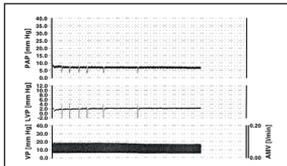
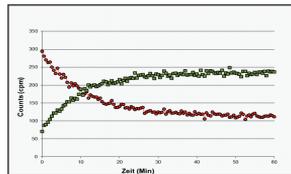


## Die Effekte von Intermedin/Adrenomedullin 2 auf die Integrität des Alveolarepithels während des akuten Atemnotsyndroms



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2021

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2021

© 2021 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFBENGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

---

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und-Biochemie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer Prof. Dr. Martin Diener

und

dem Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer Prof. Dr. W. Seeger

**Die Effekte von Intermedin/Adrenomedullin 2  
auf die Integrität des Alveolarepithels während  
des akuten Atemnotsyndroms**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr.vet.med.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Ramona Rühl**

**Tierärztin aus Alsfeld**

Gießen 2020

---

**Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Dekan** Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

**Gutachter** Prof. Dr. Martin Diener  
Prof. Dr. Werner Seeger

**Tag der Disputation:** 23.02.2021

---

*Meiner Mutter*

*1956-2011*

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>1 Einführung</b>	<b>11</b>
1.1 <i>Das Akute Atemnotsyndrom (ARDS)</i>	11
1.2 <i>Alveoläre Flüssigkeitsresorption</i>	14
1.3 <i>Tiermodelle in der Erforschung des Atemnotsyndroms</i>	18
1.4 <i>Die Kalzitonin-Peptid-Familie</i>	21
1.4.1 <i>Intermedin/Adrenomedullin 2 (IMD/AM2) und Adrenomedullin (AM/ AM1)</i>	23
1.4.2 <i>cAMP und die cAMP-abhängige Proteinkinase A</i>	25
1.4.3 <i>Die Funktion der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase</i>	26
1.4.4 <i>Die Alternative zum klassischen cAMP-abhängigen Signalweg: die cAMP-unabhängige Aktivierung der Proteinkinase A</i>	29
<b>2 Hypothese</b>	<b>31</b>
<b>3 Zielsetzung</b>	<b>32</b>
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>33</b>
4.1 <i>Die isolierte, ventilierte und perfundierte Mauslunge</i>	33
4.1.1 <i>Präparation und Isolation der Lunge</i>	33
4.1.2 <i>Ventilation der Lunge</i>	36
4.1.3 <i>Applikation von Medikamenten</i>	36
4.1.4 <i>Perfusion des Mausmodells</i>	38
4.1.5 <i>Radioaktive Tracer und Messung Tracer- Austausch</i>	41
4.1.6 <i>Kalkulation der Tracerkinetik</i>	42
4.1.7 <i>Kalkulation des Amilorid-Ouabain sensitiven Tranportes</i>	43
4.1.8 <i>Bronchoalveoläre Lavage / Verhältnis Nass-zu Trockengewicht</i>	44
4.1.9 <i>Monitoring der Parameter in der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge</i>	45
4.1.10 <i>Verwendete Substanzen im Mausmodell</i>	46
4.1.11 <i>Experimentelle Protokolle für die isolierte, ventilierte und perfundierte Mauslunge</i>	46
4.2 <i>Zellkultorexperimente</i>	47
4.2.1 <i>Biotinylierung und Streptavidin Pull-Down <math>\alpha</math>- und <math>\beta</math>-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase</i>	47

---

4.2.2	<i>Biotinylierung und Streptavidin Pull-Down <math>\beta</math>-ENaC</i>	49
4.2.3	<i>cAMP Assay</i>	50
4.2.4	<i>Proteinkinase A Assay</i>	51
4.2.5	<i>Ussing-Kammer Messung: Einfluss von Intermedin auf den trans-epithelialen Natrium-Strom</i>	54
4.2.5.1	<i>Kultur der H441 Zellen</i>	54
4.2.5.2	<i>Durchführung der Ussing-Kammer Messung</i>	55
4.3	<i>Statistische Analyse</i>	55
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
5.1	<i>Alveoläre Clearance, amilorid-ouabain-sensitiver Transport und Nass-/Trockengewichtsquotient im System der isolierten Mauslunge</i>	56
5.1.1	<i>Alveoläre Clearance bei Anwendung von Isoproterenol, Terbutalin, Amilorid und Ouabain</i>	57
5.1.2	<i>Alveoläre Clearance bei Anwendung von Amilorid, Ouabain und Intermedin/Adrenomedullin 2</i>	61
5.1.3	<i>Alveoläre Clearance bei Anwendung von H-89, SQ 22536 und Intermedin/Adrenomedullin 2</i>	65
5.2	<i>Biotinylierung und Streptavidin pull-down</i>	69
5.2.1	<i><math>\text{Na}^+</math>-<math>\text{K}^+</math>-ATPase</i>	69
5.2.2	<i>Epithelialer Natriumkanal (ENaC)</i>	73
5.3	<i>Erfassung der Aktivierung von cAMP</i>	74
5.3.1	<i>R&amp;D Systems cAMP Immunoassay</i>	74
5.4	<i>Proteinkinase A - Assay</i>	75
5.4	<i>Ussing-Kammer Messung</i>	78
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>Abstract</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>98</b>
9.1	<i>Abstracts</i>	111
9.2	<i>Veröffentlichungen</i>	112
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>113</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>114</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schema des für den alveolären Flüssigkeitstransport wichtigen distalen Lungenepithels.	16
<b>Abbildung 2:</b> Schema des gestörten alveolären Flüssigkeitstransportes	17
<b>Abbildung 3:</b> Phylogenetischer Baum von in Maus, Mensch und Kugelfisch isoliertem AM2/IMD, AM und CGRP und Amylin	22
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der Flüssigkeitsresorption über das Alveolarepithel	28
<b>Abbildung 5:</b> Anatomie der Mauslunge aus "The Mouse in Biomedical Research"	35
<b>Abbildung 6:</b> Zur Applikation verwendeter Microsprayer (Penn Century, Inc.)	37
<b>Abbildung 7:</b> Schema des Injektionsstopfens zur Instillation der im Versuch verwendeten Substanzen	38
<b>Abbildung 8:</b> Schematische Darstellung des Systems der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge	40
<b>Abbildung 9:</b> Abnahme der Tracerkonzentration in der Lunge unter Kontrollbedingungen	41
<b>Abbildung 10:</b> Elimination der Tracer aus der Lunge und deren gleichzeitige Akkumulation im Perfusat unter Kontrollbedingungen	43
<b>Abbildung 11:</b> Monitoring des pulmonarteriellen Drucks (PAP), des linksventrikulären Drucks (LAP) und des Ventilationsdrucks (VP) der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge	45
<b>Abbildung 12:</b> Funktionsprinzip des Pep Tag® (Promega, Deutschland) cAMP-abhängigen Poteinkinase (PKA) Assays	54
<b>Abbildung 13:</b> Elimination der Tracer nach Anwendung von bereits in ihrer Wirkung auf die alveolare Clearance bekannten Substanzen (Amilorid, Ouabain, Isoproterenol und Terbutalin)	57
<b>Abbildung 14:</b> Amilorid-Ouabain-sensitiver $^{22}\text{Na}$ -Transport bei Einsatz von Amilorid, Ouabain, Isoproterenol und Terbutalin	58
<b>Abbildung 15:</b> Nass-/Trockengewichtsquotient der bereits in ihrer Wirkung bekannten Substanzen (Amilorid, Ouabain, Isoproterenol und Terbutalin)	59
<b>Abbildung 16:</b> Bestimmung des $^{22}\text{Na}$ -Gehaltes und des Volumens des epithelialen Flüssigkeitsfilmes bei Anwendung von Amilorid, Ouabain, Isoproterenol und Terbutalin	60
<b>Abbildung 17:</b> Elimination der Tracer nach Anwendung von Amilorid, Ouabain, Intermedin deren Kombination	62
<b>Abbildung 18:</b> Amilorid-Ouabain-sensitiver $^{22}\text{Na}$ -Transport nach Anwendung von Amilorid, Ouabain, Intermedin deren Kombination	63
<b>Abbildung 19:</b> Nass-/Trockengewichtsquotient nach Anwendung von Amilorid, Ouabain, Intermedin und deren Kombination	63
<b>Abbildung 20:</b> Bestimmung des $^{22}\text{Na}$ -Gehaltes und des Volumens des epithelialen Flüssigkeitsfilmes nach Anwendung von Amilorid, Ouabain, Intermedin und deren Kombination	64

<b>Abbildung 21:</b> Elimination der Tracer nach Anwendung von H-89 und SQ 22536	66
<b>Abbildung 22:</b> Amilorid-Ouabain-sensitiver $^{22}\text{Na}$ -Transport bei Einsatz von H-89 und SQ 22536	67
<b>Abbildung 23:</b> Nass-/Trockengewichtsquotient nach Anwendung von H-89 und SQ 22536	67
<b>Abbildung 24:</b> Bestimmung des $^{22}\text{Na}$ -Gehaltes und des Volumens des epithelialen Flüssigkeitsfilmes nach Anwendung von H-89 und SQ 22563	68
<b>Abbildung 25:</b> Biotinylierung und Streptavidin- pull down in ATII Zellen: $\alpha\text{-Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$	69
<b>Abbildung 26:</b> Statistisch nicht signifikante Erhöhung der $\beta$ -Untereinheit der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in der Oberfläche von ATII Zellen nach Anwendung von Intermedin	70
<b>Abbildung 27:</b> Auswirkungen von Intermedin auf die $\alpha\text{-Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in ATII-Zellen bei gleichzeitiger Hemmung der Proteinkinase A durch H-89	71
<b>Abbildung 28:</b> Auswirkungen von Intermedin auf die $\alpha\text{-Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in ATII- Zellen bei gleichzeitiger Hemmung der Adenylatzyklase durch SQ22563	72
<b>Abbildung 29:</b> Auswirkungen der Anwendung von Intermedin auf den epithelialen Natriumkanal (ENaC) in A549-Zellen	73
<b>Abbildung 30:</b> Messung der Auswirkungen von Intermedin und Isoproterenol mit Hilfe eines cAMP Immunoassays (R&D Systems)	74
<b>Abbildung 31:</b> Unterschiedliche Inkubationszeiten für Intermedin (100nM) im Proteinkinase A-Assay	75
<b>Abbildung 32:</b> Konzentrationskurve von Intermedin über einen Zeitraum von 15 Minuten im Proteinkinase A-Assay	76
<b>Abbildung 33:</b> Anwendung von Intermedin und den Inhibitoren H-89 und SQ22563 im Proteinkinase A-Assay	77
<b>Abbildung 33:</b> Einfluss von Intermedin auf den Amilorid-sensitiven Strom von H441-Zellen in der Ussing-Kammer	78

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die in der Mauslunge verwendeten Wirkstoffe	46
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht über die in der Zellkultur verwendeten Wirkstoffe	49
<b>Tabelle 3:</b> Alveoläre Clearance in unterschiedlichen Tierspezies	88

---

## Abkürzungsverzeichnis

ARDS	Akutes Atemnotsyndrom (Acute Respiratory Distress Syndrome)
AM oder AM1	Adrenomedullin
AMY	Amylin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin gene-related peptide/ Kalzitinin Gen-verwandtes Peptid
$\alpha/\beta$ CGRP	Isotypen Calcitonin gene-related peptide/ Kalzitinin Gen-verwandtes Peptid
CRLR	Kalzitinin Rezeptor-ähnlicher Rezeptor (calcitonin receptor-like receptor)
CRLR + RAMP1	Rezeptorkomplex aus calcitonin receptor-like receptor+ Receptor activity modifying protein Isotyp 1
CRLR + RAMP2	Rezeptorkomplex aus calcitonin receptor-like receptor+ Receptor activity modifying protein Isotyp 2
CRLR + RAMP3	Rezeptorkomplex aus calcitonin receptor-like receptor+ Receptor activity modifying protein Isotyp 3
CT	Kalzitinin (Calcitonin)
CTR	Kalzitinin-Rezeptor (Calcitonin-Rezeptor)
CTR + RAMP1	Rezeptorkomplex aus Calcitonin-Rezeptor + Receptor activity modifying protein Isotyp 1
CTR + RAMP2	Rezeptorkomplex aus Calcitonin-Rezeptor + Receptor activity modifying protein Isotyp 2
CTR + RAMP3	Rezeptorkomplex aus Calcitonin-Rezeptor + Receptor activity modifying protein Isotyp 3
ELF	epithelial lining fluid / epithelialer Flüssigkeitsfilm
ENaC	amilorid-sensitiver epithelialer Natrium-Kanal
FIO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
I $\kappa$ B $\alpha$	Protein im NF- $\kappa$ B Komplex
I $\kappa$ B $\beta$	Protein im NF- $\kappa$ B Komplex
IMD/AM2	Intermedin/Adrenomedullin 2

---

LVP	linksventrikulärer Druck (left ventricle pressure)
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -Adenosin-Triphosphatase
NF-κB	„ <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> “, <i>Transkriptionsfaktor</i>
NO	Stickstoffmonoxid
PaO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut
PAP	pulmoarterieller Druck (pulmonary artery pressure)
PKAc	katalytische Untereinheit der Proteinkinase A
PKAr	regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A
RAMP	die Rezeptoraktivität beeinflussendes Protein (receptor activity modifying protein)
RCP	rezeptoranteiliges Protein (receptor component protein)
VP	Ventilationsdruck (ventilation pressure)

---

# 1 Einführung

## 1.1 Das Akute Atemnotsyndrom (ARDS)

Das akute Atemnotsyndrom (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) wurde erstmals 1967 in Fallberichten mehrerer schwer erkrankter Erwachsener und Kinder beschrieben und definiert. Klinisch wurde in allen Fällen eine Symptomatik mit akuter Hypoxie, einem nicht kardiogen bedingten Lungenödem, eine verminderte Lungendehnbarkeit (Compliance) und eine angestrengte Atmung beobachtet, welche eine positive Druckbeatmung (positive pressure ventilation, PPV) notwendig machte und nicht auf damals gängige Methoden in der Atemwegtherapie ansprach (Ashbaugh et al., 1967).

Das ARDS wird grundsätzlich als massive Entzündungsreaktion der Lunge auf verschiedene schädigende Faktoren bezeichnet. Charakteristisch ist ein durch die schwerwiegende Entzündung hervorgerufenen Permeabilitätsödem, wobei die Verletzung der Integrität der endothelial-interstitiellen Schranke zu einem interstitiellen Lungenödem und damit zu einer starken Beeinträchtigung des Gasaustausches führt (Matthay et al., 2019). Eine Schädigung des einschichtigen, 0,1-0,2µm dicken Alveolarepithels resultiert unter anderem in einem alveolären Lungenödem sowie einer gestörten Surfactantproduktion, die normalerweise durch Alveolarepithelzellen vom Typ II gewährleistet wird. Nachfolgend kommt es zu verminderter Lungencompliance (Lungendehnbarkeit) und alveolärem Kollaps. Die Störung der normalen Reparaturprozesse, u.a. durch proteinreiche Ödemflüssigkeit, kann zu einer irreversiblen Lungenfibrose führen.

Dem ARDS liegt immer eine identifizierbare, nichtkardiale Ursache zu Grunde (Leuwer et al., 2004). Zur Definition gehören außerdem der akute Beginn innerhalb einer Woche, sowie bilaterale Verdichtungen in der Röntgenthoraxaufnahme oder Computertomographie (Berlin – Definition, Ranieri et al., 2012).

Als häufigster Auslöser für ein akutes Lungenversagen gelten Pneumonien (bakteriell oder viral), gefolgt von nichtpulmonaler Sepsis und Aspirationspneumonien (Siegmund-Schulze, 2012; Matthay et al., 2019). Auch das SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), erstmals 2019 in Wuhan isoliert und Auslöser von COVID-19 (*COroNaVIrus Disease*) kann bei schweren Krankheitsverläufen ein ARDS hervorrufen (Yang et al., 2020).

---

Weitere Ursachen können akute Pankreatitis, Transfusionen, Überdosierung von Medikamenten, Alkoholmissbrauch, Beinahe-Ertrinken, hämorrhagischer Schock oder Reperfusionsschäden- z.B. nach Bypass-Operationen -oder Höhenkrankheit sein.

Ebenso kann eine Beatmung ein bestehendes ARDS verschlimmern oder sogar der Auslöser dafür sein (ventilator- associated lung injury, VALI). Dies ist der Fall für etwa 10% der weltweit auf einer Intensivstation behandelten Patienten (Matthay et al., 2019).

Die Diagnostik von ARDS basiert auf Konsenskriterien mit Modifikationen für Länder mit medizinischer Unterversorgung (siehe Kigali-Definition) oder epidemiologischen Unterschieden zwischen Erwachsenen und Kindern.

1992 wurden in einer europäisch-amerikanischen Konsensuskonferenz (European Society of Intensive Care Medicine, American Thoracic Society of Critical Care Medicine, Bernard et al., 1992) spezifische diagnostische Kriterien für das ARDS des Erwachsenen festgelegt. Diese Definition wurde mehrfach und zuletzt 2012 als sogenannte „Berlin-Definition“ des akuten Lungenversagens aktualisiert (Ranieri et al., 2012). Hierbei werden drei Schweregrade unterschieden, abhängig von der Schwere der Hypoxämie und unter Berücksichtigung der Reperatoreinstellungen. Eine Abänderung dieser Kriterien existiert als „Kigali-Modifikation“ von 2016, wobei die Patienten in dieser Studie nicht maschinell beatmet wurden (Riviello et al., 2016). Eine solche zuverlässige Definition des ARDS ist für die klinische Diagnostik notwendig, um die Prognose des Patienten möglichst realistisch einschätzen und optimal therapieren zu können. Die neue „Berlin- Definition“ korreliert besser als die vorhergehenden mit dem Mortalitätsrisiko der Patienten. Es beträgt für Erwachsene 27% bei mildem ARDS, 32 % bei moderatem und 45 % bei schwerem Verlauf (Siegmond-Schulze, 2012).

#### **Definition von ARDS beim Erwachsenen, „Berlin- Definition“ 2012:**

- **schweres ARDS** bei einem Quotienten von arteriellem Sauerstoffpartialdruck ( $\text{PaO}_2$ ) / inspiratorischer Sauerstoffkonzentration ( $\text{FiO}_2$ )  $\leq 100\text{mmHg}$ , bei einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP)  $\geq 5\text{cm H}_2\text{O}$
- **moderates ARDS** bei  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 = 101\text{-}200\text{mmHg}$ , bei PEEP  $\geq 5\text{cm H}_2\text{O}$  und
- **mildes ARDS** bei  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 = 201\text{-}300\text{mmHg}$ , bei PEEP  $\geq 5\text{cm H}_2\text{O}$

---

Die Mortalität bei Kindern (im Alter zwischen 2 Monaten und 17 Jahren) wird von 17-33% angegeben (Schouten et al., 2016; Khemani et al., 2018). Die Hauptrisikofaktoren und die Pathogenese des ARDS unterscheiden sich zwischen Kindern und Erwachsenen nicht, während sich epidemiologisch einige Unterschiede zeigen. Zum Beispiel tritt das pädiatrische ARDS (PARDS) aus bisher unbekanntem Gründen häufiger bei Jungen auf (Khemani et al., 2018; Bindl et al., 2003). Auch bei Kindern gilt eine Pneumonie (etwa 60 % der Fälle) als der häufigste Auslöser, hervorgerufen vor allem durch das Respiratorische Synzytialvirus oder das Influenzavirus (Nye et al., 2016).

Aufgrund dieser Unterschiede wurden durch die internationale pädiatrische Konsensuskonferenz (*PALICC- Pediatric Acute Lung Injury Consensus Conference*) eigene Kriterien für das PARDS definiert (Khemani et al., 2015).

Für Neonaten ab Geburt bis zu 4 Wochen nach Geburt (termingerecht) wurde von Experten zusätzliche Kriterien eingeführt (Montreux Definition, De Luca et al., 2017).

Hier soll der Ursprung des Ödems durch Echokardiographie kontrolliert werden, um kongenitale Herzfehler als Ursache auszuschließen; bildgebende Verfahren müssen diffuse bilaterale Infiltrate der Lunge oder komplette Trübung zeigen.

Das klinische Management des ARDS konzentriert sich auf Diagnose und Behandlung möglicher zugrundeliegender Infektionen, respiratorische Unterstützung (Sauerstoffzufuhr oder positive Druckbeatmung (PPV, *positive pressure ventilation*), ein behutsames Flüssigkeitsmanagement (vor allem für Schockpatienten) und unterstützende Maßnahmen, wie zum Beispiel künstliche Ernährung. Nach der Entdeckung, dass mechanische Kräfte durch nicht angepasste Beatmung einen wesentlichen Anteil an der Entwicklung des ARDS haben können, wurde der Fokus auf die Optimierung der notwendigen Beatmung gelegt, was zu dem Konzept der protektiven Beatmung (6ml/kg KGW) führte (Amato et al., 1998; Brochard et al., 1998, The Acute Respiratory Distress Syndrome Network, 2000). Durch diese Beatmungsstrategie konnte die für den Patienten notwendige Beatmungsdauer deutlich verkürzt, systemische Entzündungen durch Reduktion präentzündlicher Zytokinfreisetzung vermindert und drohende extrapulmonale Organversagen vermieden werden. In einer klinischen Studie von Brower et al. aus dem Jahr 2000 wurde eine um 9% reduzierte Mortalität verglichen mit dem bisher angewendeten, höheren Tidalvolumen (Atemzugvolumen, 12ml/kg KGW) beschrieben (Brower et al., 2000).

Trotz entscheidender Fortschritte in Management und Behandlung gibt es bisher keine spezifische Pharmakotherapie, um das ARDS gezielt behandeln zu können.

---

Eine gezielte Entfernung der proteinreichen Ödemflüssigkeit wäre essentiell für die Therapie des Atemnotsyndroms und würde darüber hinaus die Überlebenschance für die Patienten verbessern (Matthay, 2002; Sznajder, 2001). Je schneller die überschüssige Flüssigkeit aus dem Alveolarraum entfernt werden kann, umso besser die Prognose und das Behandlungsergebnis (Ware und Matthay, 2001), denn Patienten leiden auch nach ihrer Erkrankung häufig noch an funktionellen und/ oder psychologischen Folgeschäden.

## 1.2 Alveoläre Flüssigkeitsresorption

Das zur Blut-Gas-Schranke zählende Alveolarepithel von Säugetieren besteht aus einem kontinuierlichen Monolayer von Alveolarepithelzellen vom Typ I (ATI), welche für den Gasaustausch zuständig sind, und Alveolarepithelzellen vom Typ II (ATII), die durch Surfactantproduktion die Oberflächenspannung der Alveolen aufrechterhalten.

Diese Zelltypen transportieren Ionen und Flüssigkeit aus dem Alveolarraum und sorgen so für einen optimalen Gasaustausch. Bei gesunden Säugern ist die alveoläre Seite der Barriere von einem dünnen, extrazellulären Flüssigkeitsfilm überzogen, dem sogenannten *epithelial lining fluid* (ELF, Abbildung 1).

Dieser Flüssigkeitsfilm spielt eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der optimalen Oberflächenspannung der Alveolen und unterstützt die lokalen Abwehrmechanismen der Lunge, ohne den Gasaustausch zu beeinflussen (Ochs und Weibel., 1998). Eine Akkumulation von proteinreicher Flüssigkeit im Alveolarraum, wie sie beim ARDS auftritt, führt zu einer starken Beeinträchtigung des Gasaustausches.

Kommt es durch unterschiedliche Ursachen, z.B. Viren, Bakterien oder Aspiration von Mageninhalt zur direkten oder indirekten Beschädigung des Alveolarepithels, was eine Aktivierung des Immunsystems hervorruft, resultiert daraus eine erhöhte endotheliale und epitheliale Permeabilität, was zusätzlich die Transmigration z.B. vom Leukozyten und Ansammlung proteinreicher Flüssigkeit fördert. Das entstehende Ödem resultiert in Hypoxie und der Notwendigkeit einer mechanischen Beatmung. CO<sub>2</sub> kann nicht mehr ausreichend abgeatmet werden (Hyperkapnie) und dies führt zusammen mit dem entstehenden Sauerstoffmangel im Gewebe zu einem reduzierten vektorialen Natriumtransport, was die alveoläre Flüssigkeitsclearance unterdrückt (Abbildung 2).

Unter der alveolären Flüssigkeitsclearance versteht man die Flüssigkeitsverschiebung aus der Alveole ins Interstitium und ebenso zu einem nicht unwesentlichen Anteil vom Interstitium

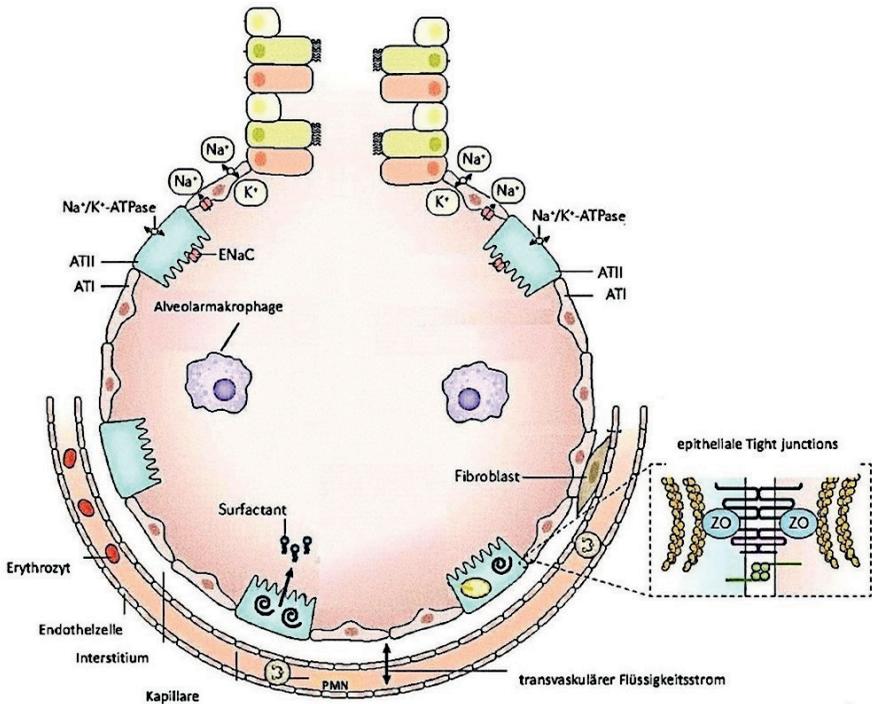
---

zurück in Lymph- und Blutgefäße. Die alveoläre Clearance beruht primär auf einem osmotischen Gradienten, der durch einen aktiven, vektoriellen Natriumtransport aufrechterhalten wird. Dieser wird hauptsächlich apikal durch den amilorid-sensitiven epithelialen Natrium-Kanal-Komplex (*epithelial sodium channel*, ENaC) sowie amilorid-insensitive Natriumkanäle und schließlich durch die basolateral befindliche Natrium-Kalium-Adenosin-Triphosphatase ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ) aufrechterhalten (Matalon und O'Brodoovich, 1999; Kellenberger und Schild, 2002). Wasser folgt dem entstehenden elektrochemischen Gradienten passiv, primär auf parazellulärem Weg.

Der gerichtete Transport von Natrium ins Interstitium und schließlich in die Blut- und Lymphgefäße durch die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  ist ein aktiver Prozess und erfolgt unabhängig von der alveolären Proteinkonzentration und vom transpulmonalen Druck (Matthay et al., 2002). Umfangreiche Forschung an menschlichen Lungen (Sakuma et al., 1994), an Tiermodellen (Serikov et al., 1993) und in flüssigkeitsgefüllten (Rutschmann et al., 1993), als auch in ventilierten, isolierten und perfundierten Lungenmodellen (Vadász et al., 2005) hat gezeigt, dass die alveoläre Clearance stark durch Hypothermie reduziert wird.

Die alveoläre Clearance wird gehemmt durch Amilorid, einen spezifischen Inhibitor des epithelialen Natriumkanals (ENaC), ebenso wie durch den  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  Inhibitor Ouabain (Ghofrani, Kohstall et al., 2001; Matthay, Folkesson et al., 2002). Ebenso ist bewiesen, dass eine Aktivierung des ENaC oder der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  zu einer erhöhten transepithelialen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  Reabsorption führt. Diese Erhöhung resultiert in einer gesteigerten Fähigkeit der Lunge zur Reabsorption von Ödemflüssigkeit (Therien und Blostein, 2000; Kaplan, 2002).

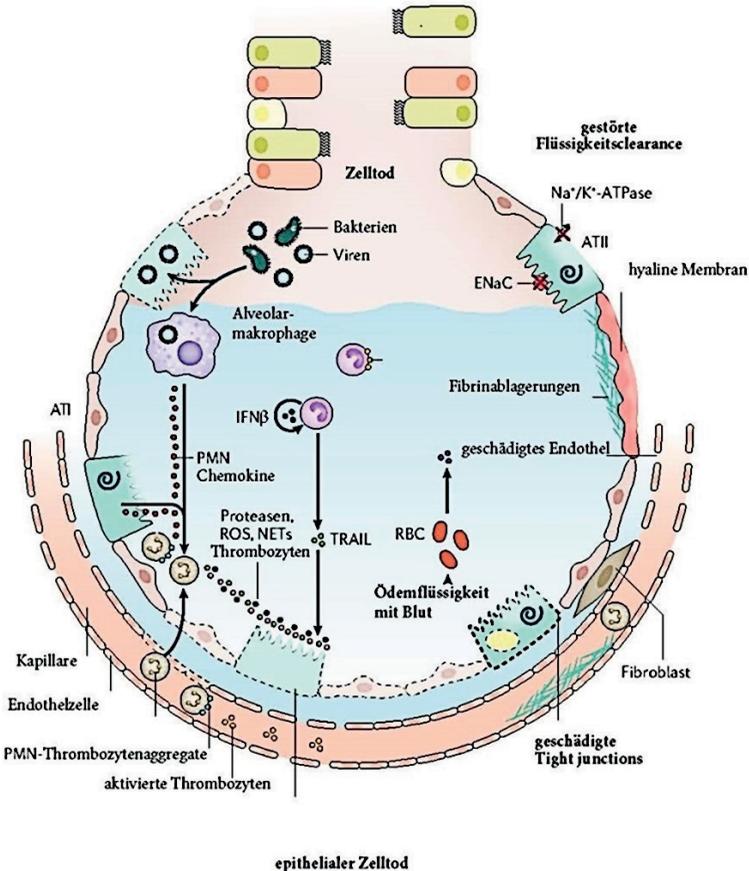
Der vektorielle Transport von Natrium, vermittelt durch apikale Natriumkanäle (ENaC) und die basolateral befindliche  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , spielen eine Hauptrolle in der Reabsorption von alveolärer Flüssigkeit.



**Abbildung 1: Schema des für den Ionen- und Wassertransport wichtigen distalen Lungenepithels – Darstellung einer gesunden Alveole**

Im gesunden Zustand transportiert der transvaskuläre Flüssigkeitsstrom Wasser und niedermolekulare gelöste Stoffe aus den Kapillaren in den interstitiellen Raum und von dort aus in die Lymphgefäße, wobei das als natürliche Barriere dienende Alveolarepithel nicht durchquert wird.

ENaC = epithelialer Natriumkanal, ATI = Alveolarepithelzellen Typ I, ATII= Alveolarepithelzellen Typ II, PMN = polymorphkernige neutrophile Granulozyten  
 [modifiziert nach Matthay et al., 2019; Nature Rev. DISEASE PRIMERS/ Article citation ID: (2019)5:18]



**Abbildung 2: Schema des gestörten alveolären Flüssigkeitstransportes-Darstellung einer geschädigten Alveole**

Durch massive Entzündungsprozesse beim ARDS kommt es zu einer erhöhten endothelialen und epithelialen Permeabilität, zur Einwanderung von Entzündungszellen (Leukozyten) und zur Ansammlung von proteinreicher Ödemflüssigkeit. Der dadurch massiv gestörte Gasaustausch, gekennzeichnet durch Hypoxämie und Hyperkapnie, führt zu einer Verminderung der Aktivität des vektorialen Natriumtransportes und damit zu einer Reduktion der alveolären Flüssigkeitsclearance.

ENaC = epithelialer Natriumkanal, AT I = Alveolarepithelzellen Typ I, AT II = Alveolarepithelzellen Typ II, PMN= polymorphkernige neutrophile Granulozyten, IFN $\beta$  = Interferon  $\beta$  (Zytokin) ROS = reaktive Sauerstoffspezies, TRAIL = Tumornekrosefaktor (TNF)-abhängiger Apoptose- induzierender Ligand

[modifiziert nach Matthay et al., 2019; Nature Rev. DISEASE PRIMERS/ Article citation ID: (2019) 5:18 ]

---

### 1.3 Tiermodelle in der Erforschung des Atemnotsyndroms

Bis in die 1980er Jahre gab es keine zufriedenstellenden Tiermodelle zur Untersuchung des pulmonalen Ödems und die Isolierung von Alveolarepithelzellen vom Typ II wurde zur Methode der Wahl. Obwohl die Auflösung des interstitiellen Ödems über die Lymphgefäße und die Mikrozirkulation der Lunge bereits von Staub in 1974 in seiner wissenschaftlichen Abhandlung über das Lungenödem diskutiert wurde, gab es keine Kenntnis über die genauen Mechanismen zur Therapie und damit zur Auflösung eines pulmonalen Ödems.

Organ- und Tiermodelle zum besseren Verständnis der Entstehungs- und Auflösungsmechanismen eines pulmonalen Ödems und/oder des ARDS haben sich mittlerweile als unverzichtbar in der Entwicklung von neuen Therapiestrategien zur Steigerung der alveolaren Clearance (*alveolar fluid clearance, AFC*) erwiesen, weil die Struktur der Lunge mit den 3 unterschiedlichen Kompartimenten Alveolarraum-Interstitium-Gefäßsystem vollständig erhalten bleibt (Matthay et al., 2005; Ghofrani et al., 2001; Vadász et al., 2005). Zudem haben sie sich als außerordentlich wertvoll in der Erforschung des aktiven transepithelialen Natriumtransportes als Basis des alveolären Flüssigkeitstransportes, bei der Identifizierung von ENaC sowie anderen Kanälen oder der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  als zugrundeliegende Schlüsselmoleküle herausgestellt (Vadász et al., 2005; Morty et al., 2007). Bezüglich der Ventilation von am akuten Atemnotsyndrom erkrankten Patienten konnte mit Hilfe von Tiermodellen eine Reduzierung sowohl der Permeabilität als auch der proinflammatorischen Zytokinfreisetzung mit Hilfe einer durch geringeres Atemvolumen und höher eingesetztem endexpiratorischem Druck („*positive end-expiratory pressure, PEEP*“) charakterisierten Beatmung erreicht werden. Diese sogenannte lungenprotektive Beatmungsstrategie wird heute klinisch angewendet, um die Gefahr eines beatmungsinduzierten Atemnotsyndroms („*ventilator-induced lung injury*“, „*ventilator-associated lung injury*“) zu minimieren (Corbridge et al., 1990; Ranieri et al., 1999; Lecuona et al., 1999; Brower et al., 2000; Frank et al., 2002).

Studien an humanen Lungen waren stark von der Erfassung des extravasalen Lungenwassers abhängig (Lange und Schuster, 1999). Ebenso wurde die Messung der nasalen Potentialdifferenz stellvertretend für die Abschätzung des transepithelialen Ionentransportes entwickelt, was sich aber für Erkrankungen, bei denen es ausschließlich auf die Erfassung des gehemmten alveolären Flüssigkeitstransportes ankommt, als eine nicht geeignete Methode herausstellte (Knowles et al., 1981).

1982 wurde mit Hilfe eines Modells von anästhesierten, ventilerten Schafen bewiesen, dass an der Aufrechterhaltung des physiologischen Flüssigkeitsgehaltes der Lunge

---

aktive Ionentransportprozesse beteiligt sind (Goodman und Crandall, 1982; Mason et al., 1982; Matthay et al., 1982) und damit ein neues Forschungsfeld bezüglich des Abbaus eines pulmonalen Ödems, nicht zuletzt im Zusammenhang mit dem akuten Lungennotsyndrom (*Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS*), eröffnet. Die Existenz dieser Ionentransportprozesse wurde durch Nachweis der Hemmung der aktiven Transportprozesse von bei 18°C perfundierten in-situ Ziegenlungen (Serikov et al., 1993) und in isolierten, perfundierten und flüssigkeitsgefüllten Rattenlungen (Rutschman et al., 1993) bestätigt. Dass aktive Transportmechanismen eine wesentliche Rolle bei der alveolären Flüssigkeitsclearance spielen, wurde zusätzlich durch Hemmung des epithelialen Natrium-Kanals (ENaC) durch den spezifischen Inhibitor Amilorid und durch gezielte Deletion der beiden Allele für  $\alpha$ ENaC in Mäusen bewiesen. Amilorid hemmt 40–70% der basalen Flüssigkeitsclearance bei Schafen, Kaninchen, Ratten, Mäusen und in der humanen Lunge. Eine Applikation von Amilorid bei neugeborenen Meerschweinchen führte zur Entstehung eines Atemnotsyndroms, Hypoxämie und erhöhtem extravaskulärem Lungenwasser (Matthay et al., 2002; O’Brodivich et al., 1990). Die Deletion der ENaC-Allele führte zum Tod etwa 40 Stunden nach der Geburt als Folge eines stark beeinträchtigten alveolären Flüssigkeitstransportes (Hummler et al., 1996). Umgekehrt führte eine Überexpression des ENaC in den unteren Atemwegen von Mäusen zu einer deutlichen Beschleunigung des Flüssigkeitstransportes und ließ auf eine Beteiligung des epithelialen Natriumkanals am aktiven Flüssigkeitstransport schließen (Mall et al., 2004).

Die Lokalisation von ENaC in der apikalen Oberfläche der Typ II Alveolarepithelzellen und seine Funktion als Natriumkanal führten zu weiteren Untersuchungen in lebenden Tieren und isolierten Organmodellen und zu der Erkenntnis, dass die treibende Kraft hinter der ENaC-vermittelten Natriumaufnahme die in der basalen Membran der Epithelzellen lokalisierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase darstellt (Sznajder et al., 2002). Bestätigt wurde diese Erkenntnis durch die Anwendung von Ouabain, einem potenten spezifischen Inhibitor der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase. Der Einsatz in isolierten, perfundierten und flüssigkeitsgefüllten Mauslungen führte zu einer Hemmung des alveolären Flüssigkeitstransportes (Icard et Saumon, 1999).

Nicht nur die Erforschung der für den alveolären Flüssigkeitstransport verantwortlichen Moleküle, sondern auch Reaktionen der Lunge auf veränderte Umweltverhältnisse können in solchen Modellen erforscht werden. Ein wichtiges Charakteristikum des akuten Atemnotsyndroms ist der Schweregrad der auftretenden Hypoxie. In isolierten, ventilierten und perfun-

---

dierten Rattenlungen führte eine Exposition gegenüber Hypoxie zu einer erhöhten Permeabilität der alveolo-kapillären Barriere, was zu einem alveolären Lungenödem durch eine deutliche Verringerung des alveolären Flüssigkeitstransportes führte (Dehler et al., 2006). Die schnelle Wiederherstellung der durch hypoxische Bedingungen gehemmten alveolären Clearance durch  $\beta$ 2-Agonisten ließ auf geänderte intrazelluläre Transportmechanismen unter Hypoxie schließen (Vivona et al., 2001). Dada et al. konnten 2003 nachweisen, dass es unter Sauerstoffmangel zu einer Endozytose der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase von der basalen Membran der Alveolarepithelzellen und damit zu einer Verringerung der Clearance kommt.

Das Vermögen von  $\beta$ -adrenergen Agonisten, den alveolären Flüssigkeitstransport zu stimulieren, wird nach einigen Untersuchungen in Tier- und Organmodellen, z.B. in anästhesierten Schafen (Berthiaume et al., 1987) oder in isolierten Puffer-perfundierten Rattenlungen (Crandall et al., 1986) der Rekrutierung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase von intrazellulären Pools zur basolateralen (Bertorello et al., 1999) und von ENaC zur apikalen Membran von Alveolarepithelzellen zugeschrieben. Darüber hinaus können  $\beta$ -Agonisten zur Auflösung des durch Hypoxie oder maschinelle Beatmung hervorgerufenen Lungenödems in Tieren beitragen (Salidas et al., 2000), was ein therapeutisches Potential für  $\beta$ -adrenerge Agonisten in der Behandlung des akuten Atemnotsyndoms erwarten ließ.

Für den Bereich der translationalen Forschung, der schnellen und effizienten Umsetzung präklinischer Forschung in die klinische Entwicklung, spielen auch für das ARDS Modelle im nichtmenschlichen Primaten (NHP, non human primate) eine wichtige Rolle. Zu betonen ist hierbei aber, dass die Genehmigung von Studien im NHP sehr stark reglementiert wird und diese nur dann eingesetzt werden, wenn die aus diesen Studien zu erwartenden Daten nicht durch andere Ersatzmethoden (Modell in einem dem NHP untergeordneten Tier oder ex vivo Modellen) generiert werden können.

So existiert ein Modell in Neuweltaffen (*Callithrix jacchus*, Krallenaffen), bei dem durch tracheale Applikation des Zytostatikums Bleomycin eine pulmonale Fibrose ähnlich der beim humanen ARDS induziert werden konnte. Nach Behandlung wurde ein initiales pulmonales Ödem, gefolgt von einer akuten interstitiellen Entzündungsreaktion beobachtet, was im Endstadium zu einer massiven Reduktion der Lungendehnbarkeit (Compliance) durch Entwicklung einer Fibrose führte (Idell et al., 1989).

Auf Grundlage der Gemeinsamkeiten in der Anatomie des Respirationstraktes und Physiologie während einer durch gram-negative Erreger hervorgerufenen Sepsis gelten Modelle im Pavian (*Papio spp.*) als geeignete Modelle für das durch Sepsis hervorgerufene ARDS im Menschen.

---

Um Langzeitfolgen des ARDS zu untersuchen, nutzen Keshari et al. das LD50 E. coli (mittlere letale Dosis - Echerichia coli, gram-negatives Kolibakterium) Modell im Pavian. Hierbei sollte die Entwicklung von ARDS assoziierten, fibrös-entzündlichen Veränderungen bis zu 27 Monate nach Verabreichung verfolgt werden. In diesem Pavianmodell konnten alle Stadien des humanen ARDS reproduziert und als Spätschäden die Lungenfibrose und eine chronische Entzündung beschrieben werden (Keshari et al., 2017).

Organ- und Tiermodelle des akuten Atemnotsyndroms zusätzlich zu durchgeführten klinischen Studien haben zu einem besseren Verständnis der Beteiligung von gestörter alveolärer Clearance an der Entstehung und Persistenz des akuten Atemnotsyndroms geführt. Die Auflösung des entstehenden Lungenödems ist wichtig für die Überlebensprognose des Patienten. Auch andere Möglichkeiten der Therapie wurden in solchen Systemen entwickelt, so zum Beispiel zusätzlich zur protektiven Beatmung mit niedrigen Tidalvolumina weitere Ventilationsstrategien, Austausch/Substitution von Surfactant, unterschiedliche Ansätze für das Flüssigkeitsmanagement, Inhalation von Vasodilatoren und Anwendung nicht glukokortikoider antiinflammatorischer Agentien (Morty et al., 2007). Tier- und Organmodelle werden ohne Zweifel auch in Zukunft wichtige Instrumente in der Entwicklung weiterer Möglichkeiten der Erhöhung des alveolären Flüssigkeitstransportes während des Atemnotsyndroms darstellen (Morty et al., 2007).

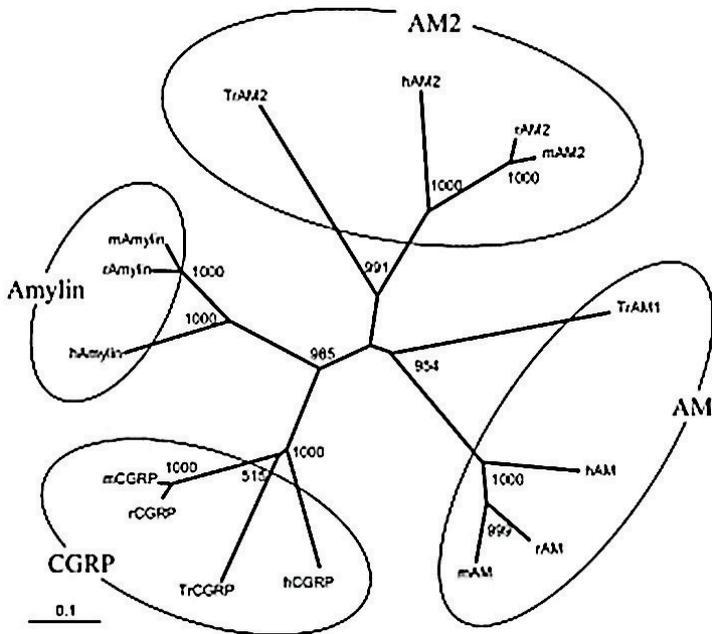
#### 1.4. Die Kalzitonin-Peptid-Familie

Zu dieser Peptidhormonfamilie werden **Kalzitonin (CT)**, **Amylin (AMY)**, „**Kalzitonin-Genverwandtes-Peptid**“ (CGRP), **Adrenomedullin (AM oder AM1)** und **Intermedin/AM2 (IMD/AM2)** gezählt.

In Säugetieren entfalten diese Peptide ihre physiologischen Wirkungen über zwei nah verwandte G-Protein gekoppelte Rezeptoren vom Typ II. Hierbei handelt es sich um den Kalzitonin Rezeptor (CTR; Lin et al., 1991a, b) und den Kalzitonin Rezeptor-ähnlichen Rezeptor (CRLR; Flühmann et al., 1995). Die pharmakologische Spezifität der Rezeptoren wird durch 3 akkessorische Proteine, die „receptor-activity modifying proteins“ (RAMPS 1-3) bestimmt. RAMP`s werden für den Transport des Kalzitonin Rezeptor-ähnlichen Rezeptors (CRLR, calcitonin receptor-like receptor) zur Zelloberfläche benötigt und werden auch deshalb als molekulare Chaperone bezeichnet (Bomberger et al., 2005a, b). Sie regulieren die Spezifität des Rezeptors und damit die Rezeptorbindung in einer der für die jeweiligen RAMP-Isoform charakteristischen Weise.

Bei AM und CGRP Rezeptoren spielt ein noch ein weiteres akzessorisches Protein eine Rolle, das sogenannte CGRP oder [RCP; „receptor component protein“] (Bell und McDermott, 2007).

Basierend auf funktionellen Charakteristika können diese 5 Peptide in 2 unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden: Zu der ersten Gruppe werden Kalzitonin und Amylin gezählt, die über den Kalzitonin Rezeptor (CTR) ihre physiologischen Wirkungen entfalten. CGRP, AM und IMD/AM2 werden der Gruppe zugerechnet, die über eine Aktivierung des Kalzitonin Rezeptor-ähnlichen Rezeptor (CRLR) agiert (Poyner et al., 2002; Roh et al., 2004).



**Abbildung 3: Phylogenetischer Baum von in Maus (m), Mensch (h) und Kugelfisch (Tr) isoliertem IMD/AM2, AM und CGRP und Amylin**

(aus [www.phoenixbiotech.net/Files/Intermedin/Intermedin.html](http://www.phoenixbiotech.net/Files/Intermedin/Intermedin.html))

---

### 1.4.1 Intermedin/Adrenomedullin 2 (IMD/AM2) und Adrenomedullin (AM/ AM1)

Im Jahr 2004 wurde von 2 unabhängigen Forschergruppen ein Peptid als neuestes Mitglied der Kalzitonin-Peptid-Familie isoliert, das Adrenomedullin 2 (AM2) (Takei et al., 2004) oder Intermedin (IMD): „Substanz im intermediären (Zwischen-) Lappen der Hypophyse“ (Rho et al., 2004). Heute wird Intermedin mit der Bezeichnung IMD/AM2 gekennzeichnet, um eine Verwechslung mit dem 1958 von Lee und Lerner isolierten Melanozyten-stimulierenden Hormon (MSH, oder auch „Intermedin“) zu vermeiden.

IMD/AM2 wird nahezu in allen endokrinen Organen der Hypothalamus –Hypophysenachse und in der Niere- u.a. in den renalen Arteriolen- zusammen mit seinen Rezeptoren exprimiert. Es kann also als ein Neurotransmitter - wie auch Adrenomedullin –

oder ein Modulator im Gehirn und als parakriner/autokriner Regulator in der zentralen und peripheren Regulation des Kreislaufsystemes und der Wasser-Elektrolythomöostase angesehen werden (Bell und Mc Dermott, 2008; Eto 2001; Takahashi 2001; Kitamura et al., 2002). IMD/AM2 stimuliert die Freisetzung des adrenokortikotropen Hormons (ACTH), Prolaktin und Oxytocin, aber unterdrückt die Freisetzung des Wachstumshormons Somatotropin (STH).

Intermedin-Transkripte wurden zusätzlich in einer Vielzahl von Organen entdeckt, z.B. im Herz - v.a. im Endothel der Herzvenen und der glatten Muskulatur der Koronararterien -, der Lunge, im Reproduktionstrakt (Ovarien, Plazenta und Uterus), im Verdauungstrakt (Pankreas, Oesophagus, Magen, Dünndarm, Colon und Rektum) und in Fettgewebe. Beim Kugelfisch (*Takifugu rupripes*), aus dem IMD/AM2 erstmals überhaupt isoliert wurde, wird es ausschließlich im Gehirn exprimiert (Ogoshi et al., 2003; Kindt et al., 2007; Morimoto et al., 2007; Roh et al., 2004; Takahashi et al., 2006; Takei et al., 2004, Chauhan et al., 2009; Wong et al., 2013).

Das Expressionsmuster von IMD/AM2 entspricht nahezu dem von AM, welches ubiquitär aus verschiedenen Zelltypen isoliert wurde, einschließlich Neuronen, Astrozyten, Fibroblasten, Makrophagen und Adipozyten (Satoh et al., 1996, Takahashi et al., 2000, Tomoda et al., 2001; Nakayama et al., 1999, Li et al., 2003). IMD/AM2 konnte aus adrenokortikalen Tumoren isoliert werden, z.B. aus Aldosteron-produzierenden Adenomen und Pheochromozytomen. Ebenso wie Adrenomedullin, welches erstmals 1993 aus dem humanen Pheochromozytom und darauffolgend aus Lungen, den Nieren und Blutgefäßen isoliert werden konnte (Eto, 2001; Kitamura et al., 1993, Sugo et al., 1994), wird auch IMD/AM2 durch seine Wirkung auf die Zell- und Blutgefäßentwicklung sowie seine Hochregulation unter Hypoxie eine Be-

---

teilung bei der Tumorentstehung zugeschrieben (Hay et al., 2011). Intermedin kann vor allem unter hypoxischen Bedingungen - ebenso wie auch Adrenomedullin - produziert werden und damit das Tumorwachstum und Metastasierung durch eine Förderung der Angiogenese noch unterstützen (Nakamura M et al, 2006; Nakayama et al, 1998). Für AM ist bewiesen, dass es das Zellwachstum begünstigt, die Lebensdauer von Zellen verlängert und eine wichtige Rolle in Angiogenese und Alveolarisierung der Lunge in der normalen Entwicklung spielt (Vadivel et al., 2010). Die Expression von AM kann durch verschiedene Stressfaktoren, z.B. Hypoxie, inflammatorische Zytokine und oxidativen Stress hervorgerufen werden (Sugo et al., 1994 a; Nakayama et al., 1998; Takahashi, 2001). Eine Erhöhung des Plasma-AM wurde bei unterschiedlichen Krankheitsbildern entdeckt, z.B. bei Bluthochdruck, Nierenerkrankungen, Herzerkrankungen oder septischem Schock (Eto, 2001).

Durch Yang et al. konnte 2006 festgestellt werden, dass IMD/AM2 perfundierte Rattenherzen vor Ischämie/Reperfusionsschäden schützt (Yang et al., 2006a, b). Ebenso wurde eine Erhöhung von IMD/AM2 während des Auftretens von myokardialen oxidativem Stress bemerkt (Pan et al., 2005). Die erhöhte Expression in Herzen von Ratten mit kongestiver Herzinsuffizienz, wie sie bereits bei AM beobachtet wurde, lässt darauf schließen, dass mit IMD/AM2 ein wichtiger Regulator der Herzfunktion isoliert wurde (Hirose et al., 2008, Totsune et al., 2000). Intrazerebroventrikulär verabreicht stimuliert es das sympathische Nervensystem und führt zu einem Ansteigen des Blutdruckes.

In Säugetieren zeigt AM potente vasodilatatorische Effekte, hauptsächlich durch Herabsetzen des peripheren Gefäßwiderstandes. Dieser Effekt konnte durch intravenöse Applikation in normalen als auch spontan hypertensiven Ratten erzeugt werden (Fujisawa et al., 2007). Neben diesem vasodilatatorischen Effekt hat AM ebenso diuretische, bronchodilatatorische und positive inotrope Wirkung, sowie eine regulierende Funktion auf die Ausschüttung von Aldosteron und adrenokortikotrope Hormone.

Die intravenöse Gabe von IMD/AM2 führt zu einem verminderten arteriellen Druck und induziert Antidiurese und Antinatriurese in Mäusen (Takei et al., 2004b).

IMD/AM2 gilt als Stabilisator der endothelialen Permeabilität (Pfeil et al., 2009). Der Nachweis der Expression von IMD/AM2 in Endothelzellen der Lunge und deren Stimulation durch Hypoxie konnte erbracht und damit frühere Studien bezüglich der Induzierbarkeit durch den Stressfaktor Hypoxie bestätigt werden (Pfeil et al., 2009). IMD/AM2 gilt nach Pfeil et al. als neues, durch Hypoxie induziertes Peptid. IMD/AM2 wird eine Rolle als vermittelndes Agens für die Verbesserung der Funktion des Lungenendothels nach Reaktion auf Entzündungsreize

---

zugeschrieben. Bis zum heutigen Zeitpunkt existieren keine Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen von Intermedin auf das Lungenepithel.

Müller et al. konnten 2011 die Reduktion pulmovaskulärer Permeabilität in Mäusen nachweisen, bei denen vorher durch eine Beatmung mit Tidalvolumina von 12ml/kg über 6 h und anschließende Behandlung mit IMD (25µg/kg x h) ein beatmungsinduziertes ARDS induziert wurde (Müller-Redetzky et al., 2011).

Unser Ziel ist es, durch Anwendung von IMD/AM2 in unserem neu etablierten System der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge und zusätzlicher Zellkultorexperimente die Auswirkungen von IMD/AM2 auf das Alveolarepithel und den alveolären Flüssigkeitstransport zu erforschen und auf diese Weise möglicherweise ähnlich positive Effekte von IMD/AM2 zu entdecken, wie sie bereits vom Lungenendothel beschrieben sind. Hierbei gehen wir davon aus, dass die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase die Hauptrolle bei den durch IMD/AM2 hervorgerufenen positiven Effekten auf das Alveolarepithel spielt, was sich letztendlich in einer von uns erhofften Steigerung der alveolären Flüssigkeitsclearance zeigen wird.

#### **1.4.2 cAMP und die cAMP-abhängige Proteinkinase A**

Das Musterbeispiel der zyklischen Adenosin 3', 5'-Monophosphat (cAMP) Signaltransduktion in der Zelle ist seit über 40 Jahren dank sorgfältiger Forschung bekannt. Der Mechanismus der cAMP-Signaltransduktion gilt damit als einer der am besten verstandenen Signalwege.

Die Proteinkinase A (PKA) wurde in den 1960er Jahren im Labor von Edwin G. Krebs entdeckt. Drei Nobelpreise wurden für die Erforschung dieses bekannten Signalweges bereits vergeben, den ersten erhielt 1971 Earl Sutherland für die Entdeckung von cAMP, der zweite ging 1992 an Edmont Fischer und Edwin Krebs für die Entdeckung der PKA und ihrer Rolle in der reversiblen Protein-Phosphorylierung als biologischer Regulationsmechanismus. Den dritten Nobelpreis konnten 1994 Alfred Gilman und Martin Rodbell für die Entdeckung der Rolle des G-Proteins im cAMP-Signalweg entgegennehmen (Chin et al., 2002). Normalerweise führt die Bindung eines Hormones an seinen Rezeptor zur Kopplung des Rezeptor-Hormon-Komplexes an ein zelluläres Guanin- Nucleotid- bindendes Protein (G-Protein), welches mit der Adenylatzyklase agiert und sie zur Bildung von cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) - dem sekundären Botenstoff dieses Signalweges - aktiviert. Die Effekte von cAMP sind durch seinen Rezeptor, die cAMP-abhängige Proteinkinase A, vermittelt. Die

---

cAMP-abhängige Proteinkinase A ist in unzählige zelluläre Prozesse involviert, z.B. Modulation von anderen Proteinkinasen, Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration und Regulation der Transkription.

In ihrer inaktiven Form existiert die PKA als ein Tetramer, welches aus je zwei unterschiedlichen Untereinheiten, der regulatorischen R-Untereinheit sowie der katalytischen C-Untereinheit besteht. Man unterscheidet 2 R-Untereinheiten, deren Isoformen als RI $\alpha$  und RI $\beta$  und RII $\alpha$  und RII $\beta$  bezeichnet werden. Bei den 2 katalytischen Untereinheiten werden C $\alpha$ , C $\beta$  und C $\gamma$  unterschieden (Chin et al., 2002). In Abwesenheit von cAMP werden durch die R-Untereinheiten die Substratbindungsstellen der C-Untereinheiten blockiert.

Die Bindung von cAMP führt zur Dissoziation der katalytischen Untereinheiten und zurück bleibt ein Dimer aus 2 regulatorischen Untereinheiten mit 4 gebundenen cAMP-Molekülen. Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung, einer reversiblen Phosphorylierung, welche eine Abdissoziation der beiden C-Untereinheiten auslöst. Die 2 regulatorischen Einheiten binden ATP, werden dann aktiviert und können dann Serin- und Threoninreste an Proteinen phosphorylieren und so diese Proteine aktivieren. Eine wichtige Rolle spielt nicht zuletzt die Aktivierung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase durch die Proteinkinase A.

Heute ist allgemein bekannt, dass dieser Signalweg als einer der wichtigsten in der eukaryotischen Zelle gilt. Nichtsdestotrotz wurden in den letzten Jahren unerwartete neue Erkenntnisse bezüglich der Komplexität und Vielseitigkeit dieses Signalweges in der Regulation zellulärer Funktionen gewonnen (Chin et al., 2002).

### **1.4.3 Die Funktion der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase**

Die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase stellt ein Transmembranprotein dar, welches an der basolateralen Membran eukaryotischer Zellen exprimiert wird. In einem ATP-verbrauchenden, aktiven Prozess werden die Gradienten von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> der Plasmamembran durch Herausschleusen von 3Na<sup>+</sup>-Ionen im Austausch gegen 2K<sup>+</sup>, die in die Zelle eingebracht werden, aufrechterhalten. Die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase ist ein heterodimeres Holoenzym, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit besitzt Bindungsstellen für Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Nukleotide und den klassischen Inhibitor der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase - das Glykosid Ouabain - und wird durch ATP phosphoryliert (Matthay et al., 2002).

---

Vier Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheit konnten identifiziert werden, jeweils mit unterschiedlicher Gewebeverteilung, wobei die  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Untereinheit im Alveolarepithel der Lunge exprimiert werden. Die glykolysierte  $\beta$ -Untereinheit, ein kleineres Polypeptid, reguliert den Einbau in die Membran und die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (Matthay et al., 2002; Rajasekaran et al., 2001). Die 4  $\beta$ -Isoformen werden in einer gewebe- und zellspezifischen Weise exprimiert. Zusätzlich zu diesen beiden Untereinheiten wurde ein kleines, transmembranäres Protein der FXFD- Familie als  $\gamma$ -Untereinheit identifiziert, welches in einigen Geweben mit den beiden anderen Untereinheiten assoziiert ist (Matthay et al., 2002).

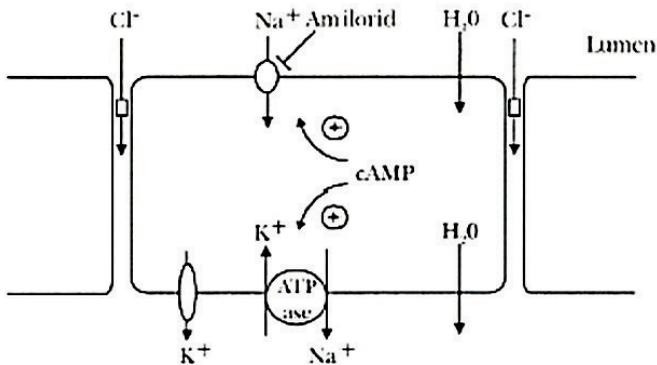
In der Lunge spielt die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  für die Aufrechterhaltung des transepithelialen osmotischen Gradienten, den vektoriellen Natriumtransport und damit für die Lungenclearance eine entscheidende Rolle:

Die primär treibende Kraft der Flüssigkeitsresorption vom Alveolarraum der Lunge ins Interstitium und die pulmonale Zirkulation ist der aktive Natriumtransport. Natrium wird mittels amilorid-sensitiver und -nichtsensitiver Natriumkanäle an der apikalen Membran der Alveolarepithelzellen in die Zellen aufgenommen und mittels der in der basolateralen Membran befindlichen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  wieder aus der Zelle „gepumpt“. Durch diesen Transport entsteht ein osmotischer Gradient, dem Wasser passiv von der apikalen Seite des Alveolarepithels (Alveolarraum) zur basolateralen Seite (Interstitium) parazellulär oder durch Aquaporin-5 Kanäle, die sich in Alveolarepithelzellen Typ II befinden, folgt (Vadász et al., 2007). Natrium kann durch verschiedene Kanäle und Transporter in die Zelle gelangen (amilorid-sensitiv und -nichtsensitiv Natriumkanäle, Kotransporter), aber die einzige Möglichkeit, über die Alveolarepithelzellen Natrium aktiv aus der Zelle befördern können, ist die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (Sznajder et al., 2002).

Die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in der Plasmamembran ist kurzfristig reguliert durch kovalente oder allosterische Modifikation und/oder Transport der zugehörigen Untereinheiten zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Pools, langfristig durch Änderungen der Synthese und/oder der Degradation der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (Matthay et al., 2002; Azzam und Sznajder, 2015). Die Regulation der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  unterliegt einer großen Anzahl im Blut zirkulierender Hormone, die sowohl kurzfristige, als auch langfristige Kontrolle auf die Aktivität ausüben können. Die langfristige Regulation, z.B. durch Thyroidhormone und Aldosteron, wird durch Veränderungen in der Genexpression, also auch auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene, vermittelt. Hierbei spielt jedoch eine Änderung der katalytischen Eigenschaften der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  keine Rolle.

Katecholamine führen über die reversible Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  zu einer kurzfristigen Aktivitätserhöhung. Schließlich kommt es in einigen Geweben durch schnelles Einwirken von Insulin, Aldosteron und Karbachol zur Änderung der subzellulären Verteilung der Untereinheiten der Natriumpumpe und zur Änderung der Verfügbarkeit der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Moleküle an der Zelloberfläche durch Rekrutierung aus intrazellulären Pools. Für den durch Aldosteron hervorgerufenen Mechanismus konnte eine Hemmung durch Colchicin, ein Zellgift, welches das mikrotubuläre Transportsystem zerstört, nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wird angenommen, dass die kurzfristige Aktivierung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  eine Rekrutierung von in intrazellulären Pools vorliegenden, inaktiven  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Untereinheiten zur Plasmamembran, vermittelt durch das mikrotubuläre Netzwerk, darstellt.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Flüssigkeitsresorption über das Alveolarepithel,**

Die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  stellt die treibende Kraft für den vektoriellen Flüssigkeitstransport vom Alveolarraum ins Interstitium der Lunge dar.

(Winkler, Dissertation Universität Ulm, 2006).

---

#### 1.4.4. Die Alternative zum klassischen cAMP-abhängigen Signalweg: die cAMP-unabhängige Aktivierung der Proteinkinase A

Durch Vinciguerra et al. konnte 2005 ein neuer cAMP-unabhängiger Mechanismus der Aktivierung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase in den Sammelrohren der Niere nachgewiesen werden: Nach deren Beschreibung führt eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Na}^+$  zur Dissoziation eines zytosolischen PKAc/I $\kappa$ B $\alpha$ /p65-NF- $\kappa$ B-Komplexes über den klassischen NF- $\kappa$ B Kinase (IKK)-abhängigen Signalweg. Hierbei gilt intrazelluläres Natrium als der am wichtigsten hormonelle Faktor, der zur Regulation der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase-Aktivität beiträgt, da jeder Anstieg oder Abfall der intrazellulären Natriumkonzentration die Aktivität entweder ansteigen oder absinken lässt (Skou et al., 1957).

Bei NF- $\kappa$ B („*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*“) handelt es sich um einen Proteinkomplex, der für die Kontrolle der Transkription von DNA eine Rolle spielt. NF- $\kappa$ B ist in zelluläre Prozesse als Antwort auf Stimuli wie Stress, Zytokine, freie Radikale, ultraviolette Strahlung, virale und bakterielle Antigene involviert und kann in nahezu allen tierischen Zelltypen gefunden werden (Gilmore et al., 2006; Perkins et al., 2007; Brasier et al., 2006). Normalerweise wird die Proteinkinase A, ein Heterotetramer, welches aus 2 katalytischen (PKAc) und 2 regulatorischen Einheiten besteht (Francis et al., 1994, Scott et al., 1991; Taylor et al., 1990), über den klassischen cAMP-Signalweg durch Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten und dadurch Freisetzung der aktivierten katalytischen Untereinheiten aktiviert.

Vinciguerra und seine Kollegen konnten zeigen, dass die erhöhte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration die IKK-Aktivität stimuliert. Hierbei wurde festgestellt, dass I $\kappa$ B $\alpha$  vermehrt in schnelle und kurzfristige Regulationsmechanismen involviert ist, während I $\kappa$ B $\beta$  mehr für die langsamere und dafür längerfristige Regulation von NF- $\kappa$ B, einschließlich Transkription und Translation, verantwortlich zu sein scheint.

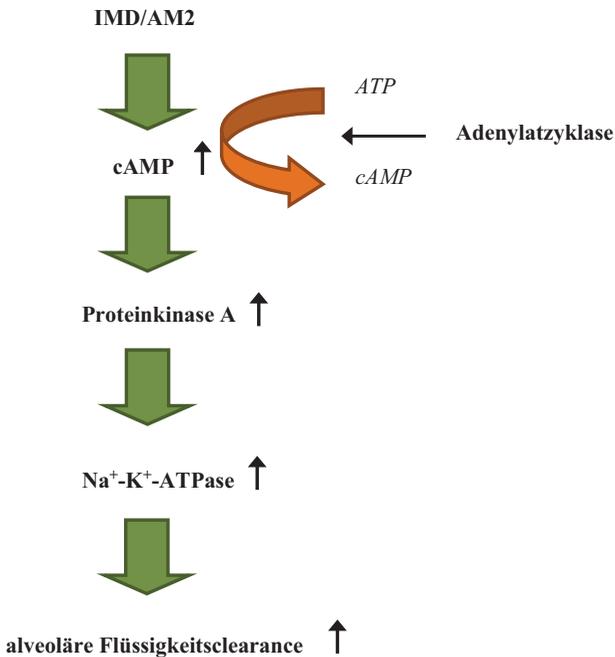
Innerhalb des zytosolischen Komplexes haben I $\kappa$ B-Proteine die Aufgabe, die Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B-Familie in einem inaktiven Zustand zu halten. Durch die Phosphorylierung einer aktivierten NF- $\kappa$ B Kinase kommt es zur Dissoziation des Komplexes und die I $\kappa$ B-Proteine werden durch Proteasomen abgebaut, was zur Freisetzung der Einzelkomponenten - unter anderem der PKAc Untereinheit - des Komplexes führt. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wird durch diese Dissoziation aktiviert und die Translokation in den Zellkern folgt. Die erhöhte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration triggert demnach die Dissoziation eines endogenen

---

PKAc/I $\kappa$ B $\alpha$ /p65-NF- $\kappa$ B-Komplexes, was zu einer cAMP-unabhängigen Aktivierung der Proteinkinase A durch freierwerdende katalytische PKA – Untereinheiten (PKAc) und damit zur Rekrutierung von Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Molekülen aus intrazellulären Kompartimenten zur Zelloberfläche in Zellen der Sammelrohre von Säugetiermieren führt. Allerdings ist weiterhin unklar, ob die auf diese Weise aktivierte Proteinkinase direkt die Translokation von Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Molekülen zur Zelloberfläche bewirkt und/oder ob weitere Signalmoleküle involviert sind (Vinciguerra et al., 2005).

## 2 Hypothese

Intermedin/ Adrenomedullin 2 (IM/AM2) entwickelt positive Effekte auf die Funktionen des Alveolarepithels, indem es durch Aktivierung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  über Adenylatzyklase, Erhöhung des sekundären Botenstoffes cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und Proteinkinase A (PKA) die Schlüsselrolle der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in der Reparatur und Aufrechterhaltung der Integrität des Alveolarepithels verstärkt und somit zur Erhaltung oder Wiederherstellung des optimalen Flüssigkeitsgleichgewichtes in der Lunge beiträgt.



---

### 3 Zielsetzung

Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen zum akuten Atemnotsyndrom sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Aufgabenstellungen bearbeitet werden:

- *Etablierung eines neuen Systems der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge*
- *Überprüfung der Anwendbarkeit auf die Untersuchung des Alveolarepithels der Maus mittels bereits bekannten pharmakologischen Modulatoren*
- *Etablierung von Intermedin/Adrenomedullin2 als neuer, vielversprechender Mediator der Integrität des Alveolarepithels*

---

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Die isolierte, ventilierte und perfundierte Mauslunge

Experimente auf physiologischer Ebene wurden in einem neu etablierten System der isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslunge durchgeführt. Als Grundlage für die Entwicklung diente ein bereits etabliertes Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Kaninchenlunge (Seeger et al., 1994).

Das Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslunge machte es möglich, die Funktion des Alveolarepithels in einem intakten ex-vivo Organ zu untersuchen. Mechanische Ventilation und Perfusion mit einem blutfreien, synthetischen Perfusat erlaubte es uns, Experimente unter stabilen Konditionen über mehrere Stunden durchzuführen und in Echtzeit Änderungen in der Funktion der alveolokapillären Barriere, unabhängig von humoralen, metabolischen oder zentralnervösen Einflüssen des Gesamtorganismus, zu untersuchen. Dieses System gestattete eine kontinuierliche Messung und Datenaufzeichnung von Lungenfunktionsparametern, wie z.B. Ventilationsdruck, pulmoarterieller und venöser Druck, Flüssigkeitsgleichgewicht und Membranpermeabilität.

#### 4.1.1 Präparation und Isolation der Lunge

Die vorliegende Studie wurde unter dem Aktenzeichen „V 5-1 - 19 c 20/15 c GI 20/10“ durch das Regierungspräsidium Gießen, Dezernat V54-Vetereinarwesen genehmigt.

Die Lungen wurden von männlichen, 25-27g schweren Mäusen (C57Bl/6N; Charles River Laboratories, Research Models and Services, Sulzfeld, Deutschland) isoliert. Die Tiere wurden vor der Präparation durch intraperitoneale Injektion einer Mischung aus 250µl Ketamin (Ketavet 100mg/ml Pfizer Pharmacia GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 250µl Xylazin (Rompun, 2%ige Injektionslösung, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) im Verhältnis 1:1 mit 500µl NaCl (0,9%, isotonisch, Laboratori Diaco Biomedical Triest, Italien, Vertrieb durch Serag Wiessner, Deutschland) betäubt. Injiziert wurden 0,1ml pro 10g Körpergewicht. Damit wurde sichergestellt, dass die Tiere sich von Beginn der Präparation an in einer tiefen Anästhesie befanden und durch Blutentzug während der Isolation der Lunge verstarben.

Zusätzlich wurde zur Antikoagulation eine Mischung mit dem Verhältnis 3:1 aus NaCl (0,9%, isotonisch, Laboratori Diaco Biomedical Triest, Italien, Vertrieb durch Serag Wiessner, Deutschland) und Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Deutschland) intraperitoneal injiziert.

---

Zunächst wurden die Mäuse in einer aufrecht-hängenden Position durch vorsichtige Fixation der Vordergliedmaßen befestigt.

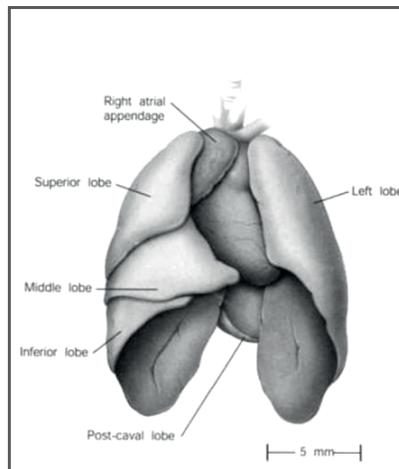
Die tief narkotisierten Tiere, die weiterhin Spontanatmung zeigten, wurden unter lokaler Anästhesie mit 2%igem Xylocain (20mg/ml; AstraZeneca, Wedel, Deutschland) zunächst mittels Tracheotomie intubiert. Dazu wurde das Fell /die Haut von der Bauchmitte bis zu den Unterkieferästen des Tieres inzidiert und die Tonsillen auseinandergespreizt, um die Trachea durch stumpfe Entfernung der über der Trachea liegenden Muskulatur freizulegen. Als nächstes wurde ein Bindfaden unterhalb der Trachea durchgeführt und ein Knoten vorgelegt. Oberhalb des Knotens wurde die Trachea eröffnet, das Tier mittels Trachealkanüle (Harvard Apparatus, Tracheal Cannula for Mouse, OD 1.0mm, L 15mm) intubiert und diese mit dem vorgelegten Faden in der Trachea fixiert. Da die spätere intratracheale Applikation der Medikamente mittels Mikrosprayer® eine Abtrennung der Lunge von den Beatmungsschläuchen notwendig machte, was zu einem Kollabieren der Lunge führte, wurde die Trachealkanüle nach Entwicklung eines geeigneten Injektionsstopfens (Beschreibung unter 4.1.3.; Abbildung 7) durch diesen ersetzt.

Nun wurde zunächst der Bauchraum des Tieres mit einer Schere eröffnet, indem die Bauchdecke leicht angehoben wurde, um darunterliegende Organe nicht zu verletzen. Dabei wurde vorsichtig die Muskulatur beidseitig entlang des Rippenbogens gelöst und die Organe nach unten verschoben, so dass die Zwerchfellfläche vollständig zu sehen war. Im nächsten Schritt wurde das Xiphoid mit einer Pinzette (Harvard Apparatus, Micro Forceps) fixiert und mit einer weiteren Pinzette vorsichtig die Brusthöhle durch Loslösen des Zwerchfells vom Brustbein aus eröffnet. Im nächsten Schritt wurde das Zwerchfell mit einer Schere (Harvard Apparatus, Vannas Tübingen Spring Scissors) entlang der Rippenbögen abgelöst. Das Perikard, sowie die Ligamente, die Herz und Lunge mit dem Thorax verbinden, wurden vorsichtig mit einer Pinzette durchtrennt. Im Anschluß wurde der Brustkorb entlang des Rippenansatzes am Brustbein eröffnet, die Rippen zur jeweiligen Seite hin gespreizt und fixiert und dabei der Herz-Lungenkomplex freigelegt. Der am oberen Rand des Thorax befindliche Thymus wurde entfernt und um die nun zugängliche Pulmonalarterie ein chirurgischer Faden gelegt und ein Knoten vorbereitet.

Nun wurde zuerst der rechte Ventrikel des Herzes und danach der linke Ventrikel nahe der Herzspitze mit der Spitze der Schere eröffnet. Danach wurde eine chirurgische Nadel-Faden Kombination (Ethicon, Ethibond Exel, 6889H, Johnson & Johnson GmbH, Deutschland) ver-

wendet, um eine einfache Tabaksbeutelnaht oberhalb der Öffnung der Herzspitze durchzuführen. Durch die Öffnung im rechten Ventrikel wurde eine Kanüle (Hugo Sachs) bis in die Pulmonalarterie vorgeschoben und mit dem vorgelegten Faden fixiert. Um einer plötzlichen Überlastung der Lungengefäße vorzubeugen und die Gefahr einer Ödembildung im Lungengewebe zu minimieren, war der Perfusatfluss zu diesem Zeitpunkt auf ein Minimum eingestellt. Im nächsten Schritt wurde der Herz- Lungenkomplex aus dem Gesamtorganismus isoliert und währenddessen die Öffnung im linken Ventrikel in kurzen Zeitabständen eröffnet, damit das über den Katheter in der Pulmonalarterie einströmende Perfusat abfließen und es nicht zum Rückstau über den linken Ventrikel, das linke Herzohr und die Lungengefäße kommen konnte.

Nun wurde der zweite Katheter in den linken Ventrikel eingeführt und mit Hilfe der vorher angebrachten Tabaksbeutelnaht fixiert. Damit wurde die Präparation, bzw. die Isolation der Lunge abgeschlossen. Abbildung 5 zeigt die Anatomie des Herz-Lungenkomplexes, wie er nach der Isolation aus dem Thorax im System integriert wurde.



**Abbildung 5: Anatomie der Mauslunge aus "The Mouse in Biomedical Research"**

Herausgeber James G. Fox (2007)

---

### 4.1.2 Ventilation der Lunge

Während der Isolation der Lunge und des nachfolgenden Experiments wurde die natürliche Atmung durch mechanische Beatmung mit Zugabe von Raumluft und normoxischen Gas (Linde AG, Deutschland) ersetzt. Dazu diente ein volumenkonstant arbeitender Mausventilator (Minivent Typ 845, Hugo Sachs Elektronik/Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland). Hier ließen sich Atemzugvolumen von 30-350 $\mu$ l und Atemfrequenzen von 80 bis hin zu 400 Atemzügen/min einstellen.

Nachdem während der Präparation der Katheter in der Pulmonalarterie fixiert war, wurde zunächst die Beatmung von Raumluft auf ein normoxisches Flaschengasgemisch (Air Liquide GmbH, Deutschland) umgestellt. Das Gemisch enthielt neben 21% Sauerstoff auch den konstanten Prozentsatz von 5,3% Kohlenstoffdioxid. Die Umstellung wurde notwendig, da sich während der Versuche keine sauerstoffverbrauchenden und kohlendioxidabgebenden Organe mehr im Kreislauf befanden und somit auch kein CO<sub>2</sub> für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes zwischen 7,35 -7,37 im Perfusat produziert wurde und deshalb exogen zugeführt werden musste. Die Beatmungsparameter wurden auf 150 $\mu$ l pro Atemzug mit 160 Atemzügen pro Minute eingestellt. Diese resultierten in einem Atemzugvolumen ( $V_T$ ) von 6ml/kg, welches als lungenprotektives Tidalvolumen in der Klinik bei ARDS Patienten angewendet wird (ARDSNet 2000, Brower et al., 2000). Um Atelektasen durch den Kollaps von Alveolen zu vermeiden, wurde ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 6mmHg eingestellt. Um einen zu hohen Ventilationsdruck während der Applikation mittels eines Mikrosprayers (Penn-Century, Inc. Wyndmoor, USA) zu vermeiden, wurde ein maximaler Ventilationsdruck von 23mmHg voreingestellt.

### 4.1.3 Applikation von Medikamenten

Die Applikation der in unseren Experimenten verwendeten Medikamente und Modulatoren wurde mit einem Mikrosprayer<sup>®</sup> (Penn-Century, Inc. Wyndmoor, USA; Modell 1A-1C) durchgeführt. Dieser bestand aus einer aus rostfreiem Stahl mit einem Borosilikat-Glas- Einsatz und einem herausnehmbaren Teflon<sup>®</sup>-Druckstempel gefertigten, manuell bedienbaren Spritze. Auf dieser Spritze wurde eine aus rostfreiem, flexiblem Stahl gefertigte Kanüle mit einem Durchmesser von 0,64mm (23 Gauge) befestigt. Dieser Spritzenaufsatz besaß am Ende einen von der Firma Penn Century, Inc. patentierten Zerstäuber, der es ermöglichte, ein Aerosol zu

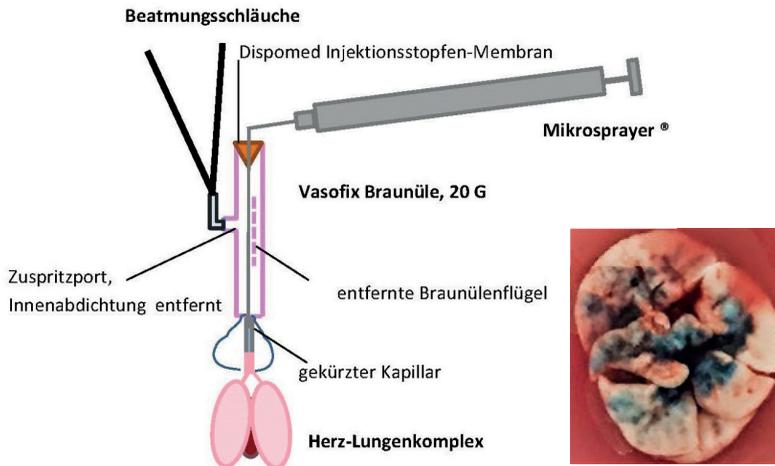
---

erzeugen. Das maximale Volumen für die Benutzung der Spritze betrug 250µl (Abbildung 6 zeigt den Mikrosprayer<sup>®</sup>während der Aerosolerzeugung im freien Raum).



**Abbildung 6: Zur Applikation verwendeter Mikrosprayer** (Penn Century, Inc.)

Um ein Kollabieren der Lunge durch Unterbrechung der Ventilation während der Applikation zu vermeiden, wurde anstatt der Trachealkanüle zur Intubation während der Präparation ein selbst entwickelter Injektionsstopfen (modifizierter Venenkatheter; 20G, B.Braun, Melsungen, Schema Abbildung 7) genutzt. Mit diesem war es möglich, die Medikamente ohne eine Entfernung der Ventilationsschläuche mit Hilfe des Mikrosprayers<sup>®</sup> zu instillieren. In die Ventilationsschläuche waren zusätzlich Filter integriert, um eine Kontamination des Ventilators mit den radioaktiven Tracern zu vermeiden.



#### Abbildung 7: Schematische Darstellung des selbst konstruierten Injektionsstopfens

Mit diesem war es möglich, die eingesetzten Substanzen mittels Mikrosprayer zu verabreichen, ohne dass eine Unterbrechung der Ventilation notwendig wurde. Die Verteilung der Substanzen mit dieser Applikationsmethode wurde mit einem Gemisch aus NaCl und Tinte überprüft und zeigte dasselbe Verteilungsmuster wie in dem hier gezeigten Foto der Zwerchfellfläche der Lunge (Bild: Bio-Equip.cn/MicroSprayer® Aerosolizer, Bio Jane Trading Limited, Penn Wu Device).

#### 4.1.4 Perfusion des Mausmodells

100ml Krebs-Henseleit-Puffer (Elektrolytlösung IIN; Serag-Wiessner, Naila, Deutschland), der 120mM NaCl, 4.3mM KCl, 1.1mM  $Ka_2PO_4$ , 2.4mM  $CaCl_2$ , 1.3mM Magnesiumphosphat, 0,24% [mass/vol] Glucose und 5% 120mM NaCl, 4.3mM KCl, 1.1mM  $Ka_2PO_4$ , 2.4mM Hydroxyethylaminopektin (als Plasmaexpander) enthielt, wurde zur Perfusion der isolierten Lunge über ein Schlauchsystem (3 Color Code Stopper Schläuche, 0.13 – 3.17mm iØ, ISMA-TEC SA, Cambridgeshire, England) verwendet.

2,5ml  $NaHCO_3$  (Natriumhydrogencarbonat 8.4 %, Braun, Melsungen, Deutschland) wurden hinzugegeben und diese Mischung für 10 Minuten mit normoxischem Gas begast, um einen physiologischen pH-Wert von 7,35-7,37 während des Experimentes im System zu erreichen.

---

Das Perfusat wurde in ein Perfusatgefäß mit dem Fassungsvermögen von 30ml gegeben und die Perfusion des Systems erfolgte durch eine von einem Mikroprozessor gesteuerte Schlauchpumpe (Reglo Digital, ISMATEC SA, Labortechnik-Analytik, DEX Health & Science, Micropump, Ltd., Cambridgeshire, England) mit einer Flussrate von 2ml/min.

Nach der Passage durch die in der Pulmonalarterie fixierten Kanüle und der Perfusion der Lunge gelangte das Perfusat durch die Kanüle im linken Ventrikel wieder in das System, den „venösen“ Anteil der Perfusion. Der Druck im linken Vorhof (left atrial pressure, LAP) wurde durch einen neben dem Perfusionsschlauch abgehenden Katheter erfasst. Die Temperatur des Perfusates wurde durch ein Thermostat-kontrolliertes Wasserbad (Thermo-Frigomix Braun, Melsungen, Deutschland) und eine unmittelbar vor den Herz-Lungenkomplex eingeschaltete exklusiv für dieses System angefertigte gläserne Blasenfalle für die Aufrechterhaltung der Perfusatemperatur gewährleistet (Abbildung 8).

Der Druck in der Pulmonalarterie (pulmonary artery pressure, PAP) wurde durch einen neben dem zuführenden Perfusionsschlauch platzierten Katheter registriert. Unmittelbar nach Fixation der Kanüle in der Pulmonalarterie wurden die Lungen mit einem auf ein Minimum eingestellten Perfusatfluß bei 4°C perfundiert.

Nachdem der Herz-Lungen-Komplex isoliert und komplett aus der Brusthöhle entnommen wurde, wurde die zweite Kanüle mit der vorgefertigten Tabaksbeutelnaht im linken Ventrikel fixiert und danach der Perfusatfluss schrittweise auf 2ml/min und die Temperatur auf 37°C über den Zeitraum von etwa 8- 10 Minuten erhöht. Während diesem Zeitraum wurden die Lungen nicht-rezirkulierend mit dem blutfreien Puffer perfundiert, um die restlichen Blutzellen aus der Zirkulation zu entfernen. Nachdem die Perfusionsgeschwindigkeit von 2ml/min erreicht und das Perfusat auf eine Temperatur von 37°C erwärmt wurde, wurde auf Rezirkulation umgestellt. Das Volumen des zirkulierenden Puffers im System und dem Puffer im Perfusatgefäß betrug zusammen 40ml. Nach der Präparation wurde der Druck im linken Ventrikel auf 1,2-1,5mmHg eingestellt.

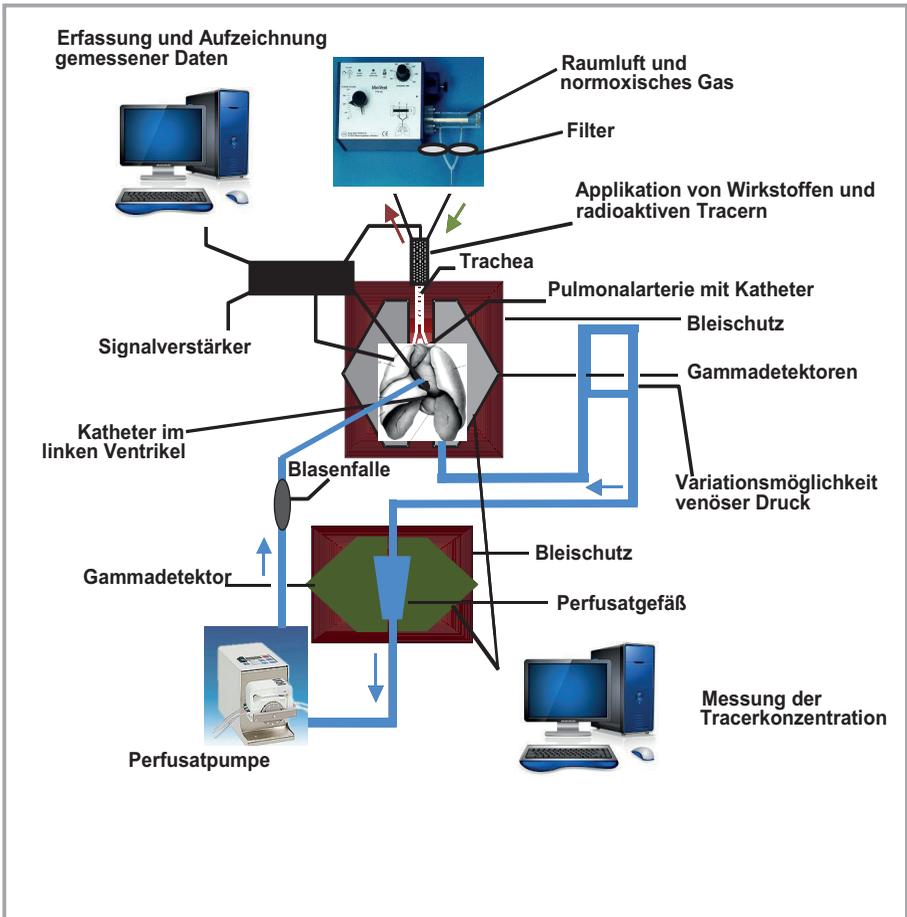
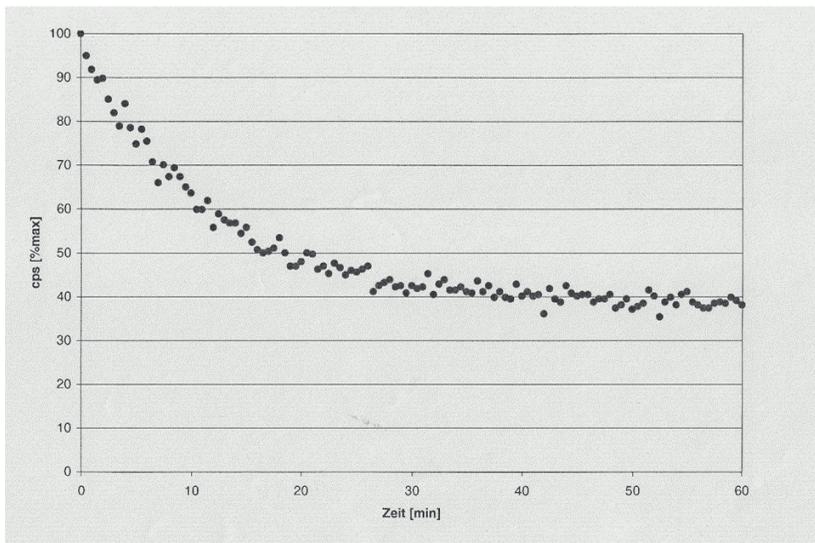


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Systems der isolierten, perfundierten und ventilerten Mauslung; roter Pfeil: Expiration, grüner Pfeil: Inspiration

#### 4.1.5 Radioaktive Tracer und Messung Tracer- Austausch

Die radioaktiven Tracer  $^{22}\text{Na}$  und  $[^3\text{H}]$  Mannitol (Perkin Elmer, Deutschland) wurden mit Hilfe des Mikrosprayers<sup>®</sup> in die Lunge instilliert. Hierbei wurden insgesamt  $80\mu\text{l}$   $^{22}\text{Na}$  und  $^3\text{H}$  appliziert, was in etwa 250 Bequerel ( $6,76 \times 10^{-9}$  Curie)  $^{22}\text{Na}$  und etwa 200 Bequerel ( $5,41 \times 10^{-9}$  Curie)  $^3\text{H}$  pro Experiment entsprach.

Zur Messung des Tracer-Austausches dienten 4 Gammadetektoren (Target System Electronic, Solingen, Germany), welche die Gammastrahlung des  $^{22}\text{Na}$  erfassten. Diese waren mit einem automatisierten Hochspannungsnetzteil verbunden, welches in ein Computersystem mit Messwertverarbeitung integriert war. Zwei dieser Detektoren wurden um die Lunge und zwei um das Perfusatgefäß platziert und auf diese Weise die Bewegungen des  $^{22}\text{Na}$  in Echtzeit gemessen. Das Ergebnis der Messung der Clearance des  $^{22}\text{Na}$  unter Kontrollbedingungen über einen Zeitraum von 60 Minuten ist in Abbildung 9 dargestellt. In Abbildung 10 ist zusätzlich die Akkumulation des  $[^3\text{H}]$  Mannitols integriert. Die Kinetik des als Indikator für passive parazelluläre epitheliale Permeabilität eingesetzten  $[^3\text{H}]$  Mannitols wurde durch Perfusatproben nach 5, 10, 15, 20, 30, 50 und 90 Minuten nach Verbringen der Lunge zwischen die Detektoren durch Messung in einem  $\beta\gamma$ -Counter im Strahlencentrum Gießen bestimmt.



**Abbildung 9: Abnahme der Tracerkonzentration in der Lunge unter Kontrollbedingungen; cps= counts per second**

---

#### 4.1.6 Kalkulation der Tracerkinetik

Die Counts des  $\gamma$ -Strahlers  $^{22}\text{Na}$  wurden kontinuierlich alle 30 Sekunden durch die Gammadektoren während des gesamten Experimentes erfasst. Als Startpunkt jeder Tracer-Elimination aus der Lunge sowie der Tracerakkumulation im Perfusat wurde die Positionierung der Lunge zwischen den Detektoren, etwa 2 Minuten nach der Applikation der radioaktiven Isotope, festgelegt. An diesem Punkt wurde die Menge von Radioaktivität in der Lunge auf 100%, die Menge im Perfusat auf 0% gesetzt. Die Rate der Clearance aus der Lunge und die Passage ins Perfusat wurden kalkuliert durch die Messung des Bereiches oberhalb der Kurve, was durch die folgende Gleichung ausgedrückt ist:

$$\text{AAC} = [(100-A) \times T] - \{[-(100-A) / e] \times [1 - \exp(e \times T)]\}$$

Hierbei bedeutet „AAC“= area above the curve; „A“ ist die Asymptote der Exponentialkurve, „T“ steht für die Zeit, „e“ ist die Exponentialfunktion der Kurve.

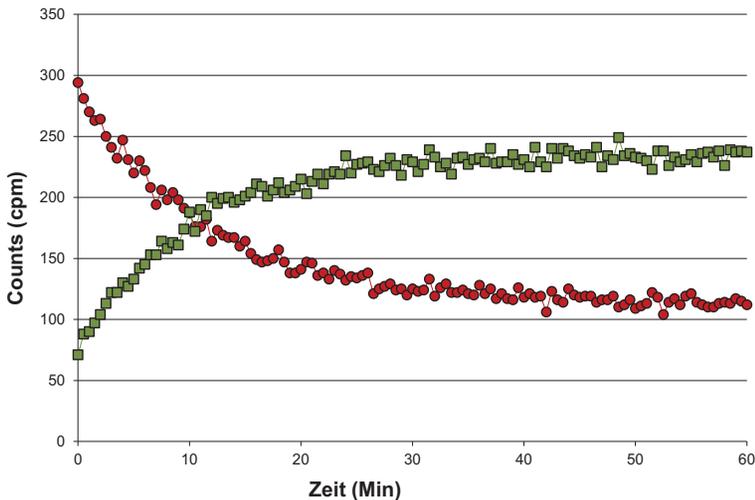
Eine standardisierte Entnahme von Perfusatproben zu unterschiedlichen Zeitintervallen machte eine Beurteilung der Unversehrtheit der alveolokapillären Barriere möglich. Gemessen wurde sie anhand der Bewegung des  $^3\text{H}$  Mannitol, welches als Marker der passiven, parazellulären Permeabilität gilt. Es repräsentiert zuckerähnliche Moleküle, die durch die Zellen nicht metabolisiert werden. (Saumon et al., 1987).

$\beta$ -Strahlung (beta-Strahlung) wird sowohl von  $^{22}\text{Na}$  als auch von  $^3\text{H}$  Mannitol emittiert. Eine effiziente Messung der emittierten Strahlung des  $^3\text{H}$  Mannitols war im Versuchsaufbau nicht möglich, da die Reichweite nur etwa 1-2cm betrug. Deshalb wurde die standardisierte Messung von Herrn Gerd Weigand in der zentralen biotechnischen Betriebseinheit des Strahlencentrums der Justus-Liebig-Universität durchgeführt. Eine Auswertung erfolgte mit einem  $\beta$ -Counter (Packard).

Der Anteil der von  $^{22}\text{Na}$  emittierten  $\beta$ -Strahlung wurde über dessen gleichzeitig vorhandene  $\gamma$ -Strahlung bestimmt. Von der Gesamt- $\beta$ -Strahlung wurde demnach der Beitrag von  $^{22}\text{Na}$  subtrahiert, so dass man nur die von  $^3\text{H}$  Mannitol abgegebene Strahlung erhielt.

In jedem einzelnen Experiment entsprach die Abnahme der Tracer in der Lunge sehr gut der Akkumulation im Perfusat. Die ermittelten Rohdaten der zu den bestimmten Zeitpunkten entnommenen Perfusatproben ermöglichten die Beschreibung eines Nuklid Anstieges. Diese den passiven, parazellulären Transport beschreibende Kurve wurde ebenfalls wie die Kurve der

Clearance – beschrieben durch die Messung von  $^{22}\text{Na}$  – als e-Funktion dargestellt (vgl. Abbildung 10).



**Abbildung 10: Elimination der Tracer aus der Lunge (●) und deren gleichzeitige Akkumulation im Perfusat (■) unter Kontrollbedingungen (cpm=counts per minute)**

#### 4.1.7 Kalkulation des Amilorid -Ouabain sensitiven Transportes

Die Kalkulation des Amilorid- Ouabain sensitiven Transportes wurde wie folgt vorgenommen:

$$\text{sensitiver Transport} = \frac{[\bar{X} \text{ von } n, \text{ z.B. „Quabain“} - \bar{X} \text{ von } n, \text{ „Amilorid + Ouabain“}]}{[\bar{X} \text{ von } n, \text{ z.B. „Kontrolle“} - \bar{X} \text{ von } n, \text{ „Amilorid + Ouabain“}]}$$

wobei  $\bar{X}$  von  $n$  dem arithmetischen Mittelwert einer Anzahl  $n$  voneinander unabhängiger Experimente entsprach. Durch Anwendung von Amilorid und Ouabain in Kombination konnte der Amilorid-Ouabain insensitive Anteil der Lungenclearance bestimmt werden, der wie in Abbildung 13 ersichtlich bei etwa 40% lag. Um den sensitiven Anteil zu bestimmen, wurde der bestimmte insensitive Anteil von dem  $\bar{X}$  der zu untersuchenden Gruppen (hier z.B.

„Ouabain“) und der Kontrolle subtrahiert und der Quotient von Versuchsgruppe und Kontrolle gebildet. Hierbei ergab sich bei Einsetzen des Kontrollwertes für die Kontrolle immer der Wert 1.

#### 4.1.8 Bronchoalveolare Lavage / Verhältnis Nass-zu Trockengewicht

Zum Abschluss jedes Experimentes wurde die linke Lunge abgebunden und 90µl isoosmolares Mannitol (Mannit-15%, Serag Wiessner, Naila, Germany) langsam in die rechte Lunge instilliert und vorsichtig dreimal aspiriert. Etwa 50-60% der instillierten Flüssigkeit konnten während der etwa 30 Sekunden dauernden Prozedur zurückgewonnen werden. Aus dieser Lavage wurde das Volumen des epithelialen Flüssigkeitsfilms (*epithelial lining fluid*, ELF) und der Gehalt an radioaktivem <sup>22</sup>Na bestimmt. Die Messung des Natriumgehaltes des Flüssigkeitsfilms wurde mit Hilfe einer ionenselektiven Elektrode (Mettler Toledo, Deutschland) durchgeführt. Diese Elektrode besaß eine Linearität für Natrium im Bereich von 1x10<sup>-5</sup> bis 1x10<sup>5</sup>mmol/L, mit einer Kreuzsensitivität von <0,1% für andere Ionen. Die auf diese Weise erhaltenen Messwerte dienen der Berechnung des Volumens des ELF:

$$(V_{BAL} + V_{ELF}) \times [Na]_{BAL} = V_{ELF} \times [Na]_{ELF}$$

$$V_{ELF} = (V_{BAL} \times [Na]_{BAL}) / ([Na]_{ELF} - [Na]_{BAL})$$

Da die BAL nur am rechten Lungenflügel durchgeführt wurde, dieser aber nur 3/5 der Gesamtlunge ausmacht (Effros et al., 1990; Ghofrani et al., 2001, Vadász et al., 2004) musste das Ergebnis zusätzlich mit 5/3 multipliziert werden:

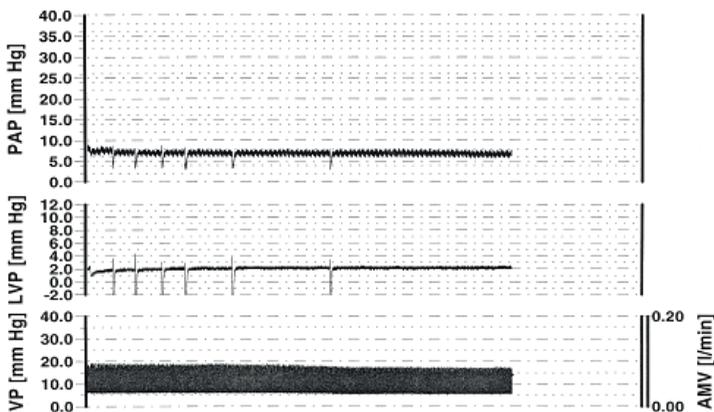
$$V_{ELF} = (V_{BAL} \times [Na]_{BAL}) / ([Na]_{ELF} - [Na]_{BAL}) \times 5/3$$

Anschließend wurde das Nassgewicht (*weight<sub>wet</sub>*) des linken Lungenflügels auf einer Präzisionswaage bestimmt und anschließend für 2 Tage im Wärmeschrank bei 48°C getrocknet. Zur Bestimmung des Trockengewichts (*weight<sub>dry</sub>*) wurde der Lungenflügel erneut gewogen. Aus den gemessenen Werten wurde nach folgender Formel die *wet/dry weight ratio* (W/D) als Parameter der Lungenödembildung berechnet (Klinzing et al., 2000).

$$W/D = \frac{weight_{wet} - weight_{dry}}{weight_{wet}} \times 100$$

#### 4.1.9 Monitoring der Parameter in der isolierten, perfundierten und ventilerten Mauslunge

Der Ventilationsdruck (ventilation pressure, VP), der Druck im linken Ventrikel (left arterial pressure, LAP) und der Druck in der Pulmonalarterie (pulmonary artery pressure, PAP) wurden mit Kanülen /Kathetern in der Expirationsschleife des Ventilators, dem linken Ventrikel und in der Pulmonalarterie erfasst (Abbildung 11). Ein elektromechanischer Druckumwandler (Combitrans, Braun, Melsungen, Germany) erlaubte die Digitalisierung dieser Signale. Alle analogen Signale wurden verstärkt, zu digitalen Signalen konvertiert und mit Hilfe der PlotIT 3.1 Software (Scientific Programming Enterprises, SPE, USA) online auf einem Computer sichtbar gemacht.



**Abbildung 11: Monitoring des pulmoarteriellen Drucks (PAP), des Druckes im linken Ventrikel (LAP) und des Ventilationsdrucks (VP)**

Die Störungen entsprechen Probeentnahmen aus dem Perfusat für die Bestimmung von [ $^3\text{H}$ ] Mannitol als Marker der passiven, parazellulären Permeabilität (5, 10, 15, 20, 30, 50 und 90 Minuten/Versuchsende).

#### 4.1.10 Verwendete Substanzen im Mausmodell

**Tabelle 1: Übersicht über die in der Mauslunge verwendeten Wirkstoffe**

<b>Substanz</b>	<b>Applikationsart</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Inkubationszeit*</b>	<b>Substanzgruppe</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Amilorid</b>	intratracheal	1mM	2-3 Minuten	ENaC- Blocker	Sigma Aldrich, (St.Louis,USA)
<b>Terbutalin</b>	intratracheal	2,22mM	2-3 Minuten	$\beta$ -Agonist, führt zu Erhöhung von cAMP	Sigma Aldrich, (St.Louis,USA)
<b>Isoproterenol</b>	intratracheal	50 $\mu$ M	30 Minuten	$\beta$ -Agonist, führt zu Erhöhung von cAMP	Sigma Aldrich, (St.Louis,USA)
<b>Ouabain</b>	Perfusat	50 $\mu$ M	30 Minuten	Herzglykosid, Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase Inhibitor	Sigma Aldrich, (St.Louis,USA)
<b>Intermedin</b>	intratracheal	10nM	10 Minuten	Mitglied der Kalzitonin-Peptid Familie	Phoenix Pharmaceuticals, (Burlingame, USA)
<b>H-89</b>	intratracheal	100 $\mu$ M	30 Minuten	selektiver Inhibitor Proteinkinase A	Sigma Aldrich, (St.Louis,USA)
<b>SQ 22536</b>	intratracheal	100 $\mu$ M	30 Minuten	Adenylatzyklaseinhibitor	Calbiochem® Merck, Darmstadt, Deutschland

\*= die Inkubationszeiten gelten für die alleinige Anwendung des Wirkstoffes. Bei einer Kombination zweier Wirkstoffe verlängert sich die Inkubationszeit des zuerst eingesetzten, z.B. Kombination Ouabain und Intermedin: Inkubationszeit für Ouabain insgesamt 40 Minuten, IMD/AM2 10 Minuten.

#### 4.1.11 Experimentelle Protokolle für die isolierte, ventilierte und perfundierte Mauslunge

##### Kontrollexperimente und Anwendung der Wirkstoffe

Nach Beendigung einer 10minütigen Periode zur Erlangung eines stabilen Systemzustandes wurde eine Applikation von physiologischer Natriumchloridlösung (90 $\mu$ l; 0,9% Serrag-Wiessner KG, Naila, Deutschland) durchgeführt, gefolgt von der 10 Minuten später stattfindenden Applikation der radioaktiven Tracer. Darauf folgte die 90minütige Messung des Tracertransportes ohne pharmakologische Intervention. Perfusatsproben wurden 5, 10, 15, 20, 30, 50 und 90 Minuten nach dem Einbringen der Lunge zwischen die beiden Gammadetektoren genommen, um die Kinetik des [<sup>3</sup>H] Mannitol bestimmen zu können. Nach 90 Minuten wurde die Perfusion gestoppt und die bronchoalveolare Lavage, wie bereits unter 4.1.7 geschildert, durchgeführt.

---

Lungen, die für unsere Experimente verwendet wurden, zeigten keine Anzeichen von Hämostasie, Ödem oder Atelektasen und wiesen während der 10 Minuten dauernden Periode zur Erreichung eines Gleichgewichtszustandes im System physiologische und konstante Messwerte für PAP, LVP und VP auf.

Eine Auflistung der in den Experimenten verwendeten Wirkstoffe zusammen mit ihren Applikationsmengen, den Herstellerfirmen und ihren Endkonzentrationen befindet sich in *Tabelle 1*. Alle verwendeten pharmakologischen Stoffe wurden in 0,9% isotonischer Natriumchloridlösung gelöst. Bei Anwendung der entsprechenden Wirkstoffe wurde anstatt physiologischer Kochsalzlösung wie im Kontrollversuch der entsprechende Wirkstoff appliziert, bei Kombinationen zweier Wirkstoffe, z.B. IMD/AM2 und Ouabain wurde nach dem Erreichen des Gleichgewichtszustandes im System zuerst das Ouabain in das Pefusat zugesetzt und nach der 30 Minuten andauernden Inkubationszeit das Intermedin intratracheal appliziert. Darauf folgte nach der für das IMD/AM2 festgelegten Inkubationszeit von 10 Minuten die Applikation der radioaktiven Tracer.

## 4.2 Zellkulturexperimente

### 4.2.1 Biotinylierung und Streptavidin Pull-Down $\alpha$ - und $\beta$ -Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase

Experimente in Monolayern aus Alveolarepithelzellen wurden durchgeführt, um die Ergebnisse aus dem System der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslung zu verifizieren.

Für diese Experimente wurden A12.10.1 Zellen aus 140-160g schweren, männlichen CD-Ratten isoliert und jeweils  $3,5 \times 10^6$  Zellen auf 400 $\mu$ m Nylon Filtern (BD Falcon CellStrainers, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) mit DMEM-Medium (PAA Laboratories GmbH, Deutschland) versetzt, mit 10%igem FCS (PAA Laboratories GmbH, Deutschland) und 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert und am vierten Tag nach Inkubation in einem Inkubator (Hera cell 150, Thermo electron corporation, Erlangen, Germany) bei 37°C und 98-99% rel. Luftfeuchte jeweils mit dem Experiment begonnen. Vor Beginn der Behandlung und direkt nach der Inkubation mit den zu testenden Wirkstoffen wurde die transepitheliale Potentialdifferenz des epithelialen Monolayers bestimmt. Sie reflektierte den Funktionszustand der Schlussleisten/Zonae occludens (tight junctions) und erlaubte auf diese Weise die Beurteilung der Monolayerintegrität. Hierzu wurde eine Elektrode verwendet (Evom World Precision

---

Instruments, Model Evom-G, Sarasota, USA). Danach erfolgte die Inkubation mit den zu testenden Substanzen. Die in der Zellkultur verwendeten Substanzen zusammen mit der verwendeten Konzentration und der Inkubationszeit sind in *Tabelle 2* aufgeführt.

Danach wurde das komplette Medium apikal und basolateral der Filter entfernt und die Filter 3x mit PBS+Mg<sup>2+</sup>+Ca<sup>2+</sup> gewaschen (Dulbecco's PBS 1x, PAA Laboratories GmbH, Österreich, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O = 0,132g/l; MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O = 0,1g/l).

Darauf folgte eine 20minütige Inkubation bei 4°C und in Dunkelheit mit Biotin (EZ- Link-Sulfo-NHS-SS-Biotin, 100mg, Thermo Scientific, Deutschland) 1mg/ml in PBS+Mg<sup>2+</sup>+Ca<sup>2+</sup>. Nach dieser Inkubation wurden die Filter 3x für 10 Minuten (mit frisch zubereitetem) PBS+Mg<sup>2+</sup>+Ca<sup>2+</sup> und Glycin (100mM, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) auf Eis inkubiert und dann die Filter erneut mit PBS+Mg<sup>2+</sup>+Ca<sup>2+</sup> gespült, um die Reaktion des Biotins abzustoppen und das nichtreaktive Biotin zu entfernen. Nach Zugabe von Lysepuffer, bestehend aus modifiziertem RIPA-Puffer (10ml 0,5M Tris pH 8,0 mit 3ml 5M NaCl + 1ml Nonidet P-40 und 1g Natriumdesoxycholat, aufgefüllt auf 100ml mit bidestilliertem Wasser) und Protein-Inhibitor-Cocktail (40µl/ml RIPA, Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) und einer 10minütigen Inkubationszeit wurde das Zell-Lysat mit einem Zellscraper vorsichtig von den Filtern abgenommen und für 10 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C in 1,5ml Eppendorftubes zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde das Lysat oberhalb des Pellets in neue Tubes überführt.

Eine Menge von 50-100µl von Streptavidin-Agarose-Beads (High Capacity Streptavidin Agarose Resin, Thermo Scientific) wurde zu dem Überstand pipettiert und über Nacht (12-16Std.) bei 4°C rotiert. Die Beads wurden dann 1x mit Lösung A (150mM NaCl + 50mM Tris pH 7,4 + 5mM EDTA), 2x mit Lösung B (5000mM NaCl + 50mM Tris pH 7,4 + 5mM EDTA), 3x mit Lösung C (5000mM NaCl + 20mM Tris pH 7,4 + 0,2 %BSA) und zuletzt mit einer Nicht-Salz-Lösung (10mM Tris pH 7,4) gewaschen.

Für die folgende Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese wurden die biotinylierten Protein-Streptavidin Agarose Bead- Komplexe mit DL-Dithiothreitol (DDT) versetzt und dann in einem Heizblock (Thermomixer comfort, Eppendorf) für 30 Minuten bei 37°C erhitzt, bevor das 10%ige SDS-Polyacrylamidgel geladen wurde. Die Laufzeit betrug etwa 90 Minuten bei einer Spannung von 110V. Die Gele wurden dann mittels einem Semi-Dry Blotting System dann auf Nitrozellulose (Trans-Blot SD, SEMI-DRY Transfer cell, Bio-Rad) übertragen.

Die Membranen wurden anschließend in 5% Magermilchpulver mit T-TBS Waschpuffer für 1 Stunde geblockt (100ml TBS 10x Stocklösung [24,2g Tris, Carl Roth GmbH und Co.KG; 80g NaCl, Carl Roth GmbH und Co.KG, gelöst in 800ml bidestilliertem Wasser (Milipore) und eingestellt auf einen pH von 7,6; zuletzt aufgefüllt auf 1 Liter mit bidestilliertem Wasser] mit 1ml Tween 20, gelöst in 800ml und nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,6 mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt). Danach folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper zur Detektion der  $\alpha$ 1-  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase (1:10 000 in T-TBS, Anti-  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$ -1, clone C464.6, upstate Milipore, Temecula, CA 92590) oder der  $\beta$ -  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase (1:1000 in T-TBS, Anti- Maus, NB300-147, Nuvus Biologicals, LLC) oder als „loading control“ Ecad (1:200 in T-TBS, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C in den jeweiligen Antikörpern rotiert. Darauf folgten 3 Waschschrte mit T-TBS mit je 5 Minuten und die Zugabe des zweiten Antikörpers für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase (Pierce® Kaninchen Anti-Maus IgG, (H+L), Peroxidase-konjugiert) oder für Ecad (Anti-Kaninchen, Santa Cruz®) 1:2500 in T-TBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

Darauf folgten wiederum 3 Waschschrte und die Zugabe von ECL (Supersignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) und die abschließende Entwicklung mittels Chemiluminszenzfilm.

**Tabelle 2: Übersicht über die in der Zellkultur verwendeten Wirkstoffe**

<b>Substanz</b>	<b>Inkubationszeit</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Substanzgruppe</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Intermedin</b>	30 Min	100nM	Mitglied der Kalzitonin-Peptid-Familie	Phoenix Pharmaceuticals, (Burlingame,USA)
<b>H-89</b>	60 Min (30 Min Vorinkubation)	100 $\mu$ M	selektiver Inhibitor Proteinkinase A	Sigma Aldrich, (St.Louis,USA)
<b>SQ 22536</b>	60 Min (30 Min Vorinkubation)	100 $\mu$ M	Adenylatzyklaseinhibitor	Calbiochem® Merck, Darmstadt, Deutschland

#### **4.2.2 Biotinylierung und Streptavidin Pull-Down $\beta$ -ENaC**

Der humane  $\beta$  -ENaC wurde in einen pcDNA3.1HIS/V5 Vector kloniert (Gwoździńska et al., 2017) und in A549 Zellen exprimiert. Das Protokoll der Biotinylierung war ähnlich dem für

---

die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. Die Denaturierung der Proben erfolgte allerdings bei 99°C für 10 Minuten und nicht bei 37°C. Für die Detektion wurde ein anti-V5-Antikörper verwendet. (1:1000 über Nacht bei 4°C, Invitrogen #R960-25) Sekundäntikörper: anti-Maus (1:1000 in T-TBS, Anti-Maus, NB300-147, Nuvus Biologicals, LLC), 1:2000 1h bei Raumtemperatur, beides in T-TBS (Waschpuffer).

### **4.2.3 cAMP Assay**

Als Kit (cAMP-Assay, R&D Systems, USA) wurde ein in 3,5 Stunden durchführbarer kompetitiver Monoassay verwendet, entwickelt um cAMP in Zellkulturüberständen, Zelllysaten, Serum, Plasma, Urin und Speichel zu messen. In unserem Fall wurden für das Assay Alveolarepithelzellen Typ II von männlichen CD-Ratten (CD® (Sprague Dawley, 140-160g) isoliert.

Ein Komplex aus einem monoklonalen, für cAMP spezifischem Maus-Antikörper und cAMP koppelte an einen vorher auf dem Well angehefteten Ziege-Anti-Maus-Antikörper. Das in der zu untersuchenden Probe enthaltene cAMP wurde dabei an eine fixe Menge Meerrettichperoxidase an Bindungsstellen des monoklonalen Antikörpers gebunden.

Die Platte wurde gewaschen, um überschüssigen monoklonalen Antikörper zu entfernen. Ein weiterer Waschschritt sorgte für die Entfernung von überschüssiger ungebundener Probe und überschüssigen Reagentien.

Um die gebundene Enzymaktivität zu bestimmen, wurde dann im folgenden Schritt eine Substratlösung zugegeben. Das Produkt dieser enzymatischen Reaktion hatte eine ausgeprägte Farbe und zeigte eine starke Absorption bei 450nm. Die Intensität dieser Farbe, spektrophotometrisch bestimmt, war proportional zu der Menge des cAMP Tracers gebunden an das Well, welche umgekehrt proportional zu der Menge an freiem cAMP während der Inkubation war.

#### **Präparation der Reagentien:**

**Zell-Lyse-Puffer:** 10ml Zell-Lyse-Puffer wurden in 40ml destilliertem/deionisiertem zu 50ml Pufferlösung verdünnt.

**Waschpuffer:** 20ml Waschpufferkonzentrat wurden mit destilliertem/deionisiertem Wasser zu einer Waschpufferlösung (500ml) verdünnt.

---

**Substratlösung:** Die beiden Farbreagentien A und B wurden zu gleichen Anteilen 15 Minuten vor Anwendung gemischt- 200µl der Mischung wurden für ein Well benötigt.

**Präparation der Standardkurve:**

**cAMP-Standard:** Der Standardlösung wurde 1ml deionisiertes/destilliertes Wasser zugefügt. Es entstand eine Stammlösung von 2400pmol/ml. Mit dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe angelegt.

Hierbei diente Zell-Lyse-Puffer als 0-Standard.

Nach Vorbereitung der Reagentien, Ansetzen der Reaktion und 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Reaktion abgestoppt und dann die Absorption bei 450nm bestimmt.

#### **4.2.4 Proteinkinase A Assay**

Das Pep Tag® (Promega, Deutschland) cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) Assay stellte einen schnelle, sensitive und von Radioaktivität unabhängige Methode dar, die Proteinkinaseaktivität zu bestimmen. Das Assay nutzte ein hell gefärbtes, fluoreszierendes Peptidsubstrat, welches eine hohe Spezifität für die PKA aufwies, das Pep Tag® A1 Peptid. Die helle, pinke Farbe des Peptides wurde durch die Zugabe eines Farbstoffmoleküls hervorgerufen.

Die Phosphorylierung der PKA veränderte die Ladung des Moleküls von +1 zu -1. Dieser Wechsel der Ladung machte es möglich, die phosphorylierten von den nicht-phosphorylierten Anteilen der PKA schnell in einem Agarosegel bei neutralem pH zu unterscheiden (Abbildung 12).

Die Benutzung dieses PKA Assays erlaubte es, innerhalb von 2 Stunden weniger als 10ng der Kinase zu detektieren.

**Durchführung:**

**Teil 1:** Behandlung der Alveolarepithelzellen vom Typ II, isoliert von männlichen CD- Ratten (CD®, Sprague Dawley, 140-160g), mit den zu testenden Wirkstoffen (siehe Tabelle 2).

**Teil 2:** Danach wurden die Zellen 2 x mit PBS (ohne Ca+Mg) gewaschen und nach den Waschrissen mit je 500µl PBS pro Filter von den Filtern abgenommen. Daraufhin wur-

den die Zellen für 5 Minuten bei 4°C bei 1200rpm zentrifugiert, um ein Pellet zu erhalten. Nun wurde das Pellet 500µl Proteinkinase –Extraktionspuffer, den Proteaseinhibitor enthaltend, versetzt. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte durch 10maliges Aspirieren mit einer Spritze. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 10.000rpm bei 4°C für 10 Minuten. Der Überstand wurde für weitere Experimente aufbewahrt.

Vorbereitung des Standards des cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) Assays

PepTag®PKA Reaktionspuffer 5x	5µl
PepTag® A1 Peptid (0,4µg/µl)	5µl
PKA Aktivator 5x Lösung	5µl
Peptid –Schonlösung (optional)	1µl
Probe/ Menge an Überstand	1-10µl

Vorbereitung der Positivkontrolle

PepTag®PKA Reaktionspuffer 5x	5µl
PepTag® A1 Peptid (0,4µg/µl)	5µl
PKA Aktivator 5x Lösung	5µl
Peptid –Schonlösung (optional)	1µl
CAMP-abhängige Proteinkinase, katalytische Untereinheit (2µg/ml in PKA Verdünnungspuffer)	5µl

Vorbereitung der Negativkontrolle (keine PKA hinzugefügt)

PepTag®PKA Reaktionspuffer 5x	5µl
PepTag® A1 Peptid (0,4µg/µl)	5µl
Peptid –Schonlösung (optional)	1µl
PKA Aktivator 5xLösung	5µl

---

**Teil 3:** Zum Zeitpunkt 0 wurden die Proben bei 30°C im Wasserbad für 1 Minute inkubiert. Dann wurde die Probe oder die cAMP-abhängige Proteinkinase (katalytische Untereinheit) hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.

**Teil 4:** Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Probe für 10 Minuten bei 95°C in einen Heizblock (Thermomixer comfort, Eppendorf) gestellt.

Danach wurden die Proben in die Mitte eines vorher vorbereiteten 0,8% Agarosegels geladen und das Gel für 15 Minuten bei 100V belassen.

Darauf folgend fand die Detektion der Banden mit UV-Licht statt. Diese Banden wurden mit Hilfe der Densitometrie (quantitative Messung der Farbdichte; Image J Analysis Software, NIH Image) ausgewertet.

ImageJ ist ein Bildbearbeitungs- und -verarbeitungsprogramm. Es wird vielfach für die medizinische und wissenschaftliche Bildanalyse genutzt, zum Beispiel zum Vermessen von Strukturen auf Mikroskopaufnahmen. ImageJ wurde in JAVA (objektorientierte Programmiersprache) geschrieben und ist damit plattformübergreifend verwendbar.

Die Blots wurden eingescannt, mittels dieser Software ausgewertet und mit Hilfe des Graph Pad Prism Programms die Kalkulation vorgenommen.

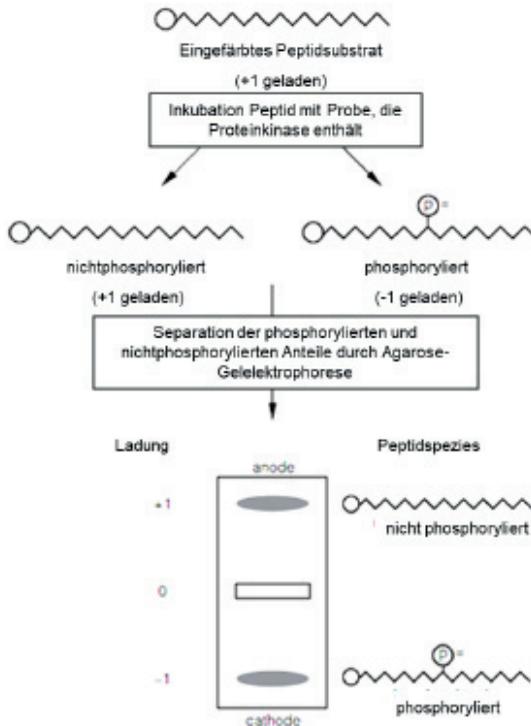


Abbildung 12: Funktionsprinzip des Pep Tag® (Promega, Deutschland) cAMP-abhängigen Poteinkinase (PKA) Assays

#### 4.2.5 Ussing-Kammer Messung: Einfluss von Intermedin auf den transepithelialen Natrium-Strom

##### 4.2.5.1 Kultur der H441 Zellen

Um den Effekt von Intermedin/Adrenomedullin2 auf den transepithelialen Natrium-Strom zu untersuchen, wurden Ussing-Kammer Messungen an humanen H441-Zellen durchgeführt. H441 Zellen bilden polarisierte Monolayer, die als Modell für distale Lungenepithelzellen verwendet werden. Die Zellen wurden auf transwell-Filter (Corning, Kaiserslautern) mit einer Wachstumsfläche von 1cm<sup>2</sup> ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium RPMI 1640/L-Glutamine (PAA, Cölbe, Deutschland) 10% FCS (PAA, Cölbe, Deutschland), 1% Penicillin/Streptomycin-Mischung (PAA, Cölbe, Deutschland), 1mM Na-Pyruvat (Sigma-Aldrich, Deutschland), 5µg/ml Insulin (Sigma-Aldrich, Deutschland), 5µg/ml Transferrin

---

(Sigma-Aldrich, Deutschland),  $5\mu\text{M}$  Na-Selenit (Sigma-Aldrich, Deutschland) auf der apikalen Seite entfernt und das Medium auf der basolateralen Seite mit  $200\text{nM}$  Dexamethason (Sigma-Aldrich, Deutschland) versetzt. Die Zellen wurden für weitere 6-7 Tage inkubiert, bevor sie für die Messungen verwendet wurden.

#### 4.2.5.2 Durchführung der Ussing-Kammer Messung

Die H441-Zell-Monolayer wurden in die Ussing-Kammern (Eigenbau des Instituts für Tierphysiologie, Giessen) eingespannt und mit temperierter physiologischer Lösung perfundiert [ $130\text{mM}$  NaCl,  $2.7\text{mM}$  KCl,  $1.5\text{mM}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $10\text{mM}$  HEPES and  $10\text{mM}$  Glucose ( $37^\circ\text{C}$ , pH 7.35)]. Zur Messung der elektrischen Parameter wurden Ag/AgCl Elektroden verbunden zu Agar-Brücken an die Kammern angeschlossen. Zuerst wurde das Potential  $V_T$  unter open-circuit-Bedingungen (offenes Kreislaufsystem) gemessen, bis sich ein stabiles Potential einstellte (bis zu 5 Minuten). Um den transepithelialen Kurzschlussstrom  $I_{sc}$  zu messen wurde nun das Potential mit einem voltage-clamp-amplifier (Eigenbau des Instituts für Tierphysiologie, Giessen) auf  $0\text{mV}$  geklemmt. Um den Natriumstrom zu bestimmen wurde  $10\mu\text{M}$  Amilorid zum Perfusat zugefügt und die Differenz  $I_{Na}$  aus dem  $I_{sc}$  vor und nach Amilorid-Applikation berechnet. Die Zellen wurden vor dem Versuch eine Stunde lang mit  $200\text{nM}$  Intermedin vorinkubiert. In jeden Versuch wurden parallel unbehandelte Kontrollzellen als Referenz gemessen.

### 4.3 Statistische Analyse

In allen Fällen wurden die Ergebnisse als Standardabweichung (SD) eines Wertes rund um dessen Mittelwert aufgezeichnet. Zur statistischen Analyse und Darstellung der Daten wurde GraphPad Prism 5 für Windows (GraphPad Software; San Diego, USA) verwendet. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden durch gepaarte (übereinstimmende Stichproben) oder ungepaarte (unabhängige Stichproben) zweiseitige Student-t-Tests durchgeführt. Intergruppenunterschiede von drei oder mehr unabhängigen Versuchsgruppen wurden unter Verwendung einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA)-die als Erweiterung der t-Tests für unabhängige Gruppen gilt- und weiterführend mit post-hoc-Dunnett-Test für Vergleich der einzelnen Gruppen mit der eingesetzten Kontrolle bewertet. Die statistische Signifikanz wurde definiert als  $*p < 0,05$ .

---

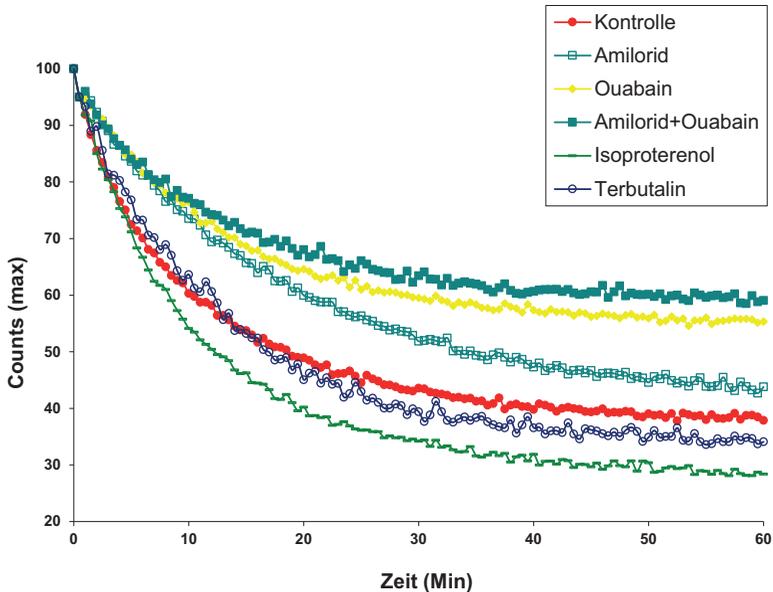
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Alveoläre Clearance, amilorid-ouabain-sensitiver Transport und Nass-/Trockengewichtsquotient im System der isolierten Mauslunge

Während der Kontrollversuche im System der isolierten, ventilerten und perfundierten Mauslunge wurden vor Applikation der radioaktiven Tracer bei einer Perfusatemperatur von 37°C 90µl physiologischer Kochsalzlösung mit Hilfe des Mikrosprayers in die Mauslunge instilliert. Nach der Applikation der radioaktiven Tracer ( $^{22}\text{Na}$  und [ $^3\text{H}$ ] Mannitol) in die distalen Atemwege wurde die Clearance des  $^{22}\text{Na}$  kontinuierlich für 60 Minuten erfasst. Etwa 62% des applizierten  $^{22}\text{Na}$ , welches als Marker für die zugrundeliegenden, aktiven Transportmechanismen der alveolären Clearance gilt, wurde innerhalb des beobachteten Zeitraums unter Kontrollbedingungen aus dem Alveolarraum entfernt (Abbildung 13). Die Akkumulation von [ $^3\text{H}$ ] Mannitol als Marker der passiven, parazellulären Permeabilität wurde unter Kontrollbedingungen nicht beeinflusst. Die Applikation von bereits in ihrer Wirkung auf die alveoläre Clearance bekannten Substanzen (Konzentrationen im Mikrospray s. Tabelle 1) diente zur Validierung und Etablierung des Systems und zeigte die durch Amilorid (Hemmung des epithelialen Natriumkanals, ENaC) und Ouabain (Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ) zu erwartende Beeinträchtigung der alveolären Flüssigkeitsclearance. Die alleinige Anwendung von Amilorid führte zu einer Verringerung des alveolären Flüssigkeitstransportes um etwa 7% auf 55%, die Anwendung von Ouabain zur Reduktion auf 42%, wobei bei Kombination der beiden Inhibitoren kumulative Wirkungen beobachtet werden konnten und aufgrund deutlich eingeschränkter Clearance nur 38% des applizierten  $^{22}\text{Na}$  während des 60-minütigen Beobachtungszeitraumes aus dem Alveolarraum entfernt wurden.

Die Anwendung der  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten Isoproterenol und Terbutalin führte erwartungsgemäß zu einer beschleunigten alveolären Clearance um etwa 5 (Terbutalin) bis 10% (Isoproterenol, Abbildung 13).

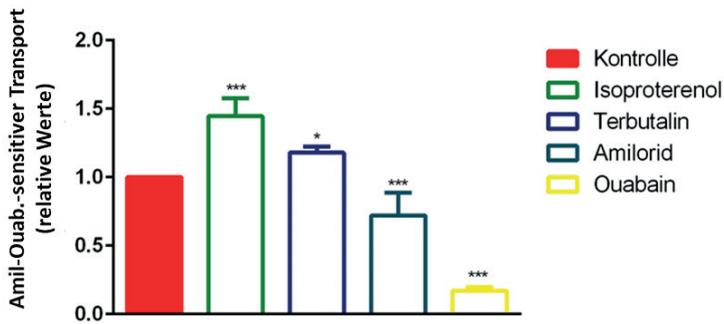
### 5.1.1 Alveoläre Clearance bei Anwendung von Isoproterenol, Terbutalin, Amilorid und Ouabain



**Abbildung 13:** Die Applikation von bereits in ihrer Wirkung auf die alveoläre Clearance bekannten Substanzen diente zur Kontrolle und Etablierung des Systems. Als Startpunkt wurde die Menge der radioaktiven Tracer in der Lunge auf 100% (Counts max), die Menge im Perfusat auf 0% gesetzt. Deutlich ist die Reduktion bzw. Steigerung des aktiven Transportes -verglichen mit der Mauslunge unter Kontrollbedingungen (rote Kurve) - zu erkennen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert einer Anzahl n von voneinander unabhängigen Experimenten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden Standardabweichungen nicht angegeben, diese wurden jedoch bei allen folgenden Auswertungen miteinbezogen.

Kontrolle n=10; Isoproterenol n=5; Terbutalin n=3; Amilorid n=5; Ouabain n=4

Bei der Kalkulation des Ouabain -Amilorid-sensitiven Transportes konnten diese Beobachtungen weiter verifiziert werden. Der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Inhibitor Ouabain und Amilorid als Inhibitor des epithelialen Natriumkanals (ENaC, epithelial sodium channel) führten zu einer deutlichen Verringerung des aktiven  $\text{Na}^+$ -Transportes, während die  $\beta$ -Agonisten Terbutalin und Isoproterenol zu einer Steigerung der Amilorid- Ouabain- sensitiven  $^{22}\text{Na}$ -Clearance führten (Abbildung 14).

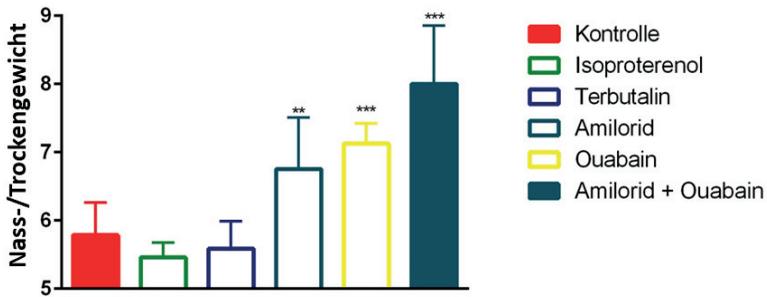


**Abbildung 14: Kalkulation des Amilorid-Ouabain sensitiven Transportes**

Während Amilorid und Ouabain den aktiven  $\text{Na}^+$ -Transport deutlich verminderten, führte die Applikation der beiden  $\beta$ -Agonisten zur Beschleunigung der Amilorid-Ouabain sensitiven  $^{22}\text{Na}$ -Clearance.

Kontrolle  $n=10$ ; Isoproterenol  $n=5$ ; Terbutalin  $n=3$ ; Amilorid  $n=5$ ; Ouabain  $n=4$ ; einfaktorielles Varianzanalyse (ANOVA); \* $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; im Vergleich zur Kontrolle, Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)

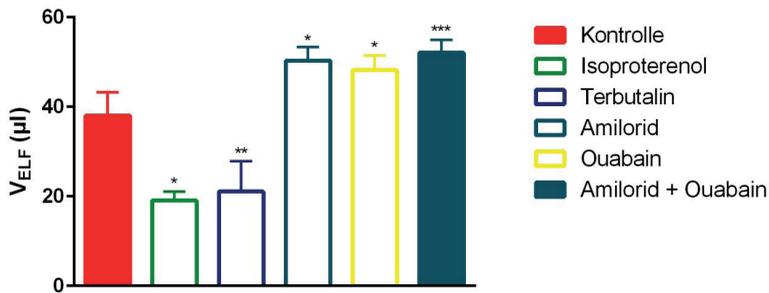
Der Feucht-/Trockengewichtsquotient (wet/dry weight ratio) dient als Parameter der pulmonalen extravaskulären Flüssigkeitsansammlung und zeigt sich bei Amilorid, Ouabain und deren Kombination durch den gehemmten aktiven Flüssigkeitstransport deutlich erhöht, während Terbutalin und Isoproterenol im Beobachtungszeitraum zu einer beschleunigten Clearance und dadurch bedingt zu einem deutlich niedrigeren Quotienten führten (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Bestimmung des Feucht-/Trockengewichtsquotienten im Anschluss an die Messung der Lungenclearance**

Nach Versuchsende wurde die linke Lunge abgebunden und eine bronchoalveoläre Lavage der rechten Lunge durchgeführt. Die linke Lunge wurde genutzt, um den Feucht-/Trockengewichtsquotienten zu bestimmen.

Kontrolle  $n=13$ ; Isoproterenol  $n=6$ ; Terbutalin  $n=3$ ; Amilorid  $n=9$ ; Ouabain  $n=6$ ; Amilorid+Ouabain  $n=3$ ; einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA); \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; im Vergleich zur Kontrolle, Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)



**Abbildung 16: Bestimmung der Menge des epithelialen Flüssigkeitsfilms über die Menge des enthaltenen <sup>22</sup>Na in der bronchoalveolären Lavage**

Die Lavage wurde direkt nach Beendigung des jeweiligen Experimentes durchgeführt.

Kontrolle n=5; Isoproterenol n=3; Terbutalin n=3; Amilorid n=4; Ouabain n=5; Amilorid+Ouabain n=4; einfaktorielles Varianzanalyse (ANOVA); \*p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; im Vergleich zur Kontrolle, Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)

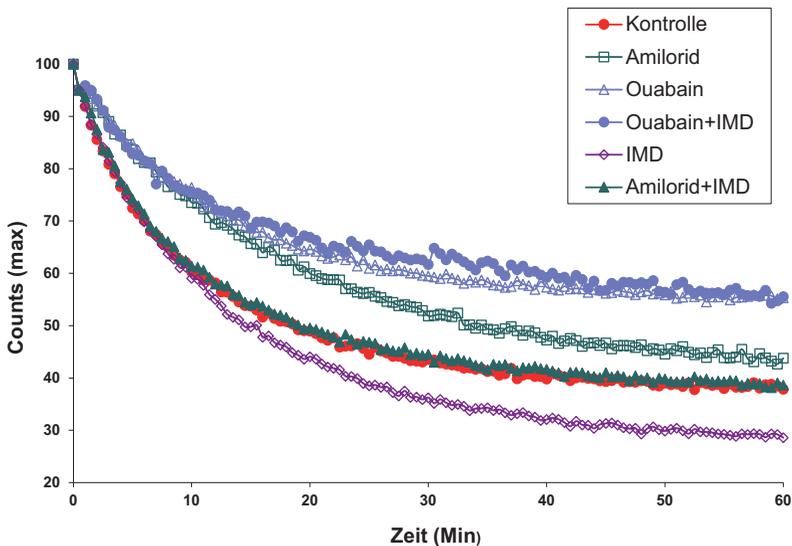
Wie aus Abbildung 16 deutlich wird, in der die Bestimmung des epithelialen Flüssigkeitsfilms (epithelial lining fluid) aus der bronchoalveolären Lavage dargestellt ist, führt eine Behandlung mit den Inhibitoren des alveolären Flüssigkeitstransportes Amilorid, Ouabain und deren Kombination zu einem Anstieg des epithelialen Flüssigkeitsfilms. Dies entspricht einer erhöhten Konzentration von <sup>22</sup>Na (Abbildung 16) und ist gleichbedeutend mit der Entwicklung eines Lungenödems. Durch Isoproterenol und Terbutalin konnte eine Beschleunigung der alveolären Clearance nachgewiesen werden, die in einem entsprechend niedrigeren Volumen des Flüssigkeitsfilms resultiert.

---

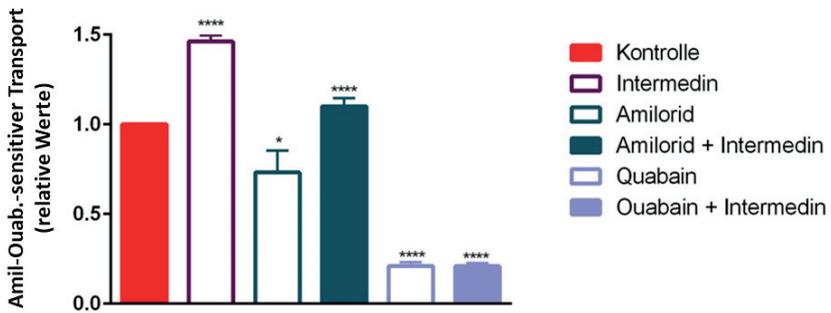
### 5.1.2 Alveoläre Clearance bei Anwendung von Amilorid, Ouabain und Intermedin/Adrenomedullin 2

Mit alleinigem Einsatz des neuen, zur Kalzitonin-Peptid-Familie zählenden IM/AM2 konnte die alveoläre Flüssigkeitsclearance innerhalb des Beobachtungszeitraumes um bis zu 10 % erhöht werden (Abbildung 17). Innerhalb des 60-minütigen Beobachtungszeitraumes wurden etwa 72 % des vorher instillierten  $^{22}\text{Na}$  aus dem Alveolarraum entfernt. Bei Kombination von IMD/AM2 mit Ouabain konnte wie erwartet kein positiver Effekt durch Einsatz von IMD/AM2 werden, was sich in einer nahezu identischen Tracerkinetik zeigte (lila Verlaufskurven in Abbildung 17). Eine positive Wirkung von IMD wurde durch Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  verhindert.

Im Gegensatz dazu konnte bei einer Kombination vom IMD/AM2 und Amilorid, dem Inhibitor des epithelialen Natriumkanals, trotz der von Amilorid hervorgerufenen Reduktion des alveolären Transportes durch IMD/AM2 eine Beschleunigung auf Kontrollniveau erzielt werden (Abbildung 17). Dies zeigte sich auch bei der Kalkulation des Ouabain-Amilorid-sensitiven Transportes (Vergleich Amilorid und Kombination Amilorid mit Intermedin; Abbildung 18), dieser wurde durch alleinige Anwendung von Intermedin nochmals um etwa die Hälfte zum Kontrollniveau beschleunigt. Wie in Abbildung 18 und 19 ersichtlich, entsprechen die Werte des Nass-/Trockengewichts-koeffizienten und das Volumen des epithelialen Flüssigkeitsfilmes ( $V_{\text{ELF}}$ ) den vorher im System der isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslunge erhobenen Clearanceraten



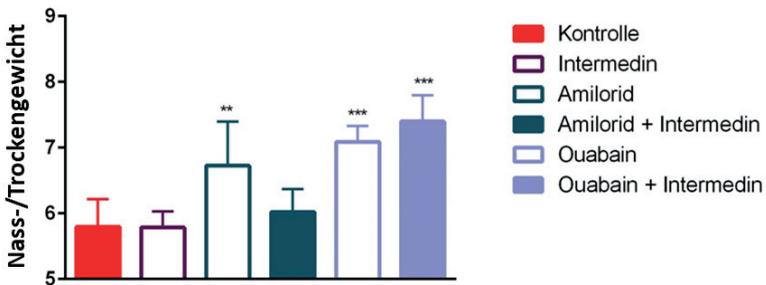
**Abbildung 17: Einsatz von Amilorid und Ouabain und deren Kombination mit Intermedin.** Während die Wirkung von Ouabain durch Intermedin nicht aufgehoben werden konnte, wurde die alveoläre Clearance durch Einsatz von Intermedin trotz Amilorid-Applikation und damit einhergehender Hemmung des epithelialen Natriumkanals ENaC auf Kontrollniveau beschleunigt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert einer Anzahl  $n$  von voneinander unabhängigen Experimenten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden Standardabweichungen nicht angegeben, diese wurden jedoch bei allen folgenden Auswertungen miteinbezogen. Kontrolle  $n=10$ ; Intermedin  $n=5$ ; Amilorid  $n=5$ ; Amilorid+Intermedin  $n=4$ ; Ouabain  $n=3$



**Abbildung 18: Amilorid-Ouabain-sensitiver <sup>22</sup>Na-Transport.**

Das in unserem neu etablierten System der isolierten Mauslunge zu testende Peptid IMD zeigte in der Lunge eine deutliche Erhöhung der Ouabain-Amilorid sensitiven Clearance.

Kontrolle n=10; Intermedin n=5; Amilorid n=5; Amilorid+Intermedin n=4; Ouabain n=3; einfaktorielles Varianzanalyse (ANOVA); \* p < 0,05; \*\*\*\* p < 0,0001; im Vergleich zur Kontrolle, Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)

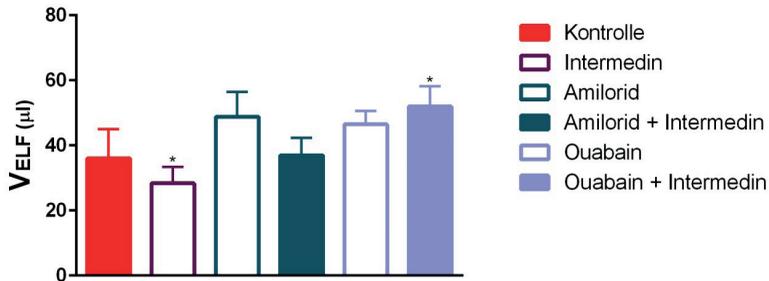


**Abbildung 19: Nass-/Trockengewichtsquotienten nach Anwendung von Intermedin kombiniert mit Amilorid und Ouabain.**

Die gemessenen Quotienten bei Einsatz der Hemmstoffe entsprechen der in der isolierten Mauslunge ermittelten Reduktion des Flüssigkeitstransportes. Eine gehemmte Clearance entspricht der Entwicklung eines stärkeren Ödemes bei Anwendung von Amilorid und Ouabain und resultiert in einem erhöhten Nass /Trockengewichtsquotienten. Der niedrigere Quotient

für die Kombination von Amilorid und Intermedin – verglichen mit der alleinigen Anwendung von Amilorid – spiegelt die in der isolierten Mauslung gestiegene Clearance auf Kontrollniveau.

Kontrolle **n**=13; Intermedin **n**=5; Amilorid **n**=9; Amilorid+Intermedin **n**=4; Ouabain **n**=6; Amilorid+ Ouabain **n**=3; einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA); \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; im Vergleich zur Kontrolle, Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)



**Abbildung 20: Messung der bronchoalveolären Lavage mittels ionenselektiver Elektrode zur Bestimmung des Na<sup>22</sup>- Gehaltes und des Volumens des epithelialen Flüssigkeitsfilmes.**

Mit Intermedin lässt sich vergleichend zu den Kontrollbedingungen eine Beschleunigung der alveolären Clearance und damit ein geringerer Na<sup>22</sup>- Gehalt messen, was einer gesteigerten alveolären Clearance entspricht.

Kontrolle **n**=5; Intermedin **n**=5; Amilorid **n**=4; Amilorid+Intermedin **n**=3; Ouabain **n**=5; Ouabain+Intermedin **n**=3; einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA); \*  $p < 0,05$ ; im Vergleich zur Kontrolle, Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)

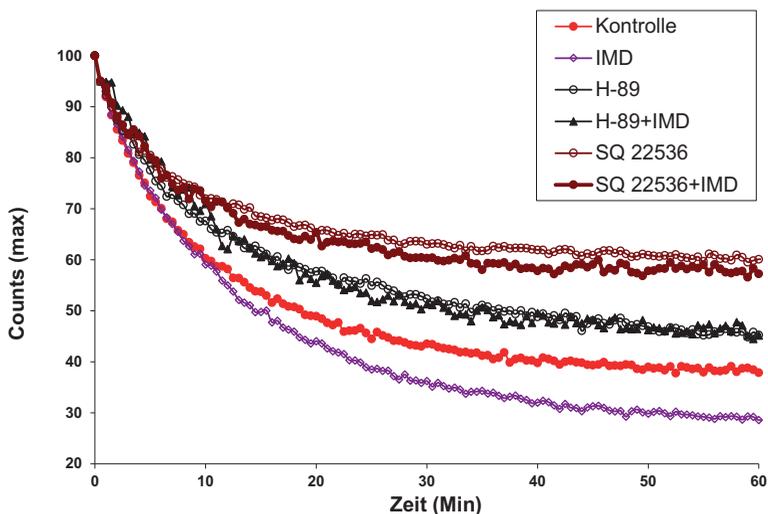
---

### 5.1.3 Alveoläre Clearance bei Anwendung von H-89, SQ 22536 und Intermedin/Adrenomedullin 2

Unserer Hypothese folgend, dass IMD positive Wirkungen auf die alveoläre Clearance hat, indem es durch Aktivierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase über Adenylatzyklase, Erhöhung des sekundären Botenstoffes cAMP und die Proteinkinase A die Rolle der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase als Schlüsselmolekül des aktiven Flüssigkeitstransportes in der Lunge unterstützt, wurden die Auswirkungen der Inhibitoren SQ 22536 (Hemmung der Adenylatzyklase) und H-89 (Hemmung der Proteinkinase A) in unserem neuen System der isolierten Mauslunge überprüft.

Wie erwartet, verlangsamte sich bei Anwendung beider Hemmstoffe die alveoläre Flüssigkeitsclearance, bei Einsatz von H-89 wurden 55%, mit SQ 22536 38% des applizierten  $^{22}\text{Na}$  innerhalb des Beobachtungszeitraums von 60 Minuten aus dem Alveolarraum entfernt. Eine gleichzeitige Anwendung von Intermedin zeigte, dass durch Wirkung beider Inhibitoren positive Effekte auf die alveoläre Flüssigkeitsclearance ausblieben (Abbildung 21).

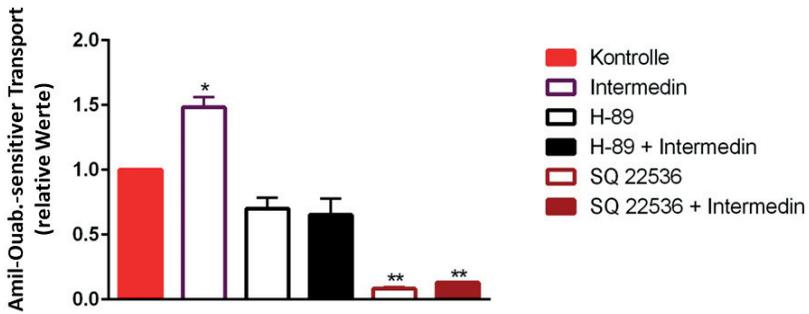
Bei der Betrachtung des Quotienten zwischen Nass- und Trockengewicht der Lunge zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Verringerung der alveolären Clearance (Abbildung 21) und der Erhöhung des extravasalen Lungenwassers und damit der Ödemflüssigkeit in der Lunge (Abbildung 24). IMD/AM2 konnte das Volumen des epithelialen Flüssigkeitsfilmes - verglichen mit der Mauslunge unter Kontrollbedingungen - deutlich reduzieren. Entsprechend der starken Hemmung des alveolären Flüssigkeitstransportes durch SQ 22536 und H-89 und damit einer Akkumulation von Flüssigkeit in der Lunge, stieg der Quotient von Nass-/Trockengewicht vor allem bei Anwendung von SQ, bzw. der Kombination von SQ und IMD/AM 2 stark an (Abbildung 23).



**Abbildung 21: Einsatz von SQ 22536 und H-89 im System der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge**

Durch den Einsatz des Proteinkinase A (PKA)-Inbibitors H89 wurde die alveoläre Clearance verlangsamt, ebenso zeigte sich eine deutliche Reduktion durch die Applikation des Adenylatzyklaseinhibitors SQ 22536. Eine Kombination beider Hemmstoffe mit Intermedin spricht aufgrund ausbleibender positiver Effekte auf die alveoläre Flüssigkeitsresorption für eine Beeinflussung von Adenylatzyklase und Proteinkinase A durch Intermedin. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert einer Anzahl  $n$  von voneinander unabhängigen Experimenten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden Standardabweichungen nicht angegeben, diese wurden jedoch bei allen folgenden Auswertungen miteinbezogen.

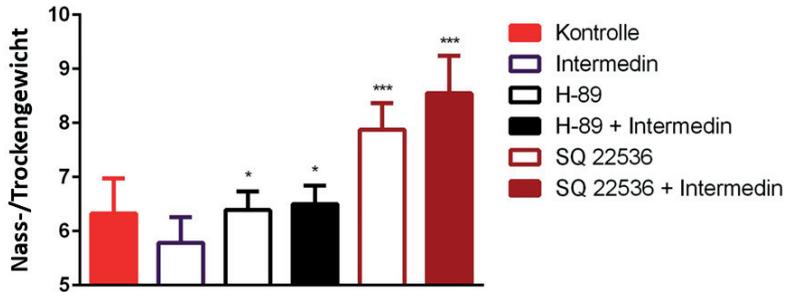
Kontrolle  $n=10$ ; Intermedin  $n=5$ ; H-89  $n=4$ ; H-89+Intermedin  $n=4$ ; SQ  $n=4$ ; SQ+Intermedin  $n=3$



**Abbildung 22: Amilorid-Ouabain sensitiver Transport bei Anwendung des Protein-kinase A- und Adenylatzyklaseinhibitors**

Durch Anwendung von SQ 22536 und H-89 konnte die der Amilorid-Ouabain-sensitive Transport deutlich reduziert werden. Wie erwartet konnte eine Steigerung durch gleichzeitigen Einsatz von IMD nicht hervorgerufen werden.

Kontrolle n= 10; Intermedin n=5; H-89 n=4; H-89+Intermedin n=4; SQ n=4; SQ+Intermedin n=3, einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA); \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; im Vergleich zur Kontrolle, Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)

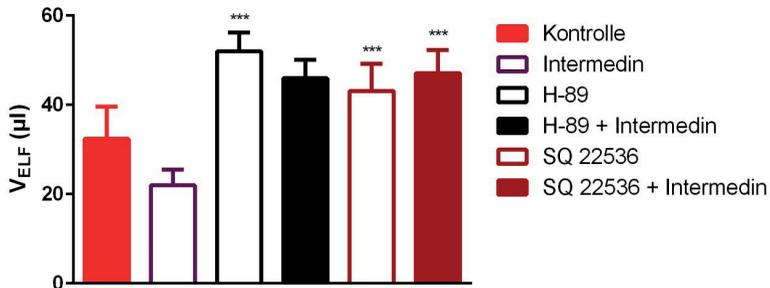


**Abbildung 23: Nass-/Trockengewicht nach Anwendung von SQ 22536 und H-89**

Bei der Betrachtung des Quotienten zwischen Nass (weight wet) - und Trockengewicht (weight dry) der Lunge zeigt sich eine deutliche Beziehung zwischen Verringerung der alveolären Clearance (Abb.21) durch Hemmung der PKA und Adenylatzyklase und

Erhöhung des extravasalen Lungenwassers.

Kontrolle n= 13; Intermedin n=5; H-89 n=18; H-89+Intermedin n=7; SQ n=5; SQ+Intermedin n=3, einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA); \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001; im Vergleich zur Kontrolle, Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)



#### Abbildung 24: Volumen des epithelialen Flüssigkeitsfilmes

Die hohen Konzentrationen des Na<sup>22</sup>- Gehaltes bei der Messung des epithelialen Flüssigkeitsfilmes stehen mit den in der Mauslunge gemessenen Clearanceraten in direktem Zusammenhang, ebenso den Quotienten von Nass-/Trockengewicht und den Daten des Amilorid-Ouabain-sensitiven-Transportes bei Einschränkung der Adenylatzyklase und Proteinkinase A.

Kontrolle n= 5; Intermedin n=6; H-89 n=3; H-89+Intermedin n=3; SQ n=3; SQ+Intermedin n=3; einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA); \*\*\* p < 0,001; im Vergleich zur Kontrolle, Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)

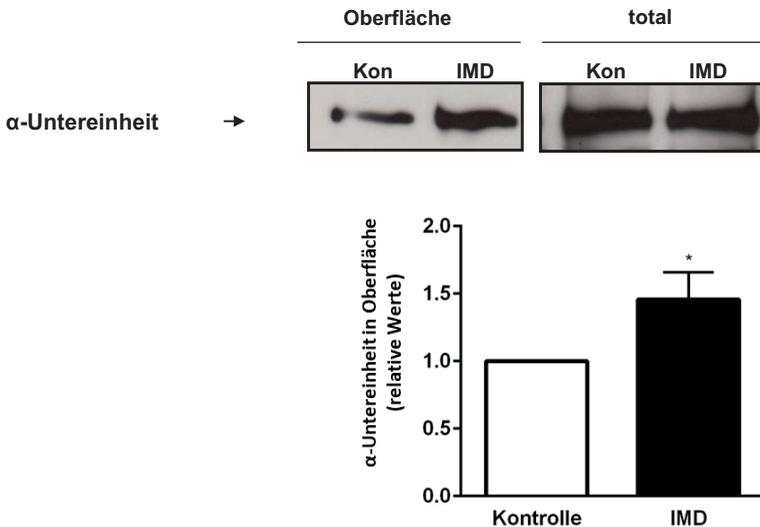
## 5.2 Biotinylierung und Streptavidin pull-down

Zur Verifizierung der im System der isolierten Mauslunge erhaltenen Ergebnisse wurden zusätzlich Experimente in Monolayern aus Alveolarepithelzellen durchgeführt.

Durch Biotinylierung und nachfolgenden Streptavidin-pull down konnte eine signifikant erhöhte Expression der  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in der Membran von Alveolarepithelzellen vom Typ II (ATII Zellen) durch Inkubation mit 100nM IMD nachgewiesen werden (Abbildung 25). Dieses Ergebnis konnte für die  $\beta$ -Untereinheit nicht bestätigt werden, hier kam es nur zu einer leichten, nicht signifikanten Erhöhung der Expression in der Zelloberfläche der Alveolarepithelzellen (Abbildung 26).

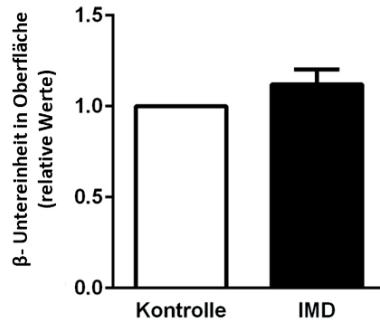
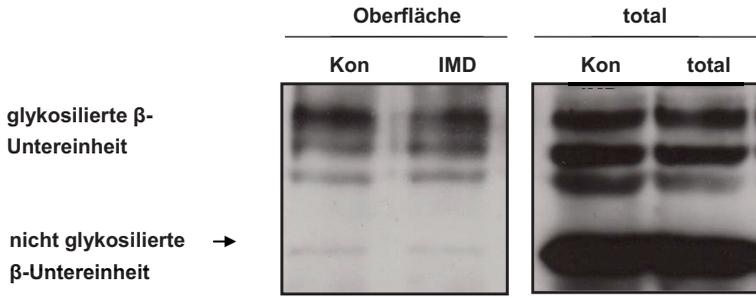
Der gleichzeitige Einsatz von H-89 verminderte die Wirkung von IMD auf die  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase, eine gleichzeitige Hemmung der Adenylatzyklase durch SQ22536 unterdrückte die Wirkung von IMD/AM2 komplett (Abbildung 27 und 28).

### 5.2.1 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase



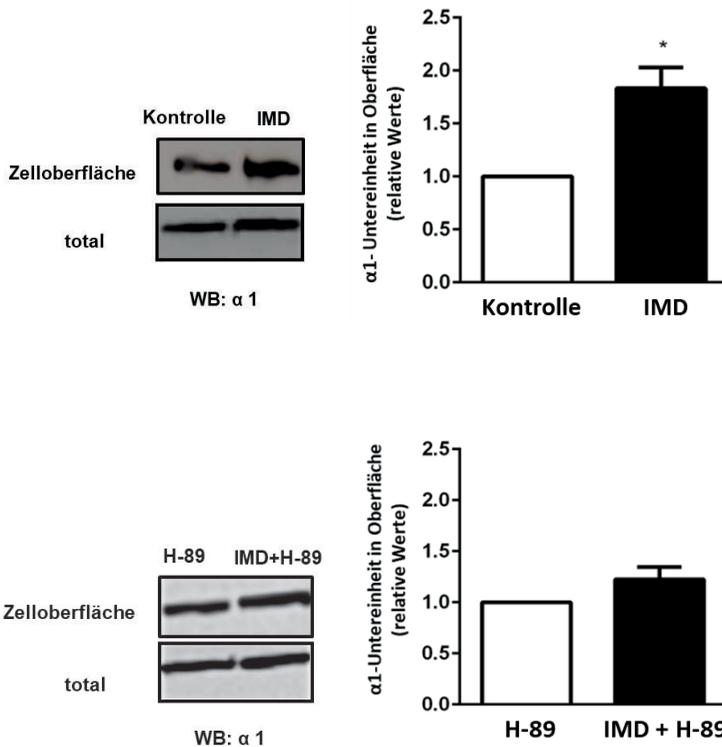
**Abbildung 25: Signifikante Erhöhung der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in der Zelloberfläche**

Inkubation der Zellen mit 100nM Intermedin (IMD), Biotinylierung und anschließendes Streptavidin-pull down in ATII Zellen;  $n=6$ , gepaarter  $t$ -Test, \*  $p < 0,05$ ; Fehlerbalken zeigt Standardabweichung (SD)



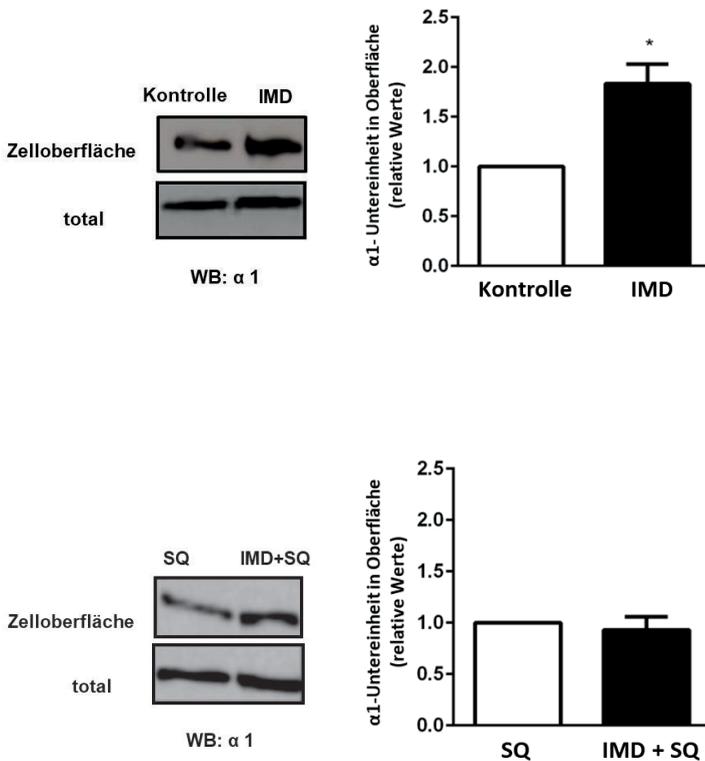
**Abbildung 26: Statistisch nicht signifikante Erhöhung der  $\beta$ - Untereinheit der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in der Oberfläche der ATII Zellen**

Inkubation mit Intermedin;  $n=5$ , gepaarter  $t$ -Test; Fehlerbalken zeigt Standardabweichung (SD)



**Abbildung 27: Intermedin führt zu einer statistisch signifikanten erhöhten Expression der  $\alpha 1$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase in der Membran von ATH Zellen.**

Unserer Hypothese folgend konnten wir nach Biotinylierung und Streptavidin pull down zeigen, dass es bei einer Hemmung der Proteinkinase A durch H-89 nicht zu einer Erhöhung der  $\alpha 1$ - Untereinheit der  $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase durch Intermedin kommt;  $n = 3$ , gepaarter t`Test, \*  $p < 0,05$ ; Fehlerbalken zeigt Standardabweichung (SD)

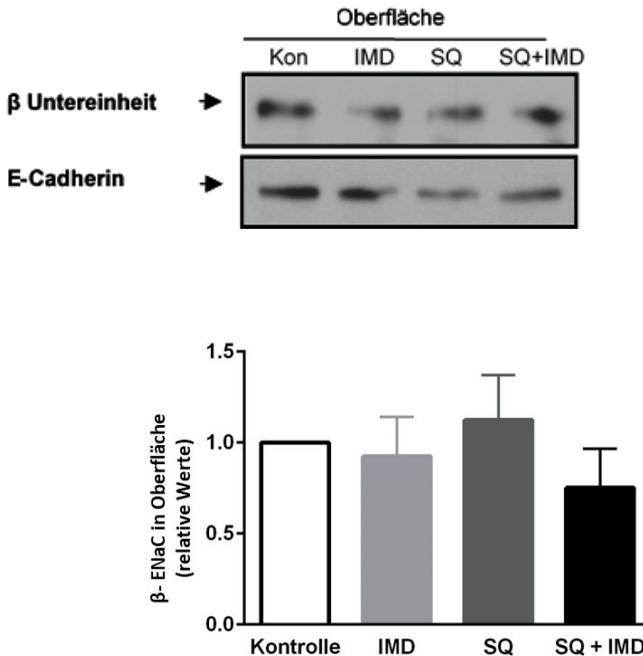


**Abbildung 28: Zelloberflächenfraktion der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  bei Anwendung von SQ 22536**  
 Im Gegensatz zu den Wirkungen von Intermedin in Abwesenheit von SQ führte die Behandlung mit Intermedin (IMD) in Gegenwart des Adenylatzyklaseinhibitors nicht zu einer Erhöhung der Zelloberflächenfraktion der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ . Repräsentative Western Blots der Zelloberflächenhäufigkeit und des gesamten Zelllysats der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , sowie ein Histogramm, dass die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimentatoren zusammenfasst sind gezeigt;  $n=3$ , gepaarter t`Test; Fehlerbalken zeigt Standardabweichung (SD)

## 5.2.2 Epithelialer Natriumkanal (ENaC)

Um mögliche zusätzliche Wirkungen von IMD auf den epithelialen Natriumkanal (ENaC) zu untersuchen, wurde der humane  $\beta$ -ENaC in einen pcDNA3.1HIS/V5 Vector cloniert (Gwoździńska et al, 2017) und in A549 Zellen exprimiert.

Eine Erhöhung des  $\beta$ -EnaC in der Zelloberfläche konnte durch den Einsatz von Intermedin/AM2 nach Biotinylierung und Streptavidin- pull down nicht belegt werden (Abbildung 29).



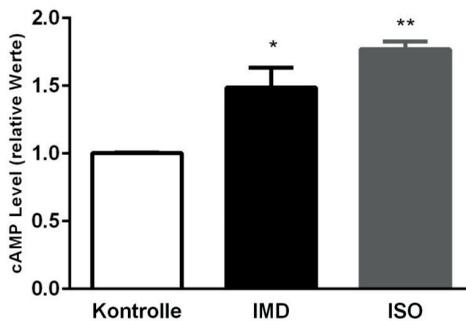
**Abbildung 29: Clonierung des humanen  $\beta$ -ENaC in einen pcDNA3.1HIS/V5 Vector (Gwoździńska et al., 2017) und Expression in A549 Zellen.**

Eine Erhöhung des  $\beta$ -ENaC in der Zelloberfläche konnte auch in humanen Zellen nicht nachgewiesen werden.  $n=5$ ; Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA); im Vergleich zur Kontrolle; Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)

## 5.3 Erfassung der Aktivierung von cAMP

### 5.3.1 R&D Systems cAMP Immunoassay

Um die Wirkung von IMD auf die Adenylatzyklase zu bestätigen, wurde ein kompetitiver cAMP- Monoassay (R&D Systems, USA) genutzt. Durch Inkubation mit Intermedin und dem  $\beta$ -Agonisten Isoproterenol, dessen Wirkungsweise über die Adenylat- zyklase- abhängige Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) bekannt ist, konnte gezeigt werden, dass auch Intermedin zu einer Erhöhung von cAMP führt (Abbildung 29).



**Abbildung 30: Messung des Anstieges von cAMP mit Hilfe eines Immunoassays (R&D Systems)**

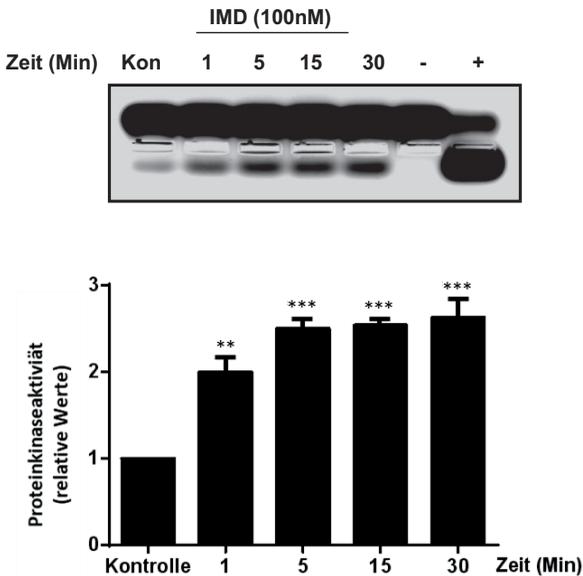
Inkubation mit Intermedin (IMD) und Isoproterenol,  $n=3$

Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; im Vergleich zur Kontrolle, Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)

## 5.4 Proteinkinase A - Assay

Aufgrund der in dem System der isolierten Mauslunge erhobenen Ergebnisse beim Einsatz des Proteinkinase A Inhibitors H-89 und des Adenylatzyklaseinhibitors SQ 22536 in Kombination mit Intermedin wurde zur weiteren Überprüfung unserer Hypothese ein Pep Tag® Proteinkinase A Assay, (Promega, Deutschland) eingesetzt.

Die zur Validierung des Proteinkinase A-Assays durchgeführten Konzentrationskurven mit eingesetzten IMD-Konzentrationen von 0,1-100nM und unterschiedlichen Inkubationszeiten von 1-30 Minuten zeigten die größte Menge an phosphorylierter PKA bei einer Konzentration von 100nM und einer Inkubationszeit von 15 und 30 Minuten (Abbildung 30 und 31).



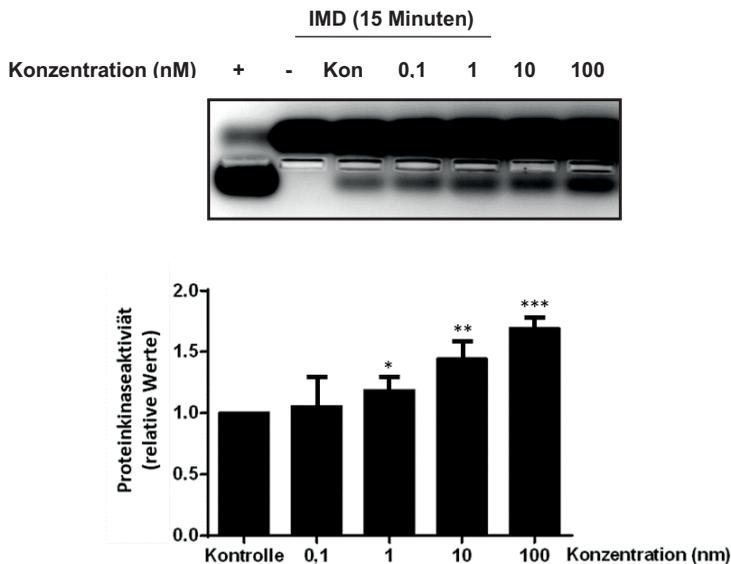
**Abbildung 31: Intermedinanwendung (100 nM) im PKA –Assay mit Inkubationszeiten von 1, 5, 15 und 30 Minuten**

Als Positivkontrolle wurde die katalytische Einheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA; 2µg/ml; 5µl, siehe oben) eingesetzt. In der Negativkontrolle befand sich nur PKA-Aktivator und Reaktionspuffer ohne Zugabe der katalytischen Untereinheit. Eine Phosphorylierung der PKA veränderte die Ladung des Moleküls von +1 zu -1. Dieser Wechsel erlaubte

es, die phosphorylierten (untere Reihe) von den nicht-phosphorylierten Anteilen der PKA (obere Reihe) in einem neutralen Agarosegel zu unterscheiden.

In unserer Versuchsanordnung zeigte sich bei Kombination mit Intermedin nach 15 Min und 30 Min die höchste Menge an phosphorylierter PKA (untere Abbildung). Während der 15minütigen Inkubationszeit kam es zu einem Aktivitätsanstieg um etwa 182% verglichen mit der Kontrolle, welche nach 30 Minuten nur geringgradig höher lag. Nach 1 Minute konnte eine Verdopplung der Proteinkinaseaktivität beobachtet werden.

n= 4 Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA); \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; im Vergleich zur Kontrolle, Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)

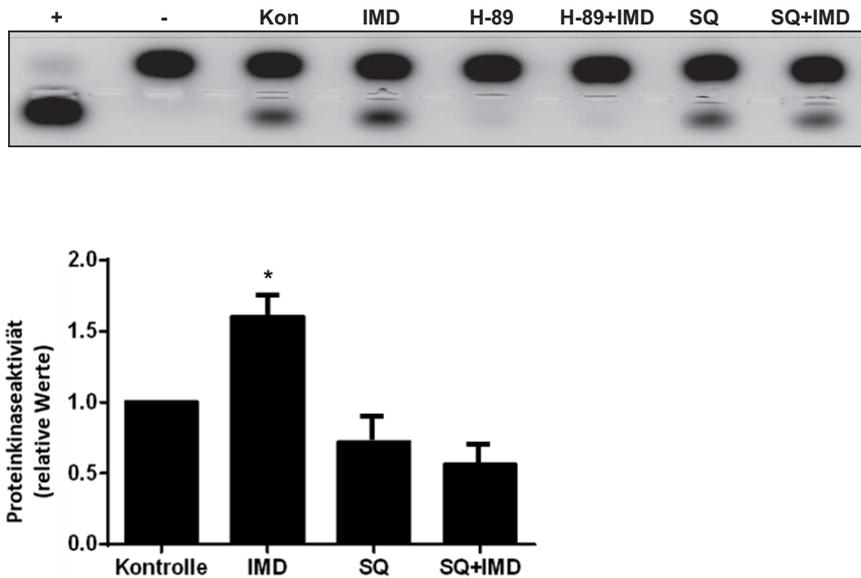


**Abbildung 32: Konzentrationskurve mit 0,1; 1; 10 und 100nM Intermedin**

Unterscheidliche Konzentrationen mit einer Inkubationsdauer von 15 Minuten in der oberen Reihe neben der Positivkontrolle (katalytische Untereinheit PKA, 2µg/ml; 5µl, siehe oben) und der Negativkontrolle. Mit einer Konzentration von 100nm konnte bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten der deutlichste Anstieg phosphorylierter PKA in der unteren Reihe zu (siehe untere Reihe ganz rechts) mit einer Erhöhung um etwa 75% im Vergleich zur Kontrolle erzeugt werden (Balken rechts in der unteren Abbildung)

n=4; Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA); \*p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle, Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)

Durch 15-minütige Inkubation des Proteinkinaseinhibitors H-89 in einer Kombination mit einer IMD -Konzentration von 100nM konnte eine vorher beobachtete Phosphorylierung der PKA (Abbildung 31 und 32) durch Intermedin unterdrückt werden (Abbildung 33).



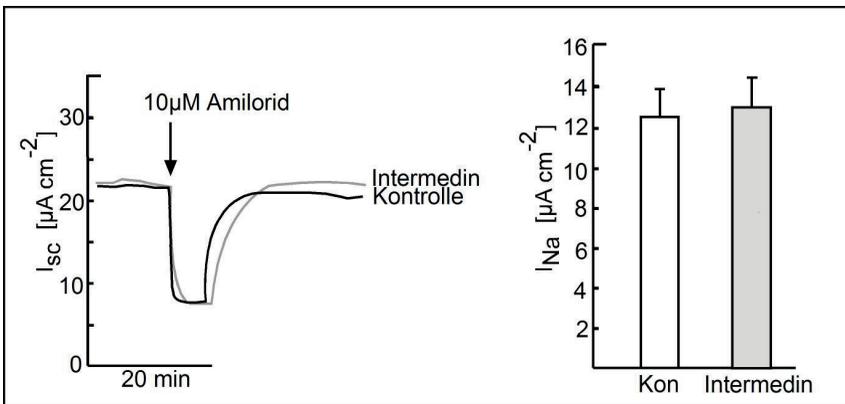
**Abbildung 33: Anwendung des Proteinkinase A Inhibitors H-89 und des Adenylatzyklaseinhibitors SQ 22536**

In der oberen Abbildung läßt sich in der unteren Reihe eine Erhöhung der Menge an phosphorylierter PKA- hervorgerufen durch Intermedin- und deren Hemmung durch den Proteinkinase A Inhibitor H-89 und den Adenylatzyklaseinhibitor SQ 22536 bei einer Konzentration von 100nM IMD und einer Inkubationszeit von 15 Minuten ablesen. Während IMD alleine zu einer Phosphorylierung der PKA führte, konnte durch H-89 und dessen Kombination mit IMD wie erwartet keine Phosphorylierung durch direkte Hemmung der PKA hervorgerufen werden. Durch Hemmung der Adenylatzyklase mittels SQ 22536 (Hemmung der Adenylatzyklase) war eine geringere Phosphorylierung der PKA zu beobachten (untere Reihe rechts).

n=3; \*p < 0,05; einfaktorielles Varianzanalyse (ANOVA); im Vergleich zur Kontrolle, Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)

## 5.5 Ussing-Kammer Messung

Eine Änderung und damit ein Einfluss von IMD/AM2 auf den amilorid-sensitiven Transport von H441-Zellen - mit hauptsächlichlicher Beteiligung des epithelialen Natriumkanals (ENaC) - konnte durch Anwendung in den Ussing-Kammer Experimenten ausgeschlossen werden. Es wurde bestätigt, dass die positive Wirkung von IMD/AM2 auf den alveolären Flüssigkeitstransport nicht durch ENaC, sondern die Aktivierung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  vermittelt wird (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Einfluss von IMD/AM2 auf den Amilorid-sensitiven Strom von H441-Zellen.**

Die H441-Zellen wurden 1 Stunde mit 200 nM Intermedin vorinkubiert und dann der Amilorid-sensitive Strom gemessen.  $n=5$ ; Student- t-Test; Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen (SD)

---

## 6 Diskussion

Das in 2004 von Takei et al. und Rho et al. in unabhängigen Laboratorien isolierte, der Kalzitinin-Peptid-Familie zugehörige Intermedin/Adrenomedullin2 (IMD/AM2) hat vielfältige Wirkungen. Es zeigt eine protektive Wirkung gegenüber oxidativem Stress, ebenso wie AM und CGRP (Takei et al., 2004; Rho et al., 2004). IMD/AM2 konnte als Stabilisator der Permeabilität des Lungenendothels identifiziert und seine protektive Wirkung durch eine erhöhte Expression als Reaktion auf hypoxischen Stress in Lungenendothelzellen nachgewiesen werden (Pfeil et al., 2009).

Bis heute gibt es keine Untersuchungen über eine Einwirkung von IMD/AM2 auf das Lungenepithel. Das Lungenepithel spielt als Bestandteil der Blut-Gas-Schranke eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Oberflächenspannung der Alveolen, den lokalen Abwehrmechanismen der Lunge, beim Gasaustausch und der Auflösung pulmonaler Ödeme (Ware et al., 2001). Es ist unter physiologischen Bedingungen mit ausreichend Sauerstoff angereichert, da dieser über die alveolokapilläre Membran (Blut-Gas-Schranke) ausgetauscht wird. Unter einer Vielzahl von pathologischen Bedingungen, unter anderem beim akuten Atemnotsyndrom (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS), wird das Alveolarepithel nur unzureichend mit Sauerstoff versorgt.

Patienten, die unter einem ARDS leiden, entwickeln ein pathognomonisches Lungenödem, resultierend in einem verminderten Sauerstoffaustausch von den Atemwegen in die pulmonale Zirkulation (Ware et al., 2000 und 2001). Dieser hypoxische Zustand führt zu einer Verminderung der alveolären Clearance, da die basolaterale  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in intrazelluläre Kompartimente endozytiert wird. Eine andauernde Hypoxie führt sogar zu einer Degradation der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (Zhou et al., 2008). Krynenko et al. konnten zeigen, dass die aus dem Sauerstoffmangel resultierende Hyperkapnie eine Oxidation der  $\beta$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  hervorruft und eine Interaktion mit der zugehörigen  $\alpha$ -Untereinheit verhindert, wobei die  $\beta$ -Untereinheiten im Endoplasmatischen Retikulum verbleiben. Dies führt zu einer reduzierten Anzahl funktionsfähiger  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  Moleküle in der Plasmamembran (Krynenko et al., 2020).

Das hat drastische Konsequenzen, da mit der Reduktion der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Aktivität das Schlüsselprotein für den aktiven  $\text{Na}^+$ -Transport über das Alveolarepithel in seiner

---

Funktion eingeschränkt wird. Unter physiologischen Bedingungen wird  $\text{Na}^+$  an der apikalen Seite der Alveolarepithelzellen, primär durch den epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal (ENaC), in die Zelle aufgenommen (Matthay et al., 2002).

Die durch Ouabain hemmbare, basolaterale  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase sorgt für den aktiven  $\text{Na}^+$ -Transport ins Interstitium der Lunge, wobei ein transepithelialer osmotischer Gradient entsteht, dem Wasser passiv in das Interstitium und die pulmonale Zirkulation folgt und damit zur Resorption von alveolärer Flüssigkeit führt (Sznajder et al., 2002). Ist diese Resorption wie beim ARDS gestört, bleibt das Lungenödem bestehen, da die in den Alveolen vorhandene Flüssigkeit nicht resorbiert werden kann. Dies führt zu einer deutlichen Verschlechterung der Prognose für den Patienten (Matthay, 2002; Sznajder, 2001).

Aufgrund der wichtigen Funktion des Alveolarepithels für die alveoläre Clearance haben wir die Wirkung von IMD/AM2 auf das Alveolarepithel untersucht. Wir beabsichtigten, die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase als Hauptakteur der von AM2/IMD hervorgerufenen positiven Effekte auf die Funktion des Alveolarepithels zu identifizieren. Unsere Hypothese beruhte auf einer durch IMD/AM2 hervorgerufene Steigerung der Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase und damit auf der Identifikation der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase als ein Schlüsselmolekül in der Reparatur und Aufrechterhaltung der Integrität des Alveolarepithels und somit der Erhaltung des optimalen Flüssigkeitsgleichgewichtes in der Lunge.

Zu diesem Zweck arbeiteten wir sowohl mit einem von uns etablierten System der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge und zusätzlich zellbiologischen Methoden. Der Hauptvorteil dieses Systems bestand darin, dass die (Patho)-Physiologie der Lunge unabhängig vom Rest des Organismus erforscht werden konnte. Eine vollständige Kontrolle der Hämodynamik und eine kontinuierliche Erfassung wichtiger physiologischer Kenngrößen wie Drücke im Gefäßsystem, der Membranpermeabilität und das damit zusammenhängende Flüssigkeitsgleichgewicht, sowie des Gasaustausches waren somit möglich. Die physiologische Struktur des Lungengewebes, die Zellpolarität und Zell-zu-Zell-Kontakte blieben erhalten (Seeger et al., 1994, Rummel, 2007).

Verglichen mit dem System der flüssigkeitsgefüllten Lunge war man mit unserem System in der Lage, über mehrere Stunden kontinuierlich Messungen durchzuführen, während im System der flüssigkeitsgefüllten Lunge nur ein Zeitpunkt im komplexen Gesamtverlauf, nämlich in diesem Fall der Zeitpunkt der Probenentnahme, betrachtet wird.

---

Zusätzlich wird das alveoläre Mikromilieu durch das Instillat bei flüssigkeitsgefüllten Lungen verändert und für den Vorgang der Instillation muß die Ventilation- soweit vorhanden- unterbrochen werden. Das erscheint nachteilig für den weiteren Versuchsverlauf, da bewiesen ist, dass durch die Ausdehnung der Lunge- z.B. nach Wiederanschießen an die Ventilation nach vorherigem alveolären Kollaps- ein Stimulus für eine vermehrte Produktion von Surfactant gesetzt wird (Wirtz und Dobbs, 1990; Wirt und Schmidt, 1992). Diese Aktivierung hat weitere Veränderungen des aktiven und passiven transepithelialen Transportes und der alveolären Flüssigkeitsabsorption zur Folge (Vejlstrup, Boyd und Dorrington, 1994) und kann so zu einer Verfälschung der Ergebnisse beitragen.

Ein Problem bei der Anwendung unseres Systems hätte sich aus dem rezirkulierenden Modus der Perfusion ergeben können: Zellen, Stoffwechselprodukte und Mediatoren könnten aus der Lunge in das Perfusat übergehen und dort durch die Rezirkulation und die fehlenden intrinsischen Abbaumechanismen akkumulieren (Schäfer, 2007). Diesbezüglich zeigten Weißmann et al. durch Verwendung von Oxygenatoren, dass sich dieser Umstand nicht auf die zu messenden Parameter und die dadurch erhaltenen Ergebnisse auswirkt (Weißmann et al., 2005).

Natürlich konnten die körpereigenen Systeme, die normalerweise für den Abbau nicht benötigter Substanzen verantwortlich sind, in der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge nicht miteinbezogen werden. In unserem Systemaufbau konnte dieser eventuelle Einfluss durch im Plasma zirkulierende Mediatoren, Hormone und zirkulierende Blutzellen leicht kontrolliert oder ausgeschlossen werden: Der Akkumulation wurde entgegengewirkt, indem die Lungen unter Erhöhung der Perfusionsgeschwindigkeit und der Temperatur bis zum Erreichen der für die Experimente zu Grunde gelegten Messwerte (Systemgleichgewicht) gespült wurden. Während diesem etwa 10 Minuten dauernden Zeitraum wurde das Perfusat nach Passage der Lunge in ein Abfallgefäß geleitet und verworfen. Herausgespülte Zellen, Proteine und nicht-zelluläre Moleküle gingen deshalb nicht in den Versuchsablauf ein. Trotz der kontinuierlichen und der am Beginn des Experimentes nicht zirkulierenden Perfusion der Lunge blieben im noch vorhandenen Gefäßsystem aufgrund von Adhäsionskräften Leukozyten wie z.B. Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten im Gefäßbett zurück. Ihre Beteiligung an biochemischen und physiologischen Prozessen ist nicht genau bekannt und nur sehr schwer nachzuvollziehen. Mehrere Arbeitsgruppen konnten jedoch nachweisen, dass die hierdurch herbeigeführten Effekte zu vernachlässigen sind (Post et al., 1992; Michelakis et al., 2004;

---

Waypa und Schuhmacker, 2006). In unsere Experimente wurden nur solche Lungen einbezogen, die während des Zeitraumes zur Erlangung eines Systemgleichgewichts physiologische und konstante Messwerte zeigten.

Als Applikationsmethode unserer pharmakologischen Modulatoren und der radioaktiven Tracer wählten wir einen Mikrosprayer<sup>®</sup> der Firma Penn Century. Dieser erwies sich als nützliches Werkzeug für die Applikation von Substanzen in die unteren Atemwege. Ohne Probleme war nach etwas Übung eine Instillation der Substanzen kurz vor der Aufzweigung der Trachea (Bifurcatio tracheae) in die beiden Hauptbronchen möglich, so dass sich das generierte Aerosol gleichmäßig auf die rechte und linke Lunge verteilen konnte. Dies wurde durch Applikation von NaCl mit zugesetzter Tinte während Kontrollversuchen bestätigt - das Verteilungsmuster des in Abbildung 7 gezeigten Fotos der Ventralansicht einer Mauslunge nach Applikation (Bio Equip.cn / MicroSprayer<sup>®</sup> Aerosolizer, Bio Jane Trading Limited, Penn Wu Device) konnte mit Hilfe des Mikrosprayers und des selbst konstruierten Injektionsstopfens (Schema Abbildung 7) reproduziert werden.

Bivas-Benita und Mitarbeiter konnten 2005 im Rahmen der Anwendung dieses Mikrosprayers zeigen, dass sich lebende Mäuse nach einer Applikation einer Substanzmenge von 50 µl innerhalb von 24 Stunden wieder komplett erholen. Eine gute Verteilung des mit dem Mikrosprayer erzeugten Aerosols konnte ebenfalls bewiesen werden (Bivas-Benita et al., 2005). Die intratracheale Instillation wird als eine der gebräuchlichsten Methoden der pulmonalen Applikation von Substanzen angesehen. Da bei unseren Versuchen Radioaktivität eingesetzt wurde, waren vor allem die Vorteile der nur geringen benötigten Substanzmenge, des minimalen Substanzverlustes und die Quantifizierbarkeit der eingesetzten Dosis wichtig. Als nachteilig ist anzusehen, dass mit dieser Applikationsart die physiologischen Inhalationsmechanismen umgangen wurden und eine gewisse Übung aufgrund der geringen Größenverhältnisse der Maus notwendig war. In unserem Fall war es möglich, die Substanzen ohne eine Unterbrechung der Ventilation durch einen Injektionsstopfen (Eigenbau, modifizierter Venenkatheter 20G, B.Braun, Melsungen, Abbildung 7) zu applizieren, so dass die Gefahr eines Alveolarkollapses und einer damit verbundenen Schädigung der Lunge durch Scherkräfte nach Wiederanschießen der Ventilation nicht bestand.

Bisherige Angaben zur alveolären Flüssigkeitsabsorption der Maus differieren aufgrund der Nutzung verschiedenartiger Systeme in unterschiedlichen Laboratorien. Nicht nur der teilweise vollkommen unterschiedliche grundlegende Aufbau der verwendeten Systeme, zum

---

Beispiel die Verwendung eines in-situ Systems oder einer isolierten Lunge, sondern auch weitere Variablen wie die verwendeten Ventilations- und Perfusionsparameter, das Narkosemanagement oder die Eigenschaften der unterschiedlichen Mausstämme sind miteinzubeziehen. So zeigten Ian Davis und Mitarbeiter, dass der Ventilationsdruck einen wesentlichen Einfluß auf die alveoläre Clearance und die Wirkung von  $\beta$ -Agonisten hat. Die Ventilationsdrücke zwischen den einzelnen Maussystemen sind nicht standardisiert und deshalb ist bei dem Vergleich der Ergebnisse, die in so unterschiedlichen Systemen erzeugt wurden, Vorsicht geboten.

In unserem System der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge wurden unter Kontrollbedingungen etwa 62% des applizierten  $^{22}\text{Na}$  innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 60 Minuten aus dem Alveolarraum entfernt. Fukuda und Mitarbeiter verglichen 2 unterschiedliche Systeme der flüssigkeitsgefüllten Mauslunge, wobei ein in-situ-Modell ohne Ventilation und das Zweite ein Modell einer ventilierten Lunge darstellte. Sie konnten zeigen, dass innerhalb der ersten 15 Minuten in beiden Systemen die Clearancerate 12% vom Gesamtvolumen der instillierten Ringerlösung betrug. Nach einem Zeitraum von über 30 Minuten zeigte sich, dass die Clearance in den in-situ-Lungen deutlich langsamer war als die in den ventilierten Vergleichslungen und außerdem einen erhöhten Gehalt an extravasalem Lungenwasser und interstitieller Flüssigkeit aufwies. Als Ursache für die erhöhte Clearance in den ventilierten Lungen wurde die positive Druckventilation gesehen, aber diese Vermutung konnte von den Autoren selbst widerlegt werden. Innerhalb des Zeitraumes von 60 Minuten erfassten Fukuda et al. eine alveoläre Flüssigkeitsabsorptionsrate von 60% des instillierten Volumens.

Verglichen mit einem Modell einer isolierten und nicht rezirkulierend perfundierten (1ml/min) Mauslunge (Icard und Saumon, 1999) war die gemessene Lungenclearance in beiden Systemen von Fukuda und Mitarbeitern um 140% schneller. Die basale Flüssigkeitsabsorptionsrate betrug im Modell der isolierten Lunge  $3,7 \pm 0,32 \text{ ml/h}$ . Als mögliche Gründe hierfür wurden die Entfernung der ableitenden Lymphgefäße, der geringe ATP-Gehalt in der Lunge und eine erhöhte vaskuläre Permeabilität der isolierten Lunge verantwortlich gemacht (Fukuda et al., 2000). Die Isolation der Lunge erfordert mechanische Ventilation, Perfusion und die Durchtrennung der neurologischen Kontrolle, was möglicherweise zu einer Änderung der biochemischen oder metabolischen Prozesse der Lunge führt und damit eine gewisse Einschränkung des Systems darstellt.

---

Garat und Mitarbeiter nutzten eine flüssigkeitsgefüllte, nicht perfundierte Lunge und applizierten einen kontinuierlichen Atemwegsdruck von 7cm H<sub>2</sub>O mit 100% O<sub>2</sub> für die 1stündige Dauer des Experimentes (Garat et al., 1998). Die gemessene Clearance in diesem System betrug 27 +/- 5% in der Stunde. Dass eine höhere Clearancerate als in anderen Spezies gemessen wurde, wurde dem im Vergleich zur Lungengröße der Maus hohen Instillationsvolumen zugeschrieben. Allerdings bestätigte sich diese Annahme nicht, ein kleineres Instillationsvolumen führte sogar zu einer Erhöhung der Clearancerate (Garat et al., 1998). Trotz der unterschiedlichen Angaben der Clearanceraten in der Mauslunge ist mittlerweile bekannt, dass die Clearance der Mauslunge im Vergleich zu anderen Spezies hoch ist (Garat et al., 1998; Fukuda et al., 2000; *The Mouse in Biomedical Research*; herausgegeben von Fox et al., 2007).

Unser System der isolierten, perfundierten und ventilierten Lunge ist ein wertvolles Werkzeug, um die Bewegung von radioaktiv markierten Molekülen (<sup>22</sup>Na, [<sup>3</sup>H] Mannitol) in Echtzeit vom Alveolarraum der Lunge in das Gefäßsystem und umgekehrt zu erforschen. Es ist nach unserem Kenntnisstand das einzige System, welches die Funktion des Alveolarepithels in Echtzeit online messen und aufzeichnen kann. Allerdings macht die Komplexität des Organes es schwierig, bestimmte physiologische und biochemische Ereignisse einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen.

Wichtige Vorteile zeigen sich bei der Betrachtung der Versuchstiere: Mäuse haben einen kurzen und schnellen Reproduktionszyklus, sind klein und unter ökonomischen Gesichtspunkten leicht zu halten. Das Mausgenom ist vollständig charakterisiert und kann deshalb leicht manipuliert werden (*The Mouse in Biomedical Research*; herausgegeben von Fox et al., 2007). Diese Tatsache eröffnet einen der größten Vorteile dieses Systems: die Nutzung von genetisch manipulierten/Knock-out Mäusen. Zudem ist eine große Menge immunologischer Agentien für Mäuse erhältlich und diese aufgrund der kleineren Mengen, die für Mäuse benötigt werden, auch kostengünstiger als für größere Versuchstiere. Eine Schwierigkeit besteht allerdings in der Präparation/Isolation, sowie dem Handling der etwa daumennagelgroßen und damit sehr empfindlichen Mauslunge.

Der aktive Transport von Ionen kann durch Amilorid auch bei Mäusen gehemmt werden, Amilorid gilt als Inhibitor der Natriumaufnahme durch die apikale Membran des Alveolarepithels und des distalen Epithels. Amilorid hemmt 40-70% der basalen alveolaren Flüssigkeitsreabsorption in Schafen, Kaninchen, Ratten, Meerschweinchen Mäusen und der menschlichen Lunge (Matthay, Folkesson und Clerici, 2002; *The Mouse in Biomedical Research*;

---

herausgegeben von Fox et al., 2007). Die Dissoziationskonstante für Amilorid liegt bei Mäusen bei etwa  $2\mu\text{M}$  (Brodovich et al., 2007). Amilorid ( $1\text{nM}$ ) hemmt die alveoläre Clearance der Lunge von Wildtyp-Mäusen um 75% (Randrianarison et al., 2008) und von Icard und Saumon wurde ein Verhältnis von 2:3 von passivem zu totalem Natriumtransport angegeben (Icard und Saumon, 1999). In unserem Fall konnte die alveoläre Clearance nicht komplett durch Amilorid unterdrückt werden, so dass die Beteiligung nicht-amilorid sensitiver Signalwege wie z.B. dem  $\text{Na}^+$ -Glukose Transporter und anderer amilorid-insensitiver Natriumkanäle bestätigt wurde (Mutlu et al., 2005).

Die Maus zeigt verglichen mit anderen Spezies eine erhöhte Abhängigkeit der alveolären Flüssigkeitsabsorption vom amilorid sensitivem  $\text{Na}^+$ -Transport (Fukuda et al., 2000; Garat et al., 1998; Brodovich et al., 2008; Icard und Saumon, 1999). Diese hohe Abhängigkeit scheint für Mäuse charakteristisch zu sein (Fukuda et al., 2000). Über 50% der alveolären Flüssigkeitsabsorption in der Mauslunge werden dem amilorid-sensitiven Transport zugerechnet (Garat et al., 1998). Brodovich et al. vermuten eine veränderte Stöchiometrie des epithelialen Natriumkanals (ENaC) oder eine zusätzliche Insertion einer zusätzlichen  $\delta$ -ENaC-Einheit, was die unterschiedliche Sensitivität gegenüber Amilorid erklären könnte.

In Ratten, Schafen, Hunden und Menschen sind 60-70% der alveolären Flüssigkeitsabsorption nicht sensitiv gegenüber Amilorid, das heißt, der Anteil von amilorid-sensitivem Transport liegt bei etwa 30-40%. Bei Mäusen hingegen liegt der Anteil amilorid-insensitiver alveolärer Flüssigkeitsabsorption bei 20-40% und variiert zwischen den einzelnen Mäusestämmen (O'Brodovich et al., 2007; Matthay und Folkesson, 2002). In CD-1 Mäusen wurde eine nur zu 20% insensitive Clearance gegenüber Amilorid entdeckt, während bei C57BL/6 Mäusen die Amilorid insensitive Clearance einen Anteil von 40% einnimmt (Matthay und Folkesson, 2002), was mit den von uns gemessenen Clearanceraten unter Amilorideinsatz übereinstimmt (Abbildung 17). Unterschiedliche Clearanceraten in verschiedenen Spezies und entsprechende Reaktionen auf Inhibitoren oder Aktivatoren sind in Tabelle 3 dargestellt.

Um weitergehend die Rolle des aktiven Transportes von Natrium durch das alveoläre Epithel der Mauslunge zu erforschen, wurden Experimente durchgeführt, die zu einer Blockade der in den Alveolarepithelzellen basolateral befindlichen  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase führten. Dazu wurde das kardiale Glykosid Ouabain (g-Strophanthin) eingesetzt. Die Schwierigkeit in der Anwendung in Tiermodellen wird aufgrund der Toxizität des Ouabains erschwert. Für Mäuse, allgemein für Nagetiere wie Ratten, Mäuse und Hamster, wird generell eine geringe Sensitivität gegenüber Ouabain postuliert (Willis und Cuveellory, 1983). Die  $\alpha$ -1  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase wird für

den ouabain-resistenten Phänotypen verantwortlich gemacht (Fallows et al., 1987). Im Nagergewebe wird in physiologischer Hinsicht in  $\alpha$ -1 und  $\alpha$ -2  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase aufgrund der großen Differenz in Affinität, beziehungsweise Sensitivität für Ouabain unterschieden (Ridge et al., 2002). Die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase besteht aus zwei Polypeptiden, d.h. einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, wobei das  $\alpha$ -Untereinheit die funktionelle Einheit darstellt und die  $\beta$ -Untereinheit der Verankerung des Proteins in der Zellmembran dient. Die Untereinheiten treten in unterschiedlichen Isoformen auf, wobei bisher 3 Isoformen für die  $\alpha$ -Untereinheit und 2 für die  $\beta$ -Untereinheit bekannt sind. Die in Nagern auftretende, ubiquitär experimentierte  $\alpha$ -1  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase ist resistent oder zeigt nur eine geringe Sensitivität gegenüber Ouabain. Die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase trägt neben der Bindungsstelle für ATP auf der zytosolischen Seite den Ionophorenanteil für den Kationentransport im Membrananteil und auf der Blutseite die Herzglykosidbindungsstelle, weshalb das Ouabain in das zirkulierende Perfusat appliziert wurde.

Sowohl  $\alpha$ -1 als auch  $\alpha$ -2  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase sind für die alveoläre Flüssigkeitsabsorption wichtig, wobei die  $\alpha$ -2  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase für etwa 60 % der basalen Clearance und etwa zu 80 % an der Erhöhung der alveolären Clearance durch  $\beta$ -adrenerge Agonisten verantwortlich ist (Matalon et al., 1999; Bertorello et al., 1999).

**Tabelle 3: Alveoläre Clearance in unterschiedlichen Tierspezies unter Kontrollbedingungen und nach Zugabe von cAMP-Agonisten oder Hemmung durch Amilorid/Ouabain modifiziert nach Matthay und Folkesson, 2002** NV:nicht vorliegend; \*Originalstudien über Zeitraum von 4 Std.

Spezies	Basale Clearance über 1Std. in %	$\beta$ -adrenerge Stimulation, Anstieg in %	Amilorid-Sensitivität, Abfall in %	Ouabain- Sensitivität, Abfall in %
<i>Maus</i>	48-60	58-71	63-91	80
<i>Meerschwein</i>	38	32	26	NV
<i>Ratte</i>	15-35	45-136	40	30-82
<i>Kaninchen</i> *	36	0	81	NV
<i>Schaf</i>	8	50-60	42	90
<i>Hund</i>	2-4	73-150	31	84
<i>Mensch</i>	3	72-100	42	50

---

Die endogene Freisetzung von Katecholaminen stimuliert die Reabsorption von fetaler Lungenflüssigkeit aus den Atemwegen. Bei ausgewachsenen Tieren ist es möglich, durch Salmeterol, Terbutalin, Isoproterenol oder Epinephrin die alveoläre Flüssigkeitsreabsorption zu erhöhen (Matthay und Folkesson, 2002; Zhou et al., 2008) Die Erhöhung der alveolären Flüssigkeitsabsorption durch Stimulation mit endogenen  $\beta$ -adrenergen Agonisten wurde bereits in vielen klinisch relevanten Tiermodellen bewiesen. Ebenso wurde demonstriert, dass die Clearance in der Lunge durch exogene  $\beta$ -adrenergen Agonisten im Falle eines Lungenschadens stimuliert werden kann (Sartori und Matthay, 2002).  $\beta$ -adrenerge Agonisten erhöhen die alveoläre Clearance in der Lunge der Ratte, des Meerschweines, der Maus, des Hundes und der menschlichen Lunge. Die Anwendung der  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten Isoproterenol und Terbutalin führte in unserem System der isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslunge erwartungsgemäß zu einer beschleunigten alveolären Clearance um etwa 5% bei Einsatz von Terbutalin und um 10% bei Anwendung von Isoproterenol (Abbildung 13). Es wurde bereits in mehreren Studien durch Experimente am Alveolarepithel von gesunden Ratten bestätigt, dass die  $\beta$ -adrenergen Agonisten Terbutalin und Isoproterenol den Anteil an intrazellulärem cAMP und damit den aktiven Natriumtransport steigern und somit die Auflösung eines Lungenödems beschleunigen können (Saldias et al., 1999). Auch in dem von uns angewendeten cAMP-Assay konnte durch Isoproterenol dieser Anstieg von cAMP reproduziert werden (Abbildung 30), welcher noch über dem durch Intermedin hervorgerufenen Anstieg von cAMP lag.

Es wird angenommen, dass es bei einer solchen  $\beta$ -adrenergen Clearanceerhöhung zu einer vermehrten Translokation oder auch Exocytose sowohl von ENaC zur apikalen Membran der Alveolarepithelzellen Typ II als auch der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase zum basolateralen Anteil der Zellen des Alveolarepithels kommt (Matthay und Folkesson, 2002; Zhou et al., 2008).

Unserer Hypothese folgend testeten wir die Auswirkungen einer Applikation von IMD/AM2 auf die Aktivität der Proteinkinase A. Wir setzen Intermedin in diesem Assay in einer Konzentrationsreihe (0,1nM: 1nM, 10nM und 100nM; siehe Abbildung 32) und einer Zeitkurve (1 min; 5min; 15min und 30 min.; siehe Abbildung 31) ein, wobei die besten Proteinkinaseaktivitäten bei einer Konzentration von 100nM mit einer Erhöhung um 75%- verglichen mit der Kontrolle -und einer Inkubationsdauer von 15/30 Minuten gemessen wurden. Während der 15minütigen Inkubationszeit kam es zu einem Aktivitätsanstieg um etwa 182% im Vergleich zur Kontrolle, nach 1 Minute konnte eine Verdopplung der Proteinkinaseaktivität beobachtet

---

werden. Eine 30minütige Inkubationszeit zeigte eine nur geringfügig höhere, nicht statistisch signifikante Proteinkinaseaktivität. Bei der Ermittlung der Auswirkungen des PKA – Inhibitors H-89 und des Adenylatzyklaseinhibitors SQ 22536 in Kombination mit Intermedin im Assay konnte mit Hilfe von H-89 die Proteinkinaseaktivität wie erwartet direkt unterbunden werden (siehe Abbildung 33), während in dem Modell der isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslunge eine Reduktion der Clearance um 7% -verglichen mit derjenigen unter Kontrollbedingungen- erfasst wurde (Abbildung 21). Mit dem Einsatz des Adenylatzyklaseinhibitors SQ 22536 konnte eine um etwa 20%ige Verringerung der Aktivität der Proteinkinase beobachtet werden (Abbildung 33), die der Verringerung der Lungenclearance im System der isolierten Mauslunge um um 20% entspricht (Abbildung 21). Eine beschleunigte Clearance im Lungenmodell bei Applikation von IMD/AM2 mit einer Konzentration von 100nm (Abbildung 21) zeigte sich in einer erwarteten Erhöhung der Proteinkinase A- Aktivität im Proteinkinase Assay um etwa 64% (Abbildung 33).

Von einer Vielzahl durchgeführter Studien ist mittlerweile bekannt, dass der bedeutendste Effekt in mit Adrenomedullin (AM) stimulierten Zellen die Erhöhung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) ist (Hinson et al., 2000). Der zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP)- Signalweg ist in viele Prozesse involviert und weithin bekannt als der „klassische“ second messenger Signalweg. cAMP hat u.a. als direktes intrazelluläres Zielmolekül die Proteinkinase A (PKA, auch cAMP-abhängige Proteinkinase).

Diese Kinase, ein Heterotetramer, welches aus 2 katalytischen und 2 regulatorischen Einheiten besteht (Francis et al., 1994; Scott et al., 1991; Taylor et al., 1990), wird durch Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten und dadurch Freisetzung der aktivierten, katalytischen Untereinheiten aktiviert.

Die Erhöhung von cAMP scheint auch charakteristisch für die anderen Mitglieder der Kalzitinin-Peptid Familie zu sein: alle hatten in Versuchen eine Erhöhung der cAMP Level in unterschiedlichen Geweben und Zellen hervorgerufen (Muff et al., 1995). Diese Eigenschaft war auch Grundlage für die Entdeckung von Adrenomedullin (Kitamura et al., 1993).

Bei geklonten Rezeptoren konnte - unabhängig davon, ob es sich um einen AM- oder CGRP-Rezeptor handelt - ein Zusammenhang mit einem erhöhten cAMP-Spiegel in transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Kapas et al., 1995, Mc Latchie et al., 1998, Muff et al., 1998, Kapas et al., 1995, Aiyar et al., 1996, Elshourbagy et al., 1998).

---

Der am häufigsten postulierte Signalweg für Adrenomedullin (ebenso CGRP, Amylin und Kalzitonin) ist eine über ein G-Protein (Guanin-Nukleotid-bindendes Protein) laufende Rezeptoraktivierung, die zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase und damit zur Anregung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A führt (Coppock et al., 1996; Hinson et al., 2000).

cAMP gilt also in der Mehrzahl der durch Adrenomedullin hervorgerufenen Wirkungen als *second messenger*, aber auch andere Einflüsse wie Stickstoffmonoxid (NO) scheinen durchaus eine Rolle zu spielen (Hinson et al., Review 2000). Aufgrund der Bedeutung von cAMP für die Mitglieder der Kalzitonin-Peptid – Familie schien unsere Hypothese, dass auch Intermedin/Adrenomedullin 2 zu einer Erhöhung des cAMP führt und damit eine Aktivierung der PKA möglich ist, wahrscheinlich.

In dem von uns angewendeten cAMP-Assay (Cayman Chemical Company) konnte eine cAMP-Erhöhung durch IMD/AM2 dargestellt werden (Abbildung 30), die ein wenig unter den durch Isoproterenol erzeugten cAMP-Werten lag. Mittels IMD/AM2 konnte eine - mit der von Isoproterenol vergleichbare - Beschleunigung des alveolären Flüssigkeitstransportes im System der isolierten Mauslunge induziert werden (Abbildung 13 und Abbildung 16), die durch die Anwendung des Inhibitors der cAMP-abhängigen Proteinkinase A -H-89 gehemmt werden konnte (Abbildung 21).

Durch den Adenylatzyklaseinhibitor SQ 22536 wurde hingegen eine deutliche Verringerung der basalen  $\text{Na}^+$ -Clearance hervorgerufen, die kaum durch Einsatz von Intermedin beeinflusst werden konnte (Abbildung 21).

Die Ergebnisse auf molekularer Ebene in A549 (humanen Lungenadenokarzinomzellen)- und murinen ATII- Zellen durch Biotinylierung und Streptavidin Pull-down zeigten eine signifikante Erhöhung der  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase und eine nicht signifikante Erhöhung der Anzahl von  $\beta$ -Untereinheiten beim Einsatz von Intermedin (Abbildung 25 und 26), ebenso konnte eine Erhöhung des  $\beta$ -ENaC in der Zelloberfläche durch den Einsatz von IMD/AM2 nach Biotinylierung und Streptavidin- pull down nicht belegt werden (Abbildung 29).

Diese durch Intermedin sowohl in humanen, als auch murinen Zelltypen hervorgerufenen Effekte lassen auf vergleichbare, spezieübergreifende Wirkungen schließen.

Um die Wirkung von IMD/AM2 auf den amilorid- sensitiven Transport - hauptsächlich repräsentiert durch den epithelialen Natriumkanal (ENaC) - zu testen, wurde zusätzlich auf Zellebene ein Streptavidin Pull-Down und zusätzlich Experimente mit humanen H441 Zellen

---

in der Ussing-Kammer durchgeführt. In dem System der isolierten Mauslung konnte die alveoläre Clearance nicht komplett (Abbildung 13) durch die Anwendung von Amilorid unterdrückt werden, so dass die Beteiligung nicht-amilorid-sensitiver Signalwege wie z.B. dem  $\text{Na}^+$ -Glukose-Transporter und anderer amilorid-insensitiver Natriumkanäle als wahrscheinlich gilt, was bereits von Mutlu postuliert wurde (Mutlu, 2005).

Die Lokalisation von ENaC in der apikalen Oberfläche der Alveolarepithelzellen und seine Funktion als Natriumkanal führten in zahlreichen Studien zu der Erkenntnis, dass die treibende Kraft hinter der ENaC-vermittelten Natriumaufnahme die in der basalen Membran der Epithelzellen lokalisierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase ist (Sznajder et al., 2002). Bestätigt wurde diese Erkenntnis durch die Anwendung von Ouabain, einem potenten und spezifischen Inhibitor der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase. In unserem System der isolierten Mauslung konnte eine deutliche Hemmung des alveolären Flüssigkeitstransportes durch Ouabain hervorgerufen werden (Abbildung 13-16), ebenso die Applikation von Ouabain in isolierten, perfundierten und flüssigkeitsgefüllten Mauslungen, durchgeführt in einer Studie von Icard und Saumon (Icard et Saumon, 1999).

Nach der Durchführung der Biotinylierung und nachfolgendem Streptavidin Pull-Down konnte anhand der Ergebnisse darauf geschlossen werden, dass das primäre Zielmolekül von IM/AM2 die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase ist. Die Ergebnisse in Abbildung 29 zeigen, dass IMD/AM2 auf die Häufigkeit des Auftretens von ENaC in der Zelloberfläche und auf den amilorid-sensitiven Transport keine Auswirkungen hat.

Eine Beteiligung Amilorid-insensitiver Natriumkanäle der apikalen Membran an der Natriumaufnahme, z.B. des  $\text{Na}^+$ -Glukose-Transporters und weiterer  $\text{Na}^+$ -Kanäle ist ebenso wahrscheinlich.

Der nach zahlreichen Experimenten mit dem cAMP-Assay gelungene Nachweis der Beteiligung von cAMP als sekundärer Botenstoff bestätigte unsere Hypothese, nach welcher dieser letztendlich zu einer Aktivierung der Proteinkinase A und damit zu einer vermehrten Rekrutierung von v.a.  $\alpha$ -Untereinheiten der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase zur Zelloberfläche der Alveolarepithelzellen aus intrazellulären Kompartimenten und damit zur Erhöhung des alveolären Flüssigkeitstransportes führte.

Durch Vinciguerra et al. konnte 2005 ein neuer, cAMP-unabhängiger Mechanismus der Aktivierung der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase in den Sammelrohren der Niere nachgewiesen werden: Demnach führt eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Na}^+$  zur Dissoziation eines zytosolischen

---

PKAc/I $\kappa$ B $\alpha$ /p65-NF- $\kappa$ B- Komplexes über den klassischen NF- $\kappa$ B Kinase (IKK)-abhängigen Signalweg. Intrazelluläres Natrium ist vermutlich der am wichtigsten hormonelle Faktor, der zur Regulation der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität beiträgt, da jeder Anstieg oder Abfall der intrazellulären Natriumkonzentration (Na<sup>+</sup>) die Aktivität entweder ansteigen oder absinken lässt (Skou et al., 1957).

Bei NF- $\kappa$ B („*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*“) handelt es sich um einen Proteinkomplex, der die Transkription von DNA kontrolliert. NF- $\kappa$ B kann in nahezu allen tierischen Zelltypen gefunden werden und ist in zelluläre Prozesse als Antwort auf Stimuli wie Stress, Zytokine, freie Radikale, ultraviolette Strahlung, virale und bakterielle Antigene involviert (Gilmore et al., 2006; Perkins et al., 2007; Brasier et al., 2006). Normalerweise wird die Proteinkinase A, ein Heterotetramer welches aus 2 katalytischen (PKAc) und 2 regulatorischen Einheiten besteht (Francis et al., 1994, Scott et al., 1991; Taylor et al., 1990) über den klassischen cAMP-Signalweg durch Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten und dadurch Freisetzung der aktivierten, katalytischen Untereinheiten aktiviert.

Vinciguerra und seine Kollegen konnten zeigen, dass das erhöhte intrazelluläre Na<sup>+</sup> die IKK-Aktivität stimuliert. Hierbei wurde festgestellt, dass I $\kappa$ B $\alpha$  vermehrt in schnellere und kurzfristige Regulationsmechanismen involviert ist, während I $\kappa$ B $\beta$  mehr für die langsamere und dafür längerfristige Regulation von NF- $\kappa$ B, einschließlich Transkription und Translation, verantwortlich zu sein scheint. I $\kappa$ B-Proteine haben innerhalb des zytosolischen Komplexes die Aufgabe, die Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B- Familie in einem inaktiven Zustand zu halten. Durch die Phosphorylierung einer aktivierten NF- $\kappa$ B Kinase kommt es zur Dissoziation des Komplexes und die I $\kappa$ B-Proteine werden durch Proteasomen abgebaut, was zur Freisetzung der Einzelkomponenten - unter anderem der PKAc (katalytische Untereinheit der Proteinkinase A) - des Komplexes führt. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wird durch diese Dissoziation aktiviert und die Translokation in den Zellkern folgt. Das erhöhte intrazelluläre Na<sup>+</sup> triggert demnach die Dissoziation eines endogenen PKAc/I $\kappa$ B $\alpha$ /p65-NF- $\kappa$ B- Komplexes, was zu einer cAMP-unabhängigen Aktivierung der Proteinkinase A durch freiwerdende katalytische PKA – Untereinheiten (PKAc) und damit zur Rekrutierung von Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase- Molekülen aus intrazellulären Kompartimenten zur Zelloberfläche in Zellen der Sammelrohre von Säugetiern führt. Unklar ist weiterhin, ob die auf diese Weise aktivierte Proteinkinase direkt zur Translokation von Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase- Molekülen zur Zelloberfläche führt und/oder ob weitere Signalmoleküle involviert sind (Vinciguerra et al., 2005).

---

Unsere Hypothese, dass Intermedin/Adrenomedullin 2 (IMD/AM2) zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase und damit zu einer Erhöhung des sekundären Botenstoffes cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat; cAMP), zu einer anschließenden Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt und somit Einfluss auf die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  hat, wodurch es zu einer Erhöhung der Ödemclearance des Alveolarepithels kommt, konnte in unserem neu etablierten System der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge belegt werden.

Inwieweit IMD/AM2 in dem von Vinciguerra et al. postulierte Signalweg eine Rolle spielt, wurde in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, bedarf aber sicherlich der weiteren Erforschung.

Mit dem Modell der isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslunge in Kombination mit der Echtzeiterfassung der alveolären Lungenclearance durch Applikation der radioaktiven Isotope ( $^{22}\text{Na}$  und  $^3\text{H}$  Mannitol) und Messung mittels  $\gamma$ -Detektoren ist es uns gelungen, ein Organmodell zu entwickeln, mit dem es möglich ist, die Physiologie und Pathologie des Alveolarepithels zu erfassen.

Dieses Modell kann einen wichtigen Beitrag in der Erforschung neuer Therapiekonzepte zur Behandlung des pulmonalen Ödems, einem Hauptcharakteristikum des akuten Atemnotsyndroms (ARDS), leisten und weitere Forschung bezüglich des Flüssigkeitsgleichgewichtes der Lunge unterstützen.

---

## 7 Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung des Flüssigkeitsgleichgewichtes im Alveolarraum der Lunge durch aktiven Transport von Natrium durch die basolateral in den Alveolarepithelzellen befindliche  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  ist essentiell für den optimalen Gasaustausch. Ein Kennzeichen des akuten Atemnotsyndroms (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) ist die Ansammlung proteinreicher Ödemflüssigkeit im Alveolarraum, welche durch Störung des Flüssigkeitsgewichtes zu einer massiven Einschränkung des Gasaustausches führt. Die daraus resultierende Hypoxämie und damit die Notwendigkeit von künstlicher Beatmung sind ebenfalls charakteristisch für das akute Atemnotsyndrom, welches trotz neuester Erkenntnisse in der Behandlung in den meisten Studien zu einer Mortalität von 30-40% führt. Eine beeinträchtigte alveoläre Clearance spielt die entscheidende Rolle für das Weiterbestehen des alveolären Ödems, wobei eine schnelle Auflösung mit einer reduzierten Mortalität korreliert.

Tier- und Organmodelle zur Beseitigung des nicht kardiogen bedingten Lungenödems als Charakteristikum des ARDS haben sich als unersetzlich in der Entwicklung von neuen Therapiestrategien zur Verbesserung der alveolären Clearance erwiesen. Für die vorliegende Arbeit wurde eine neue Methode entwickelt, die es möglich macht, die Funktion der alveolokapillären Barriere in Echtzeit in isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslungen zu erfassen.

In diesem zuerst zu etablierenden Versuchsaufbau wurde die Wirkung des in 2004 entdeckten und isolierten Peptides Intermedin/Adrenomedullin 2 (IMD/AM2) auf das Alveolarepithel und den alveolären Flüssigkeitstransport untersucht. Zusätzliche Experimente auf molekularer Ebene mit Alveolarepithelzellen (AII-Zellen) wurden parallel durchgeführt, um die Auswirkungen des Einsatzes von IMD/AM2 auf das Alveolarepithel näher zu beleuchten und die in der isolierten Mauslung beobachteten Ergebnisse zu verifizieren.

Die Applikation von zusätzlicher Flüssigkeit in den Alveolarraum der isolierten Mauslung mit Hilfe eines Mikrosprayers in Anwesenheit von pharmakologischen Modulatoren des Natriumtransportes und die anschließende Applikation der radioaktiven Tracer  $^{22}\text{Na}$  und  $[^3\text{H}]$  Mannitol diente zur Charakterisierung des aktiven und passiven Flüssigkeitstransportes. Durch Anwendung geeigneter Inhibitoren der Signalmoleküle des vermutlich beteiligten cAMP-Signalweges in der Mauslung konnten Rückschlüsse auf eine Aktivierung dieses Signalweges durch IMD/AM2 gezogen werden.

---

Unter Kontrollbedingungen wurden nahezu 62% des applizierten  $^{22}\text{Na}$  während des Beobachtungszeitraums von 60 Minuten aus dem Alveolarraum entfernt. Die alveoläre Flüssigkeitsclearance wurde durch Amilorid und Ouabain signifikant gehemmt und durch Applikation der  $\beta$ -Agonisten Terbutalin und Isoproterenol signifikant erhöht, wobei der Transit des Markers für die parazelluläre Permeabilität, [ $^3\text{H}$ ]Mannitol, unbeeinflusst blieb. Unter Kontrollbedingungen wurde ein ELF-Volumen (epithelial lining fluid;  $V_{\text{ELF}}$ ) von  $27.4 \pm 4.9 \mu\text{l}$  gemessen. Eine signifikante Erhöhung des Flüssigkeitsgehaltes im Alveolarraum konnte in Anwesenheit sowohl von Amilorid, als auch Ouabain beobachtet werden, während eine Reduktion in Zusammenhang mit der Anwendung von Terbutalin und Isoproterenol auftrat. Diese Ergebnisse stehen mit den Daten, die durch die Anwendung des Nass-zu Trockengewicht-Verhältnisses des Lungengewebes gewonnen wurden, in direktem Zusammenhang. Durch IMD/AM2 konnte eine - mit der von Isoproterenol vergleichbare - Beschleunigung des alveolären Flüssigkeitstransportes induziert werden, die durch die Anwendung eines Inhibitors der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (H-89) gehemmt werden konnte. Mit dem Adenylatzyklaseinhibitor SQ 22536 wurde hingegen eine deutliche Verringerung der basalen  $\text{Na}^+$ -Clearance hervorgerufen, die nicht durch Einsatz von Intermedin beeinflusst werden konnte. Mittels Biotinylierung ließ sich eine durch IMD/AM2 hervorgerufene, signifikante Erhöhung der  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase in der Zellmembran der AII-Zellen nachweisen, die durch entsprechende Anwendung von H-89, ebenfalls auch durch Einsatz des Adenylatzyklaseinhibitors SQ 22536, verhindert werden konnte.

Diese neue Messung von Tracer- und Flüssigkeitsbewegung über das Lungenepithel von Mäusen in Echtzeit ist eine praktikable Technik, um die Eigenschaften der alveolokapillären Barriere in gesunden Lungen zu erfassen. Die mögliche Nutzung von knock-out Mäusen in diesem System kann dazu beisteuern, neue Mechanismen zu identifizieren, welche die Formation und Auflösung des pulmonalen Ödems regulieren. Durch den Einsatz von Intermedin in dem für diese Arbeit neu etablierten System der isolierten, ventilierten und perfundierten Mauslung konnte eine deutliche Beschleunigung der alveolären Clearance erreicht werden. Eine Beteiligung der Proteinkinase A und der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase als Komponenten des klassischen cAMP-Signalweges scheint sicher, wobei eine cAMP-unabhängige Aktivierung der Proteinkinase A als mögliche Alternative zu dem klassischen cAMP-Signalweg bereits beschrieben wurde. Inwieweit Intermedin/Adrenomedullin 2 einen Einfluss auf diesen Signalweg hat, bedarf der weiteren Erforschung und eröffnet ein weiteres interessantes Forschungsfeld.

---

IMD/AM2, das jüngste Mitglied der Kalzitonin-Peptid Familie, scheint auf Grundlage dieser Arbeit eine wichtige Rolle in der weiteren Erforschung von Therapiekonzepten zur Auflösung des alveolären Ödems bei Patienten mit ARDS zu spielen.

---

## 8 Abstract

Maintaining alveolar fluid balance by active sodium transport is essential for optimal gas exchange. A hallmark of the acute respiratory distress syndrome (ARDS) is the accumulation of protein-rich edema fluid in the alveolar compartment of the lung. The resulting hypoxemia and the need for artificial ventilation strategies are also characteristic for ARDS, which cause a mortality of 30-40 % in the most studies despite knowledge of new therapeutic strategies. Impaired alveolar fluid clearance is a key underlying cause of alveolar fluid persistence and the ability of ARDS patients to clear edema fluid is correlated with reduced mortality.

Animal and organ models of edema resolution and ARDS have proved irreplaceable in the development of novel therapeutic strategies that augment alveolar fluid clearance (AFC). Here we set out to establish a new method to investigate alveolar barrier function in real-time in isolated, ventilated and perfused mouse lungs.

Intermedin/Adrenomedullin2 was isolated for the first time in the year 2004 and in this work we establish a role of this new peptide in alveolocapillary barrier function. Additional experiments in alveolar epithelial cells (ATII cells) were done to highlight the impact of intermedin on the alveolar epithel and the alveolar fluid transport and to verify the results we get in the model of the isolated mouse lung. Depositing excess liquid into the alveolar space by a microsyringe in the presence of pharmacological modulators of sodium transport and a subsequent delivery of  $^{22}\text{Na}$  and [ $^3\text{H}$ ] mannitol were applied to characterise active and passive fluid and small solute transport. Using specific inhibitors of the classical cAMP-pathway in the isolated mouse lung allows us to draw conclusions from these results about the consequences of using Intermedin for this pathway.

Approximately 62 % of the deposited  $^{22}\text{Na}$  was removed from the alveolar space within 60 min.  $^{22}\text{Na}$  clearance was significantly reduced by amiloride and ouabain and enhanced by terbutaline or isoproterenol, while transit of [ $^3\text{H}$ ] mannitol remained unaffected. Under control conditions, a  $\text{V}_{\text{ELF}}$  of  $27.4 \pm 4.9 \mu\text{l}$  was measured. A significant fluid retention was observed in the presence of amiloride and ouabain after excess liquid was deposited into the alveolar space, whereas a marked reduction in alveolar edema was detected after terbutaline or isoproterenol treatment. These results are in line with our wet-to-dry data.

The use of intermedin resulted in an isoproterenol-like increase of the alveolar fluid clearance. The adenylatecyclase inhibitor SQ 22536 and the protein kinase A inhibitor H-89 caused a significant decrease of alveolar fluid clearance. Intermedin treatment resulted in an increase of

---

the  $\alpha$ - subunit of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in the membrane of AII cells as assessed by biotinylation and streptavidin pull-down. This increase could not be seen using H-89 and the adenylatecyclase inhibitor SQ 22536.

Using IMD/AM2 in this new established system of an isolated, ventilated and perfused mouse lung showed a marked increase of alveolar fluid clearance. This increase seems to be dependent on activation of PKA and  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ . A cAMP- independend pathway is also described, but if there is an influence of Intermedin/Adrenomedullin 2 needs further investigation.

In conclusion, this novel, real-time measurement of tracer and lung liquid movement is a feasible technique to accurately assess alveolar epithelial barrier properties in intact lungs. Using knock-out animals in this system may help in identifying novel mechanisms that regulate formation and clearance of pulmonary oedema. Intermedin, a member of the calcitonin-peptide family, may play an important role in the research for new therapeutic concepts resolving alveolar edema in patients with ARDS.

---

## 9 Literaturverzeichnis

Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, et al.

**Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome.**

*N Engl J Med.* 1998;338(6):347-354. doi:10.1056/NEJM199802053380602

Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE.

**Acute respiratory distress in adults.**

*The Lancet, Saturday 12 August 1967. Crit Care Resusc.* 2005;7(1):60-61.

Azzam ZS, Sznajder JI.

**Lung Edema Clearance: Relevance to Patients with Lung Injury.**

*Rambam Maimonides Med J.* 2015;6(3): e0025. Published 2015 Jul 30.

doi:10.5041/RMMJ.10210

Bell D, McDermott BJ.

**Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems.**

*Br J Pharmacol.* 2008;153 Suppl 1(Suppl1): S247-S262. doi:10.1038/sj.bjp.0707494

Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al.

**Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination.**

*The Consensus Committee. Intensive Care Med.* 1994;20(3):225-232.

doi:10.1007/BF01704707

Berthiaume Y, Staub NC, Matthay MA.

**Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep.**

*J Clin Invest.* 1987;79(2):335-343. doi:10.1172/JCI112817

Bertorello AM, Ridge KM, Chibalin AV, Katz AI, Sznajder JI.

**Isoproterenol increases Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity by membrane insertion of alpha-subunits in lung alveolar cells.**

*Am J Physiol.* 1999;276(1): L20-L27. doi:10.1152/ajplung.1999.276.1.L20

Bindl L, Buderus S, Dahlem P, et al.

**Gender-based differences in children with sepsis and ARDS: the ESPNIC ARDS Database Group.**

*Intensive Care Med.* 2003;29(10):1770-1773. doi:10.1007/s00134-003-1948-z

Bivas-Benita M, Zwier R, Junginger HE, Borchard G.

**Non-invasive pulmonary aerosol delivery in mice by the endotracheal route.**

*Eur J Pharm Biopharm.* 2005;61(3):214-218. doi:10.1016/j.ejpb.2005.04.009

Brasier,2006:

**The NFκB regulatory network**

*Cardiovasc Toxicol.* 2006;6(2):111-30. doi: 10.1385/ct:6:2:111.

---

Brochard L, Roudot-Thoraval F, Roupie E, et al.

**Tidal volume reduction for prevention of ventilator-induced lung injury in acute respiratory distress syndrome. The Multicenter Trial Group on Tidal Volume reduction in ARDS.**

*Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(6):1831-1838.

doi:10.1164/ajrccm.158.6.9801044

Brower RG, Matthay MA, et al.

**Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome.**

*N Engl J Med.* 2000;342(18):1301-1308. doi:10.1056/NEJM200005043421801

Chauhan M, Yallampalli U, Dong YL, Hankins GD, Yallampalli C.

**Expression of adrenomedullin 2 (ADM2)/intermedin (IMD) in human placenta: role in trophoblast invasion and migration.**

*Biol Reprod.* 2009;81(4):777-783. doi:10.1095/biolreprod.108.074419

Chin KV, Yang WL, Ravatn R, et al.

**Reinventing the wheel of cyclic AMP: novel mechanisms of cAMP signaling.**

*Ann N Y Acad Sci.* 2002;968:49-64. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04326.x

Coppock HA, Owji AA, Bloom SR, Smith DM.

**A rat skeletal muscle cell line (L6) expresses specific adrenomedullin binding sites but activates adenylate cyclase via calcitonin gene-related peptide receptors.**

*Biochem J.* 1996;318 ( Pt 1)(Pt 1):241-245. doi:10.1042/bj3180241

Corbridge TC, Wood LD, Crawford GP, Chudoba MJ, Yanos J, Sznajder JJ.

**Adverse effects of large tidal volume and low PEEP in canine acid aspiration.**

*Am Rev Respir Dis.* 1990;142(2):311-315. doi:10.1164/ajrccm/142.2.311

Crandall ED, Heming TA, Palombo RL, Goodman BE.

**Effects of terbutaline on sodium transport in isolated perfused rat lung.**

*J Appl Physiol* (1985). 1986;60(1):289-294. doi:10.1152/jappl.1986.60.1.289

Dada LA, Chandel NS, Ridge KM, Pedemonte C, Bertorello AM, Sznajder JJ.

**Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC- $\zeta$ .**

*J Clin Invest.* 2003;111(7):1057-1064. doi:10.1172/JCI16826

Dada LA, Sznajder JJ.

**Mechanisms of pulmonary edema clearance during acute hypoxemic respiratory failure: role of the Na,K-ATPase.**

*Crit Care Med.* 2003;31(4 Suppl):S248-S252. doi:10.1097/01.CCM.0000057895.22008.EC

Dehler M, Zessin E, Bärtsch P, Mairbäurl H.

**Hypoxia causes permeability oedema in the constant-pressure perfused rat lung.**

*Eur Respir J.* 2006;27(3):600-606. doi:10.1183/09031936.06.00061505

---

De Luca D, van Kaam AH, Tingay DG, et al.

**The Montreux definition of neonatal ARDS: biological and clinical background behind the description of a new entity.**

*Lancet Respir Med.* 2017;5(8):657-666. doi:10.1016/S2213-2600(17)30214-X

Effros RM, Feng NH, Mason G, Sietsema K, Silverman P, Hukkanen J.

**Solute concentrations of the pulmonary epithelial lining fluid of anesthetized rats.**

*J Appl Physiol* (1985). 1990;68(1):275-281. doi:10.1152/jappl.1990.68.1.275

Elshourbagy NA, Adamou JE, Swift AM, et al.

**Molecular cloning and characterization of the porcine calcitonin gene-related peptide receptor.**

*Endocrinology.* 1998;139(4):1678-1683. doi:10.1210/endo.139.4.5860

Eto T.

**A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides.**

*Peptides.* 2001;22(11):1693-1711. doi:10.1016/s0196-9781(01)00513-7

Fallows D, Kent RB, Nelson DL, Emanuel JR, Levenson R, Housman DE.

**Chromosome-mediated transfer of the murine Na,K-ATPase alpha subunit confers ouabain resistance.**

*Mol Cell Biol.* 1987;7(8):2985-2987. doi:10.1128/mcb.7.8.2985

Flühmann B, Muff R, Hunziker W, Fischer JA, Born W.

**A human orphan calcitonin receptor-like structure.**

*Biochem Biophys Res Commun.* 1995;206(1):341-347. doi:10.1006/bbrc.1995.1047

Fox et al., 2007 (Editor)

**The Mouse in Biomedical Research, Volume 3**

2nd Edition 2007 Normative Biology, Husbandry, and Models; American College of Laboratory Animal Medicine Series

Imprint: Academic Press Published Date: 30th November 2006

Chapter 2-II- **Respiratory Physiology p. 48-58**

Francis SH, Corbin JD.

**Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases.**

*Annu Rev Physiol.* 1994; 56:237-272. doi:10.1146/annurev.ph.56.030194.001321

Frank JA, Gutierrez JA, Jones KD, Allen L, Dobbs L, Matthay MA.

**Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-injured rat lungs.**

*Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(2):242-249. doi:10.1164/ajrccm.165.2.2108087

Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, et al.

**Renal effects of a new member of adrenomedullin family, adrenomedullin2, in rats.**

*Eur J Pharmacol.* 2004;497(1):75-80. doi:10.1016/j.ejphar.2004.06.039

---

Fukuda N, Folkesson HG, Matthay MA.

**Relationship of interstitial fluid volume to alveolar fluid clearance in mice: ventilated vs. in situ studies.**

*J Appl Physiol* (1985). 2000;89(2):672-679. doi:10.1152/jappl.2000.89.2.672

Garat C, Carter EP, Matthay MA.

**New in situ mouse model to quantify alveolar epithelial fluid clearance.**

*J Appl Physiol* (1985). 1998;84(5):1763-1767. doi:10.1152/jappl.1998.84.5.1763

Ghofrani HA, Kohstall MG, Weissmann N, et al.

**Alveolar epithelial barrier functions in ventilated perfused rabbit lungs.**

*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(5):L896-L904. doi:10.1152/ajplung.2001.280.5.L896

Gilmore TD.

**Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives.**

*Oncogene*. 2006;25(51):6680-6684. doi:10.1038/sj.onc.1209954

Goodman BE, Crandall ED.

**Dome formation in primary cultured monolayers of alveolar epithelial cells.**

*Am J Physiol*. 1982;243(1):C96-C100. doi:10.1152/ajpcell.1982.243.1.C96

Gwoździńska P, Buchbinder BA, Mayer K, et al.

**Hypercapnia Impairs ENaC Cell Surface Stability by Promoting Phosphorylation, Polyubiquitination and Endocytosis of  $\beta$ -ENaC in a Human Alveolar Epithelial Cell Line.**

*Front Immunol*. 2017;8:591. Published 2017 May 23. doi:10.3389/fimmu.2017.00591)

Hay DL, Walker CS, Poyner DR.

**Adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors in endocrine-related cancers: opportunities and challenges.**

*Endocr Relat Cancer*. 2010;18(1):C1-C14. Published 2010 Dec 13. doi:10.1677/ERC-10-0244

Hinson JP, Kapas S, Smith DM.

**Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide.**

*Endocr Rev*. 2000;21(2):138-167. doi:10.1210/edrv.21.2.0396

Hirose T, Totsune K, Mori N, et al.

**Increased expression of adrenomedullin 2/intermedin in rat hearts with congestive heart failure.**

*Eur J Heart Fail*. 2008;10(9):840-849. doi:10.1016/j.ejheart.2008.06.020

Hummler E, Barker P, Gatzky J, et al.

**Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC deficient mice.**

*Nat Genet*. 1996;12(3):325-328. doi:10.1038/ng0396-325

Icard P, Saumon G.

**Alveolar sodium and liquid transport in mice.**

*Am J Physiol*. 1999;277(6):L1232-L1238. doi:10.1152/ajplung.1999.277.6.L1232

Idell S, Thrall RS, Maunder R, et al.

---

**Bronchoalveolar lavage desmosine in bleomycin-induced lung injury in marmosets and patients with adult respiratory distress syndrome.**

*Exp Lung Res.* 1989;15(5):739-753. doi:10.3109/01902148909062858

Kapas S, Clark AJ.

**Identification of an orphan receptor gene as a type I calcitonin gene-related peptide receptor.**

*Biochem Biophys Res Commun.* 1995;217(3):832-838. doi:10.1006/bbrc.1995.2847

Kaplan JH.

**Biochemistry of Na, K-ATPase.**

*Annu Rev Biochem.* 2002; 71:511-535. doi:10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218

Keshari RS, Silasi R, Popescu NI, et al.

**Inhibition of complement C5 protects against organ failure and reduces mortality in a baboon model of Escherichia coli sepsis.**

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(31): E6390-E6399. doi:10.1073/pnas.1706818114

Khemani RG, Smith L, Lopez-Fernandez YM, et al.

**Paediatric acute respiratory distress syndrome incidence and epidemiology (PARDIE): an international, observational study**

[published correction appears in *Lancet Respir Med.* 2018 Nov13:]; [published correction appears in *Lancet Respir Med.* 2019 Mar;7(3): e12]. *Lancet Respir Med.* 2019;7(2):115-128. doi:10.1016/S2213-2600(18)30344-8

Khemani RG, Smith LS, Zimmerman JJ, Erickson S;

**Pediatric Acute Lung Injury Consensus Conference Group. Pediatric acute respiratory distress syndrome: definition, incidence, and epidemiology: proceedings from the Pediatric Acute Lung Injury Consensus Conference.**

*Pediatr Crit Care Med.* 2015;16(5 Suppl 1): S23-S40. doi:10.1097/PCC 0000000000000432

Kindt F, Wiegand S, Löser C, et al.

**Intermedin: a skin peptide that is downregulated in atopic dermatitis.**

*J Invest Dermatol.* 2007;127(3):605-613. doi:10.1038/sj.jid.5700576

Kitamura K, Kangawa K, Eto T.

**Adrenomedullin and PAMP: discovery, structures, and cardiovascular functions.**

*Microsc Res Tech.* 2002;57(1):3-13. doi:10.1002/jemt.10052

Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al.

**Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma.**

*Biochem Biophys Res Commun.* 1993;192(2):553-560. doi:10.1006/bbrc.1993.1451

Knowles M, Gatzky J, Boucher R.

**Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis.**

*N Engl J Med.* 1981;305(25):1489-1495. doi:10.1056/NEJM198112173052502

Lange, N.R., Schuster, D.P.

**The measurement of lung water.**

*Crit Care* 3, R19 (1999). <https://doi.org/10.1186/cc342>

---

Lecuona E, Saldias F, Comellas A, Ridge K, Guerrero C, Sznajder JI.  
**Ventilator-associated lung injury decreases lung ability to clear edema in rats.**  
*Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(2):603-609. doi:10.1164/ajrccm.159.2.9805050

Lee TH, Lerner AB.  
**Isolation of melanocyte-stimulating hormone from hog pituitary gland.**  
*J Biol Chem.* 1956;221(2):943-959.

Leuwer et al.  
**Checkliste Interdisziplinäre Intensivmedizin; Teil III-Blauer Teil, 29 Intensivmedizinische Syndrome: ARDS ; 29.1.1. Grundlagen; 2. Aufl.; Thieme-Verlag 2004**

Li Y, Totsune K, Takeda K, Furuyama K, Shibahara S, Takahashi K.  
**Differential expression of adrenomedullin and resistin in 3T3-L1 adipocytes treated with tumor necrosis factor-alpha.**  
*Eur J Endocrinol.* 2003;149(3):231-238. doi:10.1530/eje.0.1490231

Lin HY, Harris TL, Flannery MS, et al.  
**Expression cloning and characterization of a porcine renal calcitonin receptor.**  
*Trans Assoc Am Physicians.* 1991; 104:265 -272.

Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC.  
**Increased airway epithelial Na<sup>+</sup> absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice.**  
*Nat Med.* 2004;10(5):487-493. doi:10.1038/nm1028

Matalon S, O'Brodovich H.  
**Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance.**  
*Annu Rev Physiol.* 1999; 61:627 -661. doi:10.1146/annurev.physiol.61.1.627

Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C.  
**Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema.**  
*Physiol Rev.* 2002;82(3):569-600. doi:10.1152/physrev.00003.2002

Matthay MA, Landolt CC, Staub NC.  
**Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep.**  
*J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1982;53(1):96-104.  
doi:10.1152/jappl.1982.53.1.96

Matthay MA, Robriquet L, Fang X.  
**Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury.**  
*Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(3):206-213. doi:10.1513/pats.200501-009AC

Matthay, MA, Zemans, R.L., Zimmerman, G.A. et al.  
**Acute respiratory distress syndrome.**  
*Nat Rev Dis Primers* 5, 18 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0069-0>

Mason RJ, Williams MC, Widdicombe JH, Sanders MJ, Misfeldt DS, Berry LC Jr.  
**Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(19):6033-6037. doi:10.1073/pnas.79.19.6033

---

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, et al.

**RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor.**

*Nature*. 1998;393(6683):333-339. doi:10.1038/30666

Michelakis ED, Thébaut B, Weir EK, Archer SL.

**Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O<sub>2</sub>-sensitive K<sup>+</sup> channels by a mitochondrial O<sub>2</sub>-sensor in resistance artery smooth muscle cells.**

*J Mol Cell Cardiol*. 2004;37(6):1119-1136. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.09.007

Morimoto R, Satoh F, Murakami O, et al.

**Expression of adrenomedullin2/intermedin in human brain, heart, and kidney.**

*Peptides*. 2007;28(5):1095-1103. doi:10.1016/j.peptides.2007.01.018

Morty RE, Eickelberg O, Seeger W.

**Alveolar fluid clearance in acute lung injury: what have we learned from animal models and clinical studies?**

*Intensive Care Med*. 2007;33(7):1229-1240. doi:10.1007/s00134-007-0662-7

Müller HC, Kummer W, Pfeil U, Hellwig K, Will D, Hocke AC, Hippenstiel S, Suttorp N, Witzenthath M

**Ventilator-induced lung injury: Intermedin reduziert pulmonalvaskuläre Permeabilität im Mausmodell**

*Pneumologie* 2011; 65 -A23 doi:10.1055/s-0030-1270375

Müller-Redetzky HC, Kummer W, Pfeil U, et al.

**Intermedin stabilized endothelial barrier function and attenuated ventilator-induced lung injury in mice.**

*PLoS One*. 2012;7(5): e35832. doi:10.1371/journal.pone.0035832

Muff R, Born W, Fischer JA.

**Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions.**

*Eur J Endocrinol*. 1995;133(1):17-20. doi:10.1530/eje.0.1330017

Mutlu GM, Sznajder JI.

**Mechanisms of pulmonary edema clearance.**

*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;289(5): L685-L695. doi:10.1152/ajplung.00247.2005

Nakamura M, Han B, Nunobiki O, Kakudo K.

**Adrenomedullin: a tumor progression factor via angiogenic control.**

*Curr Cancer Drug Targets*. 2006;6(7):635-643. doi:10.2174/156800906778742442

Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Shirato K, Shibahara S.

**Induction of adrenomedullin by hypoxia and cobalt chloride in human colorectal carcinoma cells.**

*Biochem Biophys Res Commun*. 1998;243(2):514-517. doi:10.1006/bbrc.1998.8131

---

Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, et al.

**Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis.**

*Clin Sci (Lond)*. 1999;97(2):247-251.

Nye S, Whitley RJ, Kong M.

**Viral Infection in the Development and Progression of Pediatric Acute Respiratory Distress Syndrome.**

*Front Pediatr*. 2016; 4:128. Published 2016 Nov 24. doi:10.3389/fped.2016.00128

O'Brodovich H, Hannam V, Seear M, Mullen JB.

**Amiloride impairs lung water clearance in newborn guinea pigs.**

*J Appl Physiol* (1985). 1990;68(4):1758-1762. doi:10.1152/jap.1990.68.4.1758

O'Brodovich H, Yang P, Gandhi S, Otulakowski G.

**Amiloride-insensitive Na<sup>+</sup> and fluid absorption in the mammalian distal lung.**

*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(3): L401-L408. doi:10.1152/ajplung.00431.2007

Ochs, Weibel 1998

**Functional design of the human lung for gas exchange.**

In: Fishman's *Pulmonary Diseases and Disorders*. 3rd ed. Fishman A.P., Elias J.A., Fishman J.A., Grippi M.A., Kaiser L.R. and Senior R.M. (eds). McGraw-Hill. pp 21-61

Ogoshi M, Inoue K, Takei Y.

**Identification of a novel adrenomedullin gene family in teleost fish.**

*Biochem Biophys Res Commun*. 2003;311(4):1072-1077. doi:10.1016/j.bbrc.2003.10.111

Pan CS, Yang JH, Cai DY, et al.

**Cardiovascular effects of newly discovered peptide intermedin/adrenomedullin 2.**

*Peptides*. 2005;26(9):1640-1646. doi:10.1016/j.peptides.2005.02.013

Perkins ND.

**Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function.**

*Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(1):49-62. doi:10.1038/nrm2083

Pfeil U, Aslam M, Paddenberg R, et al.

**Intermedin/adrenomedullin-2 is a hypoxia-induced endothelial peptide that stabilizes pulmonary microvascular permeability.**

*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297(5): L837-L845. doi:10.1152/ajplung.90608.2008

Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK.

**Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction.**

*Am J Physiol*. 1992;262(4 Pt 1):C882-C890. doi:10.1152/ajpcell.1992.262.4.C882

Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, et al.

**International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors.**

*Pharmacol Rev*. 2002;54(2):233-246. doi:10.1124/pr.54.2.233

---

Rajasekaran SA, Palmer LG, Quan K, et al.

**Na,K-ATPase beta-subunit is required for epithelial polarization, suppression of invasion, and cell motility.**

*Mol Biol Cell.* 2001;12(2):279-295. doi:10.1091/mbc.12.2.279

Randrianarison N, Clerici C, Ferreira C, et al.

**Low expression of the beta-ENaC subunit impairs lung fluid clearance in the mouse.** *Am J*

*Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;294(3): L409-L416. doi:10.1152/

*ajplung.00307.2007*

Ranieri VM, Rubenfeld GD, et al. ARDS Definition Task Force

**Acute respiratory distress syndrome: The Berlin Definition.**

*JAMA.* 2012;307(23):2526-2533. doi:10.1001/jama.2012.5669

Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, et al.

**Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial.**

*JAMA.* 1999;282(1):54-61. doi:10.1001/jama.282.1.54

Ridge KM, Olivera WG, Saldias F, et al.

**Alveolar type 1 cells express the alpha2 Na,K-ATPase, which contributes to lung liquid clearance.**

*Circ Res.* 2003;92(4):453-460. doi:10.1161/01.RES.0000059414.10360.F2

Riviello ED, Kiviri W, Twagirumugabe T, et al.

**Hospital Incidence and Outcomes of the Acute Respiratory Distress Syndrome Using the Kigali Modification of the Berlin Definition.**

*Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(1):52-59. doi:10.1164/rccm.201503-0584OC

Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein C, Hsu SY.

**Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes.**

*J Biol Chem.* 2004;279(8):7264-7274. doi:10.1074/jbc.M305332200

Rummel, Dissertation,2007, Justus-Liebig-Universität Giessen

**Mechanisms of alveolar protein clearance in isolated rabbit lungs: role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis of albumin by the alveolar epithelium**

URL:<http://geb.uni-giessen.de/Volltexte/2008/540>

Rutschman DH, Olivera W, Sznajder JI.

**Active transport and passive liquid movement in isolated perfused rat lungs.**

*J Appl Physiol* (1985). 1993;75(4):1574-1580. doi:10.1152/jappl.1993.75.4.1574

Sakuma T, Okaniwa G, Nakada T, Nishimura T, Fujimura S, Matthay MA.

**Alveolar fluid clearance in the resected human lung.**

*Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150(2):305-310. doi:10.1164/ajrccm.150.2.8049807

Saldías FJ, Lecuona E, Comellas AP, Ridge KM, Rutschman DH, Sznajder JI.

**beta-adrenergic stimulation restores rat lung ability to clear edema in ventilator-associated lung injury.**

*Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(1):282-287. doi:10.1164/ajrccm.162.1.9809058

---

Schäfer RU, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Harrison DG, Grimminger F, Weißmann N  
**Hypoxie-induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in isoliert perfundierten und ventilerten Mauslungen.**  
*Pneumologie* 2007; 61 - A30 doi:10.1055/s-2007-967251

Schouten LR, Veltkamp F, Bos AP, et al.  
**Incidence and Mortality of Acute Respiratory Distress Syndrome in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis.**  
*Crit Care Med.* 2016;44(4):819-829. doi:10.1097/CCM.0000000000001388

Scott JD.  
**Cyclic nucleotide-dependent protein kinases.**  
*Pharmacol Ther.* 1991;50(1):123-145. doi:10.1016/0163-7258(91)90075-w

Seeger W, Walmrath D, Grimminger F, et al.  
**Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs.**  
*Methods Enzymol.* 1994;233:549-584. doi:10.1016/s0076-6879(94)33060-3

Serikov VB, Grady M, Matthay MA.  
**Effect of temperature on alveolar liquid and protein clearance in an in situ perfused goat lung.**  
*J Appl Physiol* (1985). 1993;75(2):940-947. doi:10.1152/jappl.1993.75.2.940

Siegmund-Schulze, 2012  
**Die neue Definition des Lungenversagens**  
*Deutsches Ärzteblatt* 2012,109 (35-36): A-1736/B-1406/C-1386

Skou JC.  
**The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves.**  
1957. *Biochim Biophys Acta.* 1989;1000: 439-446.

Staub NC.  
**Pulmonary edema**  
May 8, 1980, *N Engl J Med* 1980; 302:1085-1087doi: 10.1056/NEJM198005083021911

Sugo S, Minamino N, Kangawa K, et al. (a)  
**Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin**  
[published correction appears in *Biochem Biophys Res Commun* 1994 Sep 15;203(2):1363].  
*Biochem Biophys Res Commun.* 1994;201(3):1160-1166. doi:10.1006/bbrc.1994.1827

Sugo S, Minamino N, Shoji H, et al. (b)  
**Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells: augmented production by tumor necrosis factor-alpha.**  
*Biochem Biophys Res Commun.* 1994;203(1):719-726. doi:10.1006/bbrc.1994.2241

Sznajder JJ.  
**Alveolar edema must be cleared for the acute respiratory distress syndrome patient to survive.**  
*Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(6):1293-1294. doi:10.1164/ajrccm.163.6. ed1801d

---

Sznajder JI, Factor P, Ingbar DH.

**Invited review: lung edema clearance: role of Na(+)- K(+)-ATPase.**

*J Appl Physiol* (1985). 2002;93(5):1860-1866. doi:10.1152/jappphysiol.00022.2002

Takahashi K.

**Adrenomedullin from a pheochromocytoma to the eye: implications of the adrenomedullin research for endocrinology in the 21st century.**

*Tohoku J Exp Med*. 2001;193(2):79-114. doi:10.1620/tjem.193.79

Takahashi K, Nakayama M, Totsune K, et al.

**Increased secretion of adrenomedullin from cultured human astrocytes by cytokines.**

*J Neurochem*. 2000;74(1):99-103. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0740099.x

Takei Y, Hyodo S, Katafuchi T, Minamino N.(a)

**Novel fish-derived adrenomedullin in mammals: structure and possible function.**

*Peptides*. 2004;25(10):1643-1656. doi:10.1016/j.peptides.2004.06.026

Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S. (b)

**Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator.**

*FEBS Lett*. 2004;556(1-3):53-58. doi:10.1016/s0014-5793(03)01368-1

Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W.

**cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes.**

*Annu Rev Biochem*. 1990; 59:971-1005. doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.004543

Tomoda Y, Isumi Y, Katafuchi T, Minamino N.

**Regulation of adrenomedullin secretion from cultured cells.**

*Peptides*. 2001;22(11):1783-1794. doi:10.1016/s0196-9781(01)00519-8

Totsune K, Takahashi K, Mackenzie HS, et al.

**Increased gene expression of adrenomedullin and adrenomedullin-receptor complexes, receptor-activity modifying protein (RAMP)2 and calcitonin-receptor-like receptor (CRLR) in the hearts of rats with congestive heart failure.**

*Clin Sci (Lond)*. 2000;99(6):541-546.

Vadász I, Morty RE, Kohstall MG, et al.

**Oleic acid inhibits alveolar fluid reabsorption: a role in acute respiratory distress syndrome?**

*Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(5):469-479. doi:10.1164/rccm.200407-954OC

Vadász I, Morty RE, Olschewski A, et al.

**Thrombin impairs alveolar fluid clearance by promoting endocytosis of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase.**

*Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33(4):343-354. doi:10.1165/rcmb.2004-0407OC

Vejlstrup NG, Boyd CA, Dorrington KL.

**Effect of lung inflation on active and passive liquid clearance from in vivo rabbit lung.**

*Am J Physiol*. 1994;267(4 Pt 1):L482-L487. doi:10.1152/ajplung.1994.267.4.L482

---

Vinciguerra M, Hasler U, Mordasini D, et al.

**Cytokines and sodium induce protein kinase A-dependent cell-surface Na,K-ATPase recruitment via dissociation of NF-kappaB/IkappaB/protein kinase A catalytic subunit complex in collecting duct principal cells.**

*J Am Soc Nephrol.* 2005;16(9):2576-2585. doi:10.1681/ASN.2005040448

Vivona ML, Matthay M, Chabaud MB, Friedlander G, Clerici C.

**Hypoxia reduces alveolar epithelial sodium and fluid transport in rats: reversal by beta-adrenergic agonist treatment.**

*Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25(5):554-561. doi:10.1165/ajrcmb.25.5.4420

Ware LB, Matthay MA.

**Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome.**

*Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(6):1376-1383. doi:10.1164/ajrccm.163.6.2004035

Waypa GB, Schumacker PT.

**Role for mitochondrial reactive oxygen species in hypoxic pulmonary vasoconstriction.**

*Novartis Found Symp.* 2006; 272:176-217.

Weissmann N, Kuzkaya N, Fuchs B, et al.

**Detection of reactive oxygen species in isolated, perfused lungs by electron spin resonance spectroscopy.**

*Respir Res.* 2005;6(1):86. Published 2005 Jul 31. doi:10.1186/1465-9921-6-86

Willis JS, Cuveellory J.

**Ouabain sensitivity: diversity and disparities.**

*Current Topics in Membranes and Transport, Volume 19, 1983, Pages 277-280, ://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)60580-8*

Winkler, Dissertation 2006, Medizinische Fakultät Ulm

**Der Einfluss von Östradiol und Progesteron auf die Nasenpotenzialdifferenz von Frühgeborenen.**

*Neonatalogie und pädiatrische Intensivmedizin, Universitätsklinikum Ulm, doi.org/10.18725/OPARU-750*

Wirtz HR, Dobbs LG.

**Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells.**

*Science.* 1990;250(4985):1266-1269. doi:10.1126/science.2173861

Wirtz H, Schmidt M.

**Ventilation and secretion of pulmonary surfactant.**

*Clin Investig.* 1992;70(1):3-13. doi:10.1007/BF00422930

Yang JH, Jia YX, Pan CS, et al.

**Effects of intermedin (1-53) on cardiac function and ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts.**

*Biochem Biophys Res Commun.* 2005;327(3):713-719. doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.071

---

Yang JH, Pan CS, Jia YX, et al.

**Intermedin1-53 activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas.**

*Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341(2):567-572. doi:10.1016/j.bbrc.2006.01.010

Yang X, Yu Y, Xu J, et al.

**Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study**

[published correction appears in *Lancet Respir Med.* 2020 Apr;8(4): e26]. *Lancet Respir Med.* 2020;8(5):475-481. doi:10.1016/S2213-2600(20)30079-5

Yu EN, Traylor ZP, Davis IC.

**Effect of ventilation pressure on alveolar fluid clearance and beta-agonist responses in mice.**

*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;297(4): L785-L793. doi:10.1152/Ajplung.00096.2009

Zhou G, Dada LA, Sznajder JI.

**Regulation of alveolar epithelial function by hypoxia.**

*Eur Respir J.* 2008;31(5):1107-1113. doi:10.1183/09031936.0015550

---

## 9.1 Abstracts

Buchaekert Y and **Ruehl R**

“Watching the Lung Work”: Real-time visualisation of transepithelial sodium transport in isolated lungs

Invited Talk: 1st Scientific Symposium of the University of Giessen and Marburg Lung Center; New methodologies for real-time visualisation of lung function, September 28-29, Staufenberg 2010, Germany

Gabrielli NM, Mazzocchi L, **Ruehl R**, Vohwinkel CU, Grzesik B, Seeger W, Kummer W, Pfeil U, Vadász I. Intermedin Enhances Alveolar Edema Clearance By Promoting Na, K-ATPase Exocytosis In A Calcitonin Receptor-Like Receptor/Receptor Activity-Modifying Proteins (CRLR/RAMPs)-Dependent Manner. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 187:A1889  
Annual meeting of the American Thoracic Society, May 2013 A58. Ion and fluid transport in the lungs

Grzesik B, **Ruehl R**, Gabrielli NM, Seeger W, Kummer W, Pfeil U, Vadász I. Intermedin promotes pulmonary edema resolution by upregulating the Na, K-ATPase. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185:A3521  
Annual meeting of the American Thoracic Society May 2012 B67. Ion transport in lung cells: impact on lung function and disease

Mazzocchi LC, Gabrielli NM, **Ruehl R**, Seeger W, Kummer W, Pfeil U, Vadász I  
Intermedin Enhances Alveolar Edema Clearance By Promoting Direct Phosphorylation Of The Na,K ATPase By Protein Kinase A. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014; 201:A3439  
Annual meeting of the American Thoracic Society, May 2014 B61. Potpourri of Injourri: epithelial cells in lung injury and repair

**Ruehl R**, Seeger W, Vadász I. Alveolar epithelial function in mouse lungs: A novel real-time measurement of barrier properties. *Eur Respir J.*, 2010 suppl.  
Annual Congress of the European Respiratory Society, Sep 2010, Thematic Poster Session

Vadász I, Buchaekert Y, **Ruehl R**, Seeger W, Morty RE. Recruitment Maneuvers Impair Alveolar Epithelial Function by Inhibiting Na, K-ATPase Function in Rabbit Lungs *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 179:A4945  
Annual meeting of the American Thoracic Society 2009, Poster Discussion Session

---

## 9.2 Veröffentlichungen

**Ruehl R**, Seeger W, Vadász I. Alveolar epithelial function in mouse lungs: A novel real-time measurement of barrier properties

Manuskript in Arbeit

Solymosi EA, Kaestle-Gembardt SM, Vadász I, Wang L, Neye N, Chupin CJA, Rozowsky S, **Ruehl R**, Tabuchi A, Schulz H, Kapus A, Morty RE, and Kuebler WM . Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(25): E2308-E2316. doi:10.1073/pnas.1216382110

---

## 10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Seeger, Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikum Giessen und Marburg, danke ich für die Bereitstellung des Themas und für die Unterstützung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. M. Diener vom Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Übernahme der Betreuung und sein Interesse an dieser extern durchgeführten Arbeit.

Dr. I. Vadász danke ich für die ständige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung meiner Versuche.

Yasmin Buchäckert möchte ich für die Einführung und tatkräftige Unterstützung beim Erlernen der Grundlagen der isolierten, ventilierten und perfundierten Lunge des Kaninchens danken.

Danke auch an Nieves Gabrielli und Benno Buchbinder, die mich vor allem bei der Durchführung der Experimente auf Zellkulturebene tatkräftig unterstützt haben.

Herrn Gerd Weigand danke ich für die Unterstützung bei der Messung meiner Proben in der zentralen biotechnischen Betriebseinheit des Strahlencentrums der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Allen Mitarbeitern des Labors Seeger danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima beim Erstellen der Arbeit.

Dank gilt auch Frau Dr. Stahl-Hennig, Leiterin der Abteilung „Infektionsmodelle“ am Deutschen Primatenzentrum in Göttingen, die es mir neben meiner Tätigkeit am Institut ermöglicht hat, diese Arbeit fertigzustellen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und den Rückhalt nicht nur während der Erstellung dieser Arbeit.

---

## Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne erlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Niedenstein, 02.10.2020

Ort, Datum



Unterschrift



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6945-2



9 783835 196945 2



Photo back cover: © Emilia Stasiak @ stock.adobe.com  
Photo front cover top: © lena5 @ iStockPhoto.com  
Photo front cover bottom: © wildcat78 @ iStockPhoto.com