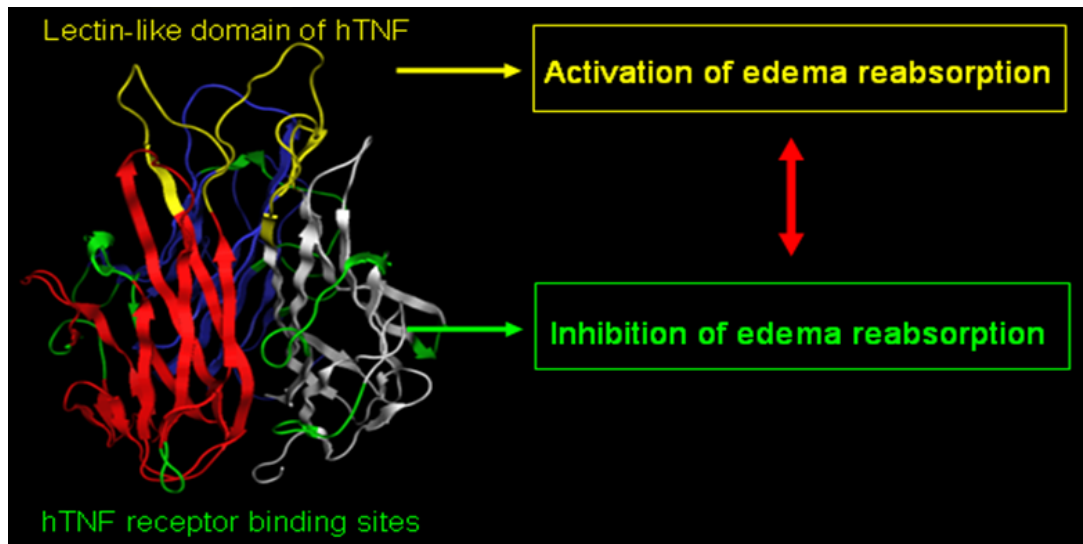


Abbildung 20 Tumornekrose Faktor (TNF).

Dem Molekül kommt eine duale Rolle zu. Die Rezeptor-Bindungsstelle hemmt die Ödemauflösung, während die Lektin-ähnliche TIP-Domäne diese durch Aktivierung von Natriumkanälen fördert (Braun et al. 2015).

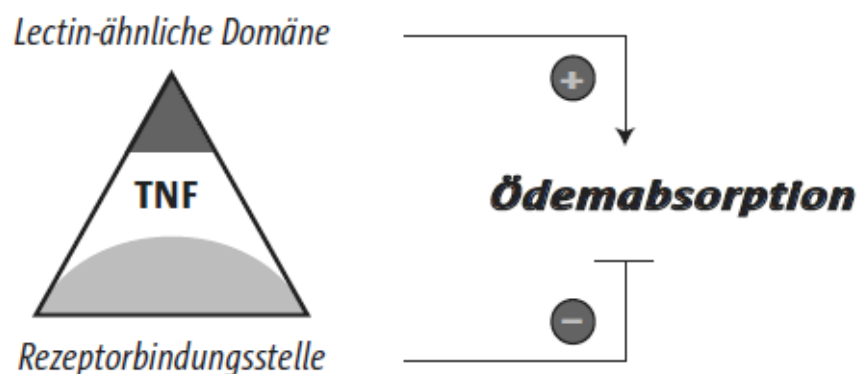


Abbildung 21 Schematische Darstellung des TNF-Moleküls in Form eines Dreiecks.²⁹

Während die TNFR-1-Bindungsstellen die Flüssigkeitsresorption eher negativ beeinflussen, aktiviert die TIP-Domäne den epithelialen Natrium-Kanal ENaC und steigert folglich die alveoläre Flüssigkeitsresorption, was eine Ödemreduktion bedingt (Yang et al. 2010).

²⁹ Intensivbuch Lunge und Beatmung, Bein & Pfeifer 2015

Auf Basis dieser Erkenntnis wurde von diesem pharmakologisch aktiven Strukturelement eine Reihe synthetischer TIP-Peptide abgeleitet und auf ihre Fähigkeit den ENaC-vermittelten, amiloridempfindlichen Natriumtransport in pulmonalen Endothel- und Alveolarepithelzellen zu erhöhen, untersucht. Unter anderem das klinische Phase IIa absolvierte Leitmolekül mit dem Laborcode AP301 (INN: *Solnatide*) zur Behandlung des Lungenpermeabilitätsödems.³⁰

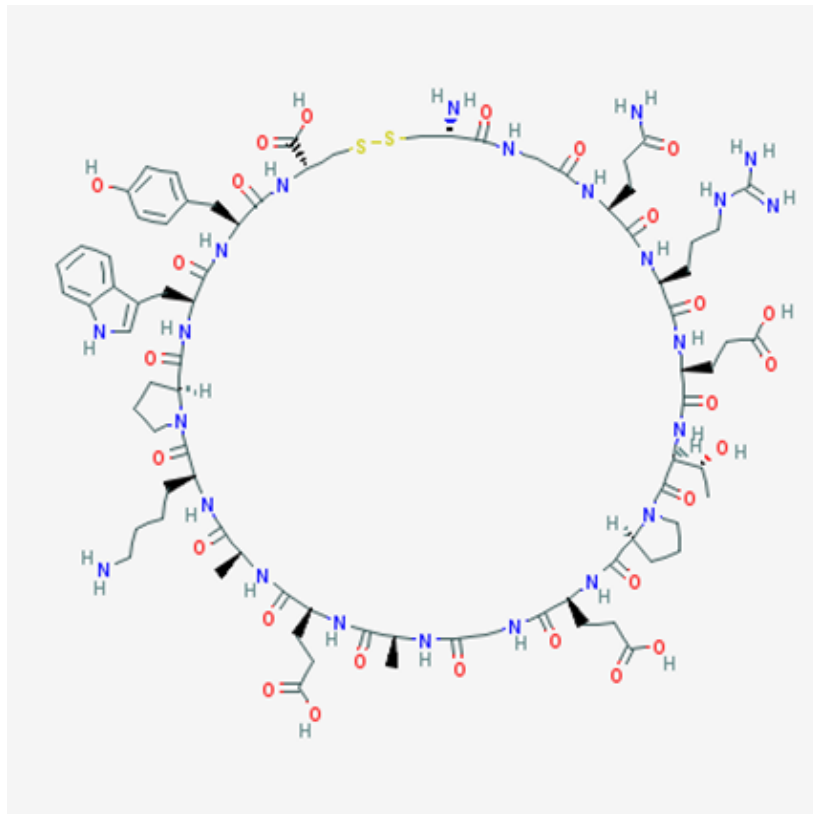


Abbildung 22 2D-Struktur von AP301 (Solnatide).³¹

Die Aminosäuresequenz des humanen TIP-Peptids **QRETPEGAEAKPWY** wurde in nahezu allen derivatisierten TIP-Testsubstanzen beibehalten. Die strukturellen Modifikationen in **Tab. 1** dargestellter, aktiver Peptide wurden basierend auf der Vorlage der nativen Lektin-artigen Domäne entwickelt (Hazemi et al. 2010).

³⁰ APEPTICO Forschung und Entwicklung GmbH

³¹ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91864495#section=Top>

Tabelle 1 aktive Testsubstanzen

TIP-Peptide	Aminosäuresequenz
AP301	Cyclo(CG QRETPEGAEAKPWYC)
AP303	Cyclo(KSPG QRETPEGAEAKPWYE)
AP309	Cyclo(KG QRETPEGAEAKPWYG)
AP310	Cyclo(Ornithin-G QRETPEGAEAKPWYG)
AP318	Cyclo(4-Aminobutansäure-G QRETPEGAEAKPWYD)
AP319	Cyclo(3-Aminopropansäure-G QRETPEGAEAKPWYE)

Voraussetzung für die Aktivierbarkeit des ENaC ist entweder ein freier, positiv geladener N-Terminus am Rest 1 oder ein freier, negativ geladener C-Terminus am Rest 17. Unter Anwesenheit beider Ladungstypen hingegen ist die Aktivierung schwächer ausgeprägt, während diese unter Abwesenheit genannter Termini gänzlich ausbleibt (Hazemi et al. 2010).

Tabelle 2 Ladungsgruppen aktiver Testsubstanzen (Hazemi et al. 2010)

TIP-Peptid	Ladung
AP301	freier, positiv geladener N-Terminus am Rest 1 + freier, negativ geladener C-Terminus am Rest 17
AP303	freier, positiv geladener N-Terminus am Rest 1 + freier, negativ geladener C-Terminus am Rest 17
AP309	freier, positiv geladener N-Terminus am Rest 1
AP310	freier, positiv geladener N-Terminus am Rest 1
AP318	freier, negativ geladener C-Terminus am Rest 17
AP319	freier, negativ geladener C-Terminus am Rest 17

Tabelle 3 Mittlere effektive Konzentration (EC_{50})
aktiver Testsubstanzen (Hazemi et al. 2010)

TIP-Peptid	EC ₅₀
AP301	54,3nM $\pm$ 0,8
AP303	56,0nM $\pm$ 0,8
AP309	38,3nM $\pm$ 1,7
AP310	45,5nM $\pm$ 0,6
AP318	24,8nM $\pm$ 0,5
AP319	19,9nM $\pm$ 0,7

Die Selektivität dieser Peptide für ENaC-vermittelten, amiloridempfindlichen Natriumstrom ist zwischen 89,6% (AP319) und 99,4% (AP309) angesiedelt (Hazemi et al. 2010).

1.6.1.1 Aktivierung – Wirkweise – molekularer Wirkmechanismus

Im Gegensatz zur cAMP-abhängigen ENaC-Aktivierung durch β -adrenerge Stimulierung, aktiviert die TIP-Domäne von TNF den epithelialen Natriumkanal in AT II-Zellen durch direkte Bindung an dessen intrazelluläre carboxyterminale Domäne der α -Untereinheit via Interaktion mit spezifischen Oligosacchariden, insbesondere N,N'-Diacetylchitobiose (Lucas et al. 2016; Dulebo et al. 2012).

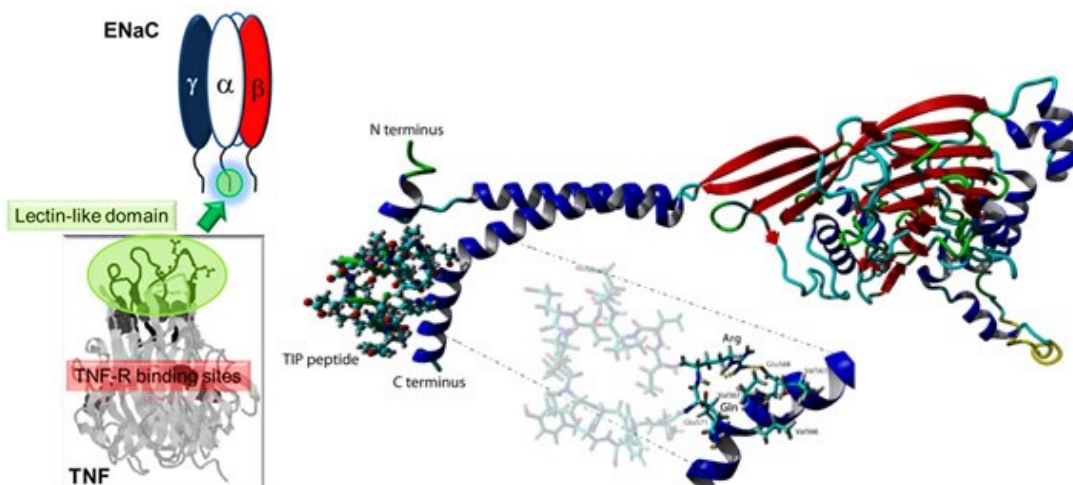


Abbildung 23 Bindung eines TIP-Peptids an ENaC.

© R. Lucas

Die durch TIP-Peptide induzierte Kanalaktivität wird durch Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit P_o und der Oberflächenexpression N erreicht – auch in Gegenwart des bakteriellen Toxins Pneumolysin, da das TIP-Peptid auch in der Lage ist eine Pneumolysin-vermittelte Aktivierung des Enzyms Proteinkinase C- α zu hemmen. So kann die Funktion des ENaC und somit die Flüssigkeitsresorption auch während einer bakteriellen Infektion aufrechterhalten werden (Czikora et al. 2014).

Neben der Aktivierung des Natriumstroms und folglich der AFC, stärkt das TIP-Peptid die Kapillarbarrierefunktion und wirkt einem durch reaktive Sauerstoffradikale und bakterielle Toxine ausgelösten Hyper-Permeabilitätsschaden an der Endothel- und Epithelzellmembran der Lunge entgegen und hemmt so die weitere Infiltration von Entzündungszellen in die Alveolen. Es entfernt angestaute Lungenflüssigkeit und verbessert insgesamt die Lungenfunktion (Lucas et al. 2012).

In einem Modell mit induzierter Lungenverletzung wurde durch TIP-Inhalation im Gegensatz zu Placebo eine signifikante Reduktion des extravaskulären Lungenwasserindex (*extravascular lung water index*, EVLWI) bei gleichzeitiger Erhöhung des $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnisses erzielt. Insgesamt kommt es unter dessen Wirkung zu einer Rückbildung des Lungenödems und einem wirksamen Schutz des Lungengewebes vor weiterer Verletzung (Hartmann et al. 2013).

1.6.1.2 Aerosol

Pulmonal-topische Applikation einer Substanz bietet den Vorteil einer großen Resorptionsoberfläche von etwa 100m^2 und einer Umgehung der Metabolisierung mit möglichem Wirkungsverlust. Dadurch sind hinreichend hohe lokale Wirkstoffkonzentrationen erzielbar bei gleichzeitiger Vermeidung systemischer UAW durch pulmonale Selektivität.³²

³² Physiologie.cc

TIP-Peptide sind wasserlöslich und können per inhalationem verabreicht werden. In gelöster Form wird die Substanz vernebelt, das resultierende Aerosol besteht aus Tröpfchen mit Durchmessern von $\leq 4\mu\text{m}$. Die Teilchengröße von Aerosolen muss zwischen 1 und $6\mu\text{m}$ betragen, um einerseits Wiederausatmung, andererseits Impaktation in den zuführenden Luftwegen zu minimieren, damit die Tröpfchen die Alveolen erreichen.³³

³³ Physiologie.cc

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Um jegliche Kontamination zu vermeiden wurden alle Schritte betreffend der Zellkultur unter sterilen Bedingungen in einer Reinraumwerkbank durchgeführt.

2.1.1 Zelllinie

Für die Versuchsreihen wurde die Zelllinie A549 verwendet; es handelt sich um humane Adenokarzinom-Zellen der Lunge die zu den alveolären Epithelzellen gehören. Sie überexprimieren ENaC endogen und stellen ein etabliertes Zellmodell der ENaC-Forschung dar (Lazrak et al., 2000).

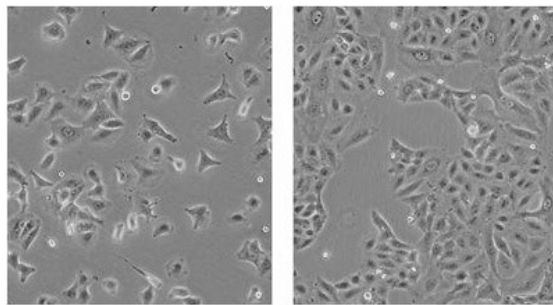


Abbildung 24 Zellen der epithelialen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 im Lichtmikroskop.³⁴

2.1.2 Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte in DMEM/F-12 [*Dulbecco's modified Eagle medium/F12 nutrient mixture Ham* + L-Glutamine (Gibco™ by Life Technologies, LifeTech Austria)] + 10% FBS + 1% Penicillin-Streptomycin in T75 Zellkulturflaschen (ThermoScientific™ BioLite) bei 37°C, 5% CO₂ bis zu einer Zelldichte etwa 80% konfluentem Wachstum entsprechend. Adhärent wachsende Zellen heften sich als Monolayerkulturen am Boden der Kulturflasche an und werden in Hinblick auf Morphologie sowie Konfluenz unter dem Invertmikroskop überprüft.

³⁴ https://www.uni-giessen.de/fbz/fsp/meu/methodenplattform/images/lunge1/image_preview

2.1.3 Passagierung

Nun wurde eine Subkultur angelegt und die Zellen – durch enzymatisches Ablösen von ihrer Wachstumsunterlage mittels der Protease Trypsin – passagiert und erneut auf eine Zellkulturflasche überführt um optimale Kulturbedingungen beizubehalten, sowie auf 100mm Petrischalen (Thermo Scientific™ BioLite) aufgeteilt.

Damit das im Nährmedium enthaltene Serum die Trypsinaktivität nicht herabsetzt, wurde beim Passagieren das Medium vor der Behandlung abgesaugt und der Zellrasen einmal vorsichtig mit PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen. Hernach wurde mit 1ml Trypsin überschichtet und 8 Minuten bei 37°C inkubiert; durch Zugabe von 5ml Medium wurde die Trypsinierung gestoppt und die Zellen resuspendiert, sowie die Zellsuspension auf die entsprechenden Kulturgefäße zu je 1ml ausgelegt und mit Nährmedium auf 10ml aufgefüllt.

Nach der Inkubation im Brutschrank bis zur gewünschten Konfluenz folgte die Behandlung mit TIP-Peptiden.

2.1.4 Behandlung

Es wurde berechnet, wie hoch die jeweilige Konzentration der TIP-Peptide AP303, AP309, AP310, AP314, AP318 in 10µl sein muss, um eine Endkonzentration von 200nM zu erreichen. Die erhaltene Lösung wurde auf die A549-Zellen aufgebracht und mit 10ml DMEM/F-12 (ohne FBS) aufgefüllt.

Die Inkubation der jeweiligen TIP-Peptide erfolgte – nebst einer unbehandelten Kontrolle – in folgendem Zeitschema: 5 Min/10 Min/30 Min.

Tabelle 4 Materialien für die Zellkultur

Medium/Reagenz	Hersteller
DMEM/F-12	Gibco Life Technologies
FBS	Sigma-Aldrich GmbH
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich GmbH
Trypsin-Lösung	Gibco Life Technologies

Tabelle 5 Zusammensetzung von PBS pH 7,4

Substanz	Menge
NaCl	137,0mM
KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄	10,0mM
KH ₂ PO ₄	1,8mM

2.2 Isolierung und Quantifizierung

2.2.1 Zelllyse

Die behandelten Zellen wurden zunächst zweimal mit kaltem PBS gewaschen bevor sie mit 1ml Lysepuffer (0,2M Natriumacetat in 0,9% NaCl, pH 5,5) versetzt und mechanisch mittels Gummischaber (*rubber policeman*) von der Wachstumsseite der Zellkulturgefäße gelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße gesammelt wurden.

Um die Proteine aus dem Probenmaterial zu isolieren, wurden Zellverbände zerstört und Zellmembranen aufgebrochen. Dies geschah durch Zugabe des nichtionischen Detergens Triton X-100 und 3x10 Sekunden Sonfizierung mittels

Ultraschallsonde. Anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert, das Zelllysate als Überstand nach 10 Minuten Zentrifugation bei ca. 13.000 RPM unter Kühlung gewonnen und in ein frisches Eppendorf überführt und im Eisschrank aufbewahrt.

Jegliche Schritte der Proteinisolierung wurden rasch und unter Kühlung der Proben durchgeführt um Proteinabbau zu vermeiden.

2.2.2 Bradford-Assay

Dient zur Bestimmung der Proteinkonzentration um bei der Gelelektrophorese definierte Proteinmengen auftragen und so einzelne Proben miteinander vergleichen zu können.

Der Nachweis beruht auf Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brillantblau (Triarylmethan) von 465nm (rotbraun) zu 595nm (blau) nach Proteinbindung in saurem Milieu.

Um die im Photometer gemessene Absorption einer bestimmten Proteinkonzentration zuordnen und somit die zu untersuchende Probe quantifizieren zu können, diente Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) (ThermoFischer, Loughborough, UK) zur Erstellung einer Standardreihe bekannter Proteinkonzentration.

Jeweils 5µl der Standardreihe sowie der zu quantifizierenden Proben wurden als Dreifachbestimmung in eine 96-Loch Mikrotiterplatte (Thermo Scientific™) pipettiert und mit je 250µl Bradford Reagenz Quick Start™ Bradford 1xDye Reagent (Bio-Rad Laboratories) versetzt.

Nach 5minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur war der Farbkomplex stabil und es erfolgte die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 595nm mittels Infinite® 200Pro multimode micro-plate reader (Tecan Austria).

Die Auswertung erfolgte dann graphisch über die Anfertigung einer Eichgeraden.

2.3 Western Blot

2.3.1 SDS-PAGE

Elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches in einem Polyacrylamid-Gel in Gegenwart von SDS unter Verwendung diskontinuierlicher Gele und Puffer nach Laemmli.

Für die Herstellung der Elektrophorese-Gele wurden in Tabelle 7 genannte Komponenten gemischt wobei die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) jeweils zum Schluss erfolgte, da die Polymerisation des Acrylamids durch den Radikalbildner APS und den Katalysator TEMED in Gang gebracht wird.

Abhängig vom Größenbereich der aufzutrennenden Proteine kann die Maschenweite des Gels durch die Acrylamid-Konzentration beeinflusst werden; es wurde 7,5%iges Trenngel und 4%iges Sammelgel verwendet (7,5% entsprechen einem Porendurchmesser von 50Å – Auftrennung eher großer Proteine).

Tabelle 6 Zusammensetzung des Trenngels 7,5%

Substanz	Menge
ddH ₂ O	9,7ml
30% Acrylamid/Bis	5,0ml
1,5M Tris, pH 8,8	5,0ml
10% SDS	200µl
10% APS	100µl
TEMED	10µl

Tabelle 7 Zusammensetzung des Sammelgels 4%

Substanz	Menge
ddH ₂ O	7,5ml
30% Acrylamid/Bis	1,7ml
0,5M Tris, pH 6,8	3,2ml
10% SDS	125µl
10% APS	125µl
TEMED	12,5µl

Aliquots der Proteinlysate wurden mit gleichen Teilen 4x-konzentrierten Probenpuffer gemischt, 10 Minuten bei 65°C erhitzt und sodann die Probentaschen des Sammelgels neben einen Marker bekannten Molekulargewichts beladen.

Das Erhitzen der Probe mit dem im Probenpuffer enthaltenen anionischen Detergens SDS und dem Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol bewirkt eine Denaturierung, Linearisierung sowie eine einheitlich negative Gesamtladung der Proteine.

Das Wanderungsverhalten im elektrischen Feld Richtung Anode wird somit lediglich von der Größe der Proteine bestimmt und erlaubt so vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf ihr Molekulargewicht und dessen relative Quantität.

Ebenfalls im Probepuffer enthaltenes Bromphenolblau dient der optischen Kontrolle der Lauffront.

Tabelle 8 Zusammensetzung des Probepuffers

Substanz	Menge
Glycerol	5,0ml
Tris-HCl, pH 6,8	1,25ml
SDS	2,0ml
Bromphenolblau	1,25ml
β -Mercaptoethanol	0,5ml

Die Elektrophorese erfolgte in einer mit Laufpuffer (enthält ebenfalls SDS) gefüllten Kammer bei konstanter Spannung von 200V und wird beendet sobald die Bromphenolblaufront knapp über der unteren Gel-Kante angelangt ist.

Tabelle 9 Zusammensetzung des Laufpuffers

Substanz	Menge
Tris	3,0g
Glycin	14,4g
SDS	1,0g
ddH ₂ O	ad 1000ml

2.3.2 Blotting/Transfer

Im Anschluss an die SDS-PAGE folgte der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran nach dem Semidry-Verfahren. In einer Blotting-Kassette wurden Gel, mit Blottingpuffer (*Towbin buffer*) befeuchtetes Filterpapier und PVDF-Membran zwischen zwei flache Elektroden gelegt. Auch hier wandern die Proteine im elektrischen Feld Richtung Anode und werden bei 25V Spannung

vom Gel auf die Membran übertragen. Die folglich erreichte Zugänglichkeit der Proteine auf der Membran erlaubt deren gezielten Nachweis mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Tabelle 10 Zusammensetzung des Blottingpuffers

Substanz	Menge
Tris	0,3g
Glycin	1,44g
SDS	0,1g
Methanol	20ml
ddH ₂ O	ad 1000ml

2.3.3 Immundetektion

Zunächst mussten die noch freien Bindungsstellen auf der Membran mit 3% BSA in PBS blockiert werden um eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Der Zusatz von 0,02% NaN₃ dient zum Schutz mikrobiellen Verderbs.

Es folgen jeweils 90minütige Inkubationen bei Raumtemperatur mit einem Primärantikörper, der spezifisch an das zu detektierende Protein bindet, anschließend mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper, der – ebenfalls spezifisch – an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet.

Tabelle 11 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
α -ENaC	Kaninchen	1:1000	Sigma
β -ENaC	Ziege	1:500	Santa Cruz
γ -ENaC	Ziege	1:1000	Santa Cruz
δ -ENaC	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
β -Actin	Maus	1:750	Santa Cruz

Tabelle 12 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti Kaninchen Ig	Ziege	1:3000	Sigma
anti Ziege Ig	Esel	1:3000	Santa Cruz
anti Maus Ig	Kaninchen	1:40000	Sigma

Die Kopplung an das Enzym HRP (*horseradish peroxidase*) erlaubt die Visualisierung der gesuchten Proteine auf der Membran mittels einer Chemolumineszenz-Reaktion. Dabei dient ECL (*enhanced chemiluminescence*) als Substrat mit dem die Membran 5 Minuten inkubiert wurde um dessen Oxidierung mittels HRP und Wasserstoffperoxid zu katalysieren.

Diese Reaktion führt zur Emission von Licht, dessen Signaldetektion durch Belichtung und Entwicklung eines ECL-Röntgenfilms erfolgt.

Zwischen den jeweiligen Inkubationsschritten wurde die Membran mehrfach mit TBS + 0,1% Tween 20 (TBS-T) gewaschen.

2.3.4 Quantifizierung und Datenanalyse

Die Intensität des emittierten Lichts ist proportional zur Konzentration des Substrats, das den Gehalt des markierten Analyten widerspiegelt, sodass auch eine Quantifizierung möglich ist.

Die entwickelten Röntgenfilme wurden gescannt und anschließend mittels der Software myImage Analysis 2.0 (Thermo Fischer Scientific™) quantifiziert.

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert der Messungen unter Berücksichtigung des mittleren Standardfehlers (*standard error of the mean*, SEM) als Dreifachbestimmung dargestellt.

Die Analyse der statistischen Signifikanz erfolgte unter Anwendung des ungepaarten t-Tests, hierbei wurden Werte von $p < 0,05$ als statistisch signifikant bewertet.

Mit Hilfe der Software Origin 7.0 (Northampton, MA, USA) wurden die erhaltenen Daten weiterverarbeitet und graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

In vorangegangenen Studien wurde nach intensiver Forschungsarbeit der ENaC als der Kanal identifiziert, der amiloridempfindlichen Natriumstrom entlang des Alveolarepithels vermittelt und dessen resorptionssteigernde Eigenschaften durch die TIP-Domäne des TNF- α -Moleküls induzierbar ist.

Mittles Patch-Clamp-Technik wurde der modulatorische Einfluss unten angeführter synthetischer TIP-Peptide auf diesen Natriumstrom experimentell untersucht und deren Aktivität *in vitro* an A549-Zellen demonstriert (Hazemi et al. 2010).

AP301, AP302, AP303, AP309, AP310, AP314, AP317, AP318, AP319, AP321, AP322, Mutante AP301

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α sowie die TIP-Peptide AP301, AP303, AP309, AP310, AP318, AP319 induzierten amiloridempfindlichen Natriumstrom durch ENaC, was in in einem deutlichen Stromanstieg resultierte (Hazemi et al., 2010).

Im Rahmen dieser vorliegenden Diplomarbeit wurde der Effekt folgender synthetischer TIP-Peptide auf das Expressionslevel aller vier ENaC-Untereinheiten α , β , γ , δ unter Anwendung der Western-Blot Methodik analysiert und untereinander verglichen:

AP303, AP309, AP310, AP318, AP314

Um den Einfluss genannter Peptide auf deren ENaC-Aktivität zu charakterisieren, wurden alle Experimente an der $\alpha\beta\gamma\delta$ -exprimierenden, humanen Lungenepithelzelllinie A549 durchgeführt. Diese erweist sich zur Untersuchung des ENaC als ideales Zellmodell, da sie alle vier Untereinheiten des Kanals endogen exprimiert und sich deren biophysikalischen Eigenschaften in Hinblick auf ENaC-vermittelten Natriumtransport in der Lunge mit denen der AT II-Zellen

decken und so ausführlich analysiert werden können (Lazrak et al. 2000a).

Die jeweiligen Stammlösungen wurden mit destilliertem Wasser auf eine für alle Testsubstanzen gleichermaßen geltende Endkonzentration von 200nM verdünnt. Dies entspricht der Konzentration, bei der eine maximale Wirkung erzielt, und in vorausgegangenen elektrophysiologischen Experimenten per Patch-Clamp-Technik nachgewiesen wurde (Hazemi et al., 2010).

Um die Dauer einer potentiellen Steigerung der ENaC-Untereinheiten-Expression festzuhalten, wurden die Zellen jeweils analog in immer gleichbleibendem Zeitintervall von 5, 10 und 30 Minuten, nebst einer unbehandelten Kontrolle, mit oben genannten TIP-Peptiden inkubiert.

Aus der Zellmembran stammendes Proteingemisch wurde mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Um Interpretationen zur Aktivität zulassen zu können, wurden die Proteinbanden anschließend unter Verwendung spezifischer Antikörper für $\alpha\beta\gamma\delta$ -Untereinheiten visualisiert und die Signale densitometrisch analysiert.

Der Versuchsablauf wurde jeweils als Dreifachfachbestimmung durchgeführt und die Proteinexpression als $MW \pm SEM$ des Vielfachen der unbehandelten Kontrolle berechnet, normalisiert auf das Protein β -Actin, das mit einem Molekulargewicht von 43 kDa als Ladekontrolle diente.

Statistische Signifikanz als p-Wert angegeben:

- * $p < 0,05$
- ** $p < 0,01$
- *** $p < 0,001$

Anhand der nachfolgenden Abbildungen werden die Effekte einer zeitabhängigen Behandlung mit 200nM oben genannter TIP-Peptide auf die Proteinexpression der vier ENaC-Untereinheiten veranschaulicht.

3.1 ENaC-Aktivierung in A549-Zellen mittels AP303

AP303 bewirkte eine deutlich zunehmende Proteinexpression von α -ENaC mit einem erreichten Maximum nach 30 Minuten (**Abb. 25**). Sie zeigte in allen Zeitintervallen einen statistisch signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Nach 30minütiger Inkubation mit AP303 fand sich eine maximale Expression von $6,22 \pm 0,44$ ($n=3$, $p<0,001$), die bereits nach 5 Minuten mit einem Level von $4,09 \pm 0,09$ ($n=3$, $p<0,001$) statistisch signifikant erhöht ist.

Die Expression von β -ENaC zeigte nach 5 Minuten eine Steigerung auf $1,25 \pm 0,06$ ($n=3$, $p<0,01$), die als statistisch signifikant zu beurteilen ist.

Es ließ sich ein transienter Anstieg von γ -ENaC nach 5 Minuten auf das $1,61 \pm 0,03$ fache des Kontrollniveaus verzeichnen ($n=3$, $p<0,001$), der nach 10 Minuten auf $1,20 \pm 0,07$ ($n=3$, $p<0,01$) und nach 30 Minuten auf nicht signifikante $1,05 \pm 0,02$ ($n=3$) abfiel.

Für δ -ENaC befand sich das Expressioniveau nach 5- und 30minütiger Inkubationsperiode auf etwa gleicher Höhe von $1,33/1,34 \pm 0,06$ ($n=3$, $p<0,001$), nach 10 Minuten auf $1,24 \pm 0,06$ ($n=3$, $p<0,01$).

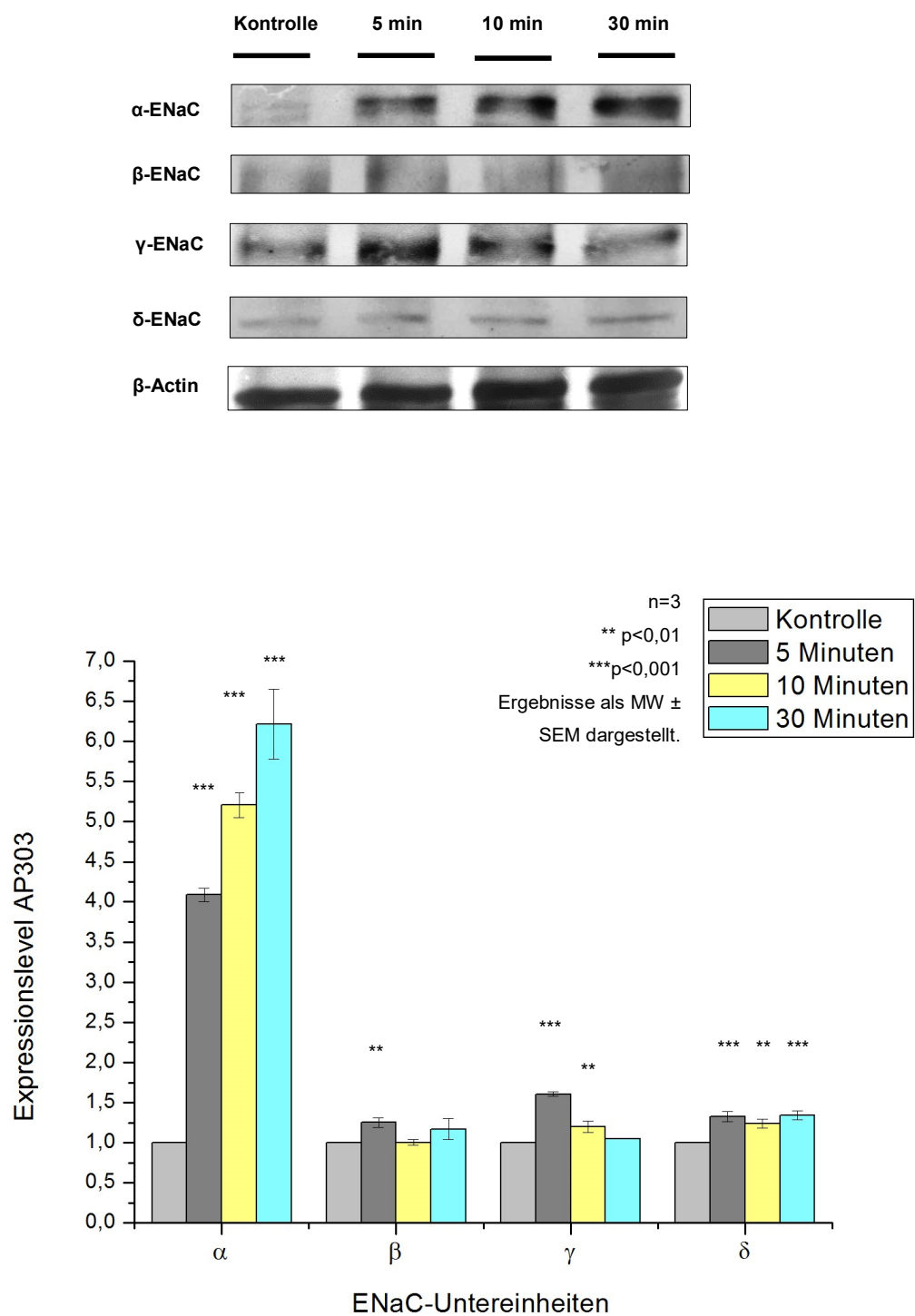


Abbildung 25 Zeitabhängige Behandlung mit 200nM AP303

3.2 ENaC-Aktivierung in A549-Zellen mittels AP309

Bei diesem aktiven TIP-Peptid ließ sich einzig eine vorübergehend gesteigerte Expression von β -ENaC nach 10 Minuten auf das $1,50 \pm 0,07$ fache ($n=3$, $p<0,001$) der Kontrolle verzeichnen. Verbleibende Proteinbanden befanden sich weitgehend unter dem Expressionslevel der Kontrolle und erreichten demnach kein signifikantes Niveau (**Abb. 26**).

Um einen maßgeblichen, ENaC-abhängigen Natriumtransport zu vermitteln, sind die beiden porenbildenden Untereinheiten α oder δ erforderlich. Da die basale Transkription von β - und γ -ENaC verhältnismäßig gering ist, stellt ihre alleinige Expression einen limitierenden Faktor für die Flüssigkeitsresorption dar. Es werden lediglich aus $\alpha\beta\gamma$ oder $\delta\beta\gamma$ zusammengesetzte Kanäle in die Zellmembran eingebaut, deren Co-Expression eine maximale Aktivität gewährleistet (Canessa et al. 1994; Firsov et al., 1998). AP309 vermag die Expression des ENaC in der Membran nicht ausreichend zu modulieren. Die Aktivität dieses TIP-Peptids ist somit alleine durch die Kinetik des Kanals bedingt.

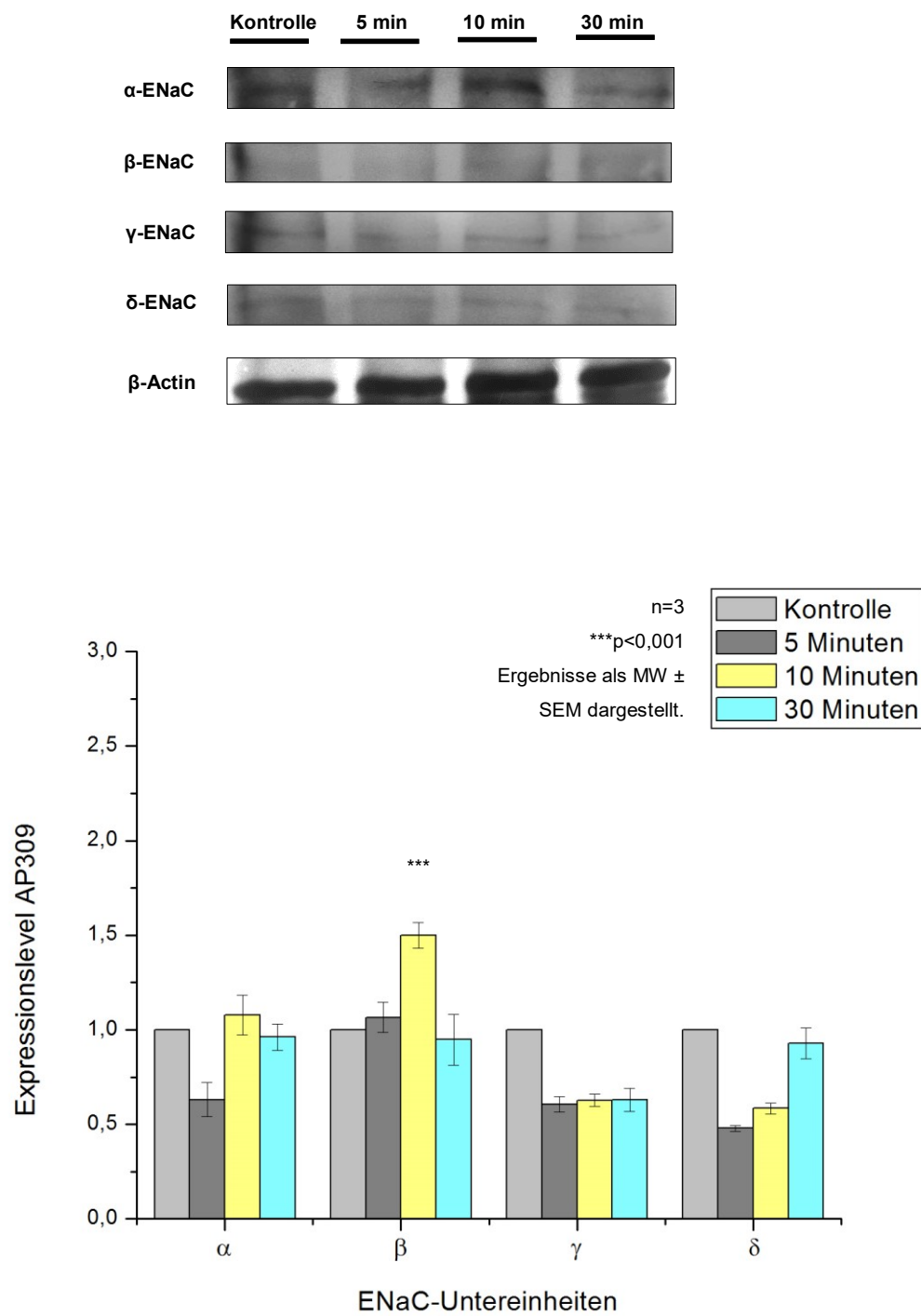


Abbildung 26 Zeitabhängige Behandlung mit 200nM AP309

3.3 ENaC-Aktivierung in A549-Zellen mittels AP310

Nachdem die Expression von α -ENaC vorerst unter das Kontrolllevel abfiel (**Abb. 27**), stieg sie nach 10 Minuten auf signifikante $1,52 \pm 0,08$ ($n=3$, $p<0,01$) mit einer Reduktion auf $1,31 \pm 0,05$ ($n=3$, $p<0,01$) nach 30 Minuten.

Für β -ENaC ergab sich ein Expressionsmuster mit initial signifikantem Anstieg auf $1,59 \pm 0,26$ ($n=3$, $p<0,01$) nach 5 Minuten und nachfolgendem Abfall auf $0,84 \pm 0,04$ ($n=3$) nach 10 Minuten und $0,94 \pm 0,16$ ($n=3$) nach 30 Minuten.

Das γ -ENaC-Protein wurde nach 5 Minuten auf das $1,37 \pm 0,08$ fache ($n=3$, $p<0,01$) exprimiert, während es nach 10 und 30 Minuten – Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle – zu einem deutlichen Abfall auf jeweils $0,60 \pm 0,05$ / $0,02$ kam.

Die Proteinexpression von δ -ENaC stieg nach 5 Minuten auf signifikante $1,70 \pm 0,06$ ($n=3$, $p<0,001$) an, während sie nach 10 Minuten auf $1,16 \pm 0,04$ ($n=3$, $p<0,01$) und nach 30 Minuten auf $1,30 \pm 0,08$ ($n=3$, $p<0,01$) sank.

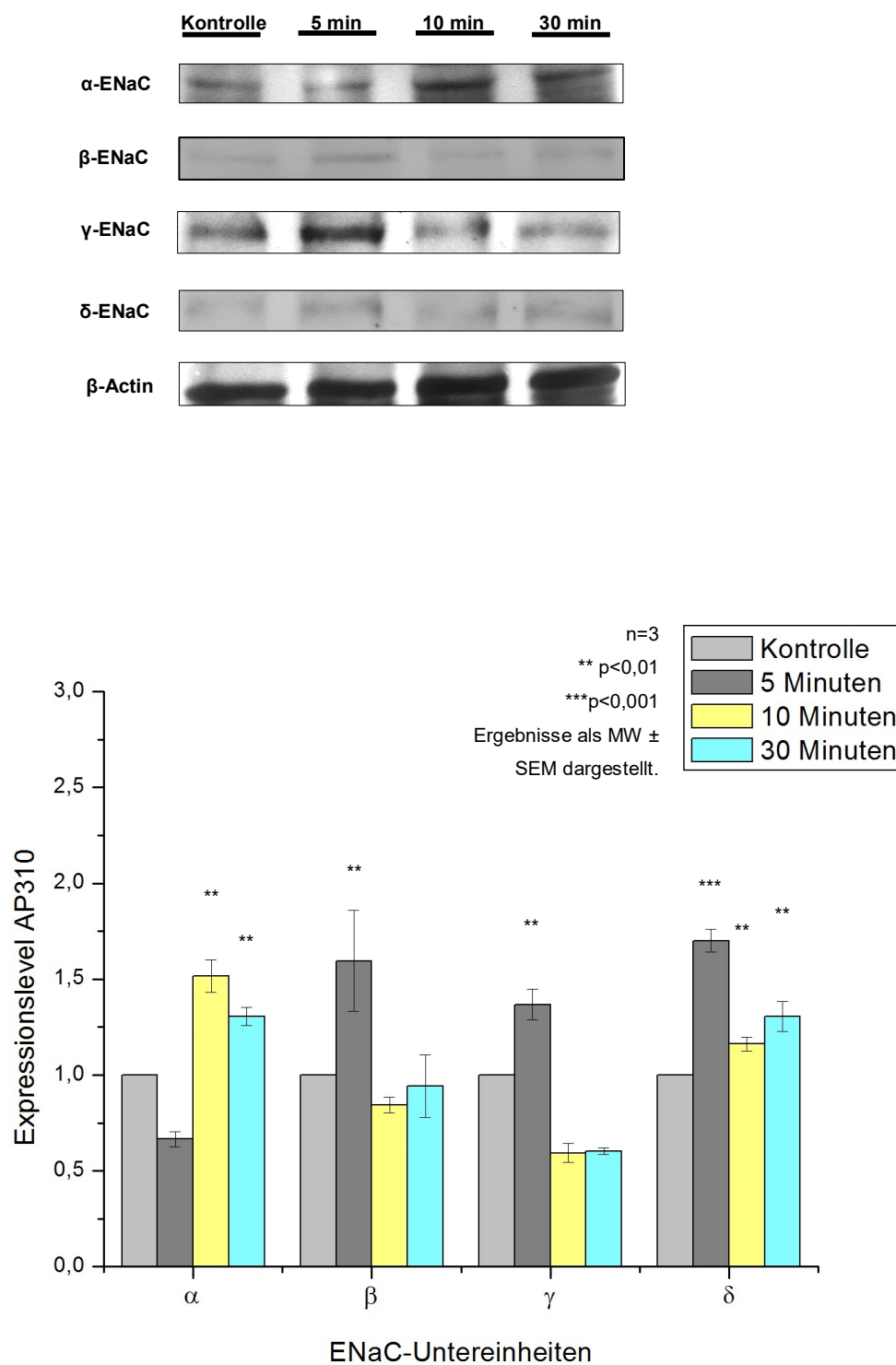


Abbildung 27 Zeitabhängige Behandlung mit 200nM AP310

3.4 ENaC-Aktivierung in A549-Zellen mittels AP318

Diese Western-Blot Analyse (**Abb. 28**) zeigte eine signifikante Steigerung der Proteinexpression von α -ENaC bereits nach 5 Minuten von $2,34 \pm 0,11$ ($n=3$, $p<0,001$) mit leicht sinkender Tendenz nach 10- und 30minütiger Behandlungsdauer auf $2,04 \pm 0,29$ ($n=3$, $p<0,001$) bzw. auf $1,76 \pm 0,06$ ($n=3$, $p<0,001$), gemessen an der Kontrolle.

Die Expressionslevel von β - und γ -ENaC stiegen jeweils nach 30 Minuten deutlich auf das $2,44 \pm 0,16$ fache ($n=3$, $p<0,001$) bzw. $1,93 \pm 0,30$ fache ($n=3$, $p<0,01$) der Kontrolle an.

Demgegenüber war für δ -ENaC ein ebenso signifikanter ($p<0,001$), transienter Anstieg nach 5 Minuten zu beobachten.

Eine verstärkte Expression aller vier Untereinheiten $\alpha\beta\gamma\delta$ (**Abb. 28**) führt zu einer maßgeblichen Induktion des Natriumtransportes via ENaC. Dieses Resultat steht mit *in vitro*-Daten im Einklang, welche das synthetische AP318 – neben AP319 – als eines der aktivsten TIP-Peptide identifizieren (Hazemi et al. 2010; Shabbir et al. 2013).

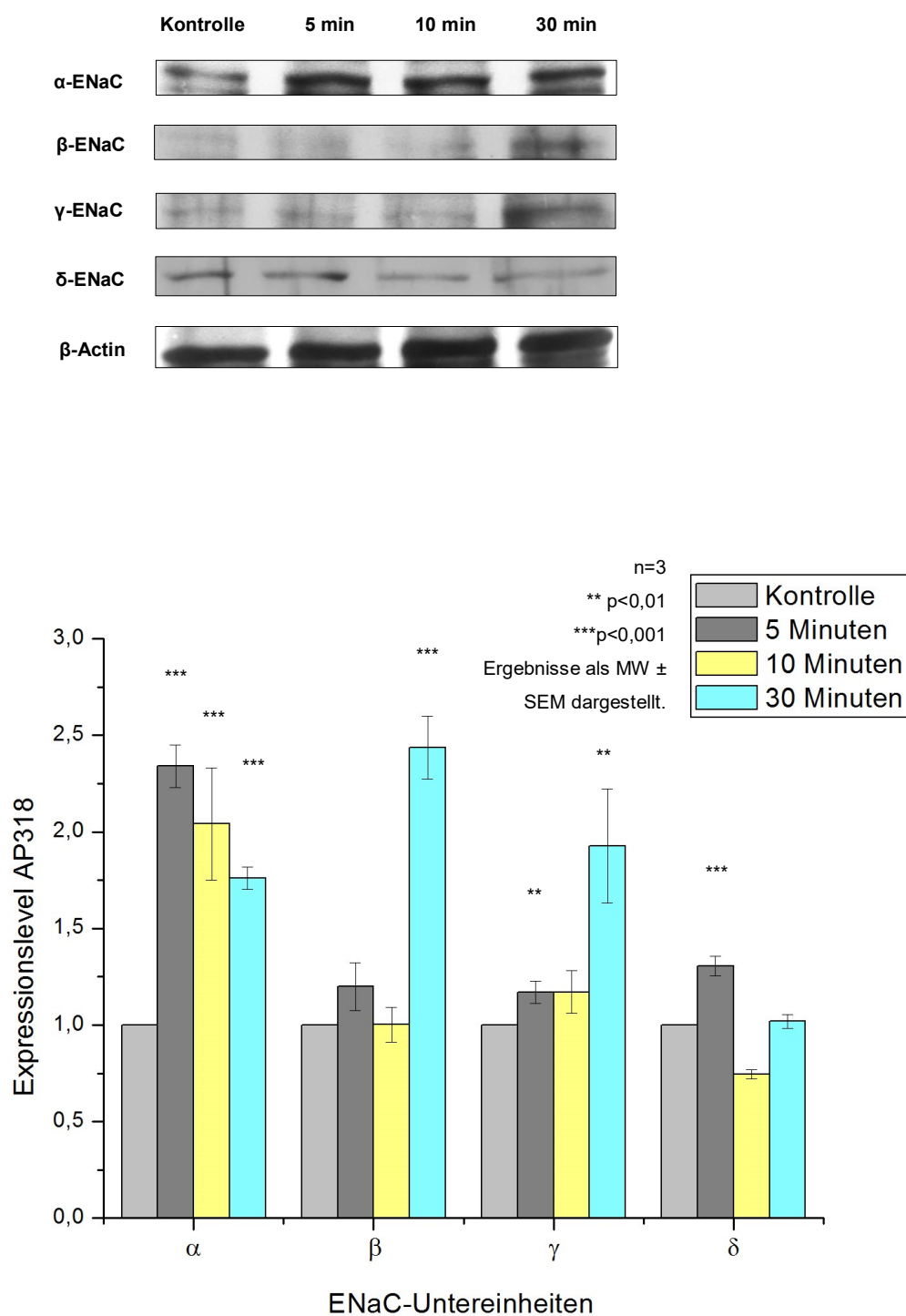


Abbildung 28 Zeitabhängige Behandlung mit 200nM AP318

3.5 ENaC-Aktivierung in A549-Zellen mittels AP314

Das nicht aktive TIP-Peptid AP314 (Hazemi et al. 2010) führte zu keiner Proteinexpression und demnach zu keiner Aktivierung von ENaC-Untereinheiten (**Abb. 29**).

Als Kontrollexperiment durchgeführt, zeigte sich im Vergleich zu aktiven TIP-Peptiden die Expression von α -, β -, γ - und δ -ENaC mit einem stetigen Abfall als vermindert – gemessen an der unbehandelten Kontrolle. Das jeweils erreichte Minimum nach 30 Minuten lag bei $0,23 \pm 0,01$ für α -ENaC, $0,58 \pm 0,08$ für β -ENaC, $0,36 \pm 0,04$ für γ -ENaC und $0,78 \pm 0,15$ für δ -ENaC.

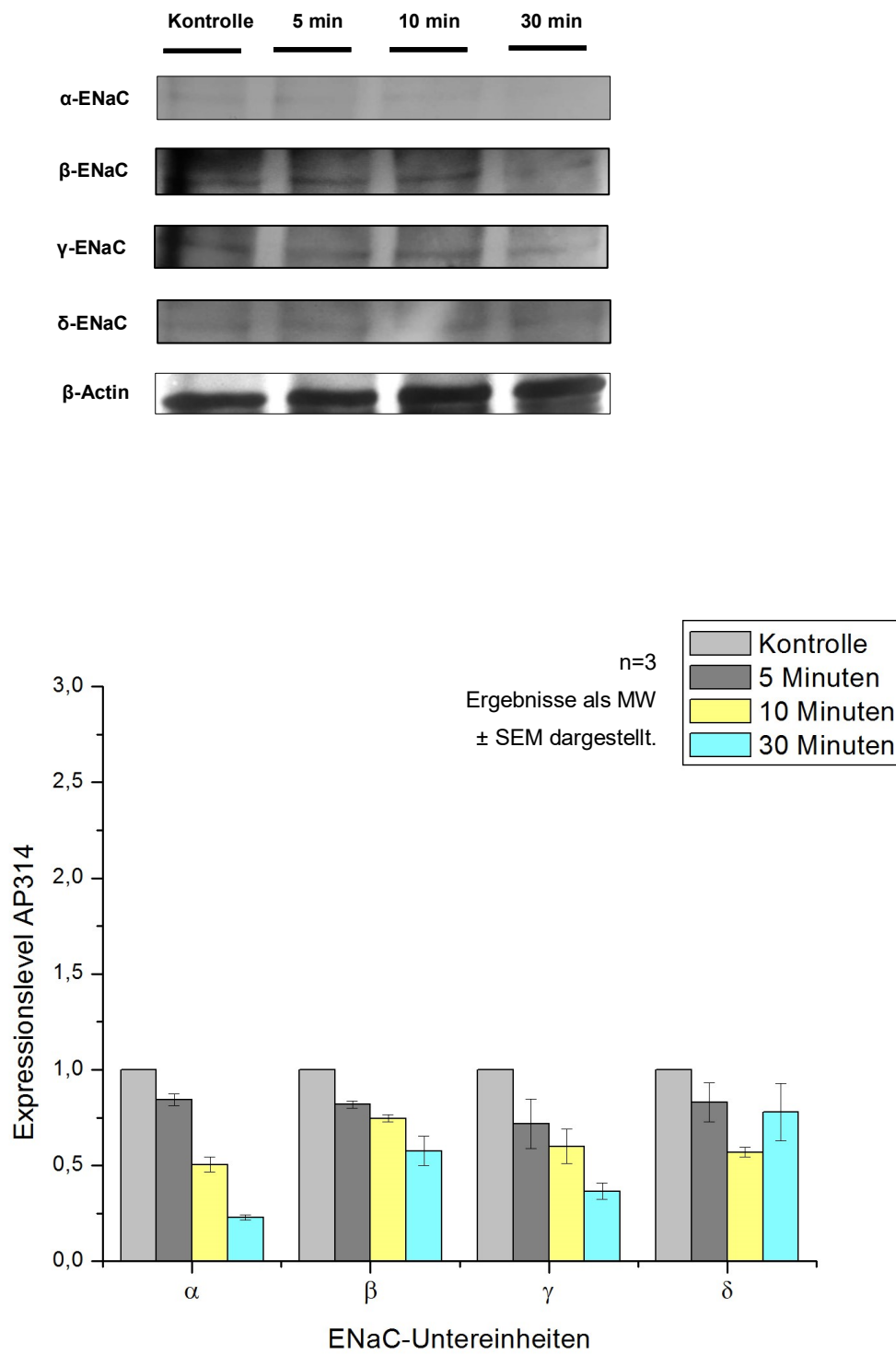


Abbildung 29 Zeitabhängige Behandlung mit 200nM AP314

3.6 α -ENaC-Aktivierung untersuchter TIP-Peptide

Die normalisierten Resultate der essentiellen, porenbildenden α -Untereinheit aller untersuchten Peptide sind in **Abb. 30** zusammengefasst dargestellt. Es fällt auf, dass AP303 und AP318 die stärkste Stimulation auf die Expression von α -ENaC aufweisen, gefolgt von AP310.

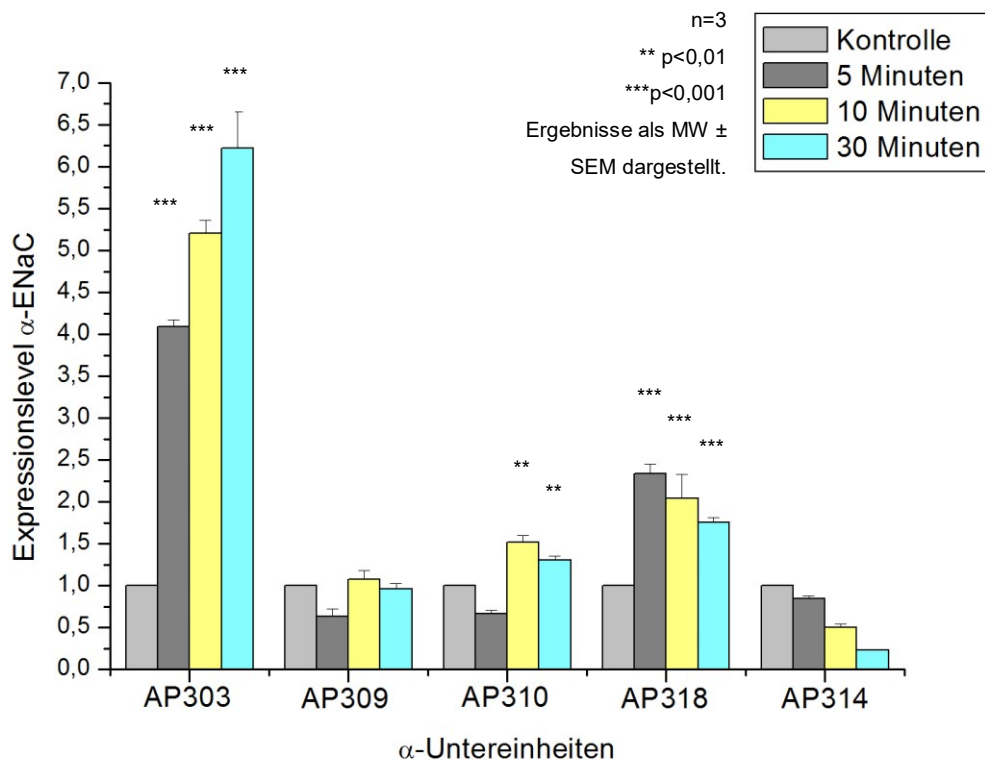


Abbildung 30 Zusammenfassung der Wirkung untersuchter TIP-Peptide auf α -ENaC

4 Diskussion

Zahlreiche Zellfunktionen des Organismus unterliegen der Abhängigkeit eines komplexen Elektrolytgleichgewichtes zwischen intra- und extrazellulärer Seite der Zellmembran. Für die Gewährleistung einer Vielzahl physiologischer Prozesse ist die Elektrolyt- und Wasserhomöostase von essentieller Bedeutung, so auch für eine adäquate Lungenfunktion. Damit der für die Atmung wichtige Gasaustausch ermöglicht wird, muss angesammelte Lungenflüssigkeit möglichst schnell resorbiert werden, indem die alveoläre Flüssigkeits-Clearance (AFC) erhöht wird. Oftmals durch Pneumonie verursacht, lässt sich die Progression zum ARDS bei ungünstigem Verlauf trotz Antibiotikatherapie häufig nicht verhindern und stellt eine ernstzunehmende Komplikation und große Herausforderung der Intensivmedizin dar. Obwohl das mit alveolärer Schädigung und Multiorganversagen einhergehende Syndrom bereits seit den 1960er Jahren bekannt ist, sind die Therapiemöglichkeiten gegenwärtig nach wie vor begrenzt und stellen daher noch immer den aktuellen Stand der Forschung dar.

Der transepitheliale Flüssigkeitstransport ist ein aktiver Prozess des Lungenepithels, der über regulierende Mechanismen der Natrium- und Wasser Resorption eine Flüssigkeitsansammlung in der Lunge verhindert. Im Falle einer unzureichenden ENaC-Aktivität kann vermehrt eingedrungene Flüssigkeit in den Alveolarraum infolge einer Epithelschädigung bei akuter Lungenverletzung nicht adäquat resorbiert werden und zur Entstehung von Lungenödemem beitragen (Mairbäurl 2006; Althaus et al. 2011). Das Ausmaß der alveolären Flüssigkeits-Clearance beim Permeabilitätsödem im Rahmen des ARDS ist maßgeblich für den klinischen Verlauf und spielt eine entscheidende Rolle in Hinblick auf das Überleben der Patienten. Die Lebenserwartung ist drastisch reduziert, wenn die resorptive Kompetenz der Lunge vermindert ist, da die Funktion hierfür zuständiger endogener Mechanismen unter Umständen verringert oder defekt sein kann (Pitkänen 2001; Ware et al. 2001). Demnach wird unter pathophysiologischen Aspekten die essentielle Bedeutung des epithelialen Natriumkanals (ENaC) in der Lunge deutlich.

Die aussichtsreichen Ergebnisse vergangener Forschungsarbeiten ebnen in den kommenden Jahren den Weg für ein klinisch relevantes Management dieses akuten Krankheitsbildes – abseits von Beatmungsstrategien, welche einen beatmungsinduzierten Lungenschaden verursachen können.

Um eine Genesung zu ermöglichen, sind folgende therapeutische Strategien erforderlich: Ödemauflösung, Stabilisierung geschädigter Epithel- und Endothelstrukturen und Abschwächung der Inflamationsreaktion (Matthay et al. 2012). Das Verständnis für die zu Grunde liegenden Mechanismen sind daher von hoher therapeutischer Relevanz.

Für das inflammatorische Geschehen ist TNF- α ein Schlüsselmolekül der frühen Phase der intrapulmonalen Entzündung, die über komplexe Regulationsmechanismen in eine Lungenschädigung mit einem Permeabilitätsödem münden. Die Präsenz proinflammatorischer Zytokine erscheint als ursächlich für die verminderte Induktion des Kanals, wofür hauptsächlich die Inhibition der ENaC-Transkription durch Zytokine wie TNF- α verantwortlich ist (Yang et al. 2010; Bhatia & Moochhala 2004).

Die in der Spitzenregion dieses Entzündungsmediators befindliche Lektin-ähnliche Domäne bewirkt hingegen eine Aktivierung der Ödemreabsorption sowie eine Versiegelung der endotheliale Barriere. Dieses sogenannte TIP-Peptid leistet demnach einen Beitrag zur dualen Rolle des pleiotrop wirkenden, proinflammatorischen TNF- α (Bhatia & Moochhala 2004). Die synthetischen TIP-Peptide, welche die Lektin-ähnliche Domäne des humanen TNF- α nachahmen, aktivieren die ENaC-vermittelte Natriumaufnahme in Typ-II-Alveolarepithelzellen und bewirken einen Anstieg der Flüssigkeits-Clearance durch Modulation der Kanalaktivität mittels Änderung der Offenwahrscheinlichkeit und Adaption der Expressionsdichte in der Zellmembran lokalisierter Kanäle. Sie haben die Fähigkeit in AT II-Zellen direkt an die α -Untereinheit des ENaC zu binden und diesen zu aktivieren (Shabbir et al. 2013; Czikora et al. 2014). TIP-Peptide sind daher eine vielversprechende therapeutische Option, um über die Entstehung eines osmotischen Gradienten die AFC zu steigern und so die Auflösung eines

Lungenödems zu bewirken, bei gleichzeitiger Wiederherstellung der Integrität der Endothel-Barriere.

Die AFC gefluteter Lungen zahlreicher ARDS-Tiermodelle wurde durch pulmonale Applikation von AP301 verbessert und erfolgreich von Ödemen befreit (Braun et al. 2005; Elia et al. 2003; Vadasz et al. 2008; Hamacher et al. 2010; Hartmann et al. 2013). TIP-Peptide wirken hierbei als einzige therapeutische Strategie spezifisch mit direktem Einfluss auf molekulare Mechanismen der Flüssigkeitsausscheidung aus den Alveolen (Krenn et al. 2017).

In einer *post-hoc*-Analyse wurde jedoch die Schlussfolgerung gezogen, dass sich eine inhalative TIP-Peptid-Therapie bei schweren alveolären Epithelschäden als eingeschränkt wirksam erwies (Hartmann et al. 2013). Die aus dieser Beobachtung gewonnen Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass die bestätigten positiven Lungenwirkungen bereits vorausgegangener Studien möglicherweise nur auf die Behandlung von leichtem bis moderatem ödematösen respiratorischen Versagen beschränkt ist. Diese Ergebnisse bedürfen weiterer Klärung.

Ebenfalls zu vielversprechenden Ergebnissen führte die Untersuchung der klinischen Wirkung von AP301 bei der Behandlung der primären Transplantatdysfunktion nach Lungentransplantation (*primary graft dysfunction after lung transplantation*, PGD), einer schweren Form des ischämischen Reperfusionsschadens. Er kann innerhalb von 72h postoperativ auftreten und ähnelt dem klinischen Bild des ARDS.³⁵ Eine Pilotstudie zeigte klinisch relevante Effekte von inhaliertem AP301. Der Gasaustausch wurde verbessert, was in einer kürzeren mechanischen Beatmung und in einem tendenziell kürzeren Aufenthalt auf der Intensivstation resultierte (Aigner et al. 2017). Basierend auf diesen ersten Ergebnissen ist weitere Forschungsarbeit auf diesem Gebiet geboten.

³⁵ Intensivmedizin, Hugo von Aken, 2007

Bereits publizierten Daten ist zu entnehmen, dass das Peptid AP301 ebenso ein potentieller Wirkstoffkandidat zur Behandlung des lebensgefährlichen Höhenlungenödems (*high-altitude pulmonary edema*, HAPE) ist. Die Ergebnisse zeigten einen signifikant niedrigeren Lungenwassergehalt als unter dem Einfluss von Dexamethason. Diese Feststellung impliziert, dass sich die Anwendung von TIP-Peptiden zur Verbesserung der AFC und der Ödemresorption als wirksamer erweist als das aktuell als Therapeutikum eingesetzte Glucocorticoid (Zhou et al. 2017). Außerdem konnten unter AP301 im Vergleich zu Dexamethason signifikant geringere Zytokinspiegel nachgewiesen werden (IL-1 β , IL-6, TNF- α) sowie eine Verbesserung der Permeabilität der alveolären Kapillarmembran (Zhou et al. 2017).

In einem Schweine-Sepsismodell dessen primärer Fokus auf dem Einfluss von AP318 auf entzündliche Vorgänge der Lunge liegt, senkte das AP301-Analogon per inhalationem die Expression der Entzündungsmediatoren IL-6, TNF- α , COX-2 signifikant ab und minderte die pulmonale Inflamationsreaktion (Hartmann et al. 2015).

Diese Offenbarungen erweitern das potentielle Indikationsgebiet dieser innovativen, vom körpereigenen Zytokin TNF- α abgeleiteten, therapeutischen Peptide, deren Eigenschaften über die der ödemreduzierenden Wirkung hinausgehen. Sie können als antiödematös, antientzündlich und hemmend auf proinflammatorische Stoffwechselwege zusammengefasst werden. Die Verträglichkeit von inhaliertem AP301 wurde in einer Studie belegt (Schwameis et al. 2014).

Angeichts der aktivitätssteigernden Wirkung auf in verschiedenen Zellen vorkommenden ENaC, ist es naheliegend TIP-Peptide auf ihre Wirksamkeit in anderen Organen zu untersuchen. AP301 und AP318 gelten auch als potentielle Kandidaten zur Behandlung des Pseudohypoaldosteronismus Typ 1b (PHA 1b), dessen Therapie bislang nur symptomatischer Natur ist (Willam et al. 2017). Diese seltene Erkrankung rührt von einem Funktionsverlust des ENaC her und bedingt ein schwerwiegendes Ungleichgewicht des Natriumhaushaltes (Gründer

et al. 1997; Kerem et al. 1999).

Die Entwicklung dieser selektiv auf den epithelialen Natriumkanal wirkenden Moleküle scheinen in Anlehnung an publizierte *in vitro* und *in vivo*-Daten in Zukunft einen hohen Stellenwert in der Forschung lebensbedrohlicher Erkrankungen zu bekommen.

Inwieweit sich der therapeutische Nutzen dieser Therapiestrategie im klinischen Alltag bewahrt, bleibt abzuwarten.

5 Literaturverzeichnis

- Aigner C., Slama A., Barta M., Mitterbauer A., Lang G., Taghavi S., et al. (2017). Treatment of primary graft dysfunction after lung transplantation with orally inhaled AP301: A prospective, randomized pilot study. *J Heart Lung Transplant*, S1053-2498(17)32036-3.
- Althaus, M., Clauss, W. G., & Fronius, M. (2011). Amiloride-sensitive sodium channels and pulmonary edema. *Pulmonary Medicine*, 2011, 1–8.
- Andreeva, A. V., Kutuzov, M. A., & Voyno-Yasenetskaya, T. A. (2007). Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(2), L259–L271.
- Asher, C., Wald, H., Rossier, B. C., & Garty, H. (1996). Aldosterone-induced increase in the abundance of Na⁺ channel subunits. *The American Journal of Physiology*, 271(2 Pt 1), C605-11.
- Aukland, K., & Reed, R. K. (1993). Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiological Reviews*, 73(1), 1–78.
- Azzam, Z. S., & Sznajder, J. I. (2015). Lung Edema Clearance: Relevance to Patients with Lung Injury. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 6(3), e0025.
- Baconguis, I., Bohlen, C. J., Goehring, A., Julius, D., & Gouaux, E. (2014). X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na⁺-selective channel. *Cell*, 156(4), 717–729.
- Bakker, J. M., Broug-Holub, E., Kroes, H., van Rees, E. P., Kraal, G., & van Iwaarden, J. F. (1998). Functional immaturity of rat alveolar macrophages during postnatal development. *Immunology*, 94(3), 304–309.
- Bardou, O., Trinh, N. T. N., & Brochiero, E. (2009). Molecular diversity and function of K⁺ channels in airway and alveolar epithelial cells. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, 296(1040–0605 (Print)), L145–L155.
- Benos, D. J., & Stanton, B. A. (1999). Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels. *Journal of Physiology*, 520(3), 631–644.
- Bernard, G. R., Artigas, A., Brigham, K. L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L., et al. (1994). Report of the American-European consensus conference on ARDS: Definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *Intensive Care Medicine*, 20(3), 225–232.

- Bhalla, V., & Hallows, K. R. (2008). Mechanisms of ENaC Regulation and Clinical Implications. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(10), 1845
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., et al. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W252–W258.
- Blazer-Yost, B. L., Liu, X., & Helman, S. I. (1998). Hormonal regulation of ENaCs: insulin and aldosterone. *The American Journal of Physiology*, 274(5 Pt 1), C1373-9.
- Braun C, Hamacher J, Morel DR, Wendel A, Lucas R. (2005). Dichotomal role of TNF in experimental pulmonary edema reabsorption. *J Immunol*. 175(5):3402-8.
- Boyle, A. J., Sweeney, R. M., & McAuley, D. F. (2013). Pharmacological treatments in ARDS; a state-of-the-art update. *BMC Medicine*, 11(1), 166.
- Caldwell, R. A. (2003). Serine protease activation of near-silent epithelial Na⁺ channels. *AJP: Cell Physiology*, 286(1), 190C–194.
- Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D., & Rossier, B. C. (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*, 367(6462), 463–467.
- Chalfie, M., & Wolinsky, E. (1990). The identification and suppression of inherited neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 345(6274), 410–416.
- Chambers, L. A., Rollins, B. M., & Tarran, R. (2007). Liquid movement across the surface epithelium of large airways. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 159(3), 256–270.
- Chen, G., & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science*, 296(5573), 1634–1635.
- Chen, J., Kleyman, T. R., & Sheng, S. (2014). Deletion of α -subunit exon 11 of the epithelial Na⁺ channel reveals a regulatory module. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 306(5), F561–F567.
- Chilvers, M. A., & O’Callaghan, C. (2000). Local mucociliary defence mechanisms. *Paediatric Respiratory Reviews*, 1(1), 27–34.
- Clements, J. A. (1997). Lung Surfactant: A Personal Perspective. *Annual Review of Physiology*, 59(1), 1–21.
- Collier, D. M., & Snyder, P. M. (2009). Extracellular protons regulate human ENaC by modulating Na⁺ self-inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 284(2), 792–798.

- Czikora, I., Alli, A., Bao, H. F., Kaftan, D., Sridhar, S., Apell, H. J., et al. (2014). A novel tumor necrosis factor-mediated mechanism of direct epithelial sodium channel activation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(5), 522–532.
- Dagenais, A., Denis, C., Vives, M. F., Girouard, S., Massé, C., Nguyen, T., et al. (2001). Modulation of α -ENaC and α 1-Na⁺-K⁺-ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281(1), L217-30.
- de la Rosa, D. A., Canessa, C. M., Fyfe, G. K., & Zhang, P. (2000). Structure and Regulation of Amiloride-Sensitive Sodium Channels. *Annual Review of Physiology*, 62(1), 573–594.
- Debonneville, C., Flores, S. Y., Kamynina, E., Plant, P. J., Tauxe, C., Thomas, M. A., et al. (2001). Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁺ channel cell surface expression. *EMBO Journal*, 20(24), 7052–7059.
- Diakov, A., Bera, K., Mokrushina, M., Krueger, B., & Korbmacher, C. (2008). Cleavage in the γ -subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) plays an important role in the proteolytic activation of near-silent channels. *Journal of Physiology*, 586(19), 4587–4608.
- Diakov, A., & Korbmacher, C. (2004). A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's α -subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38134–38142.
- Donnelly, S. C., Haslett, C., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Walz, A., Robertson, C. R., et al. (1993). Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *The Lancet*, 341(8846), 643–647.
- Duc, C., Farman, N., Canessa, C. M., Bonvalet, J. P., & Rossier, B. C. (1994). Cell-specific expression of epithelial sodium channel α , β , and γ subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: Localization by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Journal of Cell Biology*, 127(6 II), 1907–1921.
- Dulebo, A., Ettrich, R., Lucas, R., & Kaftan, D. (2012). A Computational Study of the Oligosaccharide Binding Sites in the Lectin-Like Domain of Tumor Necrosis Factor and the TNF-derived TIP Peptide. *Current Pharmaceutical Design*, 18(27), 4236–4243.
- Dumasius, V., Sznajder, J. I., Azzam, Z. S., Boja, J., Mutlu, G. M., Maron, M. B., & Factor, P. (2001). B2-Adrenergic Receptor Overexpression Increases Alveolar Fluid Clearance and Responsiveness To Endogenous Catecholamines in Rats. *Circulation Research*, 89(10), 907–914.

- Eaton, D. C., Helms, M. N., Koval, M., Bao, H. F., & Jain, L. (2009). The Contribution of Epithelial Sodium Channels to Alveolar Function in Health and Disease. *Annual Review of Physiology*, 71(1), 403–423.
- Epple, H. J., Amasheh, S., Mankertz, J., Goltz, M., Schulzke, J. D., & Fromm, M. (2000). Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits. *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 278(5), G718–G724.
- Farman, N., Talbot, C. R., Boucher, R. C., Fay, M., Canessa, C. M., Rossier, B. C., & Bonvalet, J. P. (1997). Noncoordinated expression of alpha-, beta-, and gamma-subunit mRNAs of epithelial Na⁺ channel along rat respiratory tract. *Am J Physiol*, 272(1 Pt 1), C131–C141.
- Fehrenbach, H. (2001). Alveolar epithelial type II cell: Defender of the alveolus revisited. *Respiratory Research*, 2(1), 33–46.
- Feraille, E., & Dizin, E. (2016). Coordinated Control of ENaC and Na⁺,K⁺-ATPase in Renal Collecting Duct. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(9), 2554–2563.
- Ferguson, N. D., Frutos-Vivar, F., Esteban, A., Gordo, F., Honrubia, T., Peñuelas, O., et al. (2007). Clinical risk conditions for acute lung injury in the intensive care unit and hospital ward: A prospective observational study. *Critical Care*, 11(5), R96.
- Fronius, M. (2013). Treatment of Pulmonary Edema by ENaC Activators/Stimulators. *Current Molecular Pharmacology*, 6(1), 13–27.
- Fronius, M., Clauss, W. G., & Althaus, M. (2012). Why do we have to move fluid to be able to breathe? *Frontiers in Physiology*, 3 MAY, 146.
- Garcia-Caballero, A., Rasmussen, J. E., Gaillard, E., Watson, M. J., Olsen, J. C., Donaldson, S. H., et al. (2009). SPLUNC1 regulates airway surface liquid volume by protecting ENaC from proteolytic cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(27), 11412–11417.
- Garty, H., & Palmer, L. G. (1997). Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiological Reviews*, 77(2), 359–396.
- Geiser, T. (1999). [Inflammatory cytokines and chemokines in acute inflammatory disease]. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 129(14), 540–546.
- Giraldez, T., Rojas, P., Jou, J., Flores, C., & Alvarez de la Rosa, D. (2012). The epithelial sodium channel δ -subunit: new notes for an old song. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 303(3), F328–F338.

- Goulet, C. C., Volk, K. A., Adams, C. M., Prince, L. S., Stokes, J. B., & Snyder, P. M. (1998). Inhibition of the epithelial Na⁺ channel by interaction of Nedd4 with a PY motif deleted in Liddle's syndrome. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 30012–30017.
- Gründer, S., Firsov, D., Chang, S. S., Jaeger, N. F., Gautschi, I., Schild, L., et al. (1997). A mutation causing pseudohypoaldosteronism type 1 identifies a conserved glycine that is involved in the gating of the epithelial sodium channel. *The EMBO Journal*, 16(5), 899–907.
- Guidot, D. M., Folkesson, H. G., Jain, L., Sznajder, J. I., Pittet, J.-F., & Matthay, M. A. (2006). Integrating acute lung injury and regulation of alveolar fluid clearance. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291(3), L301–L306.
- Guillot, L., Nathan, N., Tabary, O., Thouvenin, G., Le Rouzic, P., Corvol, H., et al. (2013). Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(11), 2568–2573.
- Haerteis, S., Krappitz, M., Diakov, A., Krappitz, A., Rauh, R., & Korbmacher, C. (2012). Plasmin and chymotrypsin have distinct preferences for channel activating cleavage sites in the γ subunit of the human epithelial sodium channel. *The Journal of General Physiology*, 140(4), 375–389.
- Haerteis, S., Krueger, B., Korbmacher, C., & Rauh, R. (2009). The δ -Subunit of the Epithelial Sodium Channel (ENaC) Enhances Channel Activity and Alters Proteolytic ENaC Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(42), 29024–29040.
- Hanukoglu, I., & Hanukoglu, A. (2016). Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure–function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*, 579(2), 95–132.
- Hartmann, E. K., Boehme, S., Duenges, B., Bentley, A., Klein, K. U., Kwiecien, R., et al. (2013). An inhaled tumor necrosis factor- α -derived TIP peptide improves the pulmonary function in experimental lung injury. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 57(3), 334–341.
- Hazemi, P., Tzotzos, S. J., Fischer, B., Andavan, G. S. B., Fischer, H., Pietschmann, H., et al. (2010). Essential Structural Features of TNF- α Lectin-like Domain Derived Peptides for Activation of Amiloride-Sensitive Sodium Current in A549 Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(22), 8021–8029.

- Hecker, M., Walmrath, H.-D., Seeger, W., & Mayer, K. (2008). Clinical Aspects of Acute Lung Insufficiency (ALI/TRALI). *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, 35(2), 80–88.
- Hecker, M., Weigand, M. A., & Mayer, K. (2012). [Acute respiratory distress syndrome]. *Der Internist*, 53(5), 557–566.
- Heller, R. A., & Krönke, M. (1994). Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *The Journal of Cell Biology*, 126(1), 5–9. Retrieved from
- Helve, O., Pitk&auuml;nön, O., Janér, C., & Andersson, S. (2009). Pulmonary Fluid Balance in the Human Newborn Infant. *Neonatology*, 95(4), 347–352.
- Hudson, L. D., Milberg, J. A., Anardi, D., & Maunder, R. J. (1995). Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 151(2), 293–301.
- Hudson, L. D., & Steinberg, K. P. (1999). Epidemiology of acute lung injury and ARDS. *Chest*, 116(1 Suppl), 74S–82S.
- Hummler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., et al. (1996). Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in α ENaC-deficient mice. *Nature Genetics*, 12(3), 325–328.
- Itani, O. A., Auerbach, S. D., Husted, R. F., Volk, K. A., Ageloff, S., Knepper, M. A., et al. (2002). Glucocorticoid-stimulated lung epithelial Na⁺ transport is associated with regulated ENaC and *sgk1* expression. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 282(4), L631–L641.
- Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E. B., & Gouaux, E. (2007). Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature*, 449(7160), 316–323.
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. (2004). A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. *Journal of Molecular Biology*, 338(5), 1027–1036.
- Kashlan, O. B., & Kleyman, T. R. (2011). ENaC structure and function in the wake of a resolved structure of a family member. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 301(4), F684-96.
- Katzenstein, A. L., Bloor, C. M., & Leibow, A. A. (1976). Diffuse alveolar damage-the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *The American Journal of Pathology*, 85(1), 209–228.

- Kellenberger, S., & Schild, L. (2002). Epithelial Sodium Channel/Degenerin Family of Ion Channels: A Variety of Functions for a Shared Structure. *Physiological Reviews*, 82(3), 735–767.
- Kerem, E., Bistrizter, T., Hanukoglu, A., Hofmann, T., Zhou, Z., Bennett, W., et al. (1999). Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudohypoaldosteronism. *The New England Journal of Medicine*, 341(3), 156–162.
- Kleyman, T. R., Carattino, M. D., & Hughey, R. P. (2009). ENaC at the Cutting Edge: Regulation of Epithelial Sodium Channels by Proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 20447–20451.
- Krenn K., Lucas R., Croizé A., Boehme S., Klein K.U., Hermann R., Markstaller K., Ullrich R. (2017). Inhaled AP301 for treatment of pulmonary edema in mechanically ventilated patients with acute respiratory distress syndrome: a phase IIa randomized placebo-controlled trial. *Critical Care*, 21(1):194.
- Landsman, L., & Jung, S. (2007). Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(6), 3488–3494.
- Lazrak, A., Samanta, A., & Matalon, S. (2000). Biophysical properties and molecular characterization of amiloride-sensitive sodium channels in A549 cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278(4), L848–L857.
- Levit, O., Jiang, Y., Bizzarro, M. J., Hussain, N., Buhimschi, C. S., Gruen, J. R., et al. (2009). The Genetic Susceptibility to Respiratory Distress Syndrome. *Pediatric Research*, 66(6), 693–697.
- Linko, R., Okkonen, M., Pettilä, V., Perttilä, J., Parviainen, I., Ruokonen, E., et al. (2009). Acute respiratory failure in intensive care units. Finnali: a prospective cohort study. *Intensive Care Medicine*, 35(8), 1352–1361.
- Loffing, J., & Korbmacher, C. (2009). Regulated sodium transport in the renal connecting tubule (CNT) via the epithelial sodium channel (ENaC). *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 458(1), 111–135.
- Lucas, R., Magez, S., De Leys, R., Fransen, L., Scheerlinck, J. P., Rampelberg, M., et al. (1994). Mapping the lectin-like activity of tumor necrosis factor. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5148), 814–817.
- Lucas, R., Sridhar, S., Rick, F. G., Gorshkov, B., Umapathy, N. S., Yang, G., et al. (2012). Agonist of growth hormone-releasing hormone reduces pneumolysin-induced pulmonary permeability edema. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), 2084–2089.

- Lucas, R., Verin, A. D., Black, S. M., & Catravas, J. D. (2009). Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung injury. *Biochemical Pharmacology*, 77(12), 1763–1772.
- Lucas, R., Yue, Q., Alli, A., Duke, B. J., Al-Khalili, O., Thai, T. L., et al. (2016). The Lectin-like Domain of TNF Increases ENaC Open Probability through a Novel Site at the Interface between the Second Transmembrane and C-terminal Domains of the α -Subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(45), 23440–23451.
- Mairbäurl, H. (2006). Role of alveolar epithelial sodium transport in high altitude pulmonary edema (HAPE). *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 151(2–3), 178–191.
- Maniatis, N. A., Kotanidou, A., Catravas, J. D., & Orfanos, S. E. (2008). Endothelial pathomechanisms in acute lung injury. *Vascular Pharmacology*, 49(4–6), 119–133.
- Martin, T. R. (1999). Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture. *Chest*, 116(1 Suppl), 2S–8S.
- Matsui, H., Randell, S. H., Peretti, S. W., Davis, C. W., & Boucher, R. C. (1998). Coordinated clearance of periciliary liquid and mucus from airway surfaces. *Journal of Clinical Investigation*, 102(6), 1125–1131.
- Matthay, M. A. (2002). Alveolar fluid clearance in patients with ARDS: does it make a difference? *Chest*, 122(6 Suppl), 340S–343S.
- Matthay, M. A., Ware, L. B., & Zimmerman, G. A. (2012). The acute respiratory distress syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 122(8), 2731–2740.
- Mehta, D., & Malik, A. B. (2006). Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Physiological Reviews*, 86(1), 279–367.
- Micheau, O., & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114(2), 181–190.
- Minakata, Y., Suzuki, S., Grygorczyk, C., Dagenais, A., & Berthiaume, Y. (1998). Impact of beta-adrenergic agonist on Na⁺ channel and Na⁺-K⁺-ATPase expression in alveolar type II cells. *The American Journal of Physiology*, 275(2 Pt 1), L414–22.
- Mutlu, G. M., & Sznajder, J. I. (2005). Mechanisms of pulmonary edema clearance. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(5), L685–L695.

- Nakamura, K., Stokes, J. B., & McCray, P. B. (2002). Endogenous and exogenous glucocorticoid regulation of ENaC mRNA expression in developing kidney and lung. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 283(3), C762–C772.
- Ogunniyi, A. D., LeMessurier, K. S., Graham, R. M. A., Watt, J. M., Briles, D. E., Stroehrer, U. H., & Paton, J. C. (2007). Contributions of Pneumolysin, Pneumococcal Surface Protein A (PspA), and PspC to Pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* D39 in a Mouse Model. *Infection and Immunity*, 75(4), 1843–1851.
- Palmer, L. G., & Frindt, G. (1986). Amiloride-sensitive Na channels from the apical membrane of the rat cortical collecting tubule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(8), 2767–2770.
- Piantadosi, C. A., & Schwartz, D. A. (2004). The acute respiratory distress syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 141(6), 460–470.
- Pierrakos, C., Karanikolas, M., Scolletta, S., Karamouzos, V., & Velissaris, D. (2012). Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathophysiology and Therapeutic Options. *Journal of Clinical Medicine Research*, 4(1), 7–16.
- Pitkänen, O. (2001). Lung Epithelial Ion Transport in Neonatal Lung Disease. *Neonatology*, 80(1), 14–17.
- Planès, C., Blot-Chabaud, M., Matthay, M. A., Couette, S., Uchida, T., & Clerici, C. (2002). Hypoxia and beta 2-agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47318–47324.
- Prokhorova, S., Lavnikova, N., & Laskin, D. L. (1994). Functional characterization of interstitial macrophages and subpopulations of alveolar macrophages from rat lung. *Journal of Leukocyte Biology*, 55(2), 141–146.
- Reddy, M. M., Light, M. J., & Quinton, P. M. (1999). Activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl⁻ channel function. *Nature*, 402(6759), 301–304.
- Renard, S., Voilley, N., Bassilana, F., Lazdunski, M., & Barbry, P. (1995). Localization and regulation by steroids of the alpha, beta and gamma subunits of the amiloride-sensitive Na⁺ channel in colon, lung and kidney. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 430(3), 299–307.
- Rodríguez-Gaspar, M., Santolaria, F., Jarque-López, A., González-Reimers, E., Milena, A., de la Vega, M. J., et al. (2001). Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients. *Cytokine*, 15(4), 232–236.

- Rossier, B. C. (2002). Hormonal regulation of the epithelial sodium channel ENaC: N or P(o)? *The Journal of General Physiology*, 120(1), 67–70.
- Rossier, B. C., & Schild, L. (2008). Epithelial sodium channel: mendelian versus essential hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 52(4), 595–600.
- Rossier, B. C., & Stutts, M. J. (2009). Activation of the Epithelial Sodium Channel (ENaC) by Serine Proteases. *Annual Review of Physiology*, 71(1), 361–379.
- Rossier, B. C., Vallet, V., Chraïbi, A., Gaeggeler, H.-P., & Horisberger, J.-D. (1997). An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature*, 389(6651), 607–610.
- Rubinfeld, G. D., Caldwell, E., Peabody, E., Weaver, J., Martin, D. P., Neff, M., et al. (2005). Incidence and Outcomes of Acute Lung Injury. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1685–1693.
- Schild, L., Lu, Y., Gautschi, I., Schneeberger, E., Lifton, R. P., & Rossier, B. C. (1996). Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *The EMBO Journal*, 15(10), 2381–2387.
- Schild, L., Schneeberger, E., Gautschi, I., & Firsov, D. (1997). Identification of amino acid residues in the alpha, beta, and gamma subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation. *The Journal of General Physiology*, 109(1), 15–26.
- Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 286(6), C1213–28.
- Schwameis R., Eder S., Pietschmann H., Fischer B., Mascher H., Tzotzos S., et al. (2014). A FIM study to assess safety and exposure of inhaled single doses of AP301-A specific ENaC channel activator for the treatment of acute lung injury. *J Clin Pharmacol.*, 54(3):341-50.
- Seeger, W., & Lasch, H. G. (n.d.). Septic lung. *Reviews of Infectious Diseases*, 9 Suppl 5, S570-9.
- Shabbir W., Scherbaum-Hazemi P., Tzotzos S., Fischer B., Fischer H., Pietschmann H., Lucas R., Lemmens-Gruber R. (2013). Mechanism of action of novel lung edema therapeutic AP301 by activation of the epithelial sodium channel. *Molecular Pharmacology*, 84(6):899-910.
- Sheng, S., Li, J., McNulty, K. A., Avery, D., & Kleyman, T. R. (2000). Characterization of the selectivity filter of the epithelial sodium channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8572–8581.

- Shimkets, R. A., Warnock, D. G., Bositis, C. M., Nelson-Williams, C., Hansson, J. H., Schambelan, M., et al. (1994). Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell*, 79(3), 407–414.
- Sigurdsson, M. I., Sigvaldason, K., Gunnarsson, T. S., Moller, A., & Sigurdsson, G. H. (2013). Acute respiratory distress syndrome: nationwide changes in incidence, treatment and mortality over 23 years. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 57(1), 37–45.
- Silversides, J. A., & Ferguson, N. D. (2013). Clinical review: Acute respiratory distress syndrome - clinical ventilator management and adjunct therapy. *Critical Care (London, England)*, 17(2), 225.
- Smith, D. E., Otulakowski, G., Yeager, H., Post, M., Cutz, E., & O'brodovich, H. M. (2000). Epithelial Na⁺ Channel (ENaC) Expression in the Developing Normal and Abnormal Human Perinatal Lung. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(4), 1322–1331.
- Smith, F. G., Perkins, G. D., Gates, S., Young, D., McAuley, D. F., Tunnicliffe, W., et al. (2012). Effect of intravenous β -2 agonist treatment on clinical outcomes in acute respiratory distress syndrome (BALTI-2): a multicentre, randomised controlled trial. *The Lancet*, 379(9812), 229–235.
- Smith, P. R., & Benos, D. J. (1991). Epithelial Na⁺ Channels. *Annual Review of Physiology*, 53(1), 509–530.
- Snyder, P. M. (2002). The Epithelial Na⁺ Channel: Cell Surface Insertion and Retrieval in Na⁺ Homeostasis and Hypertension. *Endocrine Reviews*, 23(2), 258–275.
- Snyder, P. M., Olson, D. R., Kabra, R., Zhou, R., & Steines, J. C. (2004). cAMP and Serum and Glucocorticoid-inducible Kinase (SGK) Regulate the Epithelial Na⁺ Channel through Convergent Phosphorylation of Nedd4-2. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 45753–45758.
- Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., & Rotin, D. (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *The EMBO Journal*, 15(10), 2371–2380.
- Stockand, J. D., Staruschenko, A., Pochynyuk, O., Booth, R. E., & Silverthorn, D. U. (2008). Insight toward epithelial Na⁺ channel mechanism revealed by the acid-sensing ion channel 1 structure. *IUBMB Life*, 60(9), 620–628.

- Sznajder, J. I., Factor, P., & Ingbar, D. H. (2002). Invited Review: Lung edema clearance: role of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. *Journal of Applied Physiology*, 93(5), 1860–1866.
- Tarran, R., Trout, L., Donaldson, S. H., & Boucher, R. C. (2006). Soluble Mediators, Not Cilia, Determine Airway Surface Liquid Volume in Normal and Cystic Fibrosis Superficial Airway Epithelia. *The Journal of General Physiology*, 127(5), 591–604.
- Tavernarakis and, N., & Driscoll, M. (1997). Molecular Modeling Of Mechanotransduction In The Nematode *Caenorhabditis Elegans*. *Annual Review of Physiology*, 59(1), 659–689.
- Tonelli, A. R., Zein, J., Adams, J., & Ioannidis, J. P. A. (2014). Effects of interventions on survival in acute respiratory distress syndrome: an umbrella review of 159 published randomized trials and 29 meta-analyses. *Intensive Care Medicine*, 40(6), 769–787.
- Tracey, K. J., & Cerami, A. (1993). Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Critical Care Medicine*, 21(10 Suppl), S415-22.
- Turnheim, K. (1991). Intrinsic regulation of apical sodium entry in epithelia. *Physiological Reviews*, 71(2), 429–445.
- Valentijn, J. A., Fyfe, G. K., & Canessa, C. M. (1998). Biosynthesis and processing of epithelial sodium channels in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30344–30351.
- Vernooy, J. H. J., Dentener, M. A., van Suylen, R. J., Buurman, W. A., & Wouters, E. F. M. (2002). Long-Term Intratracheal Lipopolysaccharide Exposure in Mice Results in Chronic Lung Inflammation and Persistent Pathology. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26(1), 152–159.
- Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Voilley, N., & Lazdunski, M. (1995). Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na^+ channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(46), 27411–27414.
- Wang, Q., & Doerschuk, C. M. (2002). The Signaling Pathways Induced by Neutrophil-Endothelial Cell Adhesion. *Antioxidants & Redox Signaling*, 4(1), 39–47.
- Wang, Y.-B., Leroy, V., Maunsbach, A. B., Doucet, A., Hasler, U., Dizin, E., et al. (2014). Sodium Transport Is Modulated by p38 Kinase–Dependent Cross-Talk between ENaC and Na,K-ATPase in Collecting Duct Principal Cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(2), 250–259.

- Ware, L. (2006). Pathophysiology of Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 27(4), 337–349.
- Ware, L. B., & Matthay, M. A. (2000). The acute respiratory distress syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 342(18), 1334–1349.
- Ware, L. B., & Matthay, M. A. (2001). Alveolar Fluid Clearance Is Impaired in the Majority of Patients with Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163(6), 1376–1383.
- Weisz, O. A., Wang, J.-M., Edinger, R. S., & Johnson, J. P. (2000). Non-coordinate Regulation of Endogenous Epithelial Sodium Channel (ENaC) Subunit Expression at the Apical Membrane of A6 Cells in Response to Various Transporting Conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 39886–39893.
- Wesch, D., Althaus, M., Miranda, P., Cruz-Muros, I., Fronius, M., González-Hernández, T., et al. (2012). Differential N termini in epithelial Na⁺ channel δ -subunit isoforms modulate channel trafficking to the membrane. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 302(6), C868-79.
- Wheeler, A. P., & Bernard, G. R. (2007). Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *The Lancet*, 369(9572), 1553–1564.
- Witzenrath, M., Gutbier, B., Hocke, A. C., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Berger, K., et al. (2006). Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Critical Care Medicine*, 34(7), 1947–1954.
- Yang, G., Hamacher, J., Gorshkov, B., White, R., Sridhar, S., Verin, A., et al. (2010). The Dual Role of TNF in Pulmonary Edema. *Journal of Cardiovascular Disease Research*, 1(1), 29–36.
- Zemans, R. L., Colgan, S. P., & Downey, G. P. (2009). Transepithelial Migration of Neutrophils. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 40(5), 519–535.
- Zemans, R. L., & Matthay, M. A. (2004). Bench-to-bedside review: the role of the alveolar epithelium in the resolution of pulmonary edema in acute lung injury. *Critical Care*, 8(6), 469.
- Zhang, Y., & Skolnick, J. (2005). TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Research*, 33(7), 2302–2309.