

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung des TRPV4-Kanals für die Entstehung
der pulmonalen Barriestörung bei Pneumokokken-Pneumonie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bill Schneider
aus Berlin

Datum der Promotion: 03.12.2021

Vorwort

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

- (i) Erfinanda L, Lin Z, Gutbier B, Reppe K, Lienau J, Hocke A, Liedtke W, Witzenrath M, Kuebler WM. Loss of CFTR causes endothelial barrier failure in pneumonia via inhibition of WNK1 and TRPV4 activation. *European Respiratory Journal* 2017;50(suppl 61):PA1874. *Die Veröffentlichung enthält Ergebnisse der Expressionsanalysen an murinen und humanen Lungen sowie Untersuchungen zur Barrierestörung bei infizierten TRPV4-KO- und WT-Tieren* (1).
- (ii) Schneider B, Gutbier B, Reppe K, Lienau J, Michalik L, Erfinanda L, Lask A, Suttorp N, Kübler WM, Witzenrath M. Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 for the Development of Acute Lung Injury in Pneumococcal Pneumonia. *Pneumologie* 2018;72(S 01):V474. *Die Veröffentlichung enthält Ergebnisse der Untersuchungen zur Barrierestörung bei infizierten TRPV4-KO- und WT-Tieren, immunologische Parameter, Bakterienlasten* (2).
- (iii) Erfinanda L, Schneider B, Gutbier B, Zou L, Reppe K, Lienau J, Hocke AC, Liedtke W, Witzenrath M, Kuebler WM. Loss of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Drives Lung Endothelial Barrier Failure in Pneumonia-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *A51 CRITICAL CARE: SHE BLINDED ME WITH SCIENCE - INSIGHTS FROM EXPERIMENTAL AND ANIMAL STUDIES IN ARDS AND SEPSIS* 2018:A1851-A5. *Die Veröffentlichung enthält Ergebnisse der Expressionsanalysen an murinen und humanen Lungen und Analysen zur Barrierestörung bei infizierten TRPV4-KO-Tieren* (3).

Gewidmet meinen Eltern Christina und Jens

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	2
Inhaltsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Abstract	14
1.1 Abstract in deutscher Sprache	14
1.2 Abstract in English.....	15
2 Einleitung	18
2.1 Die Lunge	18
2.1.1 Anatomischer Aufbau	18
2.1.2 Physiologie.....	19
2.2 Pneumonie	21
2.2.1 Definition, Klinik und Epidemiologie	21
2.2.2 Ursachen.....	21
2.2.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	22
2.2.3.1 Klassifikation und Impfung	22
2.2.3.2 Virulenzfaktoren	22
2.2.3.3 Invasive und nicht-invasive Infektionen.....	23
2.3 Akutes respiratorisches Distress-Syndrom.....	24
2.3.1 Definition, Klinik und Epidemiologie	24
2.3.2 Ätiologie und Pathogenese	25
2.3.3 Supportive Behandlungsoptionen	27
2.4 Alveolo-kapilläre Barriere	28
2.4.1 Aufbau.....	28
2.4.2 Barrierestörung beim <i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>	30
2.4.3 Molekulare Regulation der endothelialen Permeabilität	30
2.5 TRPV4-Kanal	32
2.5.1 Struktur, Vorkommen und Eigenschaften.....	32
2.5.2 Regulation durch intrazelluläre Signalwege und Mikroorganismen	35

2.5.3	Beteiligung an alveolo-kapillärer Barrierestörung.....	37
2.5.4	Pharmakologische Beeinflussung	40
3	Herleitung des Themas	43
4	Material und Methodik.....	44
4.1	Material	44
4.1.1	Geräte	44
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	45
4.1.3	Reagenzien und Medien	46
4.1.4	Medikamente.....	48
4.1.5	Primer.....	48
4.1.6	Antikörper.....	49
4.1.7	Immunoassays und Kits	49
4.1.8	Bakterienstämme und Zelllinie	50
4.1.9	Computerprogramme	50
4.2	Methodik.....	51
4.2.1	Tierversuche	51
4.2.1.1	Rechtsgrundlage, Herkunft und Haltung der Versuchstiere	51
4.2.1.2	Anzucht von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	52
4.2.1.3	Infektion und Monitoring der Versuchstiere.....	52
4.2.1.4	Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge.....	54
4.2.1.5	Präparation und Beatmung der Versuchstiere	54
4.2.2	Untersuchungen an der TRPV4-Knockout-Maus <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i>	56
4.2.2.1	Injektion von humanem Serumalbumin	56
4.2.2.2	Entnahme der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit	57
4.2.2.3	Analyse der alveolo-kapillären Barrierestörung.....	57
4.2.2.4	Differenzierung von Blutzellen	58
4.2.2.5	Differenzierung von Zellen aus der bronchoalveolären Lavage	58
4.2.2.6	Bestimmung der Bakterienlast im Blut und in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit.....	60
4.2.2.7	Analyse von Zytokinen im Plasma und in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit.....	60
4.2.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	61
4.2.3.1	Gewinnung von Lungen-Gewebe <i>in vivo</i>	61
4.2.3.2	Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen und murinen Lungen....	61

4.2.3.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	62
4.2.3.4	Berechnungen der Ergebnisse.....	64
4.2.4	Western Blot.....	65
4.2.4.1	Isolierung von Proteinen aus Lungen-Homogenaten	65
4.2.4.2	Durchführung des Western Blot	65
4.2.4.3	Berechnungen der Ergebnisse des Western Blot	67
4.2.5	Kultivierung und Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> von humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen	67
4.2.6	Untersuchungen mit einem TRPV4-Inhibitor <i>in vivo</i>	68
4.2.6.1	Behandlung der Versuchstiere mit HC-067047	68
4.2.6.2	Weiterer Versuchsablauf und Analysen	69
4.2.7	Statistische Datenanalyse	69
5	Ergebnisse	71
5.1	TRPV4-Knockout-Mäuse zeigen einen attenuierten klinischen Verlauf nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	71
5.2	TRPV4-Knockout-Mäuse weisen eine geringere alveolo-kapilläre Barrierestörung 48 h nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> auf.....	72
5.3	Der TRPV4-Knockout in Mäusen hat keinen Einfluss auf Compliance- Veränderungen durch eine <i>S. pneumoniae</i> -Pneumonie.....	73
5.4	TRPV4-Knockout-Mäuse zeigen veränderte Leukozyten-Subpopulationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit, aber nicht im Blut	74
5.5	Die pro-inflammatorische humorale Immunantwort nach einer <i>S. pneumoniae</i> -Infektion ist bei TRPV4-Knockout-Mäusen reduziert.....	77
5.6	Die Bakterienlast in der Lunge ist nach einer Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> bei TRPV4-Knockout-Mäusen reduziert	81
5.7	Die pulmonale Expression von TRPV4, WNK1 und CFTR ist nach Infektion <i>in vivo</i> mit <i>S. pneumoniae</i> reduziert.....	81
5.8	Die endotheliale Expression von TRPV4 und WNK1 <i>in vitro</i> wird durch <i>S. pneumoniae</i> nicht verändert.....	84
5.9	Der TRPV4-Inhibitor HC-067047 hat bei intraperitonealer Applikation keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf und die Barrierestörung bei Pneumokokken-Pneumonie	86
6	Diskussion	92

6.1	Bei Pneumokokken-Pneumonie vermindert ein TRPV4-Knockout die pulmonale Barrierestörung bei gleichbleibender Compliance und beeinflusst zudem den klinischen Verlauf	92
6.2	Der TRPV4-Knockout bewirkt bei Pneumokokken-Pneumonie eine reduzierte humorale und zelluläre Immunantwort bei verminderter Bakterienlast.....	96
6.3	Die Pneumokokken-Infektion führt zu einer verminderten pulmonalen Expression von TRPV4, WNK1 und CFTR im Lungenhomogenat von Maus und Mensch	103
6.4	Implikationen der Rolle von TRPV4 bei der Pneumokokken-Pneumonie für die Behandlung beim Menschen	106
7	Literaturverzeichnis	108
8	Anhang	125
8.1	Eidesstattliche Versicherung	125
8.2	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	126
8.3	Lebenslauf.....	127
8.4	Publikationsliste.....	128
8.5	Danksagung	129

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau von <i>Adherens Junctions</i>	29
Abbildung 2: Schematische Darstellung des TRPV4-Proteins.....	33
Abbildung 3: Fluoreszenz-mikroskopische dreidimensionale Darstellung der Verteilung des TRPV4-Kanals im Lungengewebe.....	34
Abbildung 4: Postulierter Mechanismus der kaskadenartigen Regulierung der Expression und Aktivität von TRPV4, WNK1 und CFTR.	37
Abbildung 5: Strukturformel des TRPV4-Inhibitors HC-067047.	42
Abbildung 6: Gating-Strategie zur Unterscheidung der unterschiedlichen Zellpopulationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit.	60
Abbildung 7: TRPV4-KO-Tiere zeigen eine verminderte Hypothermie und eine höhere prozentuale Gewichtsreduktion 48 h nach Infektion.	71
Abbildung 8: Die alveolo-kapilläre Barrierestörung bei der murinen Pneumokokken-Pneumonie 48 h nach Infektion ist bei TRPV4-KO-Tieren reduziert.....	73
Abbildung 9: Die dynamische Compliance ist bei TRPV4-KO-Tieren unverändert.....	74
Abbildung 10: Infizierte Tiere mit TRPV4-KO zeigen veränderte Leukozyten-Subpopulationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF).	76
Abbildung 11: Leukozyten-Subpopulationen im Blut unterscheiden sich nicht zwischen infizierten TRPV4-KO- und WT-Tieren.	77
Abbildung 12: Bei infizierten Tieren mit TRPV4-KO zeigen sich reduzierte pro-inflammatorische Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit.	79
Abbildung 13: Bei infizierten Tieren mit TRPV4-KO zeigen sich im Plasma reduzierte pro-inflammatorische Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen.	80
Abbildung 14: Die Bakterienlasten in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit und im Blut sind bei TRPV4-KO-Tieren reduziert.....	81
Abbildung 15: Die Expression des TRPV4-Proteins in der Lunge ist bei der murinen pulmonalen Pneumokokken-Infektion reduziert.....	82
Abbildung 16: Die pulmonale Pneumokokken-Infektion führt zu einer reduzierten mRNA-Expression von CFTR, WNK1 und TRPV4 in der Lunge der Maus und teilweise auch des Menschen.....	84

Abbildung 17: Die Expression von WNK1 und TRPV4 in pulmonalen humanen Endothelzellen wird nicht durch eine Infektion <i>in vitro</i> mit <i>S. pneumoniae</i> beeinflusst.	85
Abbildung 18: Die intraperitoneale Applikation von HC-067047 bei Mäusen attenuiert nicht die Barrierestörung und den Verlauf der Pneumokokken-Pneumonie.	87
Abbildung 19: Die Verminderung der dynamischen Compliance in der Pneumokokken-Pneumonie der Maus wird durch die intraperitoneale Applikation von HC-067047 nicht attenuiert.	88
Abbildung 20: Die Konzentrationen der Leukozyten-Subpopulationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit werden durch die intraperitoneale Applikation von HC-067047 nicht verändert.	89
Abbildung 21: Die Konzentrationen der Leukozyten-Subpopulationen im Blut werden durch die intraperitoneale Applikation von HC-067047 nicht verändert.	90
Abbildung 22: Die Bakterienlasten in der murinen Pneumokokken-Pneumonie werden durch die intraperitoneale Applikation von HC-067047 nicht reduziert.	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Geräte.....	45
Tabelle 2: Auflistung der Verbrauchsmaterialien.	46
Tabelle 3: Auflistung verwendeter Reagenzien und Medien.....	48
Tabelle 4: Auflistung verwendeter Medikamente.	48
Tabelle 5: Auflistung verwendeter Primer.	49
Tabelle 6: Auflistung verwendeter Antikörper.	49
Tabelle 7: Auflistung verwendeter Immunoassays und Kits.....	50
Tabelle 8: Auflistung verwendeter Bakterienstämme und Zelllinie.....	50
Tabelle 9: Auflistung verwendeter Computerprogramme.....	50
Tabelle 10: Scoring-Blatt zum Monitoring von Versuchstieren in Anlehnung an die Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter.	53
Tabelle 11: Applikationsschemata der drei verschiedenen Behandlungsgruppen.	69

Abkürzungsverzeichnis

®.	<i>Eingetragenes Warenzeichen</i>
4 α PDD.	<i>4α-Phorbol-12,13-Didecanoat</i>
ARDS.	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome - Akutes Atemnotsyndrom</i>
AUC.	<i>Area Under The Curve - Fläche unterhalb der Kurve</i>
BAL.	<i>Bronchoalveoläre Lavage</i>
BALF.	<i>Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit</i>
Ca ²⁺ .	<i>Calcium-Ionen</i>
CAP.	<i>Community-Acquired Pneumonia - Ambulant erworbene Pneumonie</i>
CD.	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cdc42.	<i>Cell Division Control Protein 42 Homolog</i>
cDNA.	<i>Complementary DNA - Komplementäre DNA</i>
CFTR.	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CFU.	<i>Colony Forming Unit - Kolonie-bildende Einheit</i>
Cl.	<i>Chlorid-Ionen</i>
COPD.	<i>Chronic obstructive pulmonary disease - Chronisch obstruktive Lungenerkrankung</i>
CXCL1.	<i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1</i>
CXCL2.	<i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 2</i>
CXCL5.	<i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 5</i>
DAMP.	<i>Danger Associated Molecular Patterns</i>
DNA.	<i>Deoxyribonucleic Acid - Desoxyribonukleinsäure</i>
dNTP.	<i>Nukleosidtriphosphate</i>
DPBS.	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Salin</i>
EDTA.	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
FACS ®.	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FC.	<i>Fragment Constant</i>
FEM.	<i>Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin</i>
FiO ₂ .	<i>Inspiratorische Sauerstofffraktion</i>
FSC.	<i>Forward Scatter</i>
GAPDH.	<i>Glycerinaldehy-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
GDP.	<i>Guanosindiphosphat</i>
GOI.	<i>Gene of interest</i>

<i>GRO-alpha.</i>	<i>Growth-Regulated Oncogene-alpha</i>
<i>GTP.</i>	<i>Guanosintriphosphat</i>
<i>HAP.</i>	<i>Hospital-Acquired Pneumonia - Nosokomial erworbene Pneumonie</i>
<i>hERG.</i>	<i>human Ether-a-go-go Related Gene</i>
<i>HIV.</i>	<i>Humanes Immundefizienz-Virus</i>
<i>HRP.</i>	<i>Horseradish Peroxidase</i>
<i>HSA.</i>	<i>Humanes Serum Albumin</i>
<i>huPMVEC.</i>	<i>humane mikrovaskuläre pulmonale Endothelzellen</i>
<i>IC50.</i>	<i>Mittlere inhibitorische Konzentration</i>
<i>IgA1.</i>	<i>Immunglobulin A1</i>
<i>IgG.</i>	<i>Immunglobulin G</i>
<i>IL1-β.</i>	<i>Interleukin-1-beta</i>
<i>IL-10.</i>	<i>Interleukin-10</i>
<i>IL-6.</i>	<i>Interleukin-6</i>
<i>IPD.</i>	<i>Invasive Pneumococcal Disease - Invasive Pneumokokken-Erkrankung</i>
<i>IPML.</i>	<i>Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge</i>
<i>KC.</i>	<i>Keratinocyte Chemoattractant</i>
<i>KG.</i>	<i>Körpergewicht</i>
<i>KO.</i>	<i>Knockout</i>
<i>LaGeSo.</i>	<i>Landesamt für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin</i>
<i>LPS.</i>	<i>Lipopolysaccharid</i>
<i>MLCK.</i>	<i>Myosin-light-chain-kinase - Myosin-leichte-Ketten-Kinase</i>
<i>MMP.</i>	<i>Matrix-Metalloproteasen</i>
<i>Na⁺.</i>	<i>Natrium-Ionen</i>
<i>NaCl.</i>	<i>Natriumchlorid</i>
<i>NF-κB.</i>	<i>Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' Of Activated B-Cells</i>
<i>NO.</i>	<i>Stickstoffmonoxid</i>
<i>P. aeruginosa.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>p.i.</i>	<i>Post infectionem</i>
<i>PAF.</i>	<i>Platelet-Activating Factor</i>
<i>PAMP.</i>	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
<i>PaO₂.</i>	<i>Arterieller Sauerstoffpartialdruck</i>
<i>PBS.</i>	<i>Phosphate-Buffered Saline - Phosphat-gepufferte Salzlösung</i>

<i>PEEP.</i>	<i>Positive End-Expiratory Pressure - positiver end-exspiratorischer Druck</i>
<i>PIP.</i>	<i>Peak Inspiratory Pressure - inspiratorischer Spitzendruck</i>
<i>PMN.</i>	<i>Polymorphonuclear Cell - Neutrophile Granulozyten</i>
<i>PVDF.</i>	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
<i>qPCR.</i>	<i>Quantitative polymerase chain reaction - Quantitative Polymerase-Kettenreaktion</i>
<i>Rac1.</i>	<i>Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1</i>
<i>Rho.</i>	<i>Ras Homolog Gene Family</i>
<i>RhoA.</i>	<i>Ras Homolog Gene Family, Member A</i>
<i>RIPA.</i>	<i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i>
<i>ROCK1.</i>	<i>Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1</i>
<i>ROS.</i>	<i>Reactive Oxygen Species - Reaktive Sauerstoffspezies</i>
<i>RT.</i>	<i>Reverse Transkription</i>
<i>S. pneumoniae.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>scRNA-seq.</i>	<i>Single-Cell RNA Sequencing - RNA-Sequenzierung aus Einzelzellen</i>
<i>SDS.</i>	<i>Sodium Lauryl Sulfate - Natriumlaurylsulfat</i>
<i>SEM.</i>	<i>Standard Error of the Mean - Standardfehler des Mittelwertes</i>
<i>SGK1.</i>	<i>Serum Glucocorticoid-Regulated Kinase 1</i>
<i>SSC.</i>	<i>Side Scatter</i>
<i>TLR.</i>	<i>Toll-like Rezeptoren</i>
<i>TLR4.</i>	<i>Toll-Like Receptor 4</i>
<i>TNF.</i>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<i>TNF-α.</i>	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
<i>TRPV4.</i>	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4</i>
<i>TV.</i>	<i>Tidalvolumen - Atemzugvolumen</i>
<i>VE-Cadherin.</i>	<i>Vascular Endothelial-Cadherin</i>
<i>WNK1.</i>	<i>Lysine Deficient Protein Kinase 1</i>
<i>WT.</i>	<i>Wildtyp</i>

1 Abstract

1.1 Abstract in deutscher Sprache

Einleitung: Die Mortalität der Pneumonie ist auch unter antibiotischer Therapie hoch, insbesondere wenn es zum akuten Lungenversagen, dem sogenannten *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) kommt. In der Pathogenese spielt die alveolo-kapilläre Barrierestörung eine entscheidende Rolle. Der Kationen-Kanal TRPV4 reguliert die pulmonal-vaskuläre Permeabilität in verschiedenen murinen Modellen des ARDS. Seine Rolle bei der pulmonalen Barrierestörung in der Pneumokokken-Pneumonie ist bisher ungeklärt.

Methoden: Weibliche TRPV4-Knockout- (TRPV4-KO) und Wildtyp- (WT) Mäuse (Stamm C57Bl/6J) wurden intranasal mit 5×10^6 Kolonie-bildenden Einheiten von *Streptococcus pneumoniae* (Serotyp 3) infiziert. Ihr klinischer Verlauf wurde alle 12 Stunden erfasst. 47 Stunden nach Infektion wurde Humanes Serum Albumin (HSA) intravenös appliziert. Eine Stunde später wurden die Tiere narkotisiert und präpariert. Es wurde eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt und Blut entnommen. Mit einem ELISA wurde die Konzentration von HSA in der BAL-Flüssigkeit (BALF) und im Blut bestimmt und der HSA-BALF/Plasma-Quotient als Maß für die alveolo-kapilläre Barrierestörung kalkuliert. In der BALF und im Blut wurden Bakterienlasten mittels Kultivierung auf Blutagarplatten, die Leukozyten-Subpopulationen mittels Durchflusszytometrie und Impedanzmessung, die Zyto- und Chemokine mit Multiplexassays bestimmt. Im Lungenhomogenat infizierter WT-Tiere wurde mittels Western Blot die Expression von TRPV4 und mittels qPCR die Expression von TRPV4, WNK1 und CFTR bestimmt. In einer weiteren Versuchsreihe erhielten infizierte Wildtyp-Tiere als Behandlung intraperitoneal 10 mg/kg Körpergewicht vom selektiven TRPV4-Inhibitor HC-067047 oder ein entsprechendes Lösungsmittel 24 Stunden vor, direkt nach und 24 Stunden nach Infektion.

Ergebnisse: TRPV4-KO-Tiere zeigten nach Infektion eine geringere Hypothermie, einen reduzierten HSA-BALF/Plasma-Quotienten, eine geringere Konzentration neutrophiler Granulozyten in der BALF, geringere Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine in Plasma und BALF und eine reduzierte Bakterienlast in Blut und BALF im Vergleich zu WT-Tieren. In den Lungenhomogenaten infizierter WT-Tiere fanden sich eine reduzierte Expression des TRPV4-Proteins und eine verminderte

Expression der mRNA von TRPV4, WNK1 und CFTR. Die Behandlung von infizierten WT-Tieren mit HC-067047 führte zu keiner Veränderung des HSA-BALF/Plasma-Quotienten.

Diskussion: Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass TRPV4 eine Rolle in der Entstehung der *S. pneumoniae*-induzierten Barrierestörung spielt und somit ein therapeutisches Target beim ARDS darstellen könnte. Außerdem zeigte sich, dass TRPV4 eine Rolle bei der pulmonalen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bei der Pneumonie spielt. Unklar bleibt jedoch, ob die Barrierestörung vorwiegend durch die TRPV4-Expression in Endothelzellen der Lunge oder in Leukozyten-Subpopulationen beeinflusst wird. Es kann spekuliert werden, dass die Behandlung des akuten Lungenversagens bei Pneumokokken-Pneumonie bestimmte Applikationsformen und -zeitpunkte eines TRPV4-Inhibitors erfordert.

1.2 Abstract in English

Introduction: Mortality of pneumonia remains high despite antibiotic treatment, especially when it leads to *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS). Dysfunction of the alveolocapillary barrier plays a pivotal role in the pathogenesis of ARDS. The importance of TRPV4 in murine models of ARDS has been shown. However, its role in the pathogenesis of pulmonary barrier dysfunction in pneumococcal pneumonia remains unknown.

Methods: Female TRPV4-knockout (TRPV-KO) and corresponding C57Bl/6J wildtype (WT) mice were infected intranasally with *Streptococcus pneumoniae* (5×10^6 colony-forming units, serotype 3). Body weight and temperature were monitored every 12 hours. Human serum albumin (HSA) was injected intravenously 47 hours after infection. One hour later, mice were sacrificed. Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed and blood was drawn. Concentrations of HSA in blood and BAL fluid (BALF) were quantified by ELISA, bacterial loads were quantified by culture on blood agar. The HSA BALF/plasma ratio was calculated to quantify alveolocapillary barrier dysfunction. Leucocyte subpopulations in BALF and blood were measured using FACS and a hemocytometer. Lung homogenates from WT animals were analyzed for TRPV4 protein expression by Western Blot and for mRNA expression of TRPV4, WNK1 and CFTR using qPCR. In a further set of experiments, infected WT animals received

intraperitoneal injections of the selective TRPV4 inhibitor HC-067047 (10 mg/kg bodyweight) or of the diluent (24 hours before, right after, 24 hours after infection).

Results: TRPV4-KO mice showed a lower degree of hypothermia, reduced HSA BALF/plasma ratios, a decline in PMN concentrations in BALF, lower concentrations of pro-inflammatory cytokines in BALF and plasma, and reduced CFUs in BALF and blood compared to WT mice. Lung homogenates from infected WT animals showed reduced expression of the TRPV4 protein and lower mRNA expression of TRPV4, WNK1 and CFTR. Treatment with HC-067047 of infected WT animals did not affect pulmonary permeability.

Conclusion: The data show that TRPV4 plays a pivotal role in the pathogenesis of alveolocapillary barrier dysfunction induced by *S. pneumoniae*. Further investigations should examine its role as a therapeutic target in ARDS. In addition, TRPV4 was also shown to play a role in the recruitment of PMNs to the lung after infection. However, the differential effect of TRPV4 expressed by endothelial as compared to myeloid cells on the development of alveolocapillary barrier dysfunction has not yet been determined. It is tempting to speculate that treatment of lung failure in pneumococcal pneumonia may require specific routes and timing of TRPV4 inhibitor application.

Hinweis auf Vorarbeiten im Rahmen einer Hausarbeit

Diese Dissertation baut auf einer Hausarbeit des Autors mit dem Titel „Bedeutung des TRPV4-Kanals für die pulmonale Barrierestörung bei der Pneumokokken-Pneumonie der Maus“ auf, die im Wintersemester 2016/ 17 im Modul 21 des Modellstudienganges Medizin an der Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt wurde. Darin wurde die pulmonale Barrierestörung nach Pneumokokken-Pneumonie zwischen TRPV4-KO-Tieren und WT-Tieren an einer kleineren Anzahl an Tieren in derselben Arbeitsgruppe und unter derselben Betreuung wie in dieser Promotion verglichen. Diese Promotion stellt eine deutliche Erweiterung der Thematik der Hausarbeit dar.

2 Einleitung

2.1 Die Lunge

2.1.1 Anatomischer Aufbau

Der makroskopische Aufbau des unteren Respirationstraktes beim Menschen beginnt mit dem Larynx, an welchen sich die Trachea anschließt. Diese teilt sich an der *Bifurcatio tracheae* in zwei Hauptbronchien und anschließend in Lappenbronchien auf, anschließend findet eine dichotome Teilung der Bronchien in etwa 20 Generationen statt. Die *Bronchioli terminales* sind die letzte Einheit des rein luftleitenden Systems. Im Anschluss folgen die *Bronchioli respiratorii*, die sowohl luftleitende als auch Gasaustausch-Funktion haben, sowie die *Sacculi alveolares*, die den eigentlichen Ort des Gasaustausches darstellen. Die starke Verzweigung des Bronchialbaums und die Organisation der Gasaustauschfläche in bläschenförmige Alveolen mit geringem Durchmesser (ca. 250 µm) ermöglicht eine starke Oberflächenvergrößerung der Alveolen auf über 100 m² (4, 5).

Die Alveolen sind mit sogenannten Pneumozyten ausgekleidet, die auch Epithelzellen vom Typ I oder II genannt werden. Die Pneumozyten vom Typ II bilden ausschließlich verschiedene sogenannte Surfactant-Substanzen zur Reduktion der Oberflächenspannung der Alveolen und zur Erregerelimination. Die Pneumozyten vom Typ I stellen den flächenmäßig größten Teil der alveolären Auskleidung dar und dienen dem Gasaustausch, indem sie den alveolären Teil der alveolo-kapillären Barriere bilden. Der Aufbau der alveolo-kapillären Barriere wird im Abschnitt 2.4 genauer erläutert (4, 5).

Da die Bronchien und das alveoläre System ständig mit der Umwelt in Kontakt stehen, sind verschiedene Abwehrmechanismen zum Schutz vor Erregern wie Viren, Bakterien oder Pilzen sowie vor inhalativen Toxinen notwendig. Einen wichtigen Abwehrmechanismus der Bronchien stellt die mukoziliäre Clearance dar. Durch einen Schleimteppich (Mucus), der den rhythmisch schlagenden Zellfortsätzen der Bronchialepithelzellen aufsitzt (Zilien), gelingt der Abtransport von Erregern und Schadstoffen in Richtung des Oropharyngealtraktes. Außerdem befinden sich im Alveolarraum Zellen des Immunsystems. Die wichtigsten Vertreter der angeborenen Immunantwort stellen hier die alveolären Makrophagen dar. Sie können nach der Erkennung von konservierten Erreger-Strukturen über Muster-Erkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors) wie Toll-like Rezeptoren (TLR) die Erreger durch

Phagozytose eliminieren. Die Sichtbarmachung (Opsonierung) von Erregern durch Surfactant-A und -D kann diesen Prozess erleichtern. Über die Migration in lymphatische Organe und die Präsentation der Erregerstrukturen an Zellen der adaptiven Immunantwort können auch B- und T-Lymphozyten aktiviert werden und in die Alveolen einwandern. Ebenfalls spielen sogenannte Chemokine eine Rolle beim Anlocken von Zellen des Immunsystems. Dabei handelt es sich um Proteine, die beispielsweise von Immunzellen und auch Epithelzellen sezerniert werden und über ihren Konzentrationsgradienten die Migration der Immunzellen steuern (4, 5).

2.1.2 Physiologie

Die Einatmung erfolgt durch die Kontraktion der Atemmuskulatur, wodurch sich der muskuläre und knöcherne Brustkorb weitet und Dehnungskräfte aufbaut, die über den negativen intrapleurale Druck auf die Lunge übertragen werden. Es entsteht kurzzeitig ein negativer intrapulmonaler Druck (üblicherweise in cmH_2O oder kPa angegeben) im Verhältnis zum Atmosphärendruck, wodurch Luft in die Lunge mit einem bestimmten Atemfluss (üblicherweise in Litern pro Sekunde $[\text{l/s}]$ angegeben) gesogen wird. Während es sich bei der Inspiration also um einen aktiven Prozess handelt, erfolgt die Expiration durch die elastischen Rückstellkräfte des Thorax und des Lungenparenchyms. Dabei entsteht ein zum Atmosphärendruck positiver intrapulmonaler Druck, der für die Verschiebung von Luft aus der Lunge in die Atmosphäre sorgt (6, 7).

Dahingegen erfolgt bei der assistierten oder kontrollierten Beatmung von Patient*innen unter Sedierung oder mit pulmologischen und neuromuskulären Erkrankungen die Inspiration mit Hilfe eines Überdruckes. Es existieren volumengesteuerte und druckgesteuerte Beatmungsmodi, sowie Kombinations-Modi, wie die druckregulierte-volumenkontrollierte Beatmung (*Pressure Regulated Volume Controlled*). In diesem Modus wird ein am Beatmungsgerät festgelegtes Atemzugvolumen in Druck-regulierter Weise erreicht. Das bedeutet, dass der benötigte Druck für ein garantiertes Atemzugvolumen schnell erreicht wird, wohingegen der Atemfluss dezelerierend verläuft. Bei der druckgesteuerten Beatmung wird ein Atemfluss anhand eines angestrebten inspiratorischen Druckes aufgebaut. In den

Experimenten der vorliegenden Studie wurden die Lungen der Versuchstiere *post mortem* einer solchen druckgesteuerten Beatmung unterzogen (6, 7).

In Lungenfunktionsuntersuchungen können eine Reihe von Parametern bestimmt werden, die die Volumina, Drücke, Widerstände und Luftströme in unterschiedlichen Kompartimenten der Atemwege und in verschiedenen Phasen des Atemzyklus beschreiben. Es sollen hier jene Parameter erläutert werden, die für das Verständnis der vorliegenden Studie von größter Relevanz sind.

Die Compliance wird auch als Volumendehnbarkeit bezeichnet und beschreibt die Volumenänderung, die durch eine bestimmte Druckänderung hervorgerufen wird. Es gilt:

$$C = \Delta V / \Delta P$$

wobei C die Compliance, ΔV die Volumenänderung und ΔP die Druckänderung bezeichnet. Die Compliance wird einerseits von der Dehnbarkeit des Thorax und der elastischen Fasern des Lungenparenchyms beeinflusst. Andererseits hängt sie auch von der Oberflächenspannung der Alveolen ab. Diese Rückstellkräfte der Alveolen werden durch das sogenannte Surfactant reduziert, ein Substanzgemisch, das aus Lipiden und Proteinen besteht. Die Funktion des Surfactant kann durch ein Lungenödem eingeschränkt sein, zum Beispiel bei einem entzündlichen Exsudat im Rahmen einer Pneumonie (6, 7).

Der Luftstrom in den Atemwegen erfolgt nicht ungehindert, sondern unter Überwindung von gewissen Widerständen. Unter den Strömungswiderständen spielt die Resistance die größte Rolle. Als Resistance bezeichnet man den intrapulmonalen Druck, der aufgewandt werden muss, um eine bestimmte Volumenstromstärke zu erzeugen. Nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz ist der Volumenstrom proportional zur vierten Potenz des Radius. Das bedeutet, dass eine Halbierung des Radius zu einer Reduktion des Volumenstroms auf ein Sechzehntel führt. Die Regulation des Radius der Luftwege erfolgt durch glattmuskuläre Fasern in den Wänden des Bronchialsystems und verschiedene neuronale und humorale Signale. Bei obstruktiven Erkrankungen wie Asthma oder der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) ist diese Regulation gestört (6, 7).

2.2 Pneumonie

2.2.1 Definition, Klinik und Epidemiologie

Bei der Pneumonie handelt es sich um eine Entzündung der unteren Atemwege und der Alveolen, die gemäß der Definition der *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* meist mit Husten, Fieber, Dyspnoe und radiologischen Befunden einhergeht (8). Die Weltgesundheitsorganisation bezeichnet in ihrem *Global Burden of Disease*-Bericht für das Jahr 2016 die Infektionen der unteren Atemwege, zu welchen auch die Pneumonie zählt, mit weltweit 3 Millionen Todesfällen als vierthäufigste Todesursache (9). Mit über 19.000 Todesfällen sind Pneumonien laut statistischem Bundesamt im Jahr 2015 die achthäufigste Todesursache in Deutschland (10). Es wird zwischen der außerhalb des Krankenhauses, also ambulant erworbenen (CAP, *Community-Acquired Pneumonia*) und der nosokomial erworbenen Pneumonie (HAP, *Hospital-Acquired Pneumonia*), welche definitionsgemäß 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme beginnt, unterschieden (11). Diese Unterscheidung ist für das zu erwartende Erreger-Spektrum und die sogenannte empirische antibiotische Therapie bedeutend, die eingeleitet wird, bevor ein Antibiogramm vorliegt (11).

2.2.2 Ursachen

Ätiologisch lassen sich Pneumonien, die durch infektiöse Erreger hervorgerufen werden, von den selteneren, nicht-infektiösen Pneumonien, zum Beispiel durch Magensaft-Aspiration, unterscheiden. Im Erregerspektrum der infektiösen Pneumonien finden sich neben *Influenza*-, *Adeno*-, *Rhino*- und *Coronaviren*, und Pilzen wie *Aspergillus spp.*, vor allem Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* und *Staphylococcus aureus* (8). Angaben über die Häufigkeiten der verschiedenen Erreger als Ursache von Pneumonien schwanken zum Teil erheblich zwischen unterschiedlichen Studien (8).

Eine Übersichtsarbeit über 46 Studien aus 13 europäischen Ländern ergab jedoch für den Zeitraum zwischen 1990 und 2008, dass *S. pneumoniae* die häufigste Ursache von infektiösen Pneumonien darstellt, welche ambulant erworben wurden (12). Dieser Erreger konnte bei durchschnittlich 35 % der Patient*innen nachgewiesen

werden (12). In Deutschland können etwa 40 % aller CAP auf das Bakterium zurückgeführt werden (13).

2.2.3 *Streptococcus pneumoniae*

2.2.3.1 Klassifikation und Impfung

S. pneumoniae ist eine Art innerhalb der Gattung *Streptococcus*. Es handelt sich um ein kokkenförmiges, bekapseltes, gram-positives Bakterium, das auch als Pneumokokke bezeichnet wird. Es sind derzeit über 90 Serotypen von *S. pneumoniae* bekannt, die sich hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Polysaccharid-Kapsel unterscheiden (14).

Die Inzidenz von durch *S. pneumoniae* verursachten Infektionen ist besonders bei älteren Menschen über 60 Jahren sowie Kindern und Säuglingen hoch, weshalb die Ständige Impfkommission am Robert Koch-Institut für diese Risikogruppen die Immunisierung mit einem Konjugat-Impfstoff empfiehlt (12, 15, 16). Die hohe Variabilität in der Kapsel-Zusammensetzung trägt dazu bei, dass es nach Impfungen gegen bestimmte *S. pneumoniae*-Serotypen zu einem Wechsel des Erregerspektrums unter den Neuerkrankten hin zu nicht-geimpften Serotypen kommen kann. Dies wurde 2008 für den Serotyp 19A nach der Einführung eines sieben-valenten Impfstoffes in den USA berichtet (17).

2.2.3.2 Virulenzfaktoren

Es wurden einige Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* entdeckt, die zur Ausbreitung, Vermehrung und zum Überleben des Bakteriums sowie zur Schädigung des Wirtes beitragen. Die Polysaccharid-Kapsel schützt das Bakterium vor Phagozytose und verhindert seinen Abtransport vom respiratorischem Epithel über den Mukus (18). Außerdem induziert die Polysaccharid-Kapsel die Synthese des Proteins Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), das als ein wichtiger Mediator der deregulierten Immunantwort im Rahmen einer Sepsis gilt (19). *S. pneumoniae* ist zudem in der Lage, längliche Membranfortsätze auszubilden, sogenannte Pili, die aus der Polysaccharid-Kapsel ragen. Sie begünstigen die Adhäsion an Epithelzellen des Wirtes und vermitteln die Produktion von Zytokinen (20). *S. pneumoniae* kann eine Protease synthetisieren,

die IgA1 deaktiviert. Dabei handelt es sich um ein Immunglobulin, das dem Schutz mukosaler Oberflächen dient, welche einen wichtigen Kolonisationsort von *S. pneumoniae* darstellen (21).

Besonders gut untersucht ist das Cholesterol-abhängige Zytolysin Pneumolysin, das von vielen *S. pneumoniae*-Stämmen synthetisiert wird (22). Es ist in der Lage, den Zilienschlag zu vermindern, die Integrität des respiratorischen Epithels zu schädigen sowie den unvollständigen Abbau von Erythrozyten und Hämoglobin einzuleiten, die sogenannte α -Hämolyse (23). Das von *S. pneumoniae* als Monomer synthetisierte Protein kann Oligomere formen und auf Cholesterin-reichen Zellmembranen von Wirtszellen Poren bilden, was zur Lyse der Zellen führt (24). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Pneumolysin an Muster-Erkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems bindet und damit an der Initiierung der Immunantwort gegen *S. pneumoniae* beteiligt ist (25). Außerdem wurde gezeigt, dass Pneumolysin an der Prozessierung und Sekretion von Zytokinen wie IL-1-beta beteiligt ist, was ebenfalls eine proinflammatorische Rolle des Pneumolysins für den Wirt nahelegt (26, 27). In einem Tier-Modell wurden *S. pneumoniae*-Stämme untersucht, die ein Pneumolysin mit verminderter Inflammations-Induktion und verminderter Poren-Bildung synthetisieren. Diese Tiere hatten zwar eine höhere Bakterienlast im Blut, aber gleichzeitig eine geringere Mortalität (28). Diese Erkenntnisse verdeutlichen die ambivalente Rolle des Pneumolysins für die Immunabwehr bei *S. pneumoniae*-Infektion. Sie legen auch den Verdacht nahe, dass die Balance zwischen suffizienter Immunantwort einerseits und Regulation der Inflammation andererseits ein wichtiger Faktor für den Verlauf und die Mortalität einer *S. pneumoniae*-Infektion ist.

2.2.3.3 Invasive und nicht-invasive Infektionen

Zehn Prozent der Weltbevölkerung weisen in ihrem Nasen-Rachen-Raum eine kommensale Besiedelung mit *S. pneumoniae* auf, sie zeigen also keine Krankheitssymptome trotz Erreger-Nachweis auf diesen Schleimhäuten (29). Wenn das Bakterium Krankheiten verursacht, kann man zwischen nicht-invasiven, mukosalen Infektionen und invasiven Infektionen, auch *Invasive Pneumococcal Disease* (IPD) genannt, unterscheiden. Die IPD ist definiert als Übertritt des Bakteriums in normalerweise sterile Gewebe (22). So ist bei der *S. pneumoniae*-Sepsis der Erreger

im Blut und bei der *S. pneumoniae*-Meningitis im Liquor cerebrospinalis zu finden. Serotypen, bei denen das Auftreten von IPD seltener beobachtet wurde, sind häufiger mit einer Kolonisation des Nasen-Rachen-Raums gesunder Menschen in Verbindung gebracht worden, zum Beispiel die Serotypen 3, 6A, 6B, 11A, 19F, 23F (22, 30). Doch wenn diese Serotypen IPD verursachen, dann ist ihr Nachweis oft mit einer relativ hohen Mortalität assoziiert, wenn man den Serotyp 14 als Referenz verwendet, wie eine Metaanalyse von Weinberger und Kolleg*innen zeigt (31). Der Serotyp 14 wird in der Metaanalyse als Referenz ausgewählt, da er häufig IPD verursacht und als einziger Serotyp in allen eingeschlossenen Studien eine relevante Mortalität aufweist (31). Anders verhält es sich beispielsweise bei den Serotypen 1, 4, 5, 7F, 8, die selten den Nasen-Rachen-Raum Gesunder kolonisieren, die aber häufig bei IPD nachgewiesen werden können (22, 30). Sie verursachen häufiger IPD, weisen jedoch eine relativ geringe Mortalität auf, wenn der Serotyp 14 als Referenz verwendet wird (31). Die Serotypen unterscheiden sich also nicht nur hinsichtlich ihrer präferierten Zielorgane und ihrer Fähigkeit zur Kolonisation oder Invasion, sondern auch in ihrer Pathogen-Wirt-Interaktion und Mortalität.

Kommt es bei einem Wirt, der mit einem *S. pneumoniae*-Serotyp kommensal im Nasen-Rachen-Raum besiedelt ist, zu einer Schwächung der Immunabwehr, so entsteht oft eine IPD, die mit hoher Mortalität assoziiert ist, wie es zum Beispiel bei HIV-Patient*innen beobachtet wurde (32). Wichtige Risikofaktoren für die Mortalität nach IPD sind außerdem das Alter und der Grad der Komorbidität der Patient*innen (33).

2.3 Akutes respiratorisches Distress-Syndrom

2.3.1 Definition, Klinik und Epidemiologie

Als akutes respiratorisches Distress-Syndrom (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) bezeichnet man ein hypoxämisches Parenchymversagen der Lunge. Der Begriff des *Acute Lung Injury* (ALI) bezeichnete früher mildere Formen des Lungenversagens, gilt heute in der Humanmedizin als veraltet, wird aber noch oft bei experimentellen Tiermodellen verwendet (34, 35). Nach der 2011 eingeführten Berlin-Definition sind folgende Kriterien für die Diagnose des ARDS entscheidend (35):

- (i) akuter Beginn innerhalb einer Woche nach Auftreten des angenommenen Auslösers,

- (ii) Lungenödem, das nicht durch kardiale Ursachen erklärt werden kann,
- (iii) bilaterale Verschattungen auf einem Röntgen-Bild der Lunge und
- (iv) Hypoxämie, die sich durch einen Quotienten aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck und inspiratorischer Sauerstofffraktion ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$; Horovitz-Quotient) von weniger als 300 mm Hg definiert.

Das letzte Kriterium bestimmt auch den Schweregrad und beeinflusst die Mortalität des ARDS: ein mildes ARDS ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ mm Hg) ist mit einer Mortalität von 27 Prozent, ein mittelschweres ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mm Hg) mit einer Mortalität von 32 Prozent und ein schweres ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$ mm Hg) mit einer Mortalität von 45 Prozent assoziiert (35).

Rubinfeld und Kolleg*innen (36) ermittelten in einer prospektiven, US-amerikanischen Studie über zwölf Monate in den Jahren 1999 und 2000 valide Aussagen über die Häufigkeit des ARDS. Die Inzidenz lag bei 86,2 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr und war damit höher als zuvor angenommen (36). Die Mortalität lag je nach Schweregrad zwischen 38,5 und 41,1 Prozent (36). Eine prospektive Studie aus dem Jahr 2014 untersuchte die Häufigkeit des ARDS auf Intensivstationen (37). Sie bezog über 450 Intensivstationen in 50 verschiedenen Ländern ein und fand dort eine Prävalenz des ARDS von über zehn Prozent (37). Die Mortalität unter den mit ARDS auf Intensivstationen behandelten Patient*innen lag je nach Schweregrad zwischen 34,9 und 46,1 Prozent, und ähnelt damit den Ergebnissen der US-amerikanischen Studie (37). Diese epidemiologischen Daten verdeutlichen die erhebliche medizinische und ökonomische Belastung, die sich aus dem ARDS ergibt.

2.3.2 Ätiologie und Pathogenese

Es gibt vielfältige Ursachen für das ARDS: Neben direkten Schädigungsmechanismen der Lunge wie Pneumonie, pulmonale Sepsis, Magensaft-Aspiration, Beinahe-Ertrinken, stumpfe Traumata des Thorax und Inhalationstraumata durch Rauchgas, konnten auch indirekte Schädigungen wie bei nicht-pulmonaler Sepsis, Verbrennungen, Pankreatitis und Schädel-Hirn-Trauma als ätiologische Faktoren ausgemacht werden (36, 38-44). Rubinfeld und Kolleg*innen (36) ermittelten als häufigsten Risikofaktor pulmonale Sepsis, die in 46 Prozent der Fälle vorlag, gefolgt von nicht-pulmonaler Sepsis mit 33 Prozent. Für *S. pneumoniae* konnte an Schweinen ein Zusammenhang

zwischen nicht-vitalen Bestandteilen des Bakteriums im Blut und der Entstehung von ARDS-ähnlichen Zuständen gezeigt werden (45).

Diese unterschiedlichen ätiologischen Faktoren scheinen zu einem teilweise homogenen pathophysiologischen Geschehen zu führen. So findet sich häufig die Sequenz von drei Phasen: Es kommt zu einer exsudativen und inflammatorischen, zu einer proliferativen, und schließlich zu einer fibrotischen Phase (46, 47). Zu Beginn kommt es während der exsudativen Phase zu einer Schädigung der Barriere zwischen den Alveolen und den Kapillaren, die für Flüssigkeiten und größere Moleküle dicht, für die Atemgase jedoch durchlässig ist (47). Der Aufbau dieser sogenannten alveolo-kapillären Barriere wird in Abschnitt 2.4 genauer erläutert. Durch die Barriestörung entsteht zuerst ein interstitielles Ödem, das nach weiteren Gewebeveränderungen zu einem alveolären Ödem fortschreitet. Dieses Ödem ist reich an Proteinen und neutrophilen Granulozyten sowie anderen Leukozyten (48, 49). Durch Aggregation dieser Ödembestandteile kann es zur Bildung von hyalinen Membranen in den Alveolen kommen, die den Gasaustausch erheblich erschweren (48, 50). Ab circa dem dritten Tag der exsudativen Phase kommt es zu einer Proliferation von Fibroblasten, die Fasern der interstitiellen Matrix produzieren, und von Typ II-Pneumozyten (47). Nach einer Erholungsphase zwischen dem siebten und 14. Tag kommt es bei vielen Patient*innen etwa ab der dritten Woche zu einer interstitiellen Fibrosierung (47, 50). Dies erschwert den Gasaustausch weiter, senkt die Compliance der Lunge, also die Volumendehnbarkeit, und ist auch mit einer höheren Mortalität assoziiert (51). Auch kommt die Compliance-Senkung durch den Abbau elastischer interstitieller Fasern (52) und die Schädigung der Typ II-Pneumozyten zu Stande, die die Surfactant-Proteine B und C produzieren (53). Dabei handelt es sich um Substanzgemische aus verschiedenen Lipiden und Proteinen, die die Oberflächenspannung der Alveolen senken. Atemmechanisch ist das ARDS neben der Compliance-Senkung auch durch eine verminderte funktionale Residualkapazität gekennzeichnet (54). Damit wird das Volumen bezeichnet, das nach einer nicht-forcierten Expiration in der Lunge verbleibt.

Die zelluläre Immunreaktion beim ARDS ist durch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Interstitium und den alveolären Raum gekennzeichnet (47). Diese Granulozyten weisen außerdem eine gesteigerte Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf (55). ROS tragen zur strukturellen Schädigung des Lungenparenchyms beim ARDS bei.

Die bedeutende Rolle von pro-inflammatorischen Zytokinen und anderen humoralen Faktoren beim ARDS ist seit längerer Zeit bekannt (56). So wurde zum Beispiel die Funktion von IL-8 für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Lungenparenchym und ihre Regulierung eingehend untersucht (57). Es konnte auch gezeigt werden, dass sich die beim ARDS involvierten Mediatoren je nach Entstehungsmechanismus des Lungenversagens unterscheiden: Während bei ARDS-Patient*innen nach einer direkten Schädigung der Lunge verstärkt epithelial sezernierte Substanzen wie Surfactant Protein D nachgewiesen werden können, sind es bei indirekter Schädigung vor allem endotheliale Mediatoren wie Angiopoetin-2, von Willebrand-Faktor, IL-6 und IL-8 (58).

Gattinoni und Kollegen (54) entwickelten das Konzept der sogenannten *Baby Lung* beim ARDS. Es leitet sich aus Beobachtung von computertomographischen Aufnahmen ab, die zeigen, dass der Anteil der normal belüfteten Lungenbereiche auf die Größe der Lunge eines fünf- bis sechsjährigen Kindes schrumpfen kann. Außerdem stellten sie die These auf, dass die Lungen von ARDS-Patient*innen in den normal belüfteten Bereichen keine pathologischen Veränderungen der Elastance aufweisen, also des Kehrwerts der Compliance als Maß für den elastischen Lungenwiderstand (54).

2.3.3 Supportive Behandlungsoptionen

Bisher gibt es keine kausale Therapie für das Pneumonie-induzierte ARDS beim Menschen (59). Im Mittelpunkt der supportiven Behandlungsstrategie stehen die Sedierung der Patient*innen, die Bekämpfung der zugrundeliegenden Ursache, zum Beispiel mit einer Antibiotika-Therapie, eine restriktive Einstellung des Volumenhaushaltes und der Einsatz von Diuretika, die Gabe von Muskelrelaxantien, sowie die Beatmung der Patient*innen (60-62). Hierfür konnte eine Lungen-protective Beatmungsstrategie gefunden werden: Niedrige Atemzugvolumen (< 6 ml/kg ideales Körpergewicht) und niedrige Inspirations-Plateaudrücke (< 30 cm H₂O) senken die Mortalität (63). Ein relativ hoher positiver end-expiratorischer Druck (Positive End-Expiratory Pressure, PEEP) soll den Gasaustausch durch eine Erhöhung der funktionalen Residualkapazität verbessern, die Öffnung atelektatischer Lungenareale begünstigen und den Scherstress vermindern, der mit dem wiederholten Kollabieren und Entfalten von Alveolen verbunden ist. Dies scheint insbesondere dann die Mortalität

zu senken, wenn das ARDS mit Hyperinflammation und Sepsis vergesellschaftet ist (64, 65). Der Einsatz von Glucocorticoiden zur Inflammationshemmung und von inhalativem Stickstoffmonoxid zur Dilatation von Lungenkapillaren bleibt umstritten und muss im klinischen Alltag abgewogen werden (62, 66, 67).

2.4 Alveolo-kapilläre Barriere

2.4.1 Aufbau

Einerseits müssen die belüfteten Alveolen und die durchbluteten Kapillaren dicht aneinander liegen, um den Austausch von Atemgasen zu ermöglichen. Andererseits muss eine Barriere zwischen den beiden Kompartimenten den ungerichteten Übertritt von Flüssigkeiten, Zellen, Proteinen und anderen Blut-Bestandteilen von den Kapillargefäßen in die Alveolen verhindern. Daher besitzt diese Barriere einen komplexen histologischen Aufbau, der regionale Unterschiede aufweist (68). An einigen Stellen ist sie mit weniger als 1 µm Dicke besonders dünn und ermöglicht so den Gasaustausch zwischen Alveolen und Kapillaren (68). Sie besteht dort lediglich aus dem einschichtigen Alveolar-Epithel, den kapillären Endothelzellen, einer gemeinsamen, verschmolzenen Basalmembran, und assoziierten Proteinen (68).

Ein anerkanntes Modell für die Regulation der parazellulären Dichte geht von einer Balance zwischen Adhäsionskräften unter den Endothelzellen einerseits und zentripetalen Zugkräften innerhalb jeder einzelnen Zelle andererseits aus. Wenn die Zugkräfte die Adhäsionskräfte überwiegen, kommt es zur Retraktion und im Extremfall zur Loslösung aus dem Zellverband (69, 70). Die Adhäsionskräfte des Endothelzell-Verbandes werden von verschiedenen Zell-Zell-Verbindungen generiert, von denen die *Tight Junctions* und die *Adherens Junctions* hervorzuheben sind (71, 72). Zell-Zell-Verbindungen vom Typ der *Gap Junctions* hingegen dienen hauptsächlich dem Austausch von kleinen Molekülen und Ionen zwischen Endothel- und Epithelzellen (73). Bei den Epithelzellen, welche die Alveolen auskleiden, handelt es sich um die sehr dünnen Pneumozyten vom Typ I, welche den Gasaustausch ermöglichen, und die annähernd rechteckigen Pneumozyten vom Typ II, die Surfactant produzieren (siehe Abschnitt 2.3.2). Die Zell-Zell-Verbindungen zwischen diesen Epithelzellen werden vor allem durch *Tight Junctions* gebildet, wobei ihr Aufbau den *Tight Junctions* zwischen Endothelzellen ähnelt.

Die *Tight Junctions* in den Endothel- und Epithelzellverbänden bestehen aus Transmembran-Proteinen der Claudin-Familie und aus Occludinen. Letztere sind über zwischengeschaltete Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden. *Adherens Junctions* (Abbildung 1) sind Proteinkomplexe, die im Endothel unter anderem aus dem Glykoprotein VE (*Vascular Endothelial*)-Cadherin bestehen. VE-Cadherine sind in die laterale Plasmamembran von Endothelzellen eingelagert, wo sie Polymere bilden (72). Die Cadherine benachbarter Endothelzellen können sich Ca^{2+} -abhängig verbinden (74). Auf der intrazellulären Seite beider Endothelzellen sind die Cadherine über verschiedene Proteine wie α - und β -Catenine, Plakoglobin oder p120 an die Mikrotubuli und über verschiedene Aktin-bindende Proteine an das Aktin-Zytoskelett gekoppelt (72). Während die Funktion der *Tight Junctions* vor allem im dichten parazellulären Verschluss liegt, nahm man an, dass *Adherens Junctions* vor allem der Regulation des endothelialen Wachstums und der Vermeidung des Leukozyten- und Molekül-Übertritts dienen (75). Jedoch konnte bereits 1999 von Corada und Kolleg*innen (76) *in vivo* gezeigt werden, dass VE-Cadherin die endotheliale Permeabilität in Herz und Lunge entscheidend beeinflusst. Außerdem wird ein Einfluss von *Adherens Junctions* auf die Dichte der *Tight Junctions* angenommen, der noch genauer charakterisiert werden muss (75).

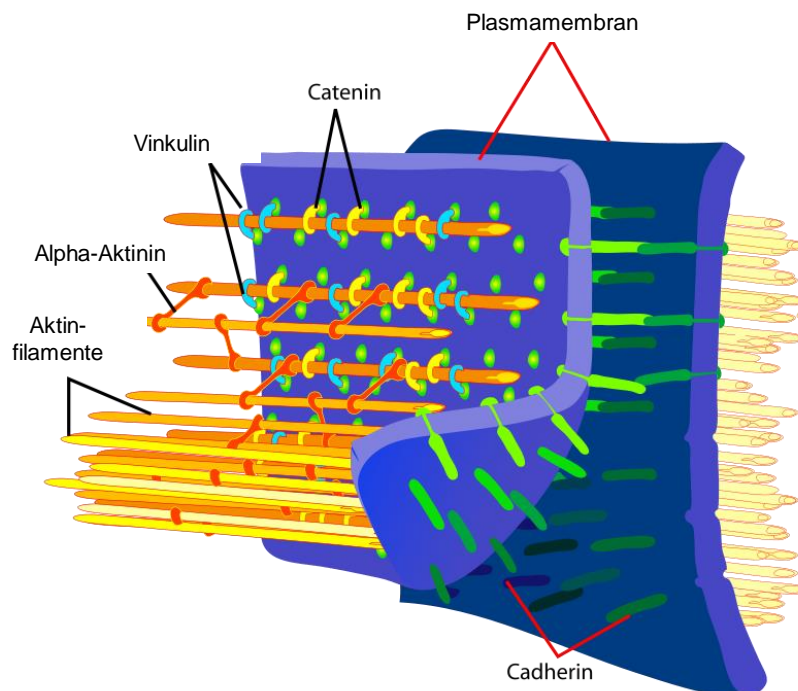


Abbildung 1: Schematischer Aufbau von *Adherens Junctions*.

Unterschiedliche Proteine regeln den Zusammenhalt zwischen den Endothelzellen untereinander und stellen außerdem eine Verbindung mit dem Zytoskelett her. VE (*Vascular*

Endothelial)-Cadherine sind die Zellmembran durchspannende Glykoproteine, die Polymere bilden und benachbarte Endothelzellen Ca^{2+} -abhängig verbinden. Auf der intrazellulären Seite sind sie über Vinkuline und Catenine mit den Aktin-Filamenten des Zytoskeletts verbunden, welches seinerseits über Verbindungen aus Alpha-Aktinin quervernetzt ist. Bearbeitet und entnommen aus einem Werk von Mariana Ruiz (77) in der *Wikimedia Commons* Bibliothek unter *Public Domain*-Lizenz, welche die Verwendung zu jedem Zweck erlaubt.

2.4.2 Barriestörung beim *Acute Respiratory Distress Syndrome*

Histopathologisch kommt es in der Frühphase des *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS), also zwei bis sieben Tage nach Einsetzen der Noxe, zu einer erhöhten Permeabilität der alveolo-kapillären Barriere (48, 49). Man nimmt an, dass diese Barriestörung unter anderem durch Mediatoren des massiven Inflammationsgeschehens vermittelt wird. Der Entzündungsmediator *Tumor Necrosis Factor* (TNF) ist zum Beispiel in der Lage, *Adherens Junctions* aus VE-Cadherin zu schädigen und kann somit zu Ödemen führen (72). Außerdem konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass der Barriestörung durch bakterielle Erreger wahrscheinlich ebenfalls eine Dysfunktion des VE-Cadherins zu Grunde liegt. Denn nach intrapulmonaler Applikation von Lipopolysaccharid, einem Endotoxin vieler gramnegativer Bakterien, zeigten Tiere mit genetisch verändertem und damit stabilisiertem VE-Cadherin weniger Ödembildung und einen verminderten Protein- und Leukozyten-Gehalt in ihren Alveolen (78). Wahrscheinlich gibt es eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen, über die es im Rahmen des ARDS je nach Ätiologie zur alveolo-kapillären Barriestörung führen kann. Diese unterschiedlichen pathophysiologischen Aspekte sind Gegenstand aktueller Forschung.

2.4.3 Molekulare Regulation der endothelialen Permeabilität

Die endotheliale Permeabilität wird entscheidend von der Funktion des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst, wie mit Cytochalasin B, einem Hemmstoff der Aktin-Polymerisierung, gezeigt werden konnte (79). Der Stoff erhöhte *in vitro* die endotheliale Permeabilität und sorgte für eine Retraktion der Zellen. Außerdem wurde wiederholt gezeigt, dass gesteigerte intrazelluläre Konzentrationen an Calcium-Ionen (Ca^{2+}) in Endothelzellen mit erhöhter alveolo-kapillärer Permeabilität assoziiert sind (80, 81). Der Ca^{2+} -Einstrom in Endothelzellen der Lungenkapillaren wird genau reguliert, zwischen

benachbarten Zellen abgestimmt und unter anderem über endosomale Strukturen gesteuert (82).

Ca^{2+} kann an das zytoplasmatische Protein Calmodulin binden und der Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex stimuliert die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (Myosin-light-chain-kinase, MLCK) (70, 83). Die aktivierte MLCK aktiviert wiederum über eine Diphosphorylierung an der leichten Kette das Myosin. Dies führt in den Endothelzellen zu einer Reihe von permeabilitätssteigernden Effekten: Es kommt zur Formierung von kontraktile Komplexen aus Aktin und dem Motorprotein Non-Muscle Myosin II, die man *Actin Stress Fibers* nennt (84). Des Weiteren wird das Protein β -Catenin, das an der Verbindung des Aktin-Zytoskeletts mit den *Adherens Junctions* beteiligt ist, gehemmt (85). Schließlich nimmt die Permeabilität des Endothels für große Proteine wie Albumin zu (84, 86).

Außerdem sind auch kleine Guanosintriphosphat (GTP)-spaltende Enzyme, sogenannte kleine GTPasen (*small GTPases*), an der Regulierung des Phosphorylierungszustandes der endothelialen MLCK beteiligt. Kleine GTPasen können GTP binden und erreichen dadurch ihren aktiven Zustand. Wenn sie das GTP durch hydrolytische Spaltung in Guanosindiphosphat (GDP) umwandeln, befinden sie sich wieder im inaktiven Zustand. Es gibt drei *Small GTPases* aus der Familie der *Ras homolog gene family* (Rho), die besondere Bedeutung für die endotheliale Permeabilität haben. Den beiden Mitgliedern der Rho-Familie *Cell division control protein 42 homolog* (Cdc42) und *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) wird eine stabilisierende Rolle auf die endotheliale Barriere zugeschrieben. Dies konnte auch bei Permeabilitätssteigerung gezeigt werden, die durch das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid und durch den Gerinnungsfaktor Thrombin induziert wurde (87, 88). *Ras homolog gene family, member A* (RhoA) kann hingegen die endotheliale Barriere destabilisieren.

RhoA aktiviert im GTP-gebundenen, aktiven Zustand die *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1* (ROCK1), die die leichte Myosin-Kette phosphoryliert und außerdem die Myosin-Phosphatase inhibiert (89, 90). Damit kann der RhoA/ROCK1-Signalweg ähnlich wie die MLCK zur Bildung von kontraktile *Actin Stress Fibers* führen und die endotheliale Permeabilität erhöhen (91, 92). Auch gibt es Hinweise darauf, dass ROCK1 über die Phosphorylierung eines Tyrosin-Restes von VE-Cadherin in der Lage ist, die Dichte der *Adherens Junctions* direkt zu vermindern (93).

Laut Lucas und Kolleg*innen könnte auch der RhoA/ROCK1-Signalweg, so wie der Ca^{2+} -Calmodulin-Signalweg, durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert werden (94). Sie vermuten, dass Ca^{2+} die Proteinkinase $\text{C}\alpha$ aktiviert, was zu einer Induktion des RhoA/ROCK1-Signalweges führt (94). Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass die Kinase ROCK1 direkt durch erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert werden kann (95). Es wurden weitere unterschiedliche Aktivatoren für die *small GTPase* RhoA und die ROCK-Kinasen gefunden, wie zum Beispiel der Gerinnungsfaktor Thrombin, das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid, reaktive Sauerstoff-Spezies und der Entzündungsmediator $\text{TNF-}\alpha$ (90, 96, 97). Zusammenfassend wurden unterschiedliche Mechanismen gefunden, über die eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration die endotheliale Permeabilität steigern kann. Dies ist im Zusammenhang mit dem Ca^{2+} -permeablen TRPV4-Kanal von Belang.

2.5 TRPV4-Kanal

2.5.1 Struktur, Vorkommen und Eigenschaften

Die Familie der *Transient Receptor Potential* (TRP)-Ionenkanäle wird aufgrund von Sequenzhomologien in sieben Unterfamilien aufgeteilt (98). TRP-Kanäle sind phylogenetisch sehr konserviert und in einer großen Bandbreite von Organismen exprimiert, wobei sie ursprünglich in *Drosophila melanogaster* charakterisiert wurden (99). Der TRP-Kanal vom Typ *Vanilloid 4* (TRPV4) ist ein nicht-selektiver Kationenkanal, dessen Permeabilitätswert für Calcium-Ionen (Ca^{2+}) P_{Ca} jedoch etwa sechs Mal höher ist als sein korrespondierender Wert für Natrium-Ionen (Na^+) P_{Na} (100, 101). Er besteht aus vier Untereinheiten, von denen jede 963 Aminosäuren lang ist. Jede Untereinheit ist hexahelikal (Abbildung 2), durchspannt also mit sechs Transmembrandomänen die Zellmembran (102). Die Domänen 5 und 6 sind an der Bildung einer die Membran durchspannenden Pore beteiligt sind (100).

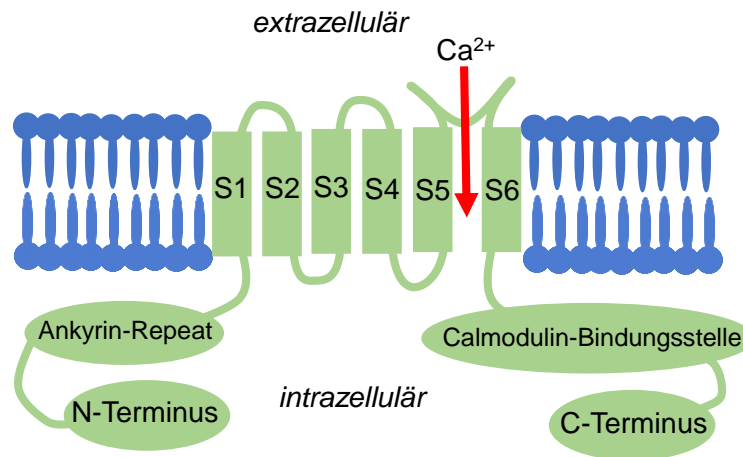


Abbildung 2: Schematische Darstellung des TRPV4-Proteins.

Zu erkennen ist der hexahelikale Membran-durchspannende Abschnitt des 963 Aminosäuren langen TRPV4-Proteins mit seinen Abschnitten S1 bis S6 sowie die Region zwischen S5 und S6, die die Ionen-durchlässige Pore bildet. Diese Pore ist unter anderem für Calcium-Ionen (Ca^{2+}) durchlässig. Am N-Terminus befinden sich sechs Ankyrin-Repeat-Domänen, am C-Terminus eine Bindungsdomäne für Calmodulin. Vier solcher Monomere bilden das als Ionen-Kanal fungierende Transmembranprotein. Abbildung erstellt nach Informationen aus (100, 102, 103).

RNA-Analysen aus Mausgeweben ergaben, dass das TRPV4-Gen in einer Vielzahl unterschiedlicher Organe und Gewebetypen zur Transkription gebracht wird, wobei besonders hohe mRNA-Konzentrationen in Niere, Lunge, Hoden, Aorta, Kleinhirn und Basalganglien gefunden wurden (104). In humanem und aus der Maus entnommenem Lungengewebe konnte der TRPV4-Kanal immunhistochemisch auf mikrovaskulären Endothelzellen und auf Alveolarepithelzellen nachgewiesen werden, welche wichtige Bestandteile der alveolo-kapillären Barriere bilden (105), wie auch in Abbildung 3 zu sehen ist. Expressionsanalysen in Geweben der Maus zeigen sein Vorkommen ebenfalls auf neutrophilen Granulozyten (106) und Makrophagen (107), die in der Lungenstrombahn zirkulieren und an der Pathogenese des ARDS beteiligt sind (34, 107).

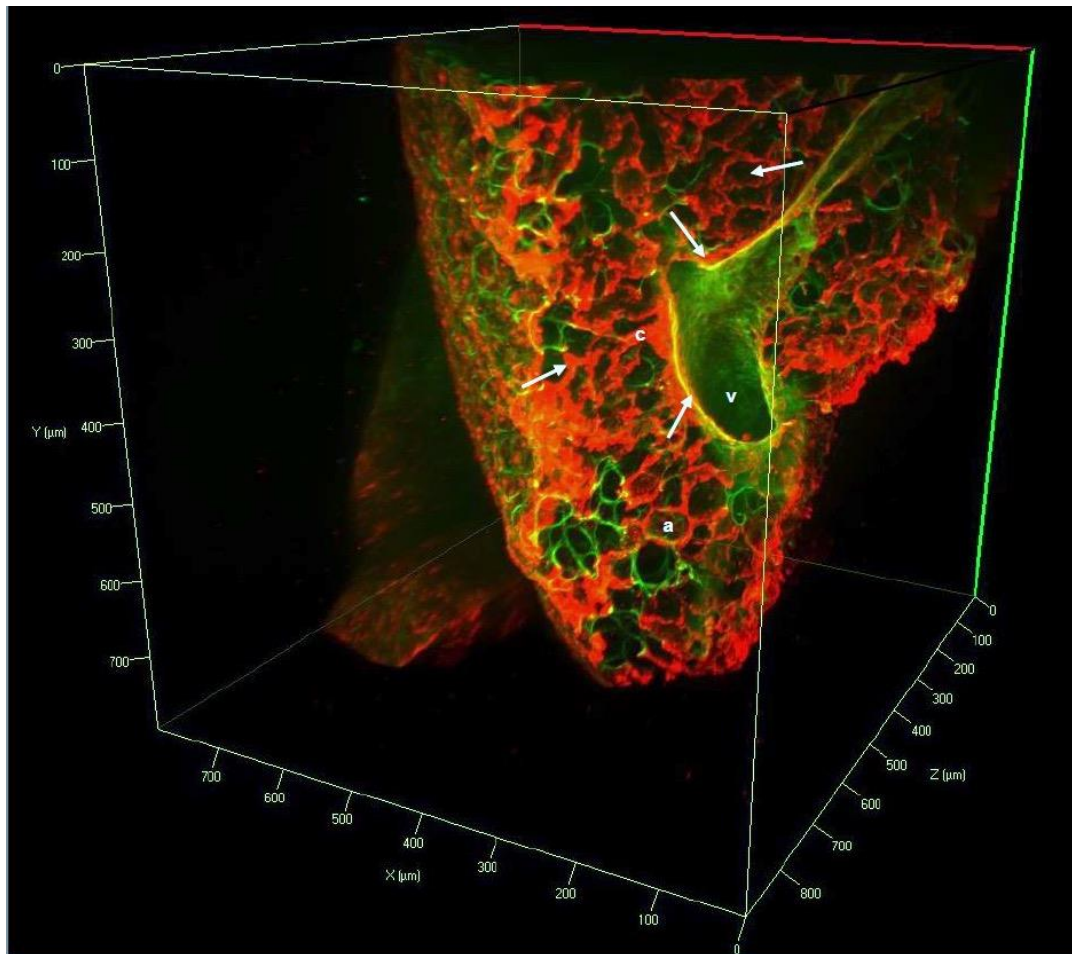


Abbildung 3: Fluoreszenz-mikroskopische dreidimensionale Darstellung der Verteilung des TRPV4-Kanals im Lungengewebe.

In diesem Ausschnitt des murinen Lungenparenchyms zeigt sich der TRPV4-Kanal in rot auf der Oberfläche von Alveolen (a), Kapillaren (c) und größeren Gefäßen (v). Kollagen ist in grün dargestellt. Der Abstand zwischen zwei Markierungen auf den x-, y- und z-Achsen entspricht 100 µm. Abbildung erstellt von Dr. Laura Michalick und mit Erlaubnis der Autorin entnommen aus (108).

Der TRPV4-Kanal hat ein polymodales Aktivierungsmuster, was bedeutet, dass seine Öffnungswahrscheinlichkeit durch unterschiedliche Reize erhöht werden kann. Bei seiner Entdeckung wurde die Reaktivität auf hypotone Osmolarität untersucht (101). Der Kanal weist mechanosensitive Eigenschaften auf: Über beta1-Integrin detektierter Dehnungsstress der extrazellulären Matrix, Scherstress an Endothelzellen und Scherstress an pulmonalen Epithelzellen können zur Aktivierung des Kanals führen (109-111). Der TRPV4-Kanal kann zudem durch Temperaturen zwischen 27 und 37 °C (112) und durch Liganden wie Arachidonsäure-Derivate, zu denen das Endocannabinoid Anandamid und einige Entzündungsmediatoren gehören, aktiviert werden (113).

Es sind zahlreiche physiologische Funktionen des Kanals in unterschiedlichen Organsystemen bekannt. Aus der großen Vielfalt an Forschungsergebnissen sollen einige genannt werden, die für die vorliegende Arbeit am meisten von Belang sind: In Endothelzellen verschiedener arterieller Gefäße, zum Beispiel in kleinen Arterien des mesenterialen Strombetts der Ratte, in Carotiden der Maus und in humanen Koronar-Arteriolen, kommt es bei TRPV4-Aktivierung zur Aktivierung von Signalwegen, die Vasodilatation bewirken, insbesondere als Reaktion auf Scherstress bei hohen Flussraten in den Gefäßen (114-116). Der Kanal ist in glatten Muskelzellen der Atemwege exprimiert und seine Aktivierung führt im Tiermodell zu Bronchokonstriktion (117). Liedtke und Kolleg*innen berichten von verminderten Trinkmengen bei TRPV4-Knockout (KO)-Mäusen (118). In der humanen Niere scheint TRPV4 im Sammelrohr besonders hoch exprimiert zu sein und dort hypotone Osmolarität des Harns zu detektieren sowie eine Rolle für die Entstehung von Zysten des Sammelrohrs in der autosomal-rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung zu spielen (119). Die Funktion von TRPV4 für die alveolo-kapillären Barriere wird im Abschnitt 2.5.3 erläutert.

2.5.2 Regulation durch intrazelluläre Signalwege und Mikroorganismen

Es werden eine Reihe von molekularen Regulationsmechanismen des TRPV4-Kanals auf Ebene seiner Funktion und Expression angenommen. Wenn der Serin-Rest 824 am C-Terminus des TRPV4-Kanals phosphoryliert ist, erhöht sich die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals. Die Proteinkinasen A und C können diese Phosphorylierung vornehmen und den Kanal somit aktivieren (120). Auch die Kinase Serum glucocorticoid-regulated kinase (SGK) 1 steigert die Öffnungswahrscheinlichkeit des TRPV4-Kanals über eine Phosphorylierung am Serin-Rest 824 und es konnte beim Beatmungs-assoziierten Lungenschaden gezeigt werden, dass die Aktivierung von SGK1 und die Kolo-kalisation der Kinase mit TRPV4 *in vitro* zu endothelialer Permeabilitätserhöhung und *in vivo* zu alveolo-kapillärer Barrierestörung führt (121). Am C-Terminus des Transmembranproteins befindet sich ebenfalls eine Bindungsdomäne für Calmodulin. Wenn hier das mit Ca^{2+} gebundene Protein Calmodulin bindet, erhöht sich die Öffnungswahrscheinlichkeit von TRPV4, wodurch der Ca^{2+} -Einstrom über den TRPV4-Kanal zu einer weiteren Potenzierung der TRPV4-Aktivität führen kann (122).

Die Familie der *With no lysine* (K) (WNK)-Kinasen besteht aus vier strukturverwandten Proteinen (WNK 1 - 4), die allesamt intrazelluläre Serin-Threonin-Kinasen bilden (123). Es konnte gezeigt werden, dass die Co-Expression von WNK1 oder WNK4 und TRPV4 in Zellkulturen die Expressionsrate des TRPV4-Gens senkt (124). WNK1 wird durch erhöhte intrazelluläre Chlorid-Ionen (Cl⁻)-Konzentrationen inhibiert, da Cl⁻ die inaktive Konformation der WNK1-Kinase begünstigt und ihre aktivierende Autophosphorylierung verhindert (125). Ein wichtiges Transmembran-Protein, das die intrazelluläre Chlorid-Konzentration senkt, ist der Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR). Die Aktivierung des CFTR-Kanals könnte also über erniedrigte Cl⁻-Konzentrationen zu einer Aktivierung der WNK1-Kinase führen und damit den TRPV4-Kanal in seiner Expression inhibieren.

Der CFTR-Kanal kann in seiner Expression und Funktion durch einige Mikroorganismen beeinflusst werden. Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ist bei Infektion von Zellkulturen durch sein Exoprodukt *Pseudomonas aeruginosa diffusible material* in der Lage, die Expression und den Ionenstrom durch den CFTR-Kanal zu senken (126). Das Influenza-Virus kann ebenfalls in Zellkulturen über sein virales Protein M2 den lysosomalen Abbau des CFTR-Kanals fördern und ihn in seiner Expression und Funktion inhibieren (127). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch die Infektion mit *S. pneumoniae* in murinem und humanem Lungengewebe zu einer verminderten Expression des CFTR-Proteins führt (1). (Formaler Hinweis: Die hierfür verwendeten murinen Lungenhomogenate wurden von unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt, während der Western Blot in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kübler erfolgte.) Dies könnte über eine verminderte WNK1-Aktivität zu einer erhöhten Expression des TRPV4-Kanals führen. Die erhöhte TRPV4-Expression könnte für die Entstehung der alveolo-kapillären Barrierestörung bedeutend sein, wie im Abschnitt 2.5.3 ausgeführt wird. Es konnte bereits von Brown und Kolleg*innen (128) gezeigt werden, dass die Inhibition des CFTR-Kanals zu erhöhter endothelialer Permeabilität führt. Der in dieser Arbeit postulierte Mechanismus über das Zusammenspiel von TRPV4, WNK1 und CFTR bei pulmonaler Infektion wird in Abbildung 4 zusammengefasst.

Über eine veränderte Expression des TRPV4-Kanals bei Infektionen gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. Infektionen des Epithels der Magenschleimhaut mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* führen über ein verändertes Methylierungsmuster des TRPV4-Gens zu einer verminderten Expression (129). Dahingegen konnte eine

erhöhte TRPV4-Expression auf mRNA-Ebene in Mukosa-Biopsien aus den Nasennebenhöhlen von Patient*innen mit chronischer Rhinosinusitis gefunden werden, wobei keine Eingrenzung der auslösenden Erreger erfolgte (130).

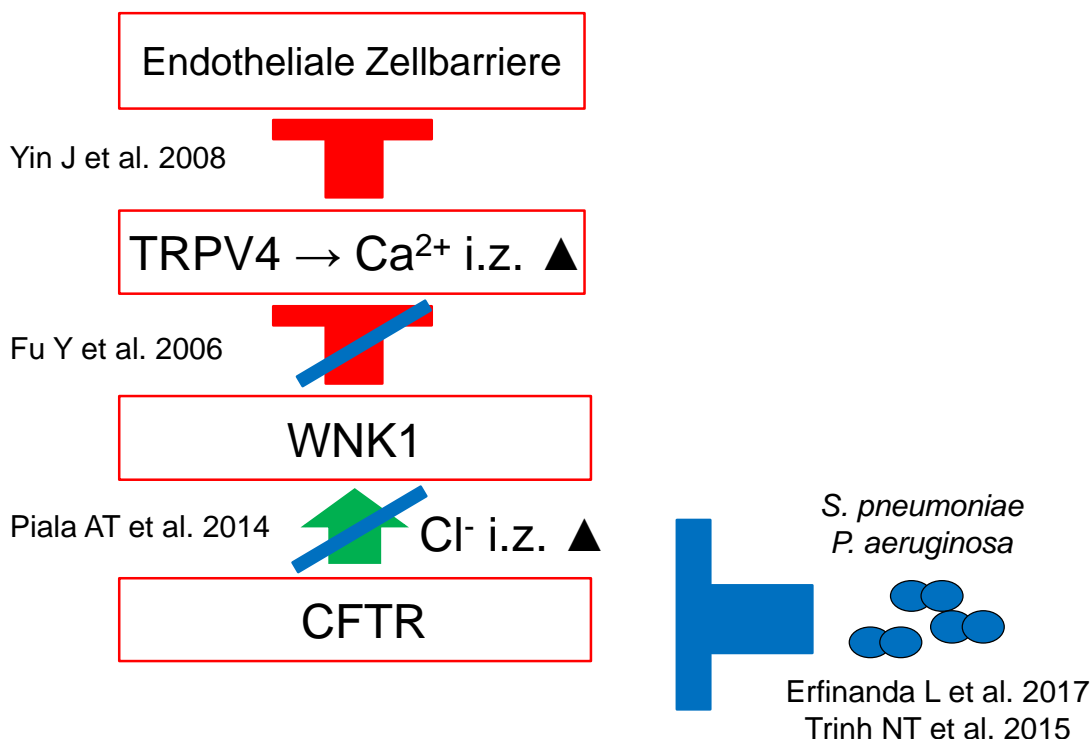


Abbildung 4: Postulierter Mechanismus der kaskadenartigen Regulierung der Expression und Aktivität von TRPV4, WNK1 und CFTR.

Aus der Zusammenschau bisheriger Untersuchungen wird folgende Hypothese über das Zusammenspiel zweier Transmembran-Kanäle und einer Kinase bei pulmonaler Infektion mit *S. pneumoniae* postuliert: Mikroorganismen wie *S. pneumoniae* und *P. aeruginosa* vermindern die Expression von CFTR, welches eigentlich die intrazelluläre Chlorid-Konzentration (Cl⁻ i.z.) senkt. Dadurch erhöht sich die intrazelluläre Chlorid-Konzentration und WNK1 wird in seiner Aktivität gehemmt. Hierdurch kommt es zu einer Dysinhibition der Funktion von TRPV4. Dieser Kanal erhöht im aktivierten Zustand die intrazelluläre Calcium-Konzentration (Ca²⁺ i.z.). Dies schwächt die endotheliale Barrierefunktion durch Lockerung der Zell-Zell-Verbindungen.

2.5.3 Beteiligung an alveolo-kapillärer Barrierestörung

Da Studien zur Rolle des TRPV4-Kanals bei der alveolo-kapillären Barrierestörung und beim ARDS unterschiedliche Modelle mit verschiedenen Auslösern des ARDS verwenden, sind sie nur eingeschränkt miteinander vergleichbar und nicht direkt auf das Pneumonie-induzierte Lungenversagen zu übertragen, das in dieser Arbeit untersucht werden sollte.

Bereits 2006 zeigten Alvarez und Kolleg*innen (105), dass isoliert-perfundierte Ratten-Lungen, die mit dem TRPV4-Aktivator 4 α -Phorbol-12,13-Didecanoat (4 α PDD) perfundiert wurden, einen dreifach erhöhten Filtrationskoeffizient K_f als Maß für die Durchlässigkeit von Wasser aufweisen. Dieser Effekt konnte durch den TRPV4-Inhibitor Rutheniumrot aufgehoben werden. Dies legt nahe, dass eine Aktivierung des TRPV4-Kanals zu einer erhöhten Durchlässigkeit der alveolo-kapillären Barriere führt.

Lange Zeit nahm man an, dass die Entstehung des Lungenödems bei erhöhtem links-atrialen Druck vor allem auf den gesteigerten hydrostatischen Druckgradienten zwischen Lungengefäßen und Alveolarraum zurückzuführen ist (131). 2008 konnten jedoch Yin und Kolleg*innen zeigen (131), dass nach hydrostatischem Stress der TRPV4-Kanal über eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in den Endothelzellen die Ödembildung vermittelt. Die Autoren berichten, der erhöhte Ca^{2+} -Spiegel würde einerseits zu einer Aktivierung der MLCK führen, was für eine erhöhte alveolo-kapilläre Permeabilität Sorge. Andererseits steigere die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration die Synthese des vasodilatatorischen Gases Stickstoffmonoxid (NO).

Auch wird diskutiert, ob die Disruption der Zell-Zell-Kontakte der alveolo-kapillären Schranke durch einen TRPV4-abhängigen Influx von Ca^{2+} mit konsekutiver Aktivierung der Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 ausgelöst wird (132). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Aktivierung von TRPV4 neben einer gesteigerten Barrierestörung auch zu einer gesteigerten Expression von MMP2 und MMP9 führt.

Hamanaka und Kolleg*innen (111) konnten 2007 zeigen, dass auch beim Beatmungs-assoziierten Lungenschaden der Ca^{2+} -permeable TRPV4-Kanal eine Rolle spielt. Nach Sedierung und Beatmung zeigten sich in TRPV4-KO-Tieren eine reduzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen im Lungenparenchym und eine verminderte alveolo-kapilläre Barrierestörung.

Die Rolle des TRPV4-Kanals beim ARDS ist wahrscheinlich vielseitig: Neben der beschriebenen Regulation der alveolo-kapillären Barriere konnte gezeigt werden, dass TRPV4 auch an der Entzündungsreaktion beim ARDS beteiligt ist (133). Balakrishna und Kolleg*innen (133) berichteten, dass im Mausmodell des Säure-induzierten Lungenschadens die Verabreichung von verschiedenen TRPV4-Inhibitoren und der homozygote KO des TRPV4-Gens zu verminderter Rekrutierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie zu erniedrigten Zytokin-Spiegeln in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) führte (133). Und auch Hamanaka und

Kolleg*innen konnten 2010 zeigen, dass der TRPV4-Kanal auf Makrophagen beim Beatmungs-assoziierten Lungenschaden zu einer signifikant erhöhten alveolo-kapillären Permeabilität führt, auch wenn sie in die isolierte Lunge eines TRPV4-KO-Tieres übertragen wurden (107). *In vitro* wurde beobachtet, dass mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierte Makrophagen eine über TRPV4 vermittelte Phagozytose-Aktivität aufweisen, die abhängig von den mechanischen Eigenschaften der Umgebungsmatrix war. In einer gering-elastischen Matrix war die Phagozytose-Aktivität höher (134). Die verminderte Elastance beim ARDS ist demzufolge ein möglicher Stimulus für TRPV4-vermittelte Aktivierung von Makrophagen.

Auch beim Lungenschaden, der durch tracheale Säureinstillation oder *Platelet-activating Factor* (PAF), einem bekannten Mediator endothelialer Permeabilitätsstörung, hervorgerufen wurde, spielt der TRPV4-Kanal in der Pathogenese der alveolo-kapillären Barriestörung eine Rolle (34).

Es wurden verschiedene mikroskopische und molekulare Veränderungen in Endothelzell-Verbänden gefunden, die im Rahmen der TRPV4-vermittelten Permeabilitätserhöhung auftreten. Von Maishan und Kolleg*innen (135) konnte 2017 gezeigt werden, dass in isolierten humanen Lungen-Endothelzellen eine Applikation des TRPV4-Induktors GSK1016790A den transendothelialen elektrischen Widerstand als Maß für die endotheliale Barrierefunktion senkt und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht. Fluoreszenzmikroskopisch zeigte sich, als morphologisches Korrelat dieser Veränderungen, dass es zu einer Auflösung von *Adherens Junctions*, einer verminderten Expression von VE-Cadherin und der Abrundung der Endothelzellen kommt. Diese neuen *in vitro*-Studien in humanem Lungengewebe verdeutlichen die Bedeutung des TRPV4-Kanals für die Dysfunktion von *Adherens Junctions* und für die Erhöhung endothelialer Permeabilität. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach Applikation des gleichen Inhibitors in humanen Endothelzellen der Retina: es kam zu einer verminderten Expression von Occludin, einem wichtigen Protein der *Tight Junctions*, und einer Reorganisation der *Adherens Junctions* mit veränderter Anordnung der Strukturproteine VE-Cadherin und beta-Catenin (136). Eine Arbeit von Wu und Kolleg*innen (137) konnte zeigen, dass der endotheliale Calcium-Einstrom durch den TRPV4-Kanal relativ spezifisch zu einer Erhöhung der endothelialen Permeabilität führt, ohne zum Beispiel die Expression von P-Selectin zu verändern. Dabei handelt es sich um ein Leukozyten-Adhäsionsprotein, das durch endothelialen Calcium-Einstrom über andere Transmembran-Kanäle als TRPV4 reguliert wird. In kardialen Fibroblasten

konnte gezeigt werden, dass der TRPV4-Kanal an der Aktivierung von Rho-Kinasen beteiligt ist, deren Bedeutung für die Regulierung von Zell-Zell-Verbindungen in Abschnitt 2.4.3 erläutert wurde (138). Es ist nicht geklärt, ob dieser Mechanismus auch in Endothelzellen der Lungenstrombahn existiert und dort zu einer über das Zytoskelett und die *Adherens Junctions* vermittelten Permeabilitätssteigerung führt.

2.5.4 Pharmakologische Beeinflussung

Eine Verwendung von Substanzen in der Humanmedizin, die den TRPV4-Kanal selektiv pharmakologisch beeinflussen, ist derzeit nicht bekannt. Jedoch werden die Aktivierung und Inhibition des TRPV4-Kanals zu wissenschaftlichen Zwecken mit verschiedenen selektiven und nicht-selektiven Substanzen untersucht. So wird der Phorbolster 4 α PDD als ein selektiver Induktor des Kanals verwendet (139).

Das Komplexsalz Rutheniumrot ist ein nicht-selektiver Inhibitor von verschiedenen TRP-Kanälen wie zum Beispiel TRPV1 und auch TRPV4 (139). Wegen seiner geringen Selektivität wird es mittlerweile häufig durch andere Substanzen ersetzt. Zu den selektiveren Inhibitoren des TRPV4-Kanals zählt die Substanz GSK2193874, die von der Firma GlaxoSmithKline entwickelt wurde (140). Wissenschaftler*innen des Unternehmens konnten zeigen, dass die Applikation der Substanz in isolierten Nagerlungen die Permeabilitätsstörung und die Ödem-Bildung in der Lunge nach erhöhtem Druck in der Lungenstrombahn senkt (141). Ihre Wirksamkeit zeigte sich ebenfalls in der im Abschnitt 6.1 diskutierten Publikation von Yin und Kolleg*innen über die Rolle des TRPV4-Kanals bei der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten in einem ARDS-Modell (34). Auch konnte gezeigt werden, dass im Modell der LPS-induzierten Sepsis und im Modell der durch Ligation und Punktion des Colons ausgelösten Sepsis die TRPV4-Inhibition durch GSK2193874 eine Reduktion der Mortalität und eine verminderte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 und IL-6 bewirkt, welche als Schlüsselmediatoren der Sepsis gelten (142). Der TRPV4-Inhibitor GSK2798745 ist bereits Gegenstand mehrerer klinischer Phase I- und II-Studien an gesunden und kranken Probanden zu Herzinsuffizienz, LPS-induziertem Lungenschaden und chronischem Husten (143).

Die Strukturformel des TRPV4-Inhibitors HC-067047 ist in Abbildung 5 dargestellt. Diese Substanz wurde von der Firma Hydra Biosciences mit Sitz in

Cambridge, Massachusetts, Vereinigte Staaten entwickelt (144, 145). Für die Maus wurde eine Konzentration zur 50-prozentigen Inhibition (IC₅₀) des Zielmoleküls TRPV4 von 17 nM ermittelt (144). Die Substanz wird als selektiv bezeichnet, da die IC₅₀-Werte für die strukturverwandten Kanäle TRPV1, TRPV2 und TRPV3 etwa 100 Mal höher liegen, für den TRPM8-Kanal und den Kalium-Ionen-Kanal *human Ether-a-go-go Related Gene* (hERG) immerhin etwa zehn Mal höher. Der nur zehnfach höhere IC₅₀-Wert für den hERG-Kanal im Vergleich zu TRPV4 könnte den Einsatz von HC-067047 theoretisch limitieren, da eine hERG-Inhibition mit bestimmten Herzrhythmusstörungen assoziiert wird (145, 146). Jedoch deutete die erste, von Hydra Biosciences unterstützte Publikation über HC-067047 ein günstiges Nebenwirkungsprofil im Maus- und Ratten-Modell an (144). Entgegen den Vermutungen, die man aufgrund von Experimenten mit TRPV4-Induktoren hatte, zeigten sich bei Applikation des TRPV4-Inhibitors HC-067047 kaum unerwünschte Veränderungen von lebenswichtigen Funktionen wie Wasseraufnahme, Herzfrequenz, Temperaturempfinden und Motorik (144).

Die Substanz HC-067047 wurde in Mausmodellen für die Untersuchung zahlreicher Fragestellungen verwendet. Dalsgaard und Kolleg*innen konnten 2016 zeigen, dass HC-067047 im Mausmodell der LPS-induzierten Sepsis die Mortalität senkt (142). Auch konnte mit der Substanz die Bedeutung des TRPV4-Kanals für unterschiedliche Schmerz-Syndrome in Mausmodellen untersucht werden: So konnten mittels HC-067047 die Symptome einer Chemotherapeutika-induzierten peripheren Neuropathie (147), der Formalin-induzierte trigeminale Schmerz (148) und der Schmerz bei chronischer Pankreatitis (149) reduziert werden. Dong und Kolleg*innen konnten mit der Substanz den Ischämie-Reperfusionsschaden am Myokard vermindern (150). Außerdem wurde mit HC-067047 die Rolle des TRPV4-Kanals für die Kornea-Fibrosierung nach alkalischer Schädigung (151) und für den Uterus-Tonus während der Schwangerschaft untersucht (152). Die Dosierung von 10 mg pro kg Körpermasse bewährte sich in den meisten der publizierten Mausmodelle, nur Zhang und Kolleg*innen zeigten in ihrer Arbeit auch mit der Dosierung von 5 mg pro kg Körpermasse einen signifikanten Effekt in ihren Experimenten (147-153). Daher wird in der vorliegenden Arbeit die Dosierung von 10 mg pro kg Körpermasse verwendet.

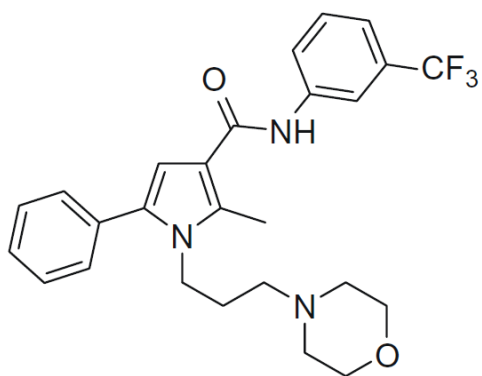


Abbildung 5: Strukturformel des TRPV4-Inhibitors HC-067047.

Die Abbildung wurde entnommen aus (145).

3 Herleitung des Themas

Die Störung der alveolo-kapillären Barriere wird als eines der Schlüsselereignisse in der Pathogenese des akuten Lungenversagens verstanden. Vielfältige immunologische Veränderungen sind ebenfalls an seiner Entstehung beteiligt. Die Bedeutung des TRPV4-Kanals für die alveolo-kapilläre Barriestörung in unterschiedlichen Modellen des Lungenschadens konnte bereits nachgewiesen werden. Dabei scheint sowohl seine Lokalisation auf Epithel- und Endothelzellen des Lungenparenchyms als auch auf Zellen des Immunsystems eine Rolle zu spielen. In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle des TRPV4-Kanals beim bakteriell induzierten akuten Lungenversagen untersucht werden, nämlich im Modell der murinen Pneumokokken-Pneumonie. Dafür sollen folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- (i) Analysen der klinischen Parameter, der Immunzellen, der Erregerlast und eine Untersuchung der alveolo-kapillären Barrierefunktion *in vivo* an TRPV4-KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp- (WT-) Mäusen mit Pneumokokken-Pneumonie.
- (ii) Analyse der Expression von TRPV4 *in vitro* und *in vivo* auf RNA- und Protein-Ebene bei Infektion mit dem Erreger der Pneumokokken-Pneumonie.
- (iii) Analyse der pharmakologischen Beeinflussbarkeit des Kanals *in vivo* im Modell der murinen Pneumokokken-Pneumonie.

4 Material und Methodik

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Gerät	Herstellerbezeichnung	Firma
Autoklav	Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec, Wettenberg
Brutschrank	Heraeus Typ BB 6220 O2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Differenzial-Druckaufnehmer (Atemfluss)	Differential pressure Transducer Validyne DP45-14	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Druckaufnehmer (Tracheal-/Kammerdruck)	Pressure Transducer MPX/Typ 399/2 und P75/Typ 379	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Druckluftpumpe zur Beatmung	Ventilation Control Module	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II ®	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Elektrophorese-Transferkammer für Semi-dry Blotting	Bio-Rad Trans-Blot SD Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Hämatologiegerät	Scil Vet abc	scil animal care company, Viernheim
Homogenisator	Ultra-TURRAX ® Homogenisator	Firma IKA, Staufen im Breisgau
Homogenisator für Gewebestücke	gentleMACS ® Dissociator	Miltenyi Biotec, Teterow
IPML-Unterdruckkammer	Isolated Lung, size 1, Typ 839	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Mikroskop zur Auszählung der Neubauer-Kammer	Zeiss Axioskop	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop zur Beobachtung der Zellkulturen	Hund Wilovert S	Helmut Hund, Wetzlar
Neubauer-Kammer	Neubauer improved bright-line	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
Peristaltikpumpe	Reglo-Analog	Ismatec, Wertheim
Pinzette, stumpf		Fine Science Tools, Heidelberg
Pipette	Eppendorf Research ® plus Einkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Präparationsbesteck		Fine Science Tools, Heidelberg
Präzisionswaage	Sartorius, MC 5(-OCE)	Sartorius AG, Göttingen
Rektalsonde	Thermometer BAT-12 Microprobe	Physitemp Instruments, Clifton, NJ, USA
Schere zur Präparation		Fine Science Tools, Heidelberg
Sicherheitswerkbank	Hera Safe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products, Langenselbold

Spektralphotometer für ELISA	Photometer Scanning Spectrophotometer, Uvikon XL	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA
Spektralphotometer für ELISA	Multiskan [®] Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spektralphotometer für ProcartaPlex [®] -Auswertung	Bio-Plex [®] Array Reader	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Spektralphotometer zur RNA/DNA-Bestimmung	NanoDrop 2000 [®]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler für qPCR	Mastercycler personal [®]	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler für reverse Transkription	7300 RT PCR System [®]	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Tierkäfige mit Filterhauben	IVC Isolated Ventilated Cage mit Filterhauben Typ II-L	ZOONLAB, Castrop-Rauxel
Trachealkanüle	Trachealkanüle für Mäuse	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Tubes für Homogenisator	gentleMACS [®] M Tubes	Miltenyi Biotec, Teterow Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2 [®] Model G-560E	G&G, Kaarst
Waage für Tiergewicht	Pocket Scale	Firma IKA, Staufeu im Breisgau
Wärmeschüttler	IKA-Schüttler, Typ MTS2	Julabo, Seelbach
Wasserbad	SW23 Schüttelwasserbad	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Western Blot-Zubehör (Gelguss-Kammer, Verbindungskabel)	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 R	

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Geräte.

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Herstellerbezeichnung	Firma
Autoradiographie-Platten	Carestream [®] Biomax light film	Carestream Health, Rochester, NY, USA
EDTA-Röhrchen für Blutentnahme	Microvette [®] 500 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Einstreu für Tierkäfige	Lignocel [®] Hygenic Animal Bedding	J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg
FACS [®] -Tubes	Falcon [®] Round-Bottom Polypropylene Tubes	Corning Inc., New York, NY, USA
Filterpapier für Western Blot	Whatman [®] Gel Blotting Paper	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Handschuhe aus Nitril		B. Braun, Melsungen
Impföse	Einmal-Impfschlingen	Sarstedt, Nümbrecht
Kanüle für intraperitoneale Injektionen	Sterican [®] G 20 x 1/2"	B. Braun, Melsungen

Kanüle für intravenöse Injektionen	Sterican ® G 26 x 1/2"	B. Braun, Melsungen
Küvette	Halb-Mikro-Küvette, PS	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatte 96-Well für ELISA	Falcon ® Polystyrene Microplates	Corning Inc., New York, NY, USA
Mikrotiterplatte 96-Well für qPCR	Micro Amp Optical 96 Well Reaction	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Parafilm ®	Parafilm ®	Bemis NA, Neenah, WI, USA
Pelletiertes Spezialfutter	ssniff ® Complete Feed for Rats & Mice	ssniff, Soest
Pipettenspitze	Pipettenspitzen, farblos	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran für Western Blot	Immobilon-P Membran, PVDF	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Reagenzgefäß zum Zentrifugieren (15, 50 ml)	Falcon ® konische Zentrifugenröhrchen	Corning Inc., New York, NY, USA
Reaktionsgefäß	Standard-Reagiergefäße 0,5/1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluss	SafeSeal Reagiergefäße 0,5/1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Schafsblut-Agar-Platte	BD ® Colombia Agar with 5 % Sheep Blood	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Silikonschläuche	VWR Silicone Peroxide Tubing	VWR, Radnor, PA, USA
Tuberkulin-Spritze	Omnifix ® F Tuberkulin Spritze	B. Braun, Melsungen
Zellkulturflasche	TC-Flasche T25 Standard	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte 6-Well	Falcon ® Multiwell-Zellkulturplatten	Corning Inc., New York, NY, USA

Tabelle 2: Auflistung der Verbrauchsmaterialien.

4.1.3 Reagenzien und Medien

Reagenz oder Medium	Herstellerbezeichnung	Firma
Acrylamid	Acrylamide for electrophoresis	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>Beads</i> für FACS ®	CountBright ® Absolute Counting Beads, for flow cytometry	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Beta-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol, 99%	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Blocking Buffer für Western Blot	Odyssey ® Blocking Buffer (PBS)	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chloroform	Chloroform, ≥99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	Trichlormethan/Chloroform, ≥99 %	Carl Roth, Karlsruhe

DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Salin	Gibco - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
EDTA	EDTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Endothelbasalmedium, Antibiotika-freies	MCDB 131 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Entwicklersubstrat für Western Blot	Pierce ® ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethanol	Ethanol, absolute for analysis	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	UltraPue ® 0.5M EDTA, pH 8.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FACS ®-Flüssigkeit beim Betrieb	FACSFlow ®	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS ®-Flüssigkeit zum Betriebsende	FACS ® Shutdown Solution	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Fetales Kälberserum	FCS (hitzeinaktiviert)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
Formaldehyd zur Zellfixierung	2 %-Formaldehyd-Lösung Methanol-frei	Carl Roth, Karlsruhe
HC-067047	HC-067047, ≥98% (HPLC)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Humanes Serumalbumin (HSA)	Alburex ® 20, 200 g/L	CSL Behring, King of Prussia, PA, USA
Hyaluronidase	Hyaluronidase from bovine testes	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isotonische Kochsalzlösung	NaCl 0,9 %	B. Braun, Melsungen
Laemmli-Puffer	Bio-Rad ® 4 x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Methylviolett	Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Milchpulver. Blotting-Grade, pulv., fettarm	Carl Roth, Karlsruhe
Natrium-Deoxycholat	Natrium-Deoxycholat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Natriumchlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Octoxinol-9 (NP-40)	Octoxinol-9 (NP-40)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin	Pen Strep 10.000 U/ml	Life Technology, Carlsbad, CA, USA
Ponceau S	Ponceau S	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Protease-Inhibitor	cComplete ®, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Applied Science, Penzberg
Reinstwasser	Aqua ad injectabilia Miniplasco ® connecet	B. Braun, Melsungen

SDS	SDS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Technisches Hefeextrakt	Bacto® Technisches Hefeextrakt	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Todd-Hewitt-Bouillon	Bacto® Todd-Hewitt-Bouillon	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Tris Base	Tris Base	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
TRIzol®	TRIzol® Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tween® 20	Tween® 20	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Wachstumsmedium - Zusatz	Endothelial Cell Growth Medium MV SupplementMix	PromoCell, Heidelberg
Wachstumsmedium für Endothelzellen	Endothelial Cell Growth Medium MV2	PromoCell, Heidelberg

Tabelle 3: Auflistung verwendeter Reagenzien und Medien.

4.1.4 Medikamente

Medikament	Herstellerbezeichnung	Firma
Augengel	THILO TEARS® Augengel	Novartis, Nürnberg
Heparin	Heparin-Rotexmedica 25000 I.E./5 ml Injektionslösung	Rotexmedica, Trittau
Ketamin	Ketamin 10% als Ketaminhydrochlorid	Pharmanovo, Hannover
Xylazin	Xylavet 20 mg/ml	CP-Pharma, Burgdorf

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Medikamente.

4.1.5 Primer

Primertarget	Herstellerbezeichnung	Firma
CFTR human	TaqMan® Gene Expression Assays Hs00357011_m1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
CFTR murin	TaqMan® Gene Expression Assays Mm00445197_m1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
GAPDH human	TaqMan® Human GAPDH Endogenous Control Hs99999905_m1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
GAPDH murin	TaqMan® Mouse GAPDH Endogenous Control Mm99999915_g1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

qPCR Mastermix	TaqMan ® Gene Expression Mastermix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TRPV4 human	TaqMan ® Gene Expression Assays Hs01099348_m1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TRPV4 murin	TaqMan ® Gene Expression Assays Mm00499025_m1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
WNK1 human	TaqMan ® Gene Expression Assays Hs01013332_m1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
WNK1 murin	TaqMan ® Gene Expression Assays Mm01184014_m1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Primer.

4.1.6 Antikörper

Antikörper	Herstellerbezeichnung	Firma
Aktin-Antikörper	Mouse Anti Alpha Actin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-Maus Sekundär-Antikörper	Goat Anti Mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Anti-Rabbit Sekundär-Antikörper	Goat Anti Rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
CD16/CD32-Antikörper	Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA
CD45 PerCP-Antikörper	PerCP Rat Anti-Mouse CD45 Clone 30-F11 (RUO)	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA
F4/80 PerCP-Antikörper	F4/80 PerCP Rat Anti-Mouse CD45 Clone 30-F11 (RUO)	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA
Ly-6G V450-Antikörper	V450 Rat Anti-Mouse Ly-6G Clone 1A8 (RUO)	BD Horizon, Franklin Lakes, NJ, USA
TRPV4-Antikörper	Anti TRPV4 Antibody from Rabbit	Alomone Labs, Jerusalem, Israel

Tabelle 6: Auflistung verwendeter Antikörper.

4.1.7 Immunoassays und Kits

Assay/ Kit	Herstellerbezeichnung	Firma
CXCL5-ELISA	Mouse LIX DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Humanes Serum Albumin-ELISA	Human Albumin ELISA Quantitation Set (E80-129)	Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA
Protein-Assay	Bio-Rad DC ® Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Reverse-Transkription-Kit	High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit®	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNA-Präparations-Kit	Direct-zol® RNA MiniPrep	Zymo Research, Irvine, CA, USA
Zytokin-Immunoassay	ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 7: Auflistung verwendeter Immunoassays und Kits.

4.1.8 Bakterienstämme und Zelllinie

Bakterienstamm/ Zelllinie	Herstellerbezeichnung	Firma/ Bezugsquelle
Humane mikrovaskuläre pulmonale Endothelzellen (huPMVEC)	Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells (HPMEC)	PromoCell, Heidelberg
<i>S. pneumoniae</i> vom Serotyp 2	NCTC 7466, Stamm D39	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Universität Greifswald
<i>S. pneumoniae</i> vom Serotyp 3	NCTC 7978	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Universität Greifswald

Tabelle 8: Auflistung verwendeter Bakterienstämme und Zelllinie.

4.1.9 Computerprogramme

Computerprogramm	Herstellerbezeichnung	Firma
Grafik- und Statistiksoftware	GraphPad® Prism 6 for Windows	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Atemwegsparemeter-Analysesoftware	Pulmodyn®	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
ELISA-Analysesoftware	Skant 4.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FACS®-Analysesoftware	FACS® Diva	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Hämatologiegerät-Analysesoftware	scil vIP Manager, V2.0	scil animal care company, Viernheim
Thermocycler-Analysesoftware	7300 System SDS Software 1.3.1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Western Blot-Bildanalysesoftware	ImageJ FIJI	FIJI Contributors Gruppe

Tabelle 9: Auflistung verwendeter Computerprogramme.

4.2 Methodik

4.2.1 Tierversuche

4.2.1.1 Rechtsgrundlage, Herkunft und Haltung der Versuchstiere

Für die Tierversuche lag ein Tierversuchsantrag mit der Antrags-Nummer G0105/16 vor, der vom Landesamt für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin (LaGeSo) vor Versuchsbeginn genehmigt wurde.

Es wurden für alle Versuche Mäuse der Art *Mus Musculus* mit dem genetischen Hintergrund C57Bl/6J verwendet. Alle Tiere waren zu Versuchsbeginn zwischen acht und zehn Wochen alt und wogen zwischen 16,8 und 23,6 Gramm.

Für die Versuchsteile zu den Auswirkungen einer pharmakologischen Behandlung sowie der Gen- und Protein-Expression wurden die Tiere von Charles River Laboratories in Sulzfeld bezogen.

Beim Vergleich der TRPV4-KO-Tiere mit Wildtyp (WT)-Tieren, stammten die WT-Tiere aus der Unit 3 der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité Universitätsmedizin Berlin in der Kraemerstr. 6 – 12, 12207 Berlin. Die KO-Tiere wurden aus der Unit 8 des FEM in der Tierhaltung des Bundesinstituts für Risikobewertung, Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin bezogen. Es handelte sich um eine Tier-Linie mit homozygotem TRPV4-KO, die erstmals 2003 von Liedtke und Kolleg*innen gezüchtet und beschrieben wurde (118). Der KO wurde mithilfe eines CreLox-Rekombinase-Systems erstellt. Es wurde ein Vektor verwendet, der ein mit loxP-Motiven flankiertes Exon 12 des TRPV4-Kanals enthielt und zu einer Exzision dieses Exons führte.

Die Tiere aus den zum Teil unterschiedlichen Zuchteinrichtungen wurden etwa eine Woche vor Versuchsbeginn in der experimentellen Tierhaltung der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie in isoliert-ventilierten Käfigen vom Typ II-L zusammengesetzt. Diese waren mit entsprechenden Filterhauben, mit Versteck- und Nestbaumaterialien (zum Beispiel Zellstoff, Papprolle) ausgestattet und den Tieren stand Trinkwasser und pelletiertes Spezialfutter für Labornager *ad libitum* zur Verfügung. In dieser Tierhaltung erfolgte alle 12 Stunden ein Wechsel der Hell- und Dunkelphasen, zudem wurden Luftfeuchtigkeit (45 – 65 %) und Temperatur (20 – 24 °C) kontinuierlich überwacht.

4.2.1.2 Anzucht von *Streptococcus pneumoniae*

In allen *in vivo*-Versuchsteilen wurden Bakterien der Art *Streptococcus pneumoniae* des Serotyps 3 vom Stamm NTCT 7978 verwendet, die von Herrn Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Universität Greifswald, bezogen wurden. Dieser Serotyp wird mit einem häufigeren Auftreten des septischen Schocks und mit einem vor allem bei älteren Menschen schwereren Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht (154). Die Bakterien lagen in der Arbeitsgruppe Witzenrath als Arbeitsstock vor, der von Frau Dr. Katrin Reppe und Herrn Moritz Müller-Plathe im Jahre 2015 angelegt wurde und bei -80 °C lagerte.

Für die *in vitro*-Infektionsversuche wurden Bakterien derselben Art vom Serotyp 2 vom Stamm D39 (NCTC 7466) verwendet, ebenfalls bezogen von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt.

Aus dem noch gefrorenen Arbeitsstock wurde mit einer Impföse eine kleine Menge entnommen und auf einer Schafsblut-Agar-Platte ausgestrichen. Die Platte wurde in einem Brutschrank für acht Stunden bei 37 °C und bei einem CO₂-Luftgehalt von fünf Prozent inkubiert. Einzelkolonien von den Agarplatten wurden mit einem Wattestäbchen in ein steriles Nährmedium überimpft (Todd-Hewitt-Bouillon mit 0,5% technischem Hefeextrakt und 10 % fetales Kälberserum).

4.2.1.3 Infektion und Monitoring der Versuchstiere

Jedem Tier wurden zum Versuchsbeginn 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* vom Serotyp 3 appliziert. Hierzu wurde die Maus in Narkose gelegt (90 mg/kg KG Ketamin und 15 mg/kg KG Xylazin i.p.) und es wurde ihr Augengel zum Schutz vor Austrocknung aufgetragen. Dann wurde das Tier mit seinen oberen Schneidezähnen an einem Bindfaden in einer speziellen Vorrichtung fixiert, sodass es sich und seine oberen Atemwege in der Senkrechten befanden. In jedes Nasenloch wurde mit einer Pipette 10 µl eines Gemisches gegeben, das zu gleichen Teilen aus Hyaluronidase und sterilem PBS (Phosphate-Buffered Saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung) mit den darin gelösten Bakterien, beziehungsweise in den Kontrollgruppen nur aus Hyaluronidase und PBS bestand. Während des Aufwachens befanden sich die Tiere in Schräglage mit

erhöhtem Oberkörper und wurden zum Schutz vor Hypothermie mit einer Wärmelampe bestrahlt.

Nach der Infektion wurden die Tiere alle zwölf Stunden einem klinischen Monitoring unterzogen, bei dem die rektale Körpertemperatur, das Körpergewicht und die Symptome aufgezeichnet wurden. Die Aufzeichnung erfolgte mithilfe eines Scoring-Blattes, welches nach der „Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere“ modifiziert wurde (Tabelle 10). Hierin wurden die Symptome nach Schweregraden in verschiedene Kategorien eingeteilt und mit konkreten Handlungsanweisungen verknüpft. Eine beschleunigte oder schwache Atmung, die Vermeidung von Bewegung oder eine Körpertemperatur geringer als 35 °C fielen beispielsweise in die Kategorien A und B und erforderten eine weitere Beobachtung des Tieres. Symptome wie Krämpfe, Torkeln oder Apathie, Zeichen von Schmerzen und eine schwerfällige Atmung fielen in die Kategorie C und erforderten das unverzügliche schmerzlose Töten des Tieres.

Symptom	Kategorie
Tier isoliert sich	A
Struppiges oder ungepflegtes Fell	A
Verhaltens- oder Haltungsauffälligkeiten	A
Augen mit krustigen Belegen oder Ausfluss	B
Atmung normal/ beschleunigt/ flach	A/ B/ C
Krämpfe, Torkeln, Apathie	C
Schmerzen (gekrümmte Haltung oder Leib aufgezogen, Laufen auf Zehenspitzen)	C
Tier vermeidet Bewegung oder Reaktionsminderung auf äußeren Reiz	A
Fehlstellung der Zähne	A
Verletzungen an der Haut	A
Abszesse, äußerlich sichtbare Infektionen, Ödeme, Automutilation	B
Stehende Hautfalten	B
Leib hart und aufgetrieben	B
Hypothermie (Körperkerntemperatur < 35 °C)	B
Körpermasseabnahme ab 10 %	A
Körpermasseabnahme ab 20 %	B
Körpermasseabnahme ab 25 %	C

Tabelle 10: Scoring-Blatt zum Monitoring von Versuchstieren in Anlehnung an die Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter.

Die verschiedenen Symptomkategorien sind mit Handlungsanweisungen verknüpft. Tiere, welche Symptome der Kategorie B aufweisen, sollen weiter beobachtet werden, während Tiere mit Symptomen der Kategorie C unverzüglich und schmerzlos getötet werden sollen.

4.2.1.4 Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge

Bei der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML) handelt es sich um ein Modell zur *ex vivo*-Untersuchung der frisch entnommenen Maus-Lunge, die somit unabhängig von humoralen und neuronalen Einflüssen analysiert werden kann. Sie wurde von Bethmann und Kolleg*innen in Zusammenarbeit mit Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland entwickelt (155). Das seit zwei Jahrzehnten etablierte Modell beinhaltet eine Kammer aus Acrylglas, in der sich eine Silikonmatte zur Fixierung der narkotisierten Maus sowie zur Präparation und Freilegung der Lunge befindet. Die Maus kann über eine Trachealkanüle mit einer Druckluftpumpe (Ventilation Control Module) verbunden und so durch einen Überdruck beatmet werden. Für die vorliegende Arbeit wurde aufgrund der kurzen Ventilationszeit auf eine Anfeuchtung der Beatmungsluft verzichtet.

Die Kammer wird mit einem Deckel dicht verschlossen und anschließend kann über einen Drei-Wege-Hahn der positive Druck, welcher normalerweise in die Trachealkanüle geleitet wird, über eine Venturi-Düse in einen negativen Druck umgewandelt und in das Kammer-Innere umgeleitet werden. Somit kann eine Unterdruck-Beatmung der Lunge erfolgen, die sich für das Lungenparenchym mechanisch schonender auswirkt und außerdem die Aufzeichnung von dynamischen Atemwegs-Parametern wie Compliance und Resistance erlaubt, welche Rückschlüsse auf die Ödem-Bildung zulassen.

Die Lungenstrombahn kann über eine Kanüle, die in die *A. pulmonalis* des Tieres eingesetzt wird, mit einer Peristaltikpumpe perfundiert werden. Somit können ein Großteil der Blutzellen und humoralen Faktoren aus der Lungenstrombahn entfernt und außerdem der pulmonal-arterielle Druck aufgezeichnet werden. Aufgrund der Fragestellung und der Kürze der Perfusionsphase floss das Perfusat aus dem linken Atrium in die IPML-Kammer ab und wurde nicht über einen Katheter aus der Kammer abgeleitet wie bei anderen IPML-Anwendungen.

4.2.1.5 Präparation und Beatmung der Versuchstiere

Zum Versuchs-Endpunkt von 48 Stunden *post infectionem* (p.i.) wurden die Tiere mit einer Mischung aus Xylazin (75 mg/kg KG Körpergewicht) und Ketamin (160 mg/kg KG

Körpergewicht) in tiefe Narkose gelegt und nach Erlöschen des Zwischenzehenreflexes präpariert.

Hierzu wurde zuerst die Cutis der Tiere in der ventralen Mittellinie von der Regio hypogastrica bis zur Mandibula geöffnet. Der Muskelschlauch um die Trachea wurde mit einer stumpfen Pinzette freigelegt, mit einem Scherenschnitt ein bis zwei Knorpelspangen kaudal des Larynx quer eingeschnitten und es wurde eine Trachealkanüle eingeführt, die mit einer Ligatur an der Trachea fixiert wurde. Anschließend wurde das Tier für den Rest der Präparation mit Raumluft beatmet, wobei mit einer Überdruck-Beatmung mit einer Atemfrequenz von 90/min, einem inspiratorischen Druck von 9 cmH₂O und einem endexpiratorischen Druck von 4,5 cmH₂O bei einem Verhältnis von Inspiration zu Expiration von 1:1 begonnen wurde.

Dann wurde eine Laparotomie durchgeführt. Leber, Gallenblase, Milz und Magen wurden nach rechts umgeschlagen und über das *Ligamentum gastrosplenicum* fixiert, sodass das Diaphragma frei lag und an seiner zu den Rippen liegenden Grenze eröffnet werden konnte. In die nun freiliegende rechte Herzkammer wurde eine intrakardiale Injektion von 50 µl Heparin (2500 Internationale Einheiten/ml) vorgenommen. Dadurch sollte die Koagel-Bildung in der Lungenstrombahn während des weiteren Präparationsverlaufes vermieden werden.

Nach zweiminütiger Zirkulation des Heparins wurde eine finale Blutentnahme aus der *V. cava caudalis* durchgeführt. Am nun verstorbenen Tier wurde eine Thorakotomie vorgenommen. Nach großzügiger Abtrennung der Herzspitze mittels Scherenschnitt waren rechte und linke Herzkammer eröffnet. Nachdem der Thymus entfernt wurde, konnte die *A. pulmonalis* freigelegt und ein Katheter über die rechte Kammer in diese eingeführt werden, der mit einer Ligatur um das Gefäß fixiert wurde. Nun wurde mittels Peristaltikpumpe mit der Perfusion der Lungenstrombahn begonnen. Die hierzu auf 37 °C erwärmte 0,9-prozentige Natriumchlorid-Lösung floss mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min und konnte aus der linken Herzkammer abfließen. Blutrückstände in der Lungenstrombahn sollten dadurch weitestgehend entfernt werden. Wenn nach vorsichtiger Lagekorrektur des Katheters der pulmonal-arterielle Druck zwischen 10 und 14 cmH₂O lag und kein Flüssigkeitsrückstau in der Lunge und den *Auriculae cordis* zu erkennen war, wurde der Deckel der Präparationskammer geschlossen und die Druckluft für die Positivbeatmung über die Venturi-Düse umgeleitet. Dadurch wurde eine Unterdruck-Beatmung der Lunge mit einem endinspiratorischen Druck von -9 cmH₂O, einem endexpiratorischen Druck von -4,5 cmH₂O und einer unveränderten

Atemfrequenz begonnen. Dies reduziert die postmortale Ödem-Entstehung und erlaubt die Aufzeichnung von atemmechanischen Parametern wie Compliance und Resistance. Die dynamische Compliance (C_{dyn}) berechnet sich nach der folgenden Formel:

$$C_{\text{dyn}} = TV / (PIP - PEEP)$$

Die Abkürzung TV steht dabei für das Tidalvolumen, PIP für den Peak Inspiratory Pressure, also den inspiratorischen Spitzendruck und PEEP für den Positive End Expiratory Pressure, also den während der Expiration erhaltenen positiven Druck. Zu Beginn und nach zwei Minuten der Unterdruck-Beatmung erfolgten tiefe Inspirationen mit einem Druck von -24 cmH₂O, sogenannte Seufzer, zur Eröffnung minderbelüfteter Lungenareale. Nach vier Minuten wurde erneut auf die Überdruck-Beatmung umgeschaltet und der Kammerdeckel geöffnet.

4.2.2 Untersuchungen an der TRPV4-Knockout-Maus *in vivo* und *ex vivo*

Zur Untersuchung des Pneumonie-induzierten Lungenversagens bei Mäusen mit TRPV4-KO wurden die Tiere wie in den Abschnitt 4.2.1.1, 4.2.1.3, 4.2.1.5 beschrieben gehalten, infiziert und präpariert. Am Ende der Präparation wurden Schwanzproben entnommen und für eventuelle Analysen des Genotyps asserviert. Ergänzend wurden die folgenden Methoden und Analysen vorgenommen.

4.2.2.1 Injektion von humanem Serumalbumin

Eine Stunde vor Versuchsende und Präparation wurde den Tieren humanes Serumalbumin (HSA) in die Schwanzvene injiziert. Zur Herstellung der Injektionslösung wurde die HSA-Zubereitung mit isotoner Kochsalzlösung im Verhältnis 1:15 verdünnt, sodass 75 µl der Verdünnung 1 mg HSA enthielten. Zur Injektion wurden die Tiere in einer Vorrichtung fixiert, die beiden Schwanzvenen mit den Fingern komprimiert und der Schwanz für eine Minute unter einer Rotlichtlampe erwärmt, um eine Dilatation der Venen hervorzurufen. Anschließend wurde mit einer Kanüle mit dünnem Lumen (26G x 1/2“) das Volumen von 75 µl der HSA-Lösung injiziert.

4.2.2.2 Entnahme der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit

Zur Durchführung der bronchoalveolären Lavage (BAL) wurden spezielle Spritzen gefertigt. Es handelte sich um 1 ml-Tuberkulin-Spritzen, in deren vorderes Ende ein Silikonschlauch mit einem Innendurchmesser von 1 mm und einem Außendurchmesser von 3 mm eingeführt wurde. Die Spritze wurde mit Parafilm® abgedichtet. Wie im Abschnitt 4.2.1.5 geschildert, wurde gegen Ende der Präparation wieder auf Überdruck-Beatmung umgestellt. Im Anschluss wurde die Trachealkanüle vom Respirator diskonnektiert und mit dem überstehenden Silikonschlauch der BAL-Spritze verbunden. Langsam wurden 650 µl gekühltes, steriles DPBS (mit einer aufgelösten Tablette Protease-Inhibitor pro 10 ml), in die Trachea und die nachgeordneten Strukturen eingespritzt und wieder ausgesogen. Dieser Vorgang wurde wiederholt. So wurden zwei Spüllösungen (bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, BALF) gewonnen, die bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert wurden.

4.2.2.3 Analyse der alveolo-kapillären Barriestörung

Zur Beurteilung der alveolo-kapillären Barriestörung wurde analysiert, wie viel des intravenös applizierten HSA in den Alveolarraum gelangte. Das bei der finalen Blutentnahme (Abschnitt 4.2.1.5) gewonnene Blut wurde zentrifugiert (4.000 rpm, 4 °C, 10 min) und das Plasma zur Bestimmung des HSA-Gehaltes verwendet. Außerdem wurden die entnommenen BALF-Proben ebenfalls zentrifugiert (2.200 rpm, 4 °C, 10 min). Da pro Tier zwei BALF-Proben gewonnen wurden, wurde aus jeder der beiden Proben 250 µl für die Messung des HSA-Gehaltes gepoolt. Der restliche BALF-Überstand wurde für weitere Analysen separat asserviert und die Zell-Pellets für eine Antikörper-Markierung weiterverarbeitet (Abschnitt 4.2.2.5).

Der HSA-Gehalt in den Proben wurde mit Hilfe des Enzym-gekoppelten Immunoassays (ELISA) mit dem Namen Human Albumin ELISA Quantitation Set (E80-129) gemäß dem Protokoll des Herstellers Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA bestimmt. Die Schwere der alveolo-kapillären Schrankenstörung konnte dann durch Berechnung der HSA-BALF/Plasma-Ratio beurteilt werden, wobei HSA_{BALF} der HSA-Konzentration in der BALF und HSA_{Plasma} jener im Plasma entspricht:

$$HSA\ BALF/Plasma\ Ratio = (HSA_{BALF} / HSA_{Plasma})$$

4.2.2.4 Differenzierung von Blutzellen

Die Leukozyten-Subpopulationen wurden mittels Impedanzmessung in einem Hämatologiegerät differenziert. Hierfür wurde ein Teil des frisch entnommenen Blutes in ein EDTA-Röhrchen überführt und vom Gerät analysiert. Die vom Gerät ausgegebenen prozentualen Anteile der Subpopulationen wurden mit der Leukozyten-Konzentration multipliziert, um Konzentrationen zu erhalten. Aus technischen Gründen konnte das Gerät bei Leukozyten-Konzentrationen unter 1.000 Zellen/ μl keine Informationen über Subpopulationen liefern.

4.2.2.5 Differenzierung von Zellen aus der bronchoalveolären Lavage

Die Leukozyten-Gesamtzahl in der BALF wurde mithilfe der Neubauer-Kammer bestimmt. Zur genaueren Analyse der Leukozyten-Zahl und der Leukozyten-Subpopulationen wurde eine Antikörper-Markierung der Zellen und anschließend eine Messung mittels Durchflusszytometrie (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*, FACS®) durchgeführt. Hierzu wurden die entnommenen BALF-Proben zentrifugiert (2200 rpm, 4 °C, 10 min), die Überstände asserviert (Abschnitt 4.2.2.2) und die Zell-Pellets der erst- und zweitentnommenen BALF in insgesamt 900 μl FACS®-Puffer (DPBS mit 5 % bovinem Serum Albumin und 2 mM EDTA) gepoolt, sodass sich mit dem Restüberstand der BALF ein Gesamtvolumen von etwa 1 ml ergab. Für die grobe Zählung der Leukozyten wurden 5 μl von der gepoolten BALF mit 5 μl 0,1 % Methylviolett-Eisessiglösung verdünnt, in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter einem Mikroskop ausgezählt. So konnte mit bekanntem Verdünnungsfaktor auf die Leukozyten-Konzentration in einem bestimmten BALF-Volumen geschlossen werden (Multiplikation des Mittelwertes von vier ausgezählten großen Feldern mit 20.000, wobei der Faktor 1:10.000 der Volumenfaktor der Neubauer-Zählkammer ist und zusätzlich eine Verdünnung mit Methylviolett um den Faktor 1:2 erfolgte).

Zur Analyse der Leukozyten-Subpopulationen mittels FACS® wurden die gepoolten BALF-Zellpellets in ein FACS®-Tube überführt, 3 ml FACS®-Puffer hinzugefügt und zentrifugiert (1500 rpm, 4 °C, 5 min). Das Tube wurde dekantiert, das Zell-Pellet mit 100 μl eines Antikörpers gegen CD16/CD32 (1:50-Verdünnung) zur Blockierung unspezifischer FC-Rezeptoren resuspendiert und für 5 min bei 4 °C

inkubiert. Anschließend wurden Antikörper zur Markierung spezifischer Oberflächenproteine von Leukozyten-Subpopulationen hinzugefügt. Pro Probe waren dies:

- (i) 0,8 µl F4/80 PerCP zum Nachweis von Makrophagen,
- (ii) 1 µl Ly-6G V450 zum Nachweis von neutrophilen Granulozyten,
- (iii) 1 µl CD45 PerCP zum Nachweis von Leukozyten.

Nach einer 30-minütigen Inkubationsphase bei 4 °C und in Dunkelheit erfolgte eine Zentrifugation (1500 rpm, 4 °C, 5 min) und anschließend eine Dekantierung. Die Antikörper-markierten Zellpellets wurden durch Zugabe von 800 µl einer Methanol-freien 2 %-Formaldehyd-Lösung fixiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Zur Entfernung des Formaldehyds wurden 3 ml FACS ®-Puffer hinzugegeben, das Tube zentrifugiert (1500 rpm, 4 °C, 5 min) und dekantiert. Das Zellpellet wurde mit 300 µl FACS ®-Puffer resuspendiert.

Kurz vor der Messung wurde in jedes Tube 50 µl einer 1:10-Verdünnung von CountBright ® Absolute Counting Beads hinzugefügt. Dabei handelt es sich um eine Lösung mit einer definierten Konzentration (50.000 oder 52.000 *Beads* pro 50 µl) von kugelförmigen Molekülaggregaten, sogenannte *Beads*, die vom Durchflusszytometer ebenfalls gezählt werden können. Durch das Verhältnis der gemessenen zur erwarteten *Bead*-Zahl kann auf die in der gesamten Probe vorliegenden Zell-Zahlen geschlossen werden, auch wenn nur ein Teil der Probe analysiert wurde. Die Durchflusszytometrie erfolgte an dem Gerät BD FACSCanto II ® der Firma Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA. Zur Charakterisierung der einzelnen Zellpopulationen wurde eine Gating-Strategie verwendet, die in Abbildung 6 dargestellt ist.

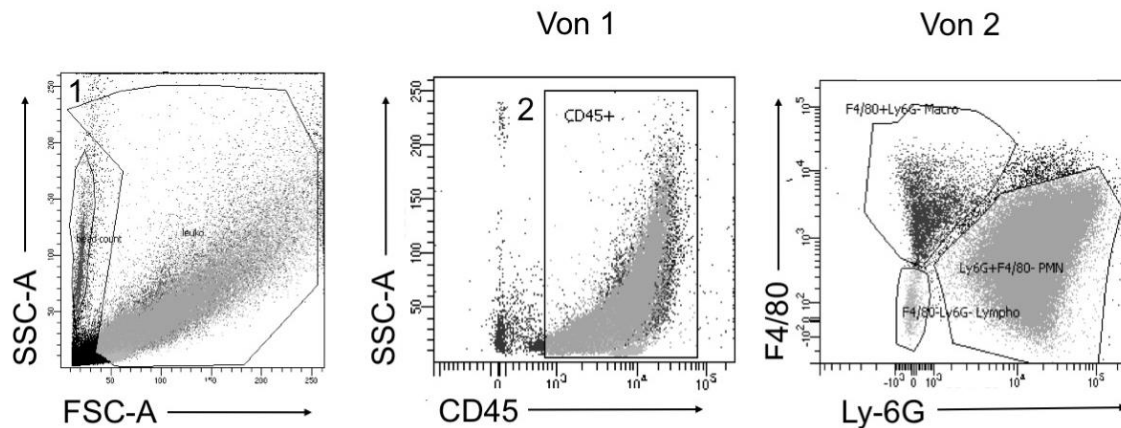


Abbildung 6: Gating-Strategie zur Unterscheidung der unterschiedlichen Zellpopulationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit.

Die Leukozyten-Subpopulationen wurden anhand der dargestellten Gating-Strategie zuerst nach *Side Scatter* (SSC) und *Forward Scatter* (FSC) geplottet, dann nach SSC und dem Leukozyten-spezifischen Membranprotein CD45, und schließlich nach dem Makrophagen-Marker F4/80 und dem Marker für neutrophile Granulozyten Ly-6G. Hierdurch konnten zusammengehörige Zellpopulationen identifiziert werden.

4.2.2.6 Bestimmung der Bakterienlast im Blut und in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit

Zur Bestimmung der CFU-Konzentrationen in den zwischenzeitlich auf Eis gelagerten Proben Blut und BALF wurden mit DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) die Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000 hergestellt. Auf 5 % Schafsblood-Agar-Platten wurden je 5 μ l der Proben pur und in den Verdünnungen zusammen mit 150 μ l sterilem DPBS pipettiert und die Platte zur Verteilung der Flüssigkeit geschwenkt. Nach 24 Stunden wurden die auf den Platten gewachsenen Kolonien gezählt und jene zur Auswertung herangezogen, welche mit der geringsten Verdünnung hergestellt wurde und dennoch deutlich abgrenzbare Einzelkolonien aufwies.

4.2.2.7 Analyse von Zytokinen im Plasma und in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit

Die Konzentrationen der Zytokine Interleukin-1-beta (IL-1-beta), Interleukin-6 (IL-6), Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 2 (CXCL2, auch als MIP2 bezeichnet) und Chemokine

(C-X-C Motif) Ligand 1 (CXCL1, auch als Keratinocyte Chemoattractant [KC] oder Growth-Regulated Oncogene-alpha [GRO-alpha] bezeichnet) wurden mithilfe eines ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay nach Protokoll des Herstellers Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA bestimmt.

Die Bestimmung des Chemokins Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 5 (CXCL5) erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers R&D Systems, Minneapolis, USA mit dem Kit Mouse LIX DuoSet ELISA.

4.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

4.2.3.1 Gewinnung von Lungen-Gewebe *in vivo*

Zur Untersuchung der Gen-Expression wurden Mäuse wie im Abschnitt 4.2.1.3 beschrieben infiziert und das Monitoring durchgeführt. Nach 48 h p.i. wurden die Mäuse einer verkürzten Präparation unterzogen: Anders als im Abschnitt 4.2.1.5 geschildert, wurde keine Trachealkanüle eingeführt und es erfolgte keine Beatmung sowie keine Entnahme einer BALF. Nach der Perfusionsphase der Lungenstrombahn von nur zwei Minuten wurde der Katheter aus der *A. pulmonalis* entfernt und es wurde mit einer Schere ausschließlich Lungenparenchym, aber kein Gewebe der Lungen-Hili reseziert. Auf 150 µl gekühltem PBS wurde die Lunge mit einer Schere grob zerkleinert.

4.2.3.2 Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen und murinen Lungen

Aus den *in vitro* kultivierten huPMVEC (Abschnitt 4.2.5) wurde 6 bzw. 24 Stunden nach Stimulation mit *S. pneumoniae* das Medium entfernt, die Wells mit DPBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml TRIzol®-Puffer lysiert. Die in dem Zell-Lysat enthaltene RNA wurde mit dem Direct-zol® RNA MiniPrep-Kit isoliert. Es wurde das Protokoll des Herstellers Zymo Research, Irvine, CA, USA verwendet.

Aus den *in vivo* gewonnenen, grob zerkleinerten Lungen sollte ebenfalls RNA isoliert werden. Zu diesem Zweck wurde die Hälfte des aus einem Tier resezierten Gewebes mit 1 ml TRIzol®-Puffer versetzt und mit einem Homogenisator fein zerkleinert. Das Homogenat wurde zentrifugiert (2.200 rpm, 4 °C, 5 min) und der Homogenatsüberstand in ein weiteres Reaktionsgefäß gegeben, kurz bei

Raumtemperatur inkubiert und danach mit 200 µl Chloroform vermischt. Nach einer weiteren Inkubationsphase von drei Minuten bei Raumtemperatur und einer Zentrifugation (12.000 rpm, 4 °C, 20 min) bildeten sich drei Phasen im Reaktionsgefäß, von denen die oberste ausschließlich RNA enthielt. Diese Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Ausfällung der RNA mit 500 µl Isopropanol versetzt. Es erfolgte eine Inkubationsphase von zehn Minuten bei Raumtemperatur. Nach einer Zentrifugation (12.000 rpm, 4 °C, 20 min) wurde der Überstand entfernt und das verbliebene Pellet gewaschen, indem es mit 1 ml 75-prozentiger Ethanol-Lösung resuspendiert wurde. Anschließend wurde das RNA-Pellet erneut zentrifugiert (9.000 rpm, 4 °C, 5 min), das Ethanol dekantiert und das noch feuchte Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur getrocknet. Das verbliebene Pellet wurde in 30 µl Reinstwasser resuspendiert und vermischt.

4.2.3.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Der RNA-Gehalt der Proben wurde mithilfe eines Spektralphotometers vom Typ NanoDrop 2000 ® von der Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA gemessen. Dadurch konnten die Volumina der verschiedenen Proben errechnet werden, die jeweils 2 µg RNA enthielten. Jene Volumina wurden für die Reverse Transkription in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In jedes Reaktionsgefäß wurden außerdem folgende Reagenzien des High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit ® (Firma Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) hinzugefügt:

- (i) 2 µl 10 x RT Buffer,
- (ii) 0,8 µl 25 x dNTP Mix (100mM),
- (iii) 2 µl 10 x RT Random Primer,
- (iv) 1 µl MultiScribe® Reverse Transcriptase,
- (v) 4,2 µl Nuclease-freies Wasser.

Das Gemisch aus Probe und Reagenzien wurde anschließend mit Reinstwasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Danach wurde eine reverse Transkription zur Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) mithilfe der in den Proben enthaltenen RNA durchgeführt. Hierzu wurden die Proben in einem Thermocycler vom Modell Mastercycler personal ® der Firma Eppendorf, Hamburg folgendem Programm unterzogen: 10 Minuten bei 25 °C, 120 Minuten bei 37 °C, 5

Minuten bei 85 °C und anschließend bis zur Entnahme der Proben aus dem Gerät eine Kühlung bei 4 °C. Die Proben wurden mit Reinstwasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und bei -80 °C eingefroren.

Um eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) durchzuführen, wurden die Proben auf eine 96-Well-Platte verteilt. Zwölf Wells wurden mit jeweils 5 µl einer bestimmten Probe befüllt. Dann wurden in jedes Well folgende Reagenzien hinzugefügt:

- (i) 4 µl Reinstwasser,
- (ii) 10 µl TaqMan ® Gene Expression Mastermix (Firma Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), der unter anderem eine DNA-Polymerase und eine Uracil-DNA-Glycosylase enthielt, sowie
- (iii) 1 µl von jeweils einem der vier verschiedenen Assay on Demand-Gemischen, welche die Sonde sowie unterschiedliche Primer enthielten.

Bei den eingesetzten Assays on Demand handelte es sich um TaqMan ® Gene Expression Assays für die Gene CFTR, WNK1, TRPV4, sowie für das Referenzgen (Housekeeping-Gene) Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Jede Probe wurde als Triplet bestimmt, also mit dem gleichen Assay und dem gleichen Primer zur qPCR-Reaktion in drei verschiedenen Reaktions-Wells angesetzt und der Mittelwert der drei Reaktionsansätze verwendet.

Die befüllte 96-Well-Platte wurde für einige Sekunden bei 1.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend lief in einen Thermocycler vom Modell 7300 RT PCR System® die qPCR auf der 96-Well-Platte ab. Initial erfolgte die Aktivierung der DNA-Polymerase des TaqMan ® Gene Expression Assays bei 50 °C für zwei Minuten sowie bei 95 °C für zehn Minuten. Dann folgten bis zu 40 Amplifikationszyklen der cDNA bestehend aus jeweils 15 Sekunden bei 95 °C und einer Minute bei 60 °C. Über photometrische Messungen im Thermocycler und mithilfe des Computerprogramms 7300 System SDS Software in der Version 1.3.1 konnte der Cycle Threshold-Wert (Ct) ermittelt werden. Dieser Wert gibt für jedes einzelnes Well an, in welchem Amplifikationszyklus der qPCR ein bestimmter Grenzwert für das Fluoreszenz-Signal erreicht wurde. War in der Ausgangsprobe zum Beispiel eine hohe Menge an RNA und damit an umgeschriebener cDNA des betreffenden Gens vorhanden, dann müssen nur wenige Zyklen bis zum Erreichen des Grenzwertes durchlaufen werden; damit wäre der Ct-Wert im Vergleich zu einer Referenzgruppe relativ niedrig.

Es erfolgten ebenfalls qPCR-Untersuchungen für die Gene TRPV4, WNK1 und CFTR in humanem Lungengewebe. Hierfür stellte freundlicherweise Dr. Diana Fatykhova aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hocke (Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité Universitätsmedizin Berlin) aufbereitete RNA-Proben von *in vitro* für 8 h mit *S. pneumoniae* (D39, Serotyp 2, NCTC7466) infiziertem humanen Lungengewebe zur Verfügung. Es wurden tumorfreie Abschnitte aus Lungenresektaten von Patienten mit Bronchialkarzinom verwendet. Die Aufklärung und Zustimmung aller Patienten sowie ein positives Votum der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin (Protokollnummern EA2/050/08 und EA2/023/07) lagen vor. Der Bezug der Gewebeproben, ihre Infektion, und die Aufbereitung der Proben für die qPCR wurden von Szymanski und Kolleg*innen beschrieben (156). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgelistet.

4.2.3.4 Berechnungen der Ergebnisse

Aus den Triplett-Messungen jeder einzelnen Probe wurde das arithmetische Mittel für den Ct-Wert eines bestimmten Gens gebildet (avg Ct). Von diesem avg Ct-Wert des zu untersuchenden Gens wurde dann der avg Ct-Wert des Housekeeping-Gens GAPDH in der gleichen Probe subtrahiert, wodurch man die avg dCt-Werte für die zu untersuchenden Gene (*Gene of interest*, GOI) CFTR, WNK1 und TRPV4 erhielt:

$$\text{avg dCt}_{(\text{GOI})} = \text{avg Ct}_{(\text{GOI})} - \text{avg Ct}_{(\text{GAPDH})}$$

Nun wurde aus den avg dCt_(GOI)-Werten der nicht-infizierten Kontrollgruppe das arithmetische Mittel gebildet (avg avg dCt_(ctrl)). Dabei wurden die verwendeten Analyse-Platten getrennt voneinander betrachtet. Der ddCt-Wert ist ein Maß für die Veränderung der Genexpression in einer bestimmten Probe aus der Versuchsgruppe oder Kontrollgruppe in Bezug auf die durchschnittliche Expression dieses Gens in der Kontrollgruppe. Dafür wird vom dCt-Wert eines bestimmten GOI in einer bestimmten Probe (avg dCt_(GOI)) der avg avg dCt_(ctrl)-Wert subtrahiert. In den Kontrollgruppen schwankten die ddCt-Werte erwartungsgemäß nahe Null.

$$\text{ddCt} = \text{avg dCt}_{(\text{GOI})} - \text{avg avg dCt}_{(\text{ctrl})}$$

Um eine übersichtliche Darstellung der Ergebnisse zu erreichen, in der eine Erhöhung der gemessenen RNA-Menge und damit der Genexpression mit einem erhöhten Wert einhergeht, wurden die ddCt-Werte zu sogenannten RQ (Relative Quantification)-Werten umgeformt.

$$RQ = 2^{-ddCt}$$

So ergab sich für jede Probe aus den Versuchs- und Kontrollgruppen für jedes einzelne GOI ein RQ-Wert. In den Kontrollgruppen schwankten die RQ-Werte erwartungsgemäß nahe eins.

4.2.4 Western Blot

4.2.4.1 Isolierung von Proteinen aus Lungen-Homogenaten

Zur Isolierung der Proteine aus den *in vivo* resezierten murinen Lungen (Abschnitt 4.2.3.1) wurde eine Hälfte des grob zerkleinerten Gewebes mit 200 µl des Radioimmunoprecipitation assay-Puffer (RIPA; destilliertes Wasser mit 50 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 1 % Octoxinol-9, 0,5 % Natrium-Deoxycholat, 5 mM EDTA, 0,1% SDS und zusätzlich 4% Protease-Inhibitor) versetzt. Anschließend wurde das Gemisch in gentleMACS® M Tubes der Firma Miltenyi Biotec, Teterow überführt, um es mit dem Gerät gentleMACS® Dissociator zu homogenisieren. Das Homogenisat wurde danach zentrifugiert (4.000 rpm, 4 °C, 5 min). Flüssiger Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 4 °C, 10 min). Der klare, schlierenfreie Überstand wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

4.2.4.2 Durchführung des Western Blot

Der Protein-Gehalt in den Lösungen, welche aus RIPA-Puffer und murinem Lungenhomogenat bzw. kultivierten huPMVEC hergestellt wurden, wurde mit dem Bio-Rad® DC Protein Assay nach dem Protokoll des Herstellers Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA bestimmt. Eine definierte Protein-Menge (50 µg bei Lungen-Homogenaten bzw. 20 µg bei kultivierten Zellen) in RIPA-Puffer wurde anschließend mit

25 % Laemmli-Puffer (in 4-facher Ausgangskonzentration, inklusive 10 % Beta-Mercaptoethanol) vermischt. Das Gemisch wurde auf einem Wärmeschüttler erhitzt (94 °C, 300 rpm, 5 min) und bis zur Verwendung eingefroren (-20 °C).

Es wurde ein selbsthergestelltes Trenngel mit einem Acrylamid-Gehalt von 8 % zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine verwendet. Die Auftrennung erfolgte in einer Gelelektrophoresekammer im Sammelgel bei 100 mV, im Trenngel bei 120 mV. Anschließend wurde ein Blotting des Gels auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) bei 0,7 A für 60 min als Semi-Dry-Blot in einer Elektrophorese-Transferkammer durchgeführt. Zur Darstellung der auf die Membran geblotteten Proteinbanden wurde eine Färbung mit 0,1 %-Ponceau S für 5 min durchgeführt. Nach dem Abwaschen der Färbelösung mit A. dest und DPBS (mit 0,05 % Tween 20) erfolgte ein Block der Membran mit Blocking Buffer (1:4 in DPBS verdünnt und mit 2,5 % Milchpulver) für eine Stunde.

Die Membran wurde auf der Höhe von 70 kDa mit einem Skalpell zerschnitten. Die obere Hälfte der Membran mit Proteinen größer als 70 kDa wurde über Nacht bei 4 °C mit einem Primär-Antikörper aus dem Kaninchen gegen TRPV4 (1:1.000 in 2,5 ml Blocking Buffer mit 0,3 % Tween 20) inkubiert. Die untere Hälfte mit Proteinen kleiner als 70 kDa wurde über Nacht mit einem Primär-Antikörper aus der Maus gegen murines Alpha-Actin (1:5.000 in 5 ml DPBS mit 0,05 % Tween 20 und 5 % Milchpulver) inkubiert.

Nachdem die Primär-Antikörper-Lösungen entfernt und die Membranen mit DPBS (mit 0,05 % Tween 20) gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit den Horseradish Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundär-Antikörpern. Die obere Membranhälfte wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde mit einem Sekundärantikörper aus der Ziege gegen Kaninchen-IgG 1:2.000 in 5 ml DPBS (mit 0,05 % Tween 20 und 5 % Milchpulver) inkubiert. Die untere Membranhälfte wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde mit einem Sekundärantikörper aus der Ziege gegen Maus-IgG 1:10.000 in 5 ml DPBS (mit 0,05 % Tween 20 und 5 % Milchpulver) inkubiert. Nach den Inkubationszeiten wurden die Sekundär-Antikörper-Lösungen entfernt und die Membranen mit DPBS (mit 0,05 % Tween 20) gewaschen. Die HRP-gekoppelte Enzymreaktion erfolgte 1 Minute lang mit Pierce ECL ®-Entwicklersubstanz (je Membranhälfte 1 ml Substrat 1 und 1 ml Substrat 2), danach wurden die Membranen abgetupft und bis zur Entwicklung in einer Entwicklungskassette verwahrt. Die Entwicklung erfolgte mit Autoradiographie-Platten versuchsweise für 15, 30 sec und 1,

5 und 15 min. Platten mit deutlichem und klar abzugrenzendem Signal wurden zur Auswertung herangezogen.

4.2.4.3 Berechnungen der Ergebnisse des Western Blot

Mithilfe des Programms ImageJ FIJI erfolgte die Auswertung des Western Blot. Die Banden wurden anhand ihrer Pixel-Dichte in Bezug auf eine für die Membran festgelegte Referenz-Fläche als Area under the Curve (AUC) dargestellt. Es wurde für jede Probe ein Quotient berechnet aus der AUC für TRPV4 und der AUC für Alpha-Actin als Referenzprotein mit konstanter Expression. Das arithmetische Mittel aller Quotienten der Kontrollgruppe einer Membran wurde gebildet. Jeder einzelne Quotient einer bestimmten Probe wurde durch diesen Mittelwert der Kontrollgruppe dividiert, um so einen Fold Change-Wert (das Vielfache der Proteinexpression in einer Probe in Bezug auf den Mittelwert der Kontrollgruppe) zu erhalten.

4.2.5 Kultivierung und Infektion mit *S. pneumoniae* von humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen

Es wurden humane mikrovaskuläre pulmonale Endothelzellen (huPMVEC) zwischen der vierten und achten Passage verwendet. Sie wurden je Well in 3 ml Endothelial Cell Growth Medium MV2 mit 5 % Endothelial Cell Growth Medium MV SupplementMix (welchem 1 % Penicillin-Streptomycin hinzugefügt wurde) bei 37 °C und 5 % CO₂-Luftgehalt für drei bis fünf Tage auf einer 6-Well-Platte inkubiert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte bei mikroskopisch ausreichendem Wachstum jeden oder jeden zweiten Tag.

Die Anzucht von *S. pneumoniae* vom Serotyp 2 (NCTC 7466) erfolgte wie im Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben. Wenn eine mikroskopisch sichtbare Konfluenz der Zellmonolayer der jeweiligen Wells von 80 bis 90 % erreicht war, wurde ein Wechsel des Mediums auf 2 ml je Well des Antibiotika-freien Endothelbasalmedium MCDB 131, versetzt mit 2 % fetalem Kälberserum (FCS) vorgenommen. Am Folgetag wurde die Stimulation der kultivierten Zellen mit *S. pneumoniae* vom Serotyp 2 vorgenommen. Hierzu wurde 1 ml des Mediums entfernt und 1 ml des gleichen, vorgewärmten Mediums

mit der photometrisch bestimmten Konzentration von 10^6 CFU/ml *S. pneumoniae* hinzugefügt. Somit befanden sich in einem Well 5×10^5 CFU/ml *S. pneumoniae*. In den Kontroll-Well erfolgte das gleiche Procedere mit vorgewärmtem Medium, das keine Bakterien enthielt.

4.2.6 Untersuchungen mit einem TRPV4-Inhibitor *in vivo*

4.2.6.1 Behandlung der Versuchstiere mit HC-067047

Zur Untersuchung der pharmakologischen Beeinflussbarkeit des TRPV4-Kanals wurde der TRPV4-Inhibitor HC-067047 der Firma Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA als intraperitoneale Injektionslösung verwendet, dessen Eigenschaften und bisherige Verwendungen im Abschnitt 2.5.4 erläutert werden. Wildtyp (WT)-Mäuse vom Stamm C57Bl/6J wurden wie im Abschnitt 4.2.1.3 entweder mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* vom Serotyp 3 infiziert oder nur mit dem Lösungsmittel einer Schein-Infektion unterzogen. Es wurde allen Tieren 24 Stunden vor, direkt bei sowie 24 Stunden nach der Infektion eine intraperitoneale Injektion verabreicht. Um die Wirkung des Inhibitors in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt zu untersuchen, wurden drei Behandlungsgruppen gebildet, die zu den verschiedenen Zeitpunkten entweder den Wirkstoff in einem Lösungsmittel oder nur das Lösungsmittel erhielten. Die drei verschiedenen Applikations-Schemata sind in der Tabelle 11 dargestellt.

Die Substanz HC-067047 wurde in einer Konzentration von 25 mM in purem Ethanol gelöst. Dies ist die vom Hersteller Tocris Bioscience genannte höchstmögliche Konzentration in diesem Lösungsmittel. Die applizierte Ethanol-Menge sollte somit minimiert werden. Wird Mäusen eine Dosis von 10 mg pro kg Körpergewicht verabreicht, können Konzentrationen der Substanz im Tier gemessen werden, die die IC₅₀ übersteigen und dennoch mit geringen Nebenwirkungen verbunden sind (144), daher wurde diese Dosierung verwendet. Einer Maus mit einem Idealgewicht von 20 g sollte somit 0,2 mg pro Applikation verabreicht werden. Da die molare Masse des Inhibitors 471,51 g/mol beträgt, war eine weitere Verdünnung der hergestellten Ethanol-Lösung auf 1:11,78 in 0,9%-NaCl-Lösung nötig, um eine Injektionslösung mit 1 mg Wirkstoff pro ml zu erhalten und somit im zu applizierenden Volumen von 200 µl eine Menge von 0,2 mg des Wirkstoffs. Sollte das Tier zu einem Applikationszeitpunkt nur das Lösungsmittel

ohne den Wirkstoff erhalten, wurden 200 µl einer Lösung aus purem Ethanol 1:11,78 in 0,9%-NaCl-Lösung verwendet.

Gruppe	24 h vor Infektion	bei Infektion	24 h p.i.
Therapie	Lösungsmittel	Lösungsmittel	HC-067047
Prävention	HC-067047	HC-067047	HC-067047
Kontrolle	Lösungsmittel	Lösungsmittel	Lösungsmittel

Tabelle 11: Applikationsschemata der drei verschiedenen Behandlungsgruppen.

Die Tiere erhielten entweder 200 µl einer Lösung aus 0,9%-NaCl und Ethanol mit 0,2 mg des TRPV4-Inhibitors HC-067047 oder nur 200 µl des Lösungsmittels ohne den Inhibitor.

4.2.6.2 Weiterer Versuchsablauf und Analysen

Die Infektion und die Präparation erfolgten bei diesen Tieren wie im Abschnitt 4.2.1 beschrieben. Die Überwachung und das Monitoring nach der Infektion wurden ebenfalls wie unter 4.2.1.3 erläutert durchgeführt, hier kamen zu den unter 4.2.6.1 angegebenen Zeitpunkten jeweils noch die intraperitonealen Injektionen hinzu. Die Analysen erfolgten in Bezug auf die gleichen Parameter wie bei dem Versuchsteil, der TRPV4-KO-Tiere mit WT-Tieren vergleicht (alveolo-kapilläre Barriestörung, Differentialblutbild, Leukozyten-Subpopulationen in der BALF, Bakterienlast in Blut und BALF sowie Zytokine in Plasma und BALF) und wurden im Abschnitt 4.2.2 erläutert.

4.2.7 Statistische Datenanalyse

Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen. Die statistische Datenauswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 6. Es fand ein Beratungsgespräch im Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin über die statistische Datenauswertung in der vorliegenden Arbeit statt.

Zur Überprüfung von Unterschieden zwischen infizierten WT- und infizierten KO-Tieren auf statistische Signifikanz wurde bei nicht-parametrischen, unverbundenen Stichproben der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Beim Verlauf der Körpertemperatur

und des Körpergewichtes wurden nur die Unterschiede bei jeweils 48 h auf statistische Signifikanz überprüft, da diese letzte Messung zu einem späten Zeitpunkt des Infektionsverlaufs als relevant angesehen wurde. Die relativen Anteile von Leukozyten-Subpopulationen an den Leukozyten-Gesamtzahlen im Blut und in der BALF wurden zwischen infizierten KO- und WT-Tieren mithilfe des im GraphPad Prism Statistik-Paketes enthaltenen multiplen t-Tests mit anschließender Bonferroni-Dunn-Korrektur für multiples Testen verglichen. Laut Information des Programm-Herstellers kann dieser Test auch für nicht-parametrische, unverbundene Stichproben angewandt werden. Bei der Bonferroni-Dunn-Korrektur werden im Wesentlichen die ermittelten p-Werte mit der Anzahl der durchgeführten Tests (in diesem Fall drei) multipliziert. Die statistische Analyse der Treatment-Versuche, wo drei verschiedene Gruppen von infizierten WT-Tieren unterschiedlichen Behandlungsschemata unterzogen wurden, erfolgte bei nicht-parametrischen, unverbundenen Stichproben in drei Gruppen mit dem Kruskal-Wallis Multiple Comparisons Test und anschließendem Posthoc-Test nach Dunn. Bei Körpertemperatur und Körpergewicht wurden in diesem Versuchsteil nur die Daten zu 48 h mittels Kruskal-Wallis Multiple Comparisons Test und Posthoc-Test nach Dunn analysiert.

Die *Fold Change*-Werte der Pixeldichte der Banden, welche die Proteinexpression im Western Blot repräsentieren, wurden mittels Mann-Whitney-U-Test für nicht-parametrische, unverbundene Stichproben verglichen.

Um Werte zu vergleichen, die im Rahmen der Auswertung möglichst wenig im Vergleich zu den Rohdaten modifiziert waren, wurden zur Berechnung der statistischen Signifikanz die ddCt-Werte eines bestimmten *Gene of Interest* zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe verglichen. Da die Versuchsgruppe mit der Kontroll-Gruppe in Bezug auf drei verschiedene Gene verglichen wurde, musste das multiple Testen bei der Testauswahl berücksichtigt werden. Es wurde bei nicht-parametrischen, unverbundenen Stichproben der im GraphPad Prism Statistik-Paket enthaltene multiple t-Test mit anschließender Bonferroni-Dunn-Korrektur für multiples Testen verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 TRPV4-Knockout-Mäuse zeigen einen attenuierten klinischen Verlauf nach Infektion mit *S. pneumoniae*

Um die klinischen Auswirkungen des TRPV4-Knockout (TRPV4-KO) im Mausmodell der Pneumokokken-Pneumonie zu untersuchen, wurden die Tiere einem regelmäßigen Monitoring unterzogen. Zum Zeitpunkt der Infektion und 12, 24, 36 sowie 48 h später wurden das Körpergewicht und die rektale Temperatur bei den mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* infizierten und den mit PBS schein-infizierten Wildtyp (WT)- und TRPV4-KO-Tieren erfasst. Wegen leicht differierender Ausgangsgewichte zwischen KO- und WT-Tieren wurde das prozentuale Gewicht relativ zum Ausgangsgewicht zur Auswertung herangezogen. Die infizierten Gruppen wurden zum Zeitpunkt 48 h p.i. auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Mit *S. pneumoniae* infizierte TRPV4-KO-Tiere hatten zu diesem Monitoring-Zeitpunkt eine signifikant höhere Körpertemperatur als WT-Tiere, zeigten also eine verminderte Hypothermie als Zeichen der schweren Pneumonie im Mausmodell (Abbildung 7A). Das Gewicht 48 h p.i. relativ zum Ausgangsgewicht war bei infizierten TRPV4-KO-Tieren signifikant niedriger im Vergleich zu infizierten WT-Tieren (Abbildung 7B).

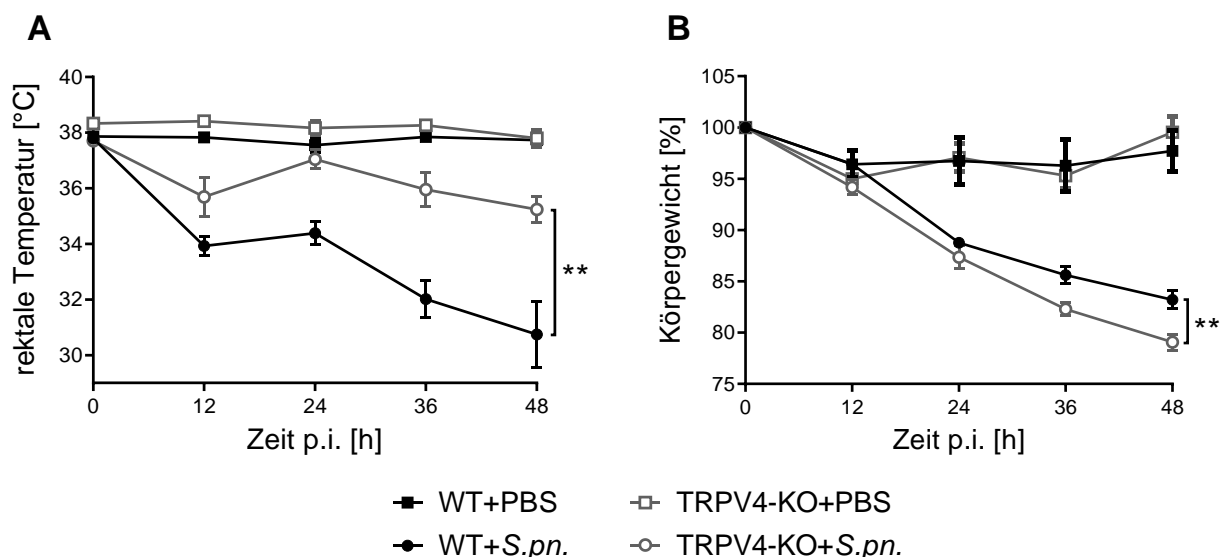


Abbildung 7: TRPV4-KO-Tiere zeigen eine verminderte Hypothermie und eine höhere prozentuale Gewichtsreduktion 48 h nach Infektion.

Wildtyp-Tiere (WT) und TRPV4-Knockout-Tiere (TRPV4-KO) wurden entweder mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert oder einer Schein-Infektion unterzogen (PBS). Dann wurde alle zwölf Stunden nach Infektion (p.i., *post infectionem*) die rektale Körpertemperatur (A) erfasst und das Körpergewicht (B) gemessen. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte mit SEM

(Fehlerbalken). PBS: n=6, *S.pn.*: n=11 (0 – 36 h) bzw. n=10 (zu 48h, da jeweils ein Tier zum Zeitpunkt 36 h p.i. bei Erreichen der Abbruchkriterien schmerzfrei getötet werden musste). Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich der *S.pn.*-Gruppen zu jeweils 48 h p.i. ** p ≤ 0,01.

5.2 TRPV4-Knockout-Mäuse weisen eine geringere alveolo-kapilläre Barrierestörung 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* auf

Eine Schlüsselfragestellung in der vorliegenden Arbeit lautete, welche Rolle der TRPV4-Kanal bei der alveolo-kapillären Barrierestörung spielt. Zu diesem Zweck wurde die alveolo-kapilläre Barrierestörung durch die Berechnung des HSA [BALF/Plasma]-Quotienten (Verhältnis der Konzentration des humanen Serum-Albumin (HSA) in der BALF zu der Konzentration im Plasma) quantifiziert. Dafür wurde den Tieren eine Stunde vor Versuchsende, also 47 h nach Infektion mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* bzw. nach Kontrollinfektion mit PBS, HSA intravenös in die Schwanzvene appliziert. Bei der Präparation erfolgte die finale Blutentnahme aus der *V. cava caudalis* und anschließend wurde *ex vivo* eine BAL durchgeführt. Mittels ELISA wurden die HSA-Konzentrationen in Plasma und BALF bestimmt. Bei intakter alveolo-kapillärer Barriere tritt kaum HSA aus den Lungen-Kapillaren in den Alveolarraum über. Der errechnete Quotient der HSA-Konzentration in der BALF zur Konzentration im Plasma korreliert mit der Schwere der alveolo-kapillären Barrierestörung. Während in den schein-infizierten Versuchsgruppen der Quotient erwartungsgemäß bei beiden Genotypen sehr niedrig ausfiel, zeigten mit *S. pneumoniae*-infizierte Mäuse deutlich höhere Werte, wobei hier die TRPV4-KO-Tiere einen signifikant niedrigeren Quotienten als die infizierten WT-Tiere aufwiesen (Abbildung 8).

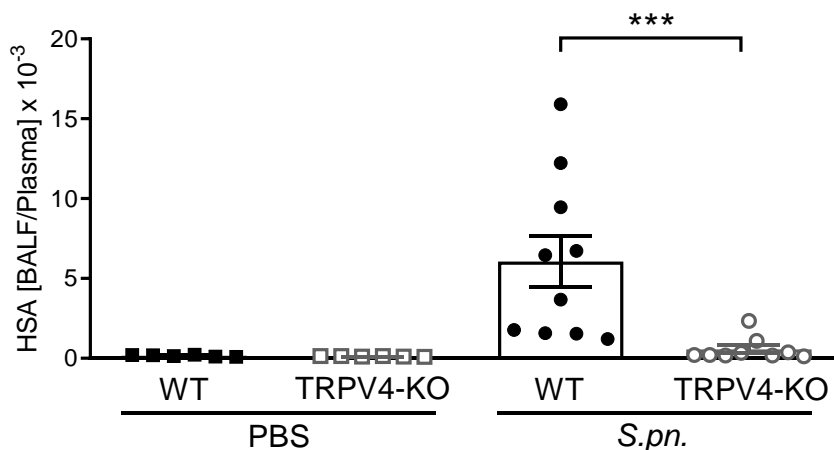


Abbildung 8: Die alveolo-kapilläre Barriestörung bei der murinen Pneumokokken-Pneumonie 48 h nach Infektion ist bei TRPV4-KO-Tieren reduziert.

Wildtyp-Tiere (WT) und TRPV4-Knockout-Tiere (TRPV4-KO) wurden entweder mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert oder einer Schein-Infektion unterzogen (PBS). 47 h nach Infektion (p.i., *post infectionem*) wurde humanes Serumalbumin (HSA) intravenös appliziert. 48 h p.i. erfolgte die Präparation der Tiere mit Entnahme von Blut und einer bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF). Nach der Bestimmung von HSA in der BALF und im Plasma mittels ELISA erfolgte die Berechnung des HSA [BALF/Plasma]-Quotienten zur Quantifizierung der alveolo-kapillären Barriestörung. Die Werte sind dargestellt als Einzelwerte (*Scatter Plot*) mit Mittelwerten (Säulen) und SEM (Fehlerbalken). PBS: n=6, *S.pn.* (WT): n=10, *S.pn.* (KO): n=9. Mann-Whitney-U-Test bei den *S.pn.*-Gruppen. *** $p \leq 0,001$.

5.3 Der TRPV4-Knockout in Mäusen hat keinen Einfluss auf Compliance-Veränderungen durch eine *S. pneumoniae*-Pneumonie

Die Compliance ist ein Wert der Lungenmechanik, der die Dehnbarkeit der Atemwege widerspiegelt und bei einer Ödembildung zum Beispiel im Rahmen einer Pneumonie oft reduziert ist. Da in Abschnitt 5.2 gezeigt wurde, dass TRPV4-KO-Mäuse nach Pneumokokken-Pneumonie eine verminderte alveolo-kapilläre Barriestörung aufweisen, sollte auch eruiert werden, ob der TRPV4-KO einen Einfluss auf die Compliance-Reduktion bei der Pneumokokken-Pneumonie in der Maus hat. Die Tiere wurden zum Versuchsendpunkt 48 h nach Infektion präpariert und die isolierte Lunge in der IPML-Kammer *ex vivo* beatmet. Nachdem die Kammer geschlossen wurde, konnte eine Phase der Unterdruck-Beatmung begonnen und verschiedene dynamische Atemwegparameter aufgezeichnet werden. Die dynamische Compliance (C_{dyn}) bezeichnet dabei den Quotienten zwischen dem während des Atemzyklus gemessenen Tidalvolumens und der Differenz zwischen inspiratorischem Spitzendruck und PEEP (nähere Erläuterungen im Abschnitt 4.2.1.5). Die Compliance wird vereinfacht als Maß

für die Dehnbarkeit der Lunge bezeichnet. Zwar zeigten sich erwartungsgemäß deutlich verminderte dynamische Compliance-Werte bei den mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* infizierten Gruppen im Vergleich zu den mit PBS schein-infizierten Gruppen, doch ergaben sich zwischen infizierten TRPV4-KO- und infizierten WT-Tieren keine signifikanten Unterschiede.

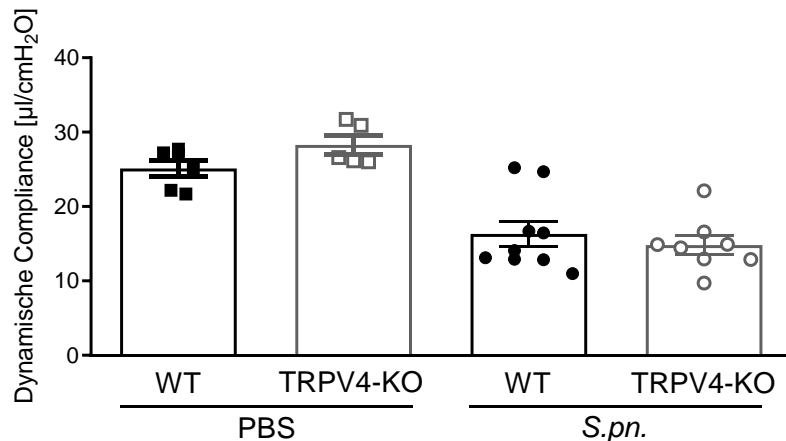


Abbildung 9: Die dynamische Compliance ist bei TRPV4-KO-Tieren unverändert.

Wildtyp-Tiere (WT) und TRPV4-Knockout-Tiere (TRPV4-KO) wurden mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert oder einer Schein-Infektion mit PBS unterzogen. Zum Versuchsendpunkt 48 h nach Infektion wurden die Tiere präpariert und die Lungen der Tiere *ex vivo* in einer IPML-Kammer einer Unterdruck-Beatmung unterzogen, wobei die dynamische Compliance aufgezeichnet wurde. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den infizierten KO- und WT-Tieren beobachtet werden. Die Werte sind dargestellt als Einzelwerte (*Scatter Plot*) mit Mittelwerten (Säulen) und SEM (Fehlerbalken). PBS (WT): n=6, PBS (KO): n=5, *S.pn.* (WT): n=9, *S.pn.* (KO): n=8.

5.4 TRPV4-Knockout-Mäuse zeigen veränderte Leukozyten-Subpopulationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit, aber nicht im Blut

In der gesunden Lunge befinden sich nur wenige Immunzellen, darunter vor allem alveoläre Makrophagen. Die bakterielle Pneumonie führt zu einer Rekrutierung verschiedener Leukozyten-Subpopulationen in die Lunge, um die Erregerlast zu reduzieren und Zell-Detritus abzuräumen. Da der TRPV4-Kanal auch auf verschiedenen Immunzellen lokalisiert ist, und eine Bedeutung des Kanals auf neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in anderen Tier-Modellen des akuten Lungenschadens nachgewiesen werden konnte (34, 107, 133), sollten in dieser Arbeit die Leukozyten-Subpopulationen in der BALF und im Blut differenziert werden. Es zeigte sich in der BALF von infizierten TRPV4-KO-Tieren im Vergleich zu infizierten WT-Tieren

eine Verminderung des relativen Anteils neutrophiler Granulozyten und eine Erhöhung des relativen Anteils der Makrophagen an den Leukozyten (Abbildung 10A). In absoluten Konzentrationen zeigte sich bei infizierten TRPV4-KO-Tieren weiterhin eine Verminderung der neutrophilen Granulozyten in der BALF (Abbildung 10B), jedoch nur noch eine tendenzielle Erhöhung der Makrophagen-Konzentration, die nicht signifikant war (Abbildung 10D). Die signifikante Erhöhung des relativen Anteils der Makrophagen an den Gesamt-Leukozyten war also auf die relative Erniedrigung der neutrophilen Granulozyten zurückzuführen. Die Lymphozyten-Konzentration zeigte keinen Unterschied zwischen infizierten WT- und TRPV4-KO-Tieren.

Im Blut konnten keine Veränderungen der relativen Anteile der Leukozyten-Subpopulationen (Abbildung 11A) oder der absoluten Konzentrationen von Lymphozyten (Abbildung 11C) oder Makrophagen (Abbildung 11D) gemessen werden. Die Konzentration der neutrophilen Granulozyten im Blut (Abbildung 11B) war ähnlich wie in der BALF tendenziell reduziert.

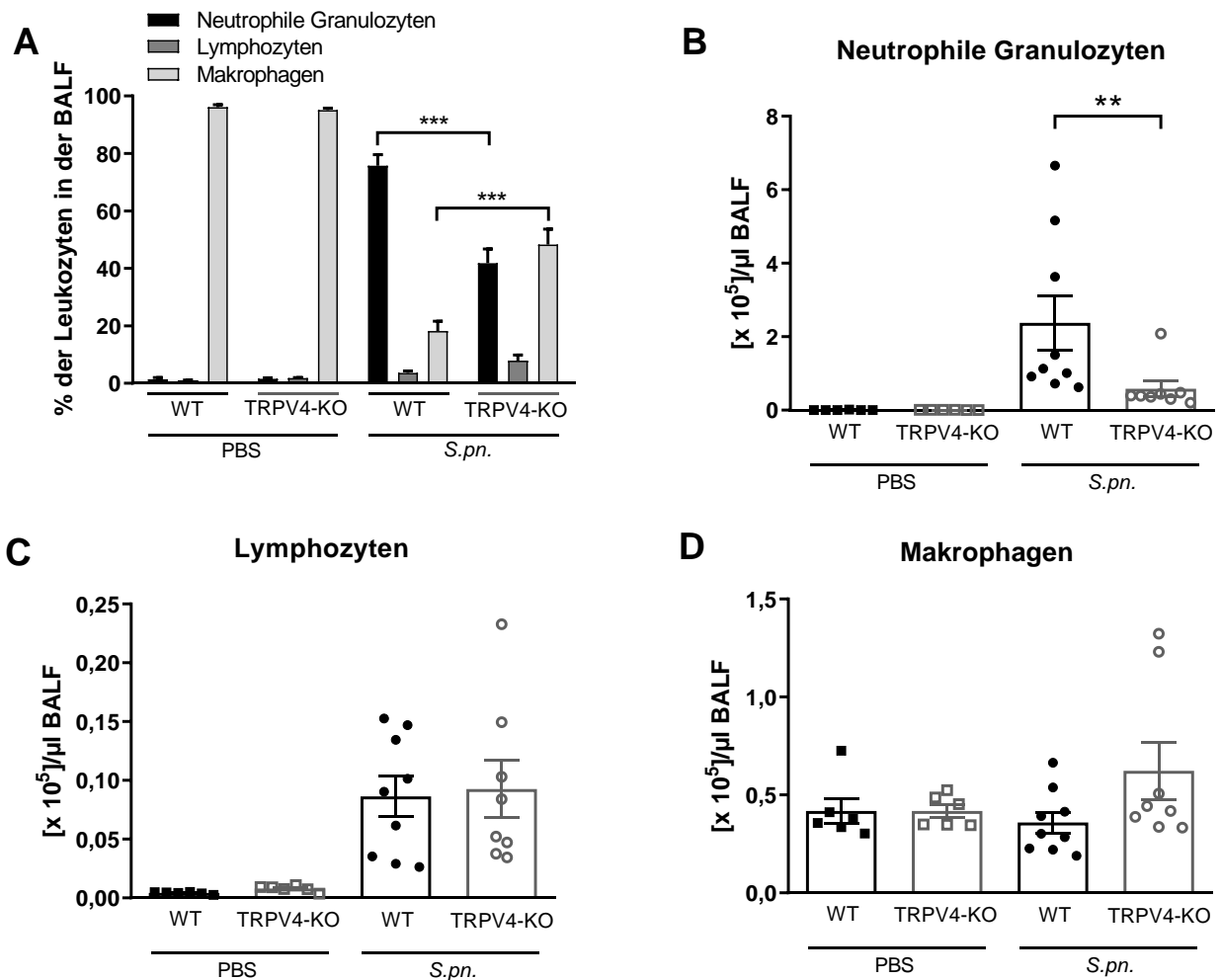


Abbildung 10: Infizierte Tiere mit TRPV4-KO zeigen veränderte Leukozyten-Subpopulationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF).

Wildtyp-Tiere (WT) und TRPV4-Knockout-Tiere (TRPV4-KO) wurden entweder mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert oder einer Schein-Infektion unterzogen (PBS). 48 h nach Infektion (p.i., *post infectionem*) erfolgte die Präparation der Tiere mit Entnahme einer bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF). Es erfolgte die Analyse der Leukozyten-Subpopulationen mithilfe der Durchflusszytometrie. Die relativen Anteile der Leukozyten-Subpopulationen in der BALF (A) zeigten bei infizierten TRPV4-KO-Tieren einen reduzierten Anteil an neutrophilen Granulozyten und einen erhöhten Anteil an Makrophagen. In absoluten Konzentrationen zeigte sich nur eine Verminderung der neutrophilen Granulozyten bei infizierten TRPV4-KO-Tieren (B), aber keine Unterschiede bei Lymphozyten (C) und Makrophagen (D). Die Werte sind dargestellt als Einzelwerte (*Scatter Plot*) mit Mittelwerten (Säulen) und SEM (Fehlerbalken). PBS (WT): n=6, PBS (KO): n=6, *S.pn.* (WT): n=9, *S.pn.* (KO): n=8. Multiple t-Tests und Bonferroni-Dunn-Korrektur für multiples Testen (A). Mann-Whitney-U-Test (B, C, D). ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001.

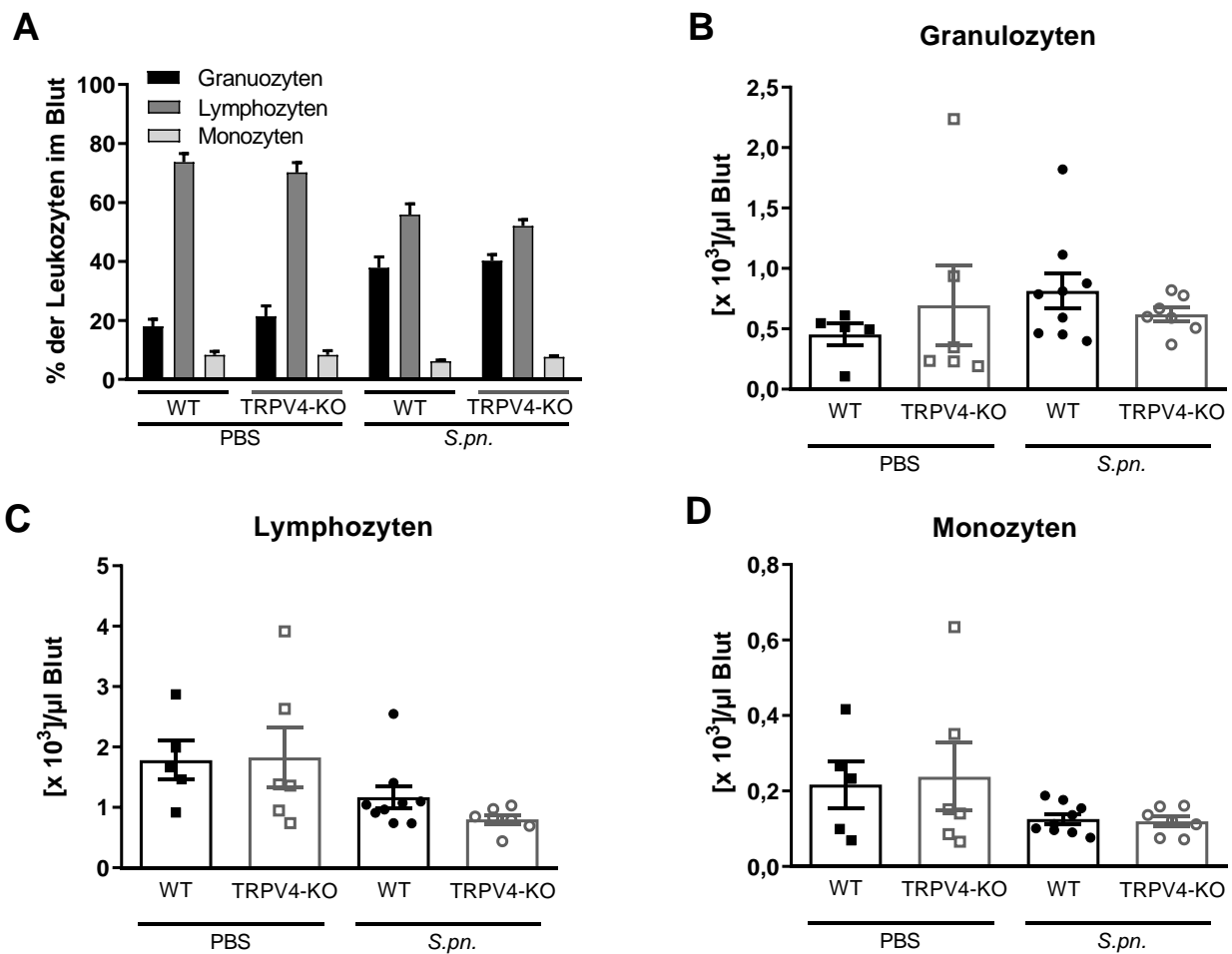


Abbildung 11: Leukozyten-Subpopulationen im Blut unterscheiden sich nicht zwischen infizierten TRPV4-KO- und WT-Tieren.

Wildtyp-Tiere (WT) und TRPV4-Knockout-Tiere (TRPV4-KO) wurden entweder mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert oder einer Schein-Infektion unterzogen (PBS). 48 h nach Infektion (p.i., *post infectionem*) erfolgte die Präparation der Tiere mit Entnahme von Blut. Die Analyse der Leukozyten-Subpopulationen wurde mittels Impedanzmessung durchgeführt. Die relativen Anteile der Leukozyten-Subpopulationen (A) und die absoluten Konzentrationen von Granulozyten (B), Lymphozyten (C) und Makrophagen (D) zeigten keine Unterschiede zwischen infizierten TRPV4-KO- und infizierten WT-Tieren. Die Werte sind dargestellt als Einzelwerte (*Scatter Plot*) mit Mittelwerten (Säulen) und SEM (Fehlerbalken). PBS (WT): n=5, PBS (KO): n=6, *S.pn.* (WT): n=9, *S.pn.* (KO): n=7.

5.5 Die pro-inflammatorische humorale Immunantwort nach einer *S. pneumoniae*-Infektion ist bei TRPV4-Knockout-Mäusen reduziert

Es konnte im Abschnitt 5.4 gezeigt werden, dass in der BALF von infizierten TRPV4-KO-Tieren im Vergleich zu infizierten WT-Tieren die neutrophilen Granulozyten in ihrer absoluten Konzentration vermindert waren und Makrophagen einen erhöhten relativen Anteil an den Leukozyten ausmachten. Der Inflammationsprozess in der Lunge wird

durch Zytokine beeinflusst und die Rekrutierung von diesen Leukozyten-Subpopulationen wird durch Chemokine reguliert. Daher sollten die Konzentrationen dieser Mediatoren in der BALF und im Plasma mit Antikörper-basierten Assays wie ELISA und ProcartaPlex® untersucht werden.

In der BALF von *S. pneumoniae*-infizierten TRPV4-KO-Tieren zeigten sich im Vergleich zu infizierten WT-Tieren deutlich reduzierte Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 (Abbildung 12A) und IL-1-beta (Abbildung 12B). Diese Zytokine werden beispielsweise von Epithelzellen und Makrophagen nach Stimulation durch konservierte Pathogen-assoziierte Merkmale sezerniert. Auch die Konzentrationen der Chemokine CXCL1 (Abbildung 12C) und CXCL2 (Abbildung 12D) waren bei infizierten TRPV4-KO-Tieren vermindert. CXCL1 und CXCL2 sind über die Bindung an den Rezeptor CXCR2 an der chemotaktischen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten beteiligt (157). Das Chemokin CXCL5, ebenfalls ein CXCR2-Ligand, zeigte zwar im Mittel eine verminderte Konzentration bei infizierten TRPV4-KO-Tieren im Vergleich zu infizierten WT-Tieren, jedoch war der Unterschied nicht signifikant (Abbildung 12E).

Im Plasma zeigten sich bei TRPV4-KO-Tieren ebenfalls reduzierte Konzentrationen von pro-inflammatorischen Mediatoren, jedoch insgesamt weniger ausgeprägt als in der BALF: Das Zytokin IL-6 (Abbildung 13A) und das Chemokin CXCL2 (Abbildung 13C) waren im Plasma infizierter TRPV4-KO-Tieren signifikant reduziert im Vergleich zu infizierten WT-Tieren. Die Konzentration des Chemokins CXCL1 (Abbildung 13B) wies hingegen keinen Unterschied zwischen infizierten Gruppen auf. Das Zytokin IL-1-beta war im Plasma nicht zu detektieren (Ergebnis nicht dargestellt). Das Chemokin CXCL5 kann nach Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe im Plasma oder Serum nicht sinnvoll bestimmt werden, da die Zentrifugation von Blut zu einer Freisetzung des Mediators aus aktivierten Thrombozyten führt (157).

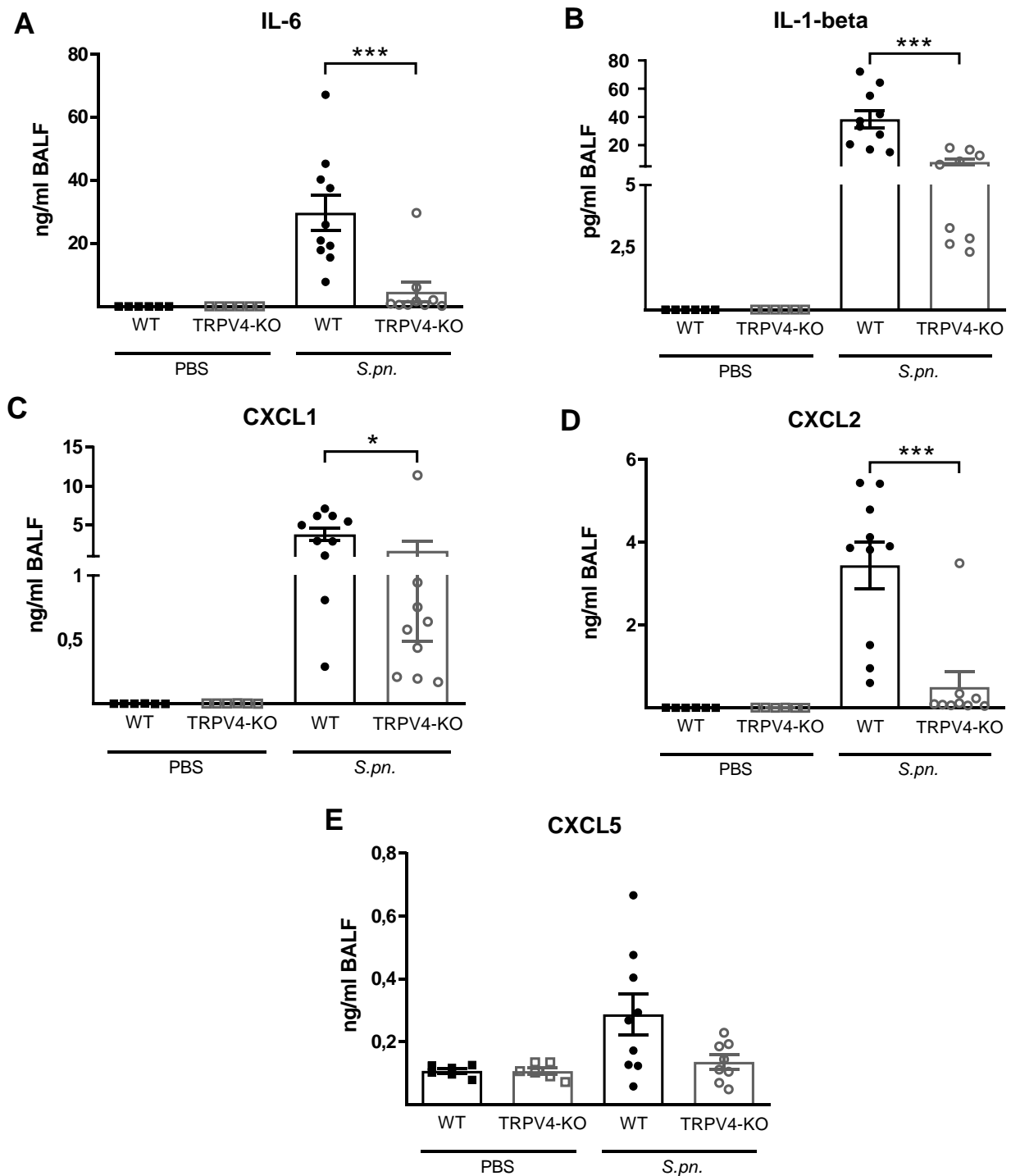


Abbildung 12: Bei infizierten Tieren mit TRPV4-KO zeigen sich reduzierte pro-inflammatorische Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit.

Wildtyp-Tiere (WT) und TRPV4-Knockout-Tiere (TRPV4-KO) wurden entweder mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert oder einer Schein-Infektion unterzogen (PBS). 48 h nach Infektion (p.i., *post infectionem*) erfolgte die Präparation der Tiere mit Entnahme einer bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF). Anschließend wurden Antikörper-basierte Assays (ELISA und ProcartaPlex®) zur Messung der Zytokine IL-6 (A) und IL-1-beta (B) sowie der Chemokine CXCL1 (C), CXCL2 (D) und CXCL5 (E) durchgeführt. Alle Zytokine und Chemokine außer CXCL5 zeigten in der BALF infizierter KO-Tiere signifikant reduzierte Konzentrationen. Die Werte sind dargestellt als Einzelwerte (*Scatter Plot*) mit Mittelwerten

(Säulen) und SEM (Fehlerbalken). PBS (WT): n=6, PBS (KO): n=6, *S.pn.* (WT): n=10 (außer in E: n=9), *S.pn.* (KO): n=9 (außer in E: n=8). Mann-Whitney-U-Test. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

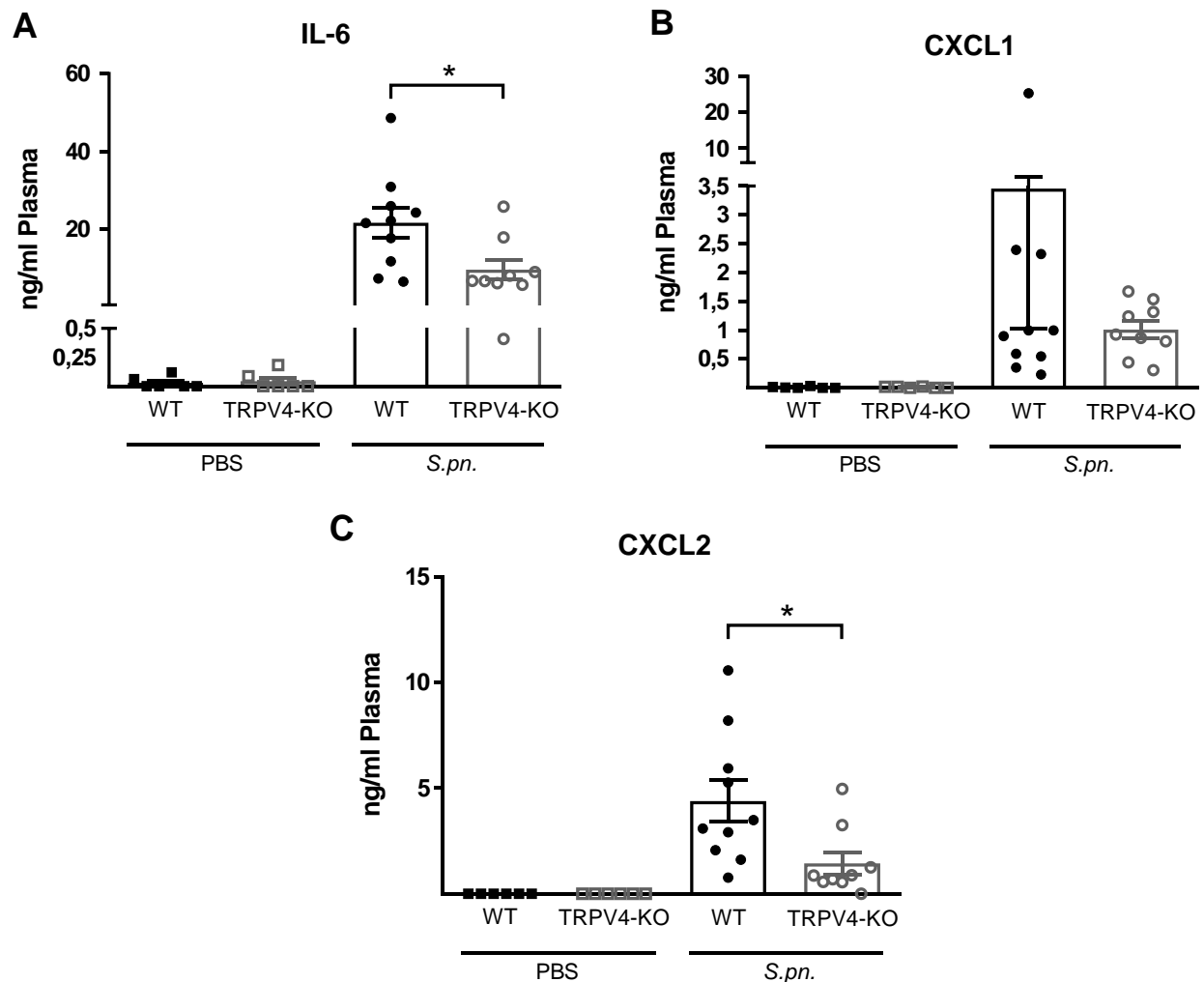


Abbildung 13: Bei infizierten Tieren mit TRPV4-KO zeigen sich im Plasma reduzierte pro-inflammatorische Zytokin- und Chemokin-Konzentrationen.

Wildtyp-Tiere (WT) und TRPV4-Knockout-Tiere (TRPV4-KO) wurden entweder mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert oder einer Schein-Infektion unterzogen (PBS). 48 h nach Infektion (p.i., *post infectionem*) erfolgte die Präparation der Tiere mit einer finalen Blutentnahme und die Abtrennung des Plasmas. Anschließend wurden Antikörper-basierte Assays (ELISA und ProcartaPlex®) zur Messung des Zytokins IL-6 (A) sowie der Chemokine CXCL1 (B) und CXCL2 (C) durchgeführt. Die Konzentrationen von IL-6 und CXCL2 waren im Plasma infizierter KO-Tiere signifikant niedriger. Nicht dargestellt sind die Konzentrationen von IL-1-beta, die sich im Plasma unterhalb der Nachweisgrenze befanden. Die Werte sind dargestellt als Einzelwerte (*Scatter Plot*) mit Mittelwerten (Säulen) und SEM (Fehlerbalken). PBS (WT): n=6, PBS (KO): n=6, *S.pn.* (WT): n=10, *S.pn.* (KO): n=9. Mann-Whitney-U-Test. * $p \leq 0,05$.

5.6 Die Bakterienlast in der Lunge ist nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* bei TRPV4-Knockout-Mäusen reduziert

Die Bakterienlast in der Lunge und im Blut spiegelt die Schwere der Infektion und die Abwehrlage des Organismus wider. Die Analyse dieses Parameters durch die Herstellung von Verdünnungsreihen und Ausstreichen der BALF- und Blutproben auf Agar-Platten zum Zeitpunkt 48 h nach Infektion sollte Aufschluss über diese Faktoren geben. Es zeigten sich sowohl im Blut als auch in der BALF von infizierten TRPV4-KO-Tieren signifikant reduzierte Konzentrationen von Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) von *S. pneumoniae* im Vergleich zu infizierten WT-Tieren.

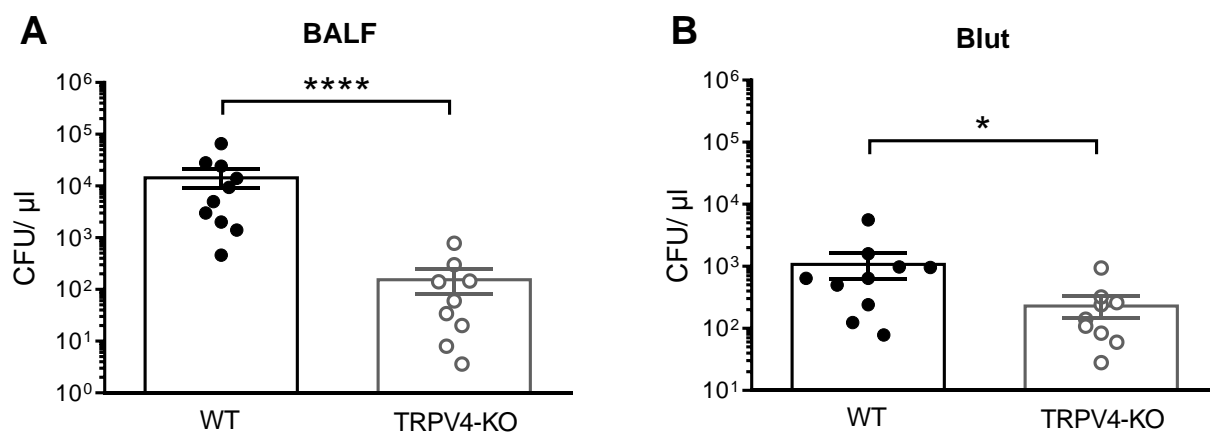


Abbildung 14: Die Bakterienlasten in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit und im Blut sind bei TRPV4-KO-Tieren reduziert.

Aus Wildtyp- (WT) und TRPV4-KO-Tieren (TRPV4-KO), die mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert wurden, wurden 48 h nach Infektion bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit (BALF, A) und Blut (B) entnommen und durch Ausstriche auf Agar-Platten auf ihre Bakterienlasten in Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) pro ml untersucht. Die Werte sind dargestellt als Einzelwerte (*Scatter Plot*) mit Mittelwerten (Säulen), und SEM (Fehlerbalken), die Skala ist logarithmisch. n=10 (A); WT: n=9, KO: n=10 (B). Mann-Whitney-U-Test. *p<0,05, ****p<0,0001.

5.7 Die pulmonale Expression von TRPV4, WNK1 und CFTR ist nach Infektion *in vivo* mit *S. pneumoniae* reduziert

Es konnte entsprechend der Hypothese gezeigt werden, dass TRPV4-KO-Tiere einen attenuierten klinischen Verlauf (Abschnitt 5.1) und eine reduzierte alveolo-kapilläre Barrierestörung (Abschnitt 5.2) bei einer veränderten zellulären und humoralen Immunantwort (Abschnitte 5.4 und 5.5) aufwiesen. Daher stellte sich die Frage, wie eine pulmonale Infektion von *S. pneumoniae* in WT-Tieren die Expression von TRPV4 auf

Protein-Ebene verändert. Dieser Frage wurde mithilfe einer Western Blot-Analyse des TRPV4-Proteins nachgegangen. Dazu wurden WT-Tiere mit *S. pneumoniae* infiziert oder mit PBS einer Schein-Infektion unterzogen und anschließend die Lunge 48 h nach Infektion entnommen und homogenisiert. Aus dem Lungenhomogenat wurde Protein isoliert, das mittels Western Blot untersucht wurde. Es zeigte sich bei den *S. pneumoniae*-infizierten Tieren eine signifikante Reduktion der TRPV4-Expression (relativ zum Referenz-Gen Aktin) im Vergleich zu den mit PBS Schein-infizierten Tieren (Abbildung 15).

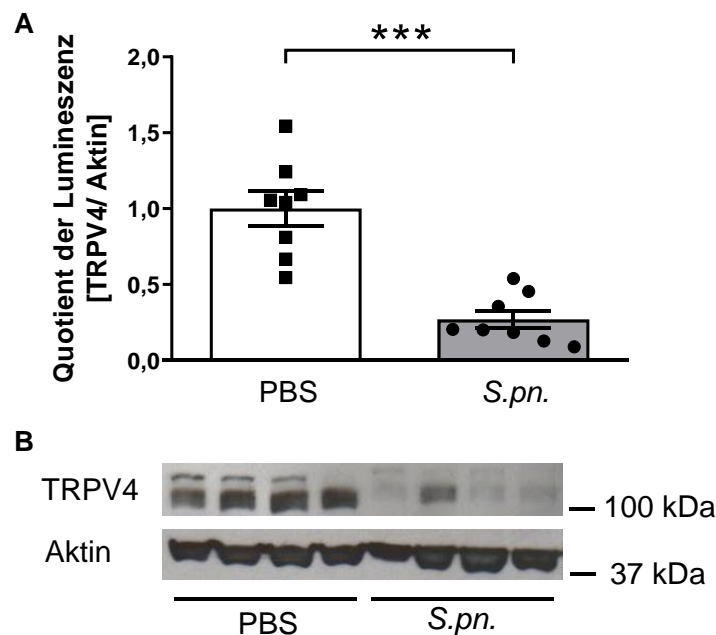


Abbildung 15: Die Expression des TRPV4-Proteins in der Lunge ist bei der murinen pulmonalen Pneumokokken-Infektion reduziert.

Wildtyp-Mäuse wurden entweder mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert oder einer Schein-Infektion unterzogen (PBS). 48 h nach Infektion erfolgte die Präparation der Tiere mit Entnahme des Lungenparenchyms, das anschließend homogenisiert wurde und aus dem die Proteine isoliert wurden. Es erfolgte die Quantifizierung der Proteine TRPV4 und des Referenzproteins Aktin mittels Western Blot. Es wurde der Quotient aus den Lumineszenz-Signalen der beiden Proteine gebildet und zur Expression von Aktin normalisiert (A). Dargestellt ist außerdem ein repräsentativer Western Blot von insgesamt zwei Blots (B). Die Werte sind dargestellt als Einzelwerte (*Scatter Plot*) mit Mittelwerten (Säulen) und SEM (Fehlerbalken). $n=8$. Mann-Whitney-U-Test. *** $p \leq 0,001$.

Bisherigen Arbeiten zufolge soll die Funktion und Expression von TRPV4 von verschiedenen anderen Proteinen beeinflusst werden, wie bereits im Abschnitt 2.5.2 erläutert: Beispielsweise reduziert die Kinase WNK1 die Expression von TRPV4. Das WNK1-Protein wiederum wird durch den Ionenkanal CFTR aktiviert (124, 125). Daher sollte mithilfe der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) untersucht werden,

ob in Tieren, die mit *S. pneumoniae* vom Serotyp 3 infiziert wurden, möglicherweise eine veränderte Expression der Gene CFTR, WNK1 und TRPV4 entsprechend einer Signalkaskade stattfindet. Die Signale der untersuchten Gene wurden im Verhältnis zum Signal des Referenz-Gens GAPDH berechnet. In Einklang mit dem Ergebnis des Western Blots, zeigte sich auch in der qPCR eine signifikant reduzierte Expression von TRPV4 im Lungenhomogenat infizierter WT-Mäuse im Vergleich zu Schein-infizierten Mäusen 48 h nach Infektion (Abbildung 16A). Auch die Gene WNK1 und CFTR waren im Lungenhomogenat infizierter Mäuse geringer exprimiert als in Schein-infizierten Tieren.

Die bisherigen Ergebnisse der Protein- und mRNA-Analysen dieser Arbeit stammten aus dem Mausmodell der Pneumokokken-Pneumonie. Um zu eruieren, ob beim Menschen eine vergleichbare Regulation der Gene CFTR, WNK1 und TRPV4 erfolgt, wurden mittels qPCR Lungenbiopsate untersucht, die *in vitro* mit *S. pneumoniae* vom Serotyp 2 in einer Dosis von 10^2 CFU/ml für 8 h infiziert wurden. Diese infizierten Biopsate wurden freundlicherweise von Dr. Diana Fatykhova aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hocke zur Verfügung gestellt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus dem Mausmodell, zeigte sich auch in den infizierten humanen Lungenbiopsaten eine verminderte Expression von TRPV4 und CFTR (Abbildung 16B). Eine reduzierte Expression, aber kein signifikanter Unterschied fand sich hingegen beim WNK1-Gen.

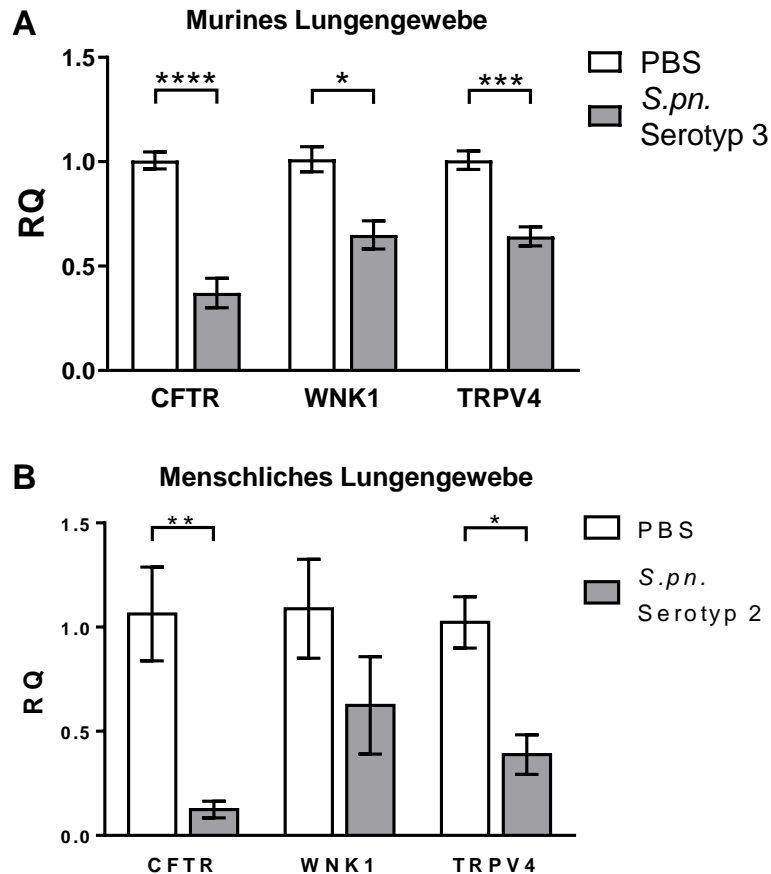


Abbildung 16: Die pulmonale Pneumokokken-Infektion führt zu einer reduzierten mRNA-Expression von CFTR, WNK1 und TRPV4 in der Lunge der Maus und teilweise auch des Menschen.

Wildtyp-Mäuse wurden *in vivo* entweder mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) vom Serotyp 3 infiziert oder einer Schein-Infektion unterzogen (PBS). 48 h nach Infektion erfolgte die Präparation der Tiere mit Entnahme des Lungenparenchyms, das anschließend homogenisiert wurde und aus dem die mRNA isoliert und mittels qPCR (quantitative Polymerase-Kettenreaktion) analysiert wurde (A). Humane Lungenresektate wurden *in vitro* mit *S. pn.* vom Serotyp 2 (10^2 CFU/ml) infiziert und es wurde anschließend ebenfalls eine mRNA-Isolierung und qPCR-Analyse durchgeführt (B). In den beiden Probenarten wurde der mRNA-Gehalt der Gene CFTR, WNK1 und TRPV4 bestimmt und zum konstant exprimierten Referenzgen GAPDH normalisiert. Anschließend erfolgte die Berechnung des RQ-Wertes (*Relative Quantification*), welcher als dimensionslose Größe die Expression eines Gens im Verhältnis zur Expression in der Schein-infizierten Referenzgruppe angibt. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte mit SEM (Fehlerbalken). $n=8$ (A), $n=4$ (B). Multiple t-Tests (bei Analyse mehrerer Gene pro Einzelprobe) und Bonferroni-Dunn-Korrektur für multiples Testen. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

5.8 Die endotheliale Expression von TRPV4 und WNK1 *in vitro* wird durch *S. pneumoniae* nicht verändert

Im Abschnitt 5.7 wurde gezeigt, dass die Expression von TRPV4 auf RNA- und Protein-Ebene und die Expression von WNK1 und CFTR auf RNA-Ebene nach *S. pneumoniae*-

Infektion in murinen Lungenhomogenaten reduziert ist. Teilweise konnte dies auch in humanen Lungenhomogenaten beobachtet werden. Ein Lungenhomogenat besteht aus unterschiedlichen Zellentitäten, wobei die Expression von TRPV4 auf Endothelzellen und Epithelzellen der Lunge und verschiedenen Immunzellen bereits nachgewiesen wurde, wie im Abschnitt 2.5.1 erklärt (105-107). Es sollte daher untersucht werden, ob *in vitro* kultivierte und mit *S. pneumoniae* (Serotyp 2) infizierte humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen, als wesentlicher funktionaler Bestandteil der alveolokapillären Barriere, ein verändertes Expressionsprofil dieser Gene in der qPCR aufweisen und ob dies abhängig vom Zeitpunkt nach der Infektion ist. Weder die Expression von WNK1 noch von TRPV4 unterschieden sich 6 oder 24 h p.i. zwischen mit *S. pneumoniae* infizierten und Schein-infizierten Zellkulturen. Ein Nachweis des Gens CFTR war in diesen Proben nicht möglich.

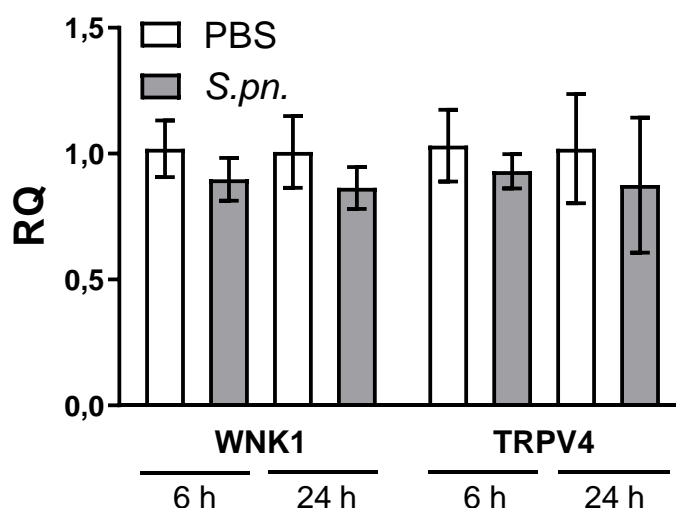


Abbildung 17: Die Expression von WNK1 und TRPV4 in pulmonalen humanen Endothelzellen wird nicht durch eine Infektion *in vitro* mit *S. pneumoniae* beeinflusst.

Die Zellmonolayer von humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen wurden mit *S. pneumoniae* vom Serotyp 2 (*S.pn.*) infiziert und zu den Zeitpunkten 6 h und 24 h nach Infektion homogenisiert und einer mRNA-Isolation unterzogen. Anschließend erfolgte die Bestimmung des mRNA-Gehalts der Gene CFTR, WNK1 und TRPV4 mittels qPCR (quantitative Polymerase-Kettenreaktion). Die Expression der Gene wurde zum konstant exprimierten Referenzgen GAPDH normalisiert. Es erfolgte die Berechnung des RQ-Wertes (*Relative Quantification*), welcher als dimensionslose Größe die Expression eines Gens im Verhältnis zur Expression in der Schein-infizierten Referenzgruppe angibt. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte mit SEM (Fehlerbalken). n=4.

5.9 Der TRPV4-Inhibitor HC-067047 hat bei intraperitonealer Applikation keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf und die Barrierestörung bei Pneumokokken-Pneumonie

Da TRPV4-KO-Tiere mit Pneumokokken-Pneumonie eine reduzierte alveolo-kapilläre Barrierestörung zeigten und einen attenuierten klinischen Verlauf aufwiesen (Abschnitte 5.1 und 5.2), sollte untersucht werden, ob mit einer intraperitonealen Applikation des selektiven TRPV4-Inhibitors HC-067047 in einer Dosierung von 10 mg pro kg Körpergewicht ähnliche Effekte erzielt werden können. Hierfür wurden WT-Tiere vom Stamm C57Bl/6J mit Pneumokokken infiziert und unterschiedlichen Behandlungsschemata unterzogen. Beim therapeutischen Behandlungsschema wurde 24 h vor Infektion und zum Zeitpunkt der Infektion eine Mischung aus Ethanol gelöst in isotonischer Kochsalzlösung (Verdünnungsfaktor 1:11,78) als Placebo-Lösung verabreicht, 24 h nach Infektion wurde die Substanz HC-067047 in der Lösung verabreicht. Beim präventiven Behandlungsschema wurde zu allen drei Zeitpunkten HC-067047 in der Lösung verabreicht und bei der reinen Kontroll-behandelten Gruppe zu allen drei Zeitpunkten die Mischung aus Ethanol und isotonischer Kochsalzlösung appliziert. Es zeigte sich bei keinem der erhobenen Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen der Pneumokokken-infizierten Tiere. In Abbildung 18 ist dargestellt, dass der HSA [BALF/Plasma]-Quotient als Maß für die Permeabilitätsstörung, die Körpertemperatur und die Entwicklung des Körpergewichtes keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen zeigte. Weiterhin konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsschemata in Bezug auf andere erhobene Parameter wie die dynamische Compliance (Abbildung 19), die Konzentrationen der Leukozyten-Subpopulationen in der BALF und im Blut (Abbildung 20 und Abbildung 21) und die Bakterienlasten in der BALF und im Blut (Abbildung 22) beobachtet werden.

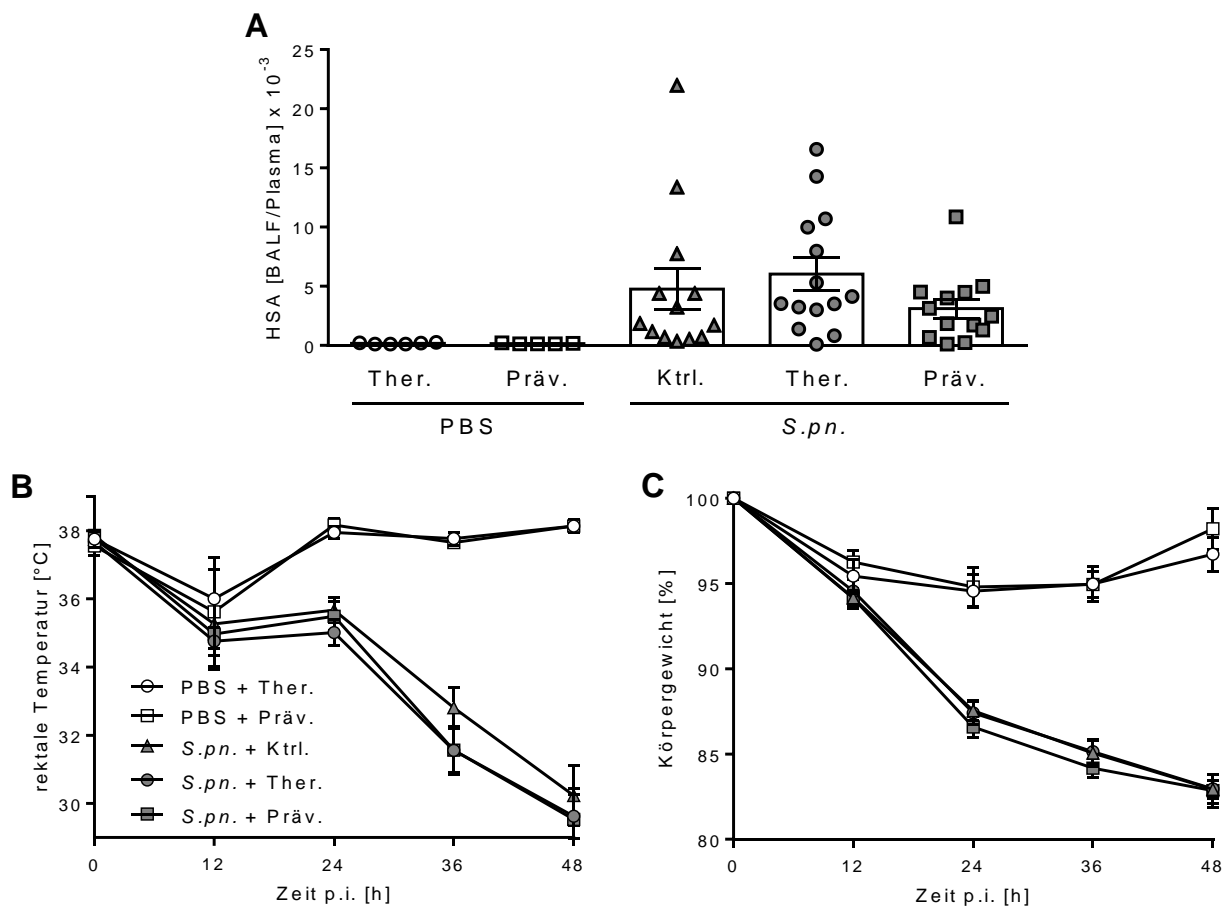


Abbildung 18: Die intraperitoneale Applikation von HC-067047 bei Mäusen attenuiert nicht die Barrierestörung und den Verlauf der Pneumokokken-Pneumonie.

Wildtyp-Tiere wurden entweder mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert oder mit PBS einer Schein-Infektion unterzogen und 24 h vor, zeitgleich mit und 24 h nach der Infektion (p.i., *post infectionem*) entweder mit 10 mg pro kg Körpergewicht HC-067047 oder mit dem entsprechenden Lösungsmittel als Placebo intraperitoneal behandelt. Die Applikation erfolgte entweder in einem therapeutischen Applikationsschema (abgekürzt mit Ther., Applikation von Lösungsmittel 24 h vor Infektion und bei Infektion, HC-067047 zu 24 h p.i.), einem präventiven Applikationsschema (abgekürzt mit Präv., zu allen drei Zeitpunkten HC-067047) oder einem Kontroll-Schema (abgekürzt mit Ktrl., zu allen drei Zeitpunkten Lösungsmittel). Es zeigten sich keine Unterschiede in Bezug auf die alveolo-kapilläre Barrierestörung (A), die Entwicklung der Körpertemperatur (B) und des Gewichtes (C). Die Werte sind in (A) dargestellt als Einzelwerte (*Scatter Plot*) mit Mittelwerten (Säulen) und SEM (Fehlerbalken), in (B) als Mittelwerte mit SEM (Fehlerbalken). PBS+Ther./ Präv.: n=6, *S.pn.*+Ther./ Präv./ Ktrl.: n=16 (A). PBS+Ther.: n=6, PBS+Präv.: n=5 *S.pn.*+Ther./ Präv./ Ktrl.: n=14 (B und C). Kruskal-Wallis Multiple Comparisons Test mit Posthoc-Test nach Dunn zwischen *S.pn.*-Gruppen (A) bzw. *S.pn.*-Gruppen zum Zeitpunkt 48 h (B und C).

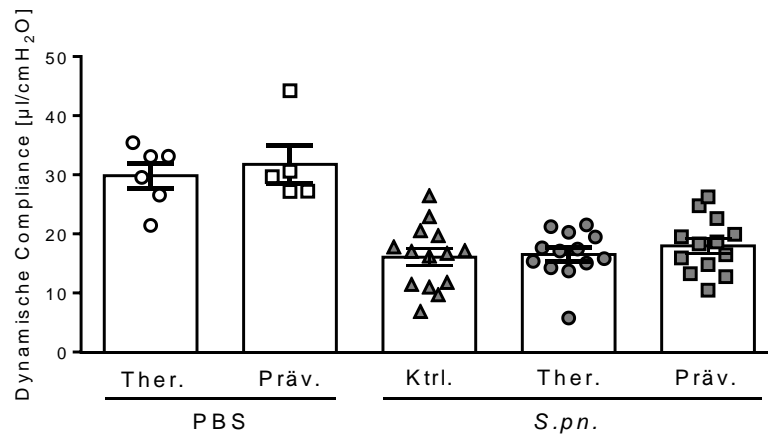


Abbildung 19: Die Verminderung der dynamischen Compliance in der Pneumokokken-Pneumonie der Maus wird durch die intraperitoneale Applikation von HC-067047 nicht attenuiert.

Wildtyp-Tiere wurden entweder mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert oder mit PBS einer Schein-Infektion unterzogen und 24 h vor, zeitgleich mit und 24 h nach der Infektion (p.i., *post infectionem*) entweder mit 10 mg pro kg Körpergewicht HC-067047 oder mit dem entsprechenden Lösungsmittel als Placebo intraperitoneal behandelt. Die Applikation erfolgte entweder in einem therapeutischen Applikationsschema (abgekürzt mit Ther., Applikation von Lösungsmittel 24 h vor Infektion und bei Infektion, HC-067047 zu 24 h p.i.), einem präventiven Applikationsschema (abgekürzt mit Präv., zu allen drei Zeitpunkten HC-067047) oder einem Kontroll-Schema (abgekürzt mit Ktrl., zu allen drei Zeitpunkten Lösungsmittel). Zum Versuchsendpunkt 48 h p.i. wurden die Tiere präpariert und die Lungen der Tiere *ex vivo* in einer IPML-Kammer einer Unterdruck-Beatmung unterzogen, wobei die dynamische Compliance aufgezeichnet wurde. Die Werte sind dargestellt als Einzelwerte (*Scatter Plot*) mit Mittelwerten (Säulen) und SEM (Fehlerbalken). PBS+Ther.: n=6, PBS+Präv.: n=5, *S.pn.*+Ktrl.: n=14, *S.pn.*+Ther./Präv.: n=13. Kruskal-Wallis Multiple Comparisons Test mit Posthoc-Test nach Dunn zwischen *S.pn.*-Gruppen.

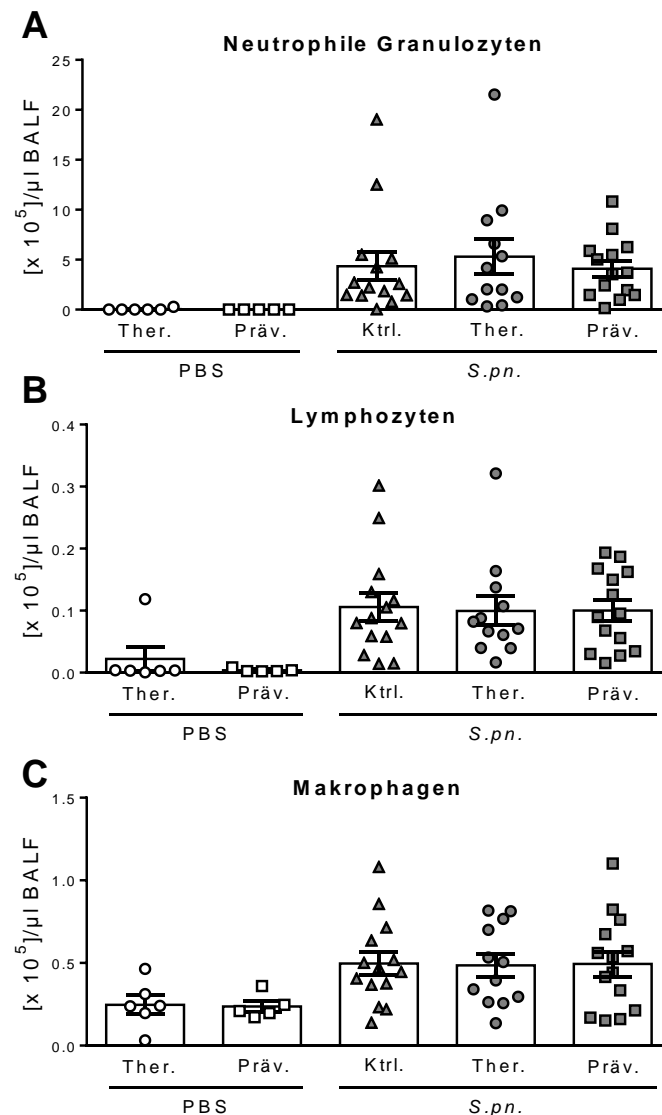


Abbildung 20: Die Konzentrationen der Leukozyten-Subpopulationen in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit werden durch die intraperitoneale Applikation von HC-067047 nicht verändert.

Wildtyp-Tiere wurden entweder mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert oder mit PBS einer Schein-Infektion unterzogen und 24 h vor, zeitgleich mit und 24 h nach der Infektion (p.i., *post infectionem*) entweder mit 10 mg pro kg Körpergewicht HC-067047 oder mit dem entsprechenden Lösungsmittel als Placebo intraperitoneal behandelt. Die Applikation erfolgte entweder in einem therapeutischen Applikationsschema (abgekürzt mit Ther., Applikation von Lösungsmittel 24 h vor Infektion und bei Infektion, HC-067047 zu 24 h p.i.), einem präventiven Applikationsschema (abgekürzt mit Präv., zu allen drei Zeitpunkten HC-067047) oder einem Kontroll-Schema (abgekürzt mit Ktrl., zu allen drei Zeitpunkten Lösungsmittel). 48 h p.i. erfolgte die Präparation der Tiere mit Entnahme einer bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF). Es erfolgte die Differenzierung der Leukozyten-Subpopulationen mithilfe der Durchflusszytometrie in neutrophile Granulozyten (A), Lymphozyten (B) und Makrophagen (C). Die Werte sind dargestellt als Einzelwerte (*Scatter Plot*) mit Mittelwerten (Säulen) und SEM (Fehlerbalken). PBS+Ther: n=6, PBS+Präv: n=5, *S.pn.*+Ther: n=12, *S.pn.*+Präv/ Ktrl.: n=14. Kruskal-Wallis Multiple Comparisons Test mit Posthoc-Test nach Dunn zwischen *S.pn.*-Gruppen.

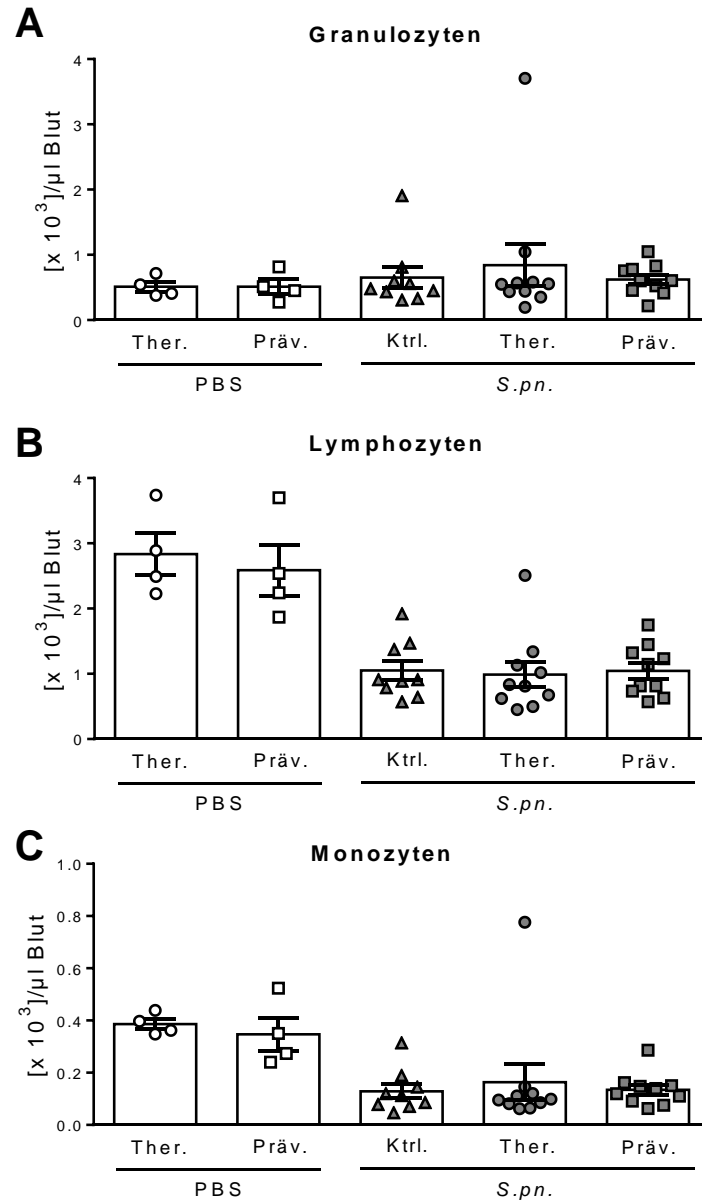


Abbildung 21: Die Konzentrationen der Leukozyten-Subpopulationen im Blut werden durch die intraperitoneale Applikation von HC-067047 nicht verändert.

Wildtyp-Tiere wurden entweder mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert oder mit PBS einer Schein-Infektion unterzogen und 24 h vor, zeitgleich mit und 24 h nach der Infektion (p.i., *post infectionem*) entweder mit 10 mg pro kg Körpergewicht HC-067047 oder mit dem entsprechenden Lösungsmittel als Placebo intraperitoneal behandelt. Die Applikation erfolgte entweder in einem therapeutischen Applikationsschema (abgekürzt mit Ther., Applikation von Lösungsmittel 24 h vor Infektion und bei Infektion, HC-067047 zu 24 h p.i.), einem präventiven Applikationsschema (abgekürzt mit Präv., zu allen drei Zeitpunkten HC-067047) oder einem Kontroll-Schema (abgekürzt mit Ktrl., zu allen drei Zeitpunkten Lösungsmittel). 48 h p.i. erfolgte die Präparation der Tiere mit Entnahme von Blut. Die Leukozyten-Subpopulationen wurden mittels Impedanzmessung in Granulozyten (A), Lymphozyten (B) und Monozyten (C) differenziert. Die Werte sind dargestellt als Einzelwerte (*Scatter Plot*) mit Mittelwerten (Säulen) und SEM (Fehlerbalken). PBS: n=4, *S.pn.*+Ktrl.: n=9, *S.pn.*+Ther./ Präv.: n=10. Kruskal-Wallis Multiple Comparisons Test mit Posthoc-Test nach Dunn zwischen *S.pn.*-Gruppen.

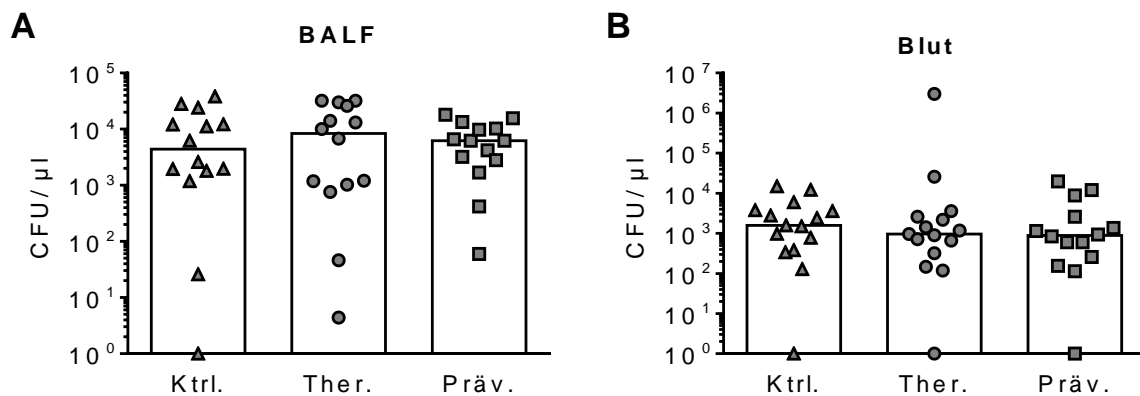


Abbildung 22: Die Bakterienlasten in der murinen Pneumokokken-Pneumonie werden durch die intraperitoneale Applikation von HC-067047 nicht reduziert.

Wildtyp-Tiere wurden mit 5×10^6 CFU *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert und 24 h vor, zeitgleich mit und 24 h nach der Infektion (p.i., *post infectionem*) entweder mit 10 mg pro kg Körpergewicht HC-067047 oder mit dem entsprechenden Lösungsmittel als Placebo intraperitoneal behandelt. Die Applikation erfolgte entweder in einem therapeutischen Applikationsschema (abgekürzt mit Ther., Applikation von Lösungsmittel 24 h vor Infektion und bei Infektion, HC-067047 zu 24 h p.i.), einem präventiven Applikationsschema (abgekürzt mit Präv., zu allen drei Zeitpunkten HC-067047) oder einem Kontroll-Schema (abgekürzt mit Ktrl., zu allen drei Zeitpunkten Lösungsmittel). 48 h nach Infektion wurden die bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit (BALF, A) und Blut (B) entnommen und durch Ausstriche auf Agar-Platten auf ihre Bakterienlasten in Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) pro ml untersucht. Die Werte sind dargestellt als Einzelwerte (*Scatter Plot*) mit Mittelwerten (Säulen), und SEM (Fehlerbalken), die Skala ist logarithmisch. n=14 (A). Ktrl., Ther.: n= 15, Präv.: n=14 (B). Kruskal-Wallis Multiple Comparisons Test mit Posthoc-Test nach Dunn.

6 Diskussion

6.1 Bei Pneumokokken-Pneumonie vermindert ein TRPV4-Knockout die pulmonale Barrierestörung bei gleichbleibender Compliance und beeinflusst zudem den klinischen Verlauf

In der vorliegenden Studie zeigte sich im Mausmodell der Pneumokokken-Pneumonie eine reduzierte alveolo-kapilläre Barrierestörung bei TRPV4-KO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren. Mit dem HSA [BALF/ Plasma]-Quotienten wurde ein solider Parameter analysiert, der die alveolo-kapilläre Barrierestörung zu einem bestimmten Zeitpunkt im Infektionsverlauf widerspiegelt. Dieser Zeitpunkt liegt bei der HSA-Injektion und der Entnahme der BALF und des Blutes, was in der vorliegenden Studie 47 bzw. 48 h p.i. geschah. Andere Studien, welche in Tiermodellen die alveolo-kapilläre Barrierestörung untersuchten, verwendeten mitunter statt des HSA [BALF/ Plasma]-Quotienten die gesamte Proteinmenge in der BALF. Diese muss jedoch eher als Maß für die seit Infektionsbeginn kumulierte Barrierschädigung gesehen werden. Hamanaka und Kolleg*innen konnten 2007 zeigen, dass auch beim Beatmungs-assoziierten Lungenschaden der TRPV4-Kanal zur Entstehung der alveolo-kapillären Permeabilitätsstörung beiträgt (111). Nach der Ventilation mit schädlichen Spitzendrücken zeigten sich in TRPV4-KO-Tieren eine reduzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen im Lungenparenchym und ein verminderter Filtrationskoeffizient, der Rückschlüsse auf die alveolo-kapilläre Permeabilität zulässt. Hamanaka und Kolleg*innen führten jedoch keine Quantifizierungen des Lungenödems oder des HSA [BALF/ Plasma]-Quotienten durch. Michalick und Kolleg*innen zeigten 2017, dass die Barrierestörung beim Beatmungs-induzierten Lungenschaden über eine Phosphorylierung des TRPV4-Kanals durch die Serum Glucocorticoid-regulated Kinase 1 (SGK1) induziert wird (121). Sie quantifizierten den Lungenschaden sowohl über einen Quotienten aus Nass-Gewicht zu Trocken-Gewicht und die Protein-Konzentration in der BALF, als auch über den HSA [BALF/ Plasma]-Quotienten und einen histologischen Schweregrad-Score, wobei alle Parameter bei TRPV4-KO-Tieren signifikant reduziert waren.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an Tieren mit ubiquitärem TRPV4-KO durchgeführt, nicht jedoch an Tieren mit chimärem TRPV4-KO in einzelnen Geweben. In diesem Zusammenhang ist eine Publikation von Yin und Kolleg*innen interessant. Sie untersuchten 2016, inwiefern der TRPV4-Kanal auf neutrophilen

Granulozyten einerseits und im Lungenparenchym andererseits für die Entstehung der alveolo-kapilläre Barrierestörung eine Rolle spielt (34). Intratracheale Salzsäure-Applikation im Mausmodell wird häufig mit der Magensäure-Aspiration, einem wichtigen Auslöser für das ARDS beim Menschen, verglichen. Beim Mausmodell des durch intratracheale Salzsäure-Applikation hervorgerufenen Lungenversagens führte der TRPV4-KO im Lungenparenchym zu einer verminderten Lungengewichtszunahme und verminderten Konzentration von Protein in der BALF, sogar unabhängig vom Genotyp zirkulierender Immunzellen wie neutrophiler Granulozyten. Dahingegen war die Schwere des Lungenschadens, der in isolierten Mäuselungen *ex vivo* durch Platelet-activating Factor (PAF) hervorgerufen wurde, einem bekannten Mediator endothelialer Permeabilitätsstörung (158), abhängig vom Genotyp der zirkulierenden Immunzellen. Die alveolo-kapilläre Barrierestörung war reduziert, wenn die isolierten Lungen mit dem Blut von TRPV4-KO-Mäusen perfundiert wurden im Vergleich zum Blut von WT-Tieren. Das Ergebnis war unabhängig vom Genotyp des Parenchyms der isolierten Lunge. *In vitro* stellten die Autor*innen fest, dass murine neutrophile Granulozyten mit TRPV4-KO eine verminderte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies nach Stimulation mit PAF aufweisen. Dies legt eine wichtige Rolle des TRPV4-Kanals auf Blutzellen wie den neutrophilen Granulozyten für die Entstehung der PAF-induzierten alveolo-kapillären Barrierestörung nahe. Zusammenfassend scheint dem TRPV4-Kanal abhängig vom Auslöser des Lungenversagens entweder auf dem Parenchym oder den zirkulierenden Immunzellen eine entscheidende Rolle zuzukommen. Es wäre für zukünftige Forschungsvorhaben eine interessante Frage, ob beim Lungenversagen durch Pneumokokken-Pneumonie die alveolo-kapilläre Barrierestörung sowohl vom Genotyp des Lungenparenchyms als auch vom Genotyp der zirkulierenden Immunzellen abhängig ist oder ob ein Einflussfaktor überwiegt. Dazu könnten mithilfe von Knochenmark-Irradiation und -Transplantation chimäre Mäuse mit TRPV4-KO im Lungenparenchym und TRPV4-WT-Status im Knochenmark (aus welchem die zirkulierenden Immunzellen stammen) und umgekehrt hergestellt werden. Dann könnte nach der *S. pneumoniae*-Infektion von Tieren mit komplettem TRPV4-KO und von chimären Tieren der HSA [BALF/ Plasma]-Quotient bestimmt und verglichen werden.

Anders als in den bisher genannten Studien und der vorliegenden Arbeit wurde in einem *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)-Pneumonie-Modell bei TRPV4-KO-Tieren eine erhöhte Protein-Konzentration in der BALF und damit eine vermehrte alveolo-kapilläre Permeabilität gefunden (159, 160). Die Autoren bringen dies mit einer

verminderten Phagozytose-Aktivität der TRPV4-defizienten Makrophagen in Zusammenhang. Sie vermuten, dass der TRPV4-Kanal auf Makrophagen die verminderte Elastizität des infizierten Lungenparenchyms detektiert und dass diese Information mit Signalen von Rezeptoren der angeborenen Immunantwort, sogenannten Toll-like Rezeptoren, kombiniert wird. Bei gleichzeitigem Vorliegen von veränderter Gewebeelastizität und der Aktivierung der Immunrezeptoren soll die Phagozytose-Aktivität der Makrophagen gesteigert sein, was die Bakterienlast reduziert. Dahingegen konnte für die Pneumokokken-Pneumonie gezeigt werden, dass die entscheidende Rolle der Makrophagen eher in der Beseitigung von abgestorbenen neutrophilen Granulozyten als in der Bekämpfung der Erreger besteht (161, 162). Möglicherweise können die unterschiedlichen Auswirkungen des TRPV4-KO zwischen dem Modell des *S. pneumoniae*- und des *P. aeruginosa*-induzierten Lungenschadens mit der differentiellen Rolle der Makrophagen erklärt werden. Es wäre möglicherweise aufschlussreich, die Phagozytose-Aktivität von TRPV4-KO- und WT-Makrophagen in Phagozytose-Assays zu vergleichen. Auch könnte man die Erregerdichte von *in vitro* mit *S. pneumoniae* infizierten Alveolar-Epithelzellen untersuchen, die mit TRPV4-KO- oder WT-Makrophagen inkubiert wurden, um Aufschluss über die Rolle des TRPV4-Kanals für die Erreger-Eradikation bei Pneumokokken-Pneumonie zu erhalten.

In der Zusammenschau legen bisherige Arbeiten und die vorliegenden Ergebnisse nahe, dass entweder den TRPV4-Kanälen im Lungenparenchym oder jenen im zirkulierenden Blut eine entscheidende Bedeutung für die Entwicklung der alveolo-kapilläre Barrierestörung zukommen kann, je nach Schädigungsmechanismus der Lunge. Auch scheint der Kanal in den meisten Modellen des akuten Lungenversagens eine Schlüsselrolle für die Entstehung der alveolo-kapillären Barrierestörung zu spielen, wohingegen er im Kontext der *P. aeruginosa*-Pneumonie eine protektive Rolle für die Lungenschädigung zu spielen scheint.

Die Compliance als Maß der elastischen Volumen-Dehnbarkeit der Atemwege ist beim Vorliegen eines Lungenödems, wie es zum Beispiel im Rahmen der Pneumonie auftritt, oft vermindert. Flüssigkeit in den Alveolen reduziert den Effekt von Substanzen wie den Surfactantproteinen A und D, wodurch die Oberflächen-Spannung in den Alveolen erhöht wird und es zur Atelektasen-Bildung und zur Reduktion der Compliance kommt. In der vorliegenden Studie wurde zwar eine reduzierte alveolo-kapilläre Barrierestörung bei infizierten TRPV4-KO-Tieren gefunden, jedoch keine Unterschiede in der dynamisch gemessenen Compliance zwischen infizierten TRPV4-KO- und WT-

Mäusen. Dies könnte dem Zeitpunkt der Compliance-Messung geschuldet sein. Während die Frühphase der Ödem-Bildung durch den Austritt eines Protein-reichen Exsudats gekennzeichnet ist, kommt es in der Spätphase durch den erhöhten kolloid-osmotischen Gradienten zwischen Alveolen und Kapillaren zum Austritt größerer Flüssigkeits-Mengen. Möglicherweise war zum Analysezeitpunkt 48 h nach Infektion in der vorliegenden Arbeit noch kein signifikanter Unterschied zwischen den Compliance-Werten zu erkennen, da noch kein größerer Flüssigkeits-Ausstrom in die Alveolen erfolgt war. Es wäre möglich, dass zu einem späteren Zeitpunkt TRPV4-KO-Tiere im Vergleich zu WT-Tieren aufgrund der reduzierten Barrierestörung ein vermindertes Ödem und damit eine attenuierte Compliance-Reduktion aufweisen könnten.

Von Yin und Kolleg*innen konnte in einem Modell mit einem anderen Schädigungsmechanismus gezeigt werden, dass der TRPV4-Kanal an der Compliance-Verminderung beim akuten Lungenversagen beteiligt ist (34). Zwei Stunden nach intratrachealer Salzsäure-Instillation zeigten Mäuse, die einen TRPV4-KO hatten oder denen ein pharmakologischer TRPV4-Inhibitor verabreicht wurde, eine signifikant höhere Compliance im Vergleich zu WT- oder unbehandelten Tieren nach Salzsäure-Applikation.

Die Wechselwirkung zwischen dem TRPV4-Kanal und den mechanischen Eigenschaften des Lungengewebes wurde auch von Scheraga und Kolleg*innen untersucht. Sie konnten zeigen, dass der TRPV4-Kanal zur Orchestrierung von verschiedenen Signalen der Lungenschädigung beiträgt: die Aktivierung von Makrophagen auf das bakterielle Toxin Lipopolysaccharid erfolgte in Abhängigkeit von der extrazellulären Steifigkeit der Matrix, auf der die Makrophagen kultiviert wurden (163). Es sind weitere Experimente zur Klärung der Frage nötig, ob auch bei der Pneumokokken-Pneumonie der TRPV4-Kanal eine Rolle für die Integration von Lungen-mechanischen und bakteriellen Signalen hat. Auch ist zu beachten, dass das *P. aeruginosa*-Pneumonie-Modell von Scheraga und Kolleg*innen einen chronischen Infektionsverlauf darstellt (siehe Abschnitt 6.1), während in der vorliegenden Arbeit vielmehr ein akut verlaufendes Infektionsmodell untersucht wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Barrierefunktion in der Lunge durch den TRPV4-KO stabilisiert wird, sondern auch der Abfall der Körpertemperatur bei Pneumokokken-Pneumonie durch den TRPV4-KO attenuiert wird. Die Hypothermie ist ein Zeichen des septischen Infektionsverlaufes und ist ein valider Prädiktor für einen schweren Krankheitsverlauf mit hoher Sterblichkeit bei

der murinen Pneumokokken-Pneumonie (164). Die Hypothermie war bei TRPV4-KO-Tieren deutlich reduziert im Vergleich zu WT-Tieren. Dies legt einerseits einen attenuierten Infektionsverlauf nahe und kann andererseits auf eine geringer ausgeprägte Dysregulation der septischen Immunantwort hindeuten. Die Körpertemperatur wird bei Säugetieren in anterioren Regionen des Hypothalamus reguliert und unterliegt dem Einfluss verschiedener neuronaler und humoraler Faktoren. In einem oft verwendeten murinen Modell, in welchem Sepsis durch die Ligatur und Punktion des Zäkums induziert wird, zeigten Tiere mit IL-6-KO im Gegensatz zu WT-Tieren keine Hypothermie in den ersten 24 Stunden (165). In der vorliegenden Studie war die systemische Konzentration von IL-6 bei TRPV4-KO-Tieren mit Pneumokokken-Pneumonie erniedrigt. Dies könnte die verminderte Hypothermie bei diesen Tieren erklären. Dahingegen diskutieren Stewart und Kolleg*innen erhöhte IL-6-Konzentrationen als Folge und nicht zwangsläufig als Ursache von Hypothermie (166). Scheraga und Kolleg*innen veröffentlichten bei ihrer Studie zur Rolle des TRPV4-Kanals im Modell der murinen *P. aeruginosa*-Pneumonie keine Daten zum klinischen Verlauf; die Arbeit ist derzeit nur als Abstract verfügbar (134).

6.2 Der TRPV4-Knockout bewirkt bei Pneumokokken-Pneumonie eine reduzierte humorale und zelluläre Immunantwort bei verminderter Bakterienlast

In der vorliegenden Studie zeigte sich 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* bei den TRPV4-KO-Tieren in der BALF eine abgeschwächte humorale Immunantwort im Vergleich zu den WT-Tieren. So fanden sich in der BALF der infizierten TRPV4-KO-Tiere im Vergleich zur Wildtypgruppe signifikant reduzierte Konzentrationen der Zytokine IL-1-beta, IL-6, CXCL2 und CXCL1. Jedoch war der Unterschied bei CXCL2 stärker ausgeprägt als bei CXCL1. Dies spiegelte sich auch auf Ebene der systemischen Zytokin-Konzentrationen im Plasma der Tiere wider. Hier zeigte sich zwar ebenfalls eine signifikant reduzierte Konzentration der Zytokine IL-6 und CXCL2, jedoch konnte man für CXCL1 im Plasma lediglich eine nicht-signifikant reduzierte Konzentration bei TRPV4-KO-Tieren im Vergleich zur Wildtypgruppe beobachten.

Im verwendeten Modell der murinen Pneumokokken-Pneumonie war die Lunge der Ort der Primärinfektion und somit zumindest in der Frühphase auch die primäre Quelle der Zytokin-Produktion und Ort der Rekrutierung von Zellen des angeborenen

Immunsystems. Erst mit einer gewissen Verzögerung und in geringerer Konzentration kommt es zum Übertritt dieser Mediatoren und Immunzellen in die Blutbahn. Möglicherweise würde eine Analyse des Verlaufs der Pneumokokken-Infektion bei TRPV4-KO-Tieren und WT-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten auch weitere signifikante Unterschiede in Bezug auf die Zytokine und zellulären Bestandteile des Immunsystems zeigen.

Es ist aus anderen Studien mit Pneumokokken-infizierten Mäusen bekannt, dass IL-1-beta eine zentrale Rolle für die Rekrutierung von Immunzellen, wie neutrophile Granulozyten, spielt und dadurch zu einer reduzierten Erregerlast in der Lunge führt (167). Außerdem bewirkt IL-1-beta die NF- κ B-vermittelte Sekretion der Chemokine CXCL1 und CXCL2 aus neutrophilen Granulozyten (167). In der vorliegenden Arbeit waren die Konzentrationen der Chemokine CXCL1 und CXCL2 in der BALF von TRPV4-KO-Tieren reduziert, was mit dem verminderten Stimulus durch IL-6 und IL-1-beta erklärt werden könnte. Es konnte in der Dissertation von Berger gezeigt werden, dass das Chemokin CXCL2 bei *S. pneumoniae*-Infektion *in vitro* vor allem von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen freigesetzt wird, wohingegen CXCL1 von Epithel- und Endothelzellen sowie von alveolären Makrophagen sezerniert wird und die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten aus den Blutgefäßen an den Ort der Inflammation bewirkt (157). Die erniedrigten CXCL1-Konzentrationen in der BALF, jedoch nicht im Plasma von TRPV4-KO-Tieren, sind eine mögliche Ursache für die verminderte Konzentration von neutrophilen Granulozyten in der BALF.

Auch für einen anderen Stimulus des akuten Lungenversagens, der intratrachealen Instillation von Salzsäure, konnten bei TRPV4-KO-Tieren verminderte Konzentrationen der Zytokine IL-1-beta, IL-6 sowie der Chemokine CXCL1 und CXCL2 in der BALF gefunden werden (34). Dies stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie überein und verdeutlicht, dass der TRPV4-Kanal bei einer Reihe von ätiologisch unterschiedlichen Entitäten des akuten Lungenversagens eine vergleichbare Rolle für die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine zu spielen scheint.

Auch Pairet und Kolleg*innen konnten in einem murinen *in vivo*-Modell des Beatmungs-assoziierten Lungenschadens zeigen, dass die Applikation des selektiven TRPV4-Inhibitors GSK2193874 zu einer signifikant reduzierten Sekretion des Chemokins CXCL1 und des Zytokins IL-6 in der BALF führt (168). *In vitro* untersuchten sie die unterschiedlichen Zellpopulationen, welche in der Lunge Zytokine produzieren. Dabei konnten sie zeigen, dass die IL-6-Sekretion aus humanen Lungenepithelzellen,

die mechanischem Dehnungsstress ausgesetzt waren, durch den selektiven TRPV4-Inhibitor signifikant reduziert wird. Die vollständig fehlende Sekretion von IL-6 aus humanen Lungenepithelzellen wurde erst durch die unspezifische Inhibition anderer Ca^{2+} -Kanäle erreicht. Aus Makrophagen scheint die Sekretion von IL-1-beta, IL-6 und anderen Zytokinen hingegen bei Dehnungsstress *in vitro* fast vollständig vom TRPV4-Kanal abhängig zu sein. Auch das Chemokin IL-8 wurde aus Makrophagen unter Dehnungsstress TRPV4-abhängig freigesetzt. Der selektive TRPV4-Induktor GSK1016790A führte *in vitro* bei der Inkubation von humanen Lungenepithelzellen zu einer vermehrten Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-8. Dies ist für die vorliegende Studie von Bedeutung, da humanes IL-8 sich funktionell homolog zu den murinen Chemokinen CXCL1 und CXCL2 verhält (169). Zusammenfassend kann spekuliert werden, dass die Aktivierung von TRPV4 durch verschiedene Stimuli sowohl auf Lungenepithelzellen als auch auf Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen zu einer Sekretion von Zytokinen wie CXCL1, CXCL2, IL-6 und IL-1-beta führt.

Es wäre für zukünftige Experimente interessant, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Alveolar-Epithelzellen mit TRPV4-KO oder nach pharmakologischer Inhibition mit spezifischen TRPV4-Antagonisten *in vitro* mit *S. pneumoniae* zu infizieren und die Konzentration sezernierter Zytokine wie IL-6 oder Chemokine wie CXCL1 und CXCL2 zu messen. Möglicherweise ist die hier gezeigte reduzierte Mediatorfreisetzung bei TRPV4-KO-Mäusen mit Pneumokokken-Pneumonie auf die veränderte Zytokin-Produktion einzelner Zellpopulationen zurückzuführen. Dies könnte Implikationen für die Entwicklung von TRPV4-Inhibitoren zur klinischen Anwendung beim Pneumokokken-induzierten Lungenversagen in Bezug auf die Gewebespezifität und Applikationsform der Substanzen haben.

Herbold und Kolleg*innen (170) untersuchten die Rolle des CXCR2-Rezeptors für die Immunantwort bei Pneumokokken-Pneumonie. CXCR2 ist der Rezeptor für die in den vorliegenden Experimenten untersuchten Zytokine CXCL2 und CXCL1. Mäuse mit CXCR2-KO zeigten nach inhalativer Infektion mit *S. pneumoniae* signifikant verminderte Konzentrationen von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in der BALF im Vergleich zu WT-Tieren, ohne dass sich die Konzentrationen vor der Infektion unterschieden hätten. Ebenfalls zeigten die CXCR2-KO-Tiere eine signifikant erhöhte Bakterienlast und Mortalität. Besonders interessant ist jedoch der Effekt einer partiellen Depletion des CXCR2-Rezeptors. Chimäre Mäuse, die mittels Knochenmark-Irradiation und -Transplantation generiert wurden, zeigten erst bei einem CXCR2-KO-Anteil von

75% im Knochenmark signifikant erhöhte Bakterienkonzentrationen in der BALF. Es kann somit vermutet werden, dass die Aktivierung des CXCR2-Rezeptors durch Liganden wie CXCL1 und CXCL2 und die anschließende Rekrutierung zwar in gewissem Maße für die erfolgreiche Reduktion der pulmonalen Bakterienlast notwendig sind, eine übermäßige Sekretion dieser Zytokine über verstärkte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten jedoch schädigende Effekte (zum Beispiel durch den *Oxidative Burst* mit Sezernierung von freien Radikalen) auf das Lungenparenchym und die Blut-Luft-Schranke bewirken könnte. Dies könnte erklären, warum in der vorliegenden Arbeit bei TRPV4-KO-Tieren trotz einer verminderten humoralen und zellulären Inflammation keine Erhöhung der Bakterienlast im Blut und in der BALF gefunden wurde und die Tiere einen attenuierten klinischen Verlauf aufwiesen: die humoralen Stimuli zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten sind bei TRPV4-KO-Tieren nicht komplett depletiert, sondern in ausreichendem Maße vorhanden, um eine Reduktion der Bakterienlast von *S. pneumoniae* zu gewährleisten. Die Inflammation ist jedoch geringer als bei WT-Tieren ausgeprägt, sodass die schädigenden Effekte einer dysregulierten Immunantwort auf die alveolo-kapilläre Barriere und andere Strukturen wahrscheinlich schwächer ausfallen. Wie die vorliegende Studie verwendeten auch Herbold und Kolleg*innen ein *in vivo*-Mausmodell der Pneumokokken-Pneumonie, jedoch erfolgte die Infektion mit einem anderen Serotyp und mit geringeren Infektionsdosen (3×10^6 statt 5×10^6 CFU) bei einer anderen Applikationsart (inhalativ statt intranasal).

In Bezug auf die zelluläre Immunantwort zeigte sich in der BALF eine Reduktion der absoluten Konzentration neutrophiler Granulozyten. Dieses Ergebnis kann einerseits auf die verminderte Konzentration von IL-1-beta in der BALF zurückgeführt werden, da dieses Zytokin eine wesentliche Rolle in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bei der Pneumokokken-Pneumonie spielt (167). Andererseits ist eine direkte Regulation der neutrophilen Granulozyten durch ihre membranständigen TRPV4-Kanäle denkbar: *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion an Endothelzellen und die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten durch den inflammatorischen Mediator PAF abhängig von TRPV4 ist (34). Es wäre für zukünftige Studien daher interessant, ob auch *S. pneumoniae* selbst oder von ihm sezernierte Substanzen wie Pneumolysin zu einer Aktivierung und Adhäsion von neutrophilen Granulozyten führen, die abhängig von TRPV4 ist.

Yin und Kolleg*innen, die, wie im Abschnitt 6.1 erläutert, die Rolle des TRPV4-Kanals auf unterschiedlichen Gewebearten beim akuten Lungenversagen untersuchten, konnten *in vitro* an neutrophilen Granulozyten mit TRPV4-KO zeigen, dass sie auf den pro-inflammatorischen Stimulus PAF verminderte Aktivierungsmuster wie einen reduzierten intrazellulären Calcium-Anstieg, eine geringere Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und eine reduzierte Adhäsionsneigung aufweisen (34). Dies untermauert die These, dass der TRPV4-Kanal bei unterschiedlichen Entitäten des akuten Lungenversagens nicht nur die Migration von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum und damit ihre Konzentration in der BALF erhöht, sondern auch an der funktionellen Aktivierung der neutrophilen Granulozyten beteiligt ist.

Eine Limitation der vorliegenden Studie ist die Übertragbarkeit von Beobachtungen des murinen Immunsystems auf das des Menschen. Inwieweit der TRPV4-Kanal für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten auch beim Menschen eine Rolle spielt, bedarf weiterer Untersuchungen. *In silico*-Analysen lassen eine deutlich verminderte Expression des TRPV4-Gens in humanen neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu anderen TRP-Genen vermuten (133). Andererseits wurde *in vitro* das Aktivierungsmuster von neutrophilen Granulozyten durch PAF anhand der intrazellulären Calcium-Konzentration und die Wirkung eines TRPV4-Inhibitors untersucht und verglichen (34). Hierbei zeigten sich sowohl an murinen als auch an humanen Zellen signifikant reduzierte Aktivierungsmuster nach Inkubation mit einem TRPV4-Inhibitor.

Für die Leukozyten-Subpopulation der Makrophagen konnte nur eine Reduktion des relativen Anteils dieser Zellpopulation an der Gesamtzahl der Leukozyten in der BALF gefunden werden, und kein signifikanter Unterschied für die absolute Konzentration dieser Zellen. Somit kann das Ergebnis primär als eine Verschiebung der relativen Anteile der Leukozyten-Subpopulationen durch eine verminderte Konzentration an neutrophilen Granulozyten verstanden werden. Jedoch ist die Rolle der Makrophagen für die Entstehung der Barrierestörung bei anderen Ätiologien des akuten Lungenversagens bereits gesichert: beim Beatmungs-induzierten Lungenschaden mit hohen inspiratorischen Spitzendrücken war die Barrierestörung *ex vivo* in TRPV4-KO-Tieren reduziert. Wurde die Lunge eines TRPV4-KO-Tieres jedoch mit WT-Makrophagen perfundiert, zeigte sich eine erhöhte Barrierestörung (107). Zwar waren die absoluten Konzentrationen der Makrophagen in der BALF und im Blut in der vorliegenden Studie nicht verändert, jedoch wären in Zukunft Studien beim

Pneumokokken-induzierten Lungenschaden zu funktionellen Veränderungen von TRPV4-KO-Makrophagen aufschlussreich. Zum Beispiel könnte die Phagozytose-Aktivität von *in vitro* mit *S. pneumoniae* stimulierten TRPV4-KO- und WT-Makrophagen verglichen werden.

Eine neuere Studie von Alpizar und Kolleg*innen (171) zeigt, dass der TRPV4-Kanal auch eine Funktion bei der angeborenen Immunantwort als Pathogen Associated Molecular Pattern-Rezeptor haben könnte. *In vitro* zeigten humane und murine tracheo-bronchiale Epithelzellen nach Stimulation mit LPS ein Reaktionsmuster, das abhängig von TRPV4 war, aber nicht von TLR4 (Toll-like receptor 4), dem bisher favorisierten Rezeptor des angeborenen Immunsystems für LPS. Die Epithelzellen zeigten bei LPS-Stimulation erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentrationen, sezernierten antimikrobielle Substanzen wie Stickstoffmonoxid und hatten eine erhöhte ziliäre Schlagfrequenz (171). Diese Effekte ließen sich durch KO des TRPV4-Gens und pharmakologische Inhibition des Kanals signifikant reduzieren. In Bezug auf *S. pneumoniae* konnte gezeigt werden, dass Lipoproteine in der Membran des Bakteriums eine Rolle für die Aktivierung von TLR2 und damit für die Initiierung der angeborenen Immunantwort spielen (172). Es wäre somit eine interessante Frage, ob der TRPV4-Kanal auch im Falle einer *S. pneumoniae*-Infektion eine Rolle als Pattern Recognition Receptor auf Epithelzellen und auf Zellen des angeborenen Immunsystems spielt. Man könnte dazu anhand des Calcium-Einstroms die Aktivierung von TRPV4 durch bakterielle Lipoproteine bzw. durch Lipoprotein-defiziente Stämme von *S. pneumoniae* untersuchen.

Die vorliegende Arbeit und die oben zitierten Studien zeigten im Wesentlichen eine pro-inflammatorische Wirkung des TRPV4-Kanals. Dahingegen konnte in anderen Infektionsmodellen eine anti-inflammatorische Wirkung des TRPV4-Kanals gefunden werden: Eine *in vivo*-Studie des LPS-induzierten Lungenschadens zeigte bei Mäusen mit TRPV4-Defizienz eine erhöhte Konzentration von neutrophilen Granulozyten in der BALF (171). *In vitro* zeigten die Autoren, dass murine tracheo-bronchiale Epithelzellen mit TRPV4-KO nach LPS-Stimulation signifikant erhöhte Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine CXCL-1 und IL-6 sezernierten. Eine Arbeit von Scheraga und Kolleg*innen konnte zeigen, dass der TRPV4-Kanal *in vivo* bei intratrachealer Infektion mit *P. aeruginosa* eine verminderte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, eine reduzierte Leukozyten-Infiltration und, wie bereits im Abschnitt 6.1 erwähnt, eine erniedrigte alveolo-kapilläre Barrierestörung bewirkt (134). Ebenfalls fanden Scheraga

und Kolleg*innen, dass der TRPV4-Kanal bei mit LPS stimulierten Makrophagen *in vitro* die Synthese des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 steigert und die Synthese des pro-inflammatorisch wirksamen IL-1-beta reduziert sowie die Phagozytose-Aktivität der Makrophagen steigert (163). In ihrem Modell war *P. aeruginosa* in Agarosegel-Kügelchen eingebettet, was einen chronischen Infektionsverlauf hervorruft. Dahingegen war in der vorliegenden Studie das Modell der murinen Pneumokokken-Pneumonie durch einen akuten Infektionsverlauf gekennzeichnet. Außerdem wurden in der Arbeit von Scheraga und Kolleg*innen die BALF-Proben zu späteren Zeitpunkten (drei und acht Tage nach Infektion) als im vorliegenden Modell entnommen.

Zusammenfassend konnten die verschiedenen Studien an Tiermodellen des Lungenschadens entweder anti- oder pro-inflammatorische Auswirkungen einer TRPV4-Aktivierung beobachten. Diese Unterschiede scheinen mit den verschiedenen Auslösern des Lungenschadens und der akuten oder chronischen Verlaufsform in Verbindung zu stehen: Während TRPV4 bei LPS-Applikation und pulmonaler *P. aeruginosa*-Infektion eine anti-inflammatorische Rolle zu spielen scheint, steht beim Beatmungs-assoziierten, Salzsäure-induzierten und durch *S. pneumoniae* ausgelösten Lungenschaden offenbar die pro-inflammatorische Wirkung im Vordergrund. Scheraga und Kolleg*innen (173) spekulierten 2017, dass dies mit einer Integration der Signale vom TRPV4-Kanal und von unterschiedlichen Rezeptoren, die Pathogen- und Gefahr-assoziierte molekulare Muster erkennen (DAMP/ PAMP, *Danger/ Pathogen Associated Molecular Patterns*), in Zusammenhang stünde. Des Weiteren vertreten sie die These, dass im Falle des LPS-induzierten Lungenschadens der TRPV4-Kanal auf Makrophagen für die Sekretion eines anti-inflammatorischen Zytokin-Profiles mit geringeren IL-1-beta- und höheren IL-10-Konzentrationen verantwortlich sei. Diese Wirkung des Kanals sei abhängig von den veränderten mechanischen Eigenschaften des geschädigten Lungenparenchyms. Dahingegen spielen in der vorliegenden Untersuchung des Pneumokokken-induzierten Lungenschadens die Makrophagen für die Erreger-Elimination eine untergeordnete Rolle, wie bereits im Abschnitt 6.1 erwähnt (161, 162). Auch waren keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die absoluten Makrophagen-Konzentrationen in der BALF und im Blut der Tiere zu finden, was als weiterer Hinweis für die differente Rolle dieser Zellpopulation im Vergleich zum LPS-induzierten Lungenversagen gewertet werden könnte.

6.3 Die Pneumokokken-Infektion führt zu einer verminderten pulmonalen Expression von TRPV4, WNK1 und CFTR im Lungenhomogenat von Maus und Mensch

In der vorliegenden Studie zeigten Mäuse mit TRPV4-KO nach Pneumokokken-Pneumonie eine verminderte alveolo-kapilläre Barriestörung bei einem attenuierten klinischen Verlauf. Es wurde in dieser Arbeit auch untersucht, wie sich eine *S. pneumoniae*-Infektion in WT-Tieren auf die Expression verschiedener Gene auswirkt: Untersucht wurden die Gene TRPV4 sowie WNK1, welches die Expression von TRPV4 hemmt (124), und CFTR, welches über eine verminderte intrazelluläre Chlorid-Konzentration wiederum WNK1 aktiviert (125). Es zeigte sich, dass die Expression von CFTR auf mRNA-Ebene reduziert ist, sowohl im Lungenhomogenat von *in vivo* infizierten Mäusen als auch bei *in vitro* infizierten humanen Lungenresektaten. Eine verminderte CFTR-Expression mit konsekutiv erhöhter intrazellulärer Chlorid-Konzentration sollte einen negativen Einfluss auf den Aktivierungszustand von WNK1 haben. Es zeigte sich im Lungenhomogenat infizierter Mäuse tatsächlich eine reduzierte WNK1-Expression auf mRNA-Ebene.

Es wäre zu erwarten gewesen, dass die TRPV4-Expression im Lungenhomogenat von infizierten Tieren erhöht sei, denn erstens zeigten TRPV4-KO-Tiere in der Pneumokokken-Pneumonie einen attenuierten Verlauf des Lungenversagens und der alveolo-kapillären Barriestörung, und zweitens sollte nach bisherigem Kenntnisstand eine reduzierte WNK1-Expression zu einer verstärkten TRPV4-Expression führen (124). Überraschenderweise fand sich jedoch in murinen Lungenhomogenaten von Tieren mit Pneumokokken-Infektion eine signifikant reduzierte Expression von TRPV4 sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene. Auch in *S. pneumoniae*-infizierten humanen Lungenresektaten war die Expression von TRPV4 auf mRNA-Ebene vermindert.

Ein möglicher Erklärungsansatz ist die Regulation der TRPV4-Expression durch eine negative Feedback-Schleife. Bereits 2008 berichteten Yin und Kolleg*innen (131), dass der TRPV4-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom in mikrovaskulären Lungenendothelzellen zu einer gesteigerten Synthese von NO (Stickstoffmonoxid) führt. Dies bewirkt über eine vermehrte Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat eine Hemmung des TRPV4-Kanals, was an einem verminderten intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom erkennbar war. Der Einfluss von NO auf die Expression von TRPV4 wurde nicht untersucht. Die

Autoren schlussfolgern, dass der erhöhte Ca^{2+} -Spiegel nach TRPV4-Aktivierung einerseits die endotheliale Permeabilität steigert, andererseits aber für ein negatives Feedback am TRPV4-Kanal sorgt und die alveolo-kapilläre Barriere vor übermäßiger Permeabilität schützt (131). Es kann spekuliert werden, dass NO nicht nur zu einer funktionellen Inhibition, sondern auch zu einer verminderten Expression von TRPV4 führen könnte. Dies könnte erklären, warum in der vorliegenden Studie einerseits der TRPV4-Kanal in einem *in vivo*-Modell der Pneumokokken-Pneumonie die alveolo-kapilläre Barriere destabilisiert und gleichzeitig Pneumokokken-infizierte WT-Tiere eine verminderte Expression von TRPV4 in der Lunge aufweisen.

Eine weitere mögliche Erklärung für die verminderte TRPV4-Expression bei infizierten Tieren könnte in der veränderten zellulären Zusammensetzung des Lungenhomogenats liegen. Durch eine massive Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lungenstrombahn und ihre intra-alveoläre Migration im Rahmen der Pneumokokken-Pneumonie kommt es zu einer relativen Erhöhung des Anteils von Immunzellen an der Gesamtmasse der Lunge auf Kosten der Lungenparenchymzellen. So könnten möglicherweise stärker TRPV4-exprimierende Endothelzellen und Pneumozyten im Lungenhomogenat einen geringeren Anteil ausmachen zugunsten von vielleicht geringer TRPV4-exprimierenden neutrophilen Granulozyten, sodass in der Summe im Lungenhomogenat infizierter Tiere eine reduzierte TRPV4-Expression zu finden ist. Zwar wurden in den vorliegenden Experimenten die Blutgefäße der Lungen vor Homogenisierung für einige Minuten mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert und somit einige der in der Lungenstrombahn befindlichen Zellen entfernt, jedoch erfolgte dies wahrscheinlich nicht ganz vollständig, und die Zellen, welche sich bereits im Alveolarraum befinden, blieben hiervon auch ausgenommen. Ermert und Kolleg*innen zeigten an *ex vivo* perfundierten Kaninchen-Lungen, dass beträchtliche Mengen an Leukozyten-Subpopulationen in der Lungenstrombahn auch nach Perfusion mit Puffer-Lösung verbleiben (174). Dies würde jedoch nicht erklären, warum auch in humanen Lungenresektaten in der vorliegenden Arbeit eine verminderte mRNA-Expression von TRPV4 und CFTR nach Infektion mit *S. pneumoniae* gefunden wurde. Diese Lungenresektate wurden *in vitro* infiziert, weshalb eine nachträgliche Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten nicht möglich war.

In den hier durchgeführten Analysen wurden also Lungenhomogenate verwendet, in denen sich sowohl Epithelzellen, zum Beispiel in Form der Pneumozyten vom Typ I, als auch Endothelzellen und Immunzellen wie neutrophile Granulozyten und

Makrophagen befinden. Auf all diesen Zell-Entitäten konnte eine Expression des TRPV4-Kanals in der Vergangenheit bereits nachgewiesen werden (105-107). In den hier durchgeführten Analysen konnte in humanen mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen eine Expression von TRPV4 und WNK1 zwar nachgewiesen werden, es fanden sich jedoch keine Unterschiede zwischen mit *S. pneumoniae* infizierten und schein-infizierten Zellen. Eine Limitation der vorliegenden Arbeit ist, dass die *in vivo*-Studien an Mäusen, die *in vitro*-Untersuchung aber an humanen Endothelzellen durchgeführt wurden und somit eine eingeschränkte Vergleichbarkeit vorliegt. Es konnte in der vorliegenden Studie nicht genauer differenziert werden, auf welchen anderen Zell-Entitäten die TRPV4-Expression reduziert, unverändert oder möglicherweise erhöht ist. Hierzu wäre eine Analyse mittels *Single-Cell RNA Sequencing* (scRNA-seq) von Nutzen, da sie im Unterschied zur hier verwendeten RT-PCR-Analyse von Gewebe-Homogenaten die Expression einzelner Zellen untersucht (175). Bei der scRNA-seq erfolgt zuerst eine Isolierung von Einzelzellen, die sich zuvor in einem Gewebeverband befanden. Die Isolierung einzelner Zellen kann durch verschiedene Methoden erfolgen: zum Beispiel mittels enzymatischer Trennung von Zellverbänden in den Lungen-Biopsaten und anschließendem *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS®; auch in dieser Arbeit zur Identifikation der Leukozyten-Subpopulationen verwendet) oder mittels Laser capture microdissection, einer Methode, bei der mithilfe von optischen Merkmalen einzelne Zellen und Zellpopulationen identifiziert und mit der Energie eines Lasers von ihrer Umgebung separiert werden. Anschließend werden bei der DropSeq-Methode (176) die Zellen in sogenannte *Droplets* eingefügt. Dies sind wässrige Partikel im Größenbereich von Pico-Metern, die durch Öl- und Wasser-Phasen entstehen. In jedem *Droplet* befindet sich je eine Zelle. Ein Gemisch aus tausenden *Droplets* kann dann parallel, aber räumlich getrennt einer reversen Transkription und anschließendem *Next Generation Sequencing* zur massiven Amplifikation und Analyse der entstanden cDNA genutzt werden. Die Auswertung der Daten eines scRNA-seq ist aufwändig und erfordert den Abgleich mit bestehenden Gen-Datenbanken. Die Methodik des Single Cell Sequencing ist erst seit einigen Jahren etabliert und stand zum Zeitpunkt der Experimente dieser Arbeit nur in wenigen Laboren zur Verfügung. Sie wäre jedoch eine leistungsstarke Methode, um in der Zukunft die Expressionsprofile der Gene TRPV4, WNK1 und CFTR getrennt in den unterschiedlichen Zellpopulationen der Lunge zu analysieren.

6.4 Implikationen der Rolle von TRPV4 bei der Pneumokokken-Pneumonie für die Behandlung beim Menschen

Es wurde keinerlei Einfluss des selektiven TRPV4-Inhibitors HC-067047 auf den klinischen Verlauf, die Bakterienlast, die Barrierestörung und die humorale sowie zelluläre Immunantwort bei der Pneumokokken-Pneumonie im Mausmodell gefunden. Auch Yin und Kolleg*innen konnten nach der intravenösen Applikation von HC-067047 beim Säure-induzierten Lungenschaden im Mausmodell keine Veränderungen von Parametern wie Compliance, Feucht-/Trockengewicht der Lunge und Proteinmenge in der BALF, die die Schwere des Lungenschadens anzeigen, beobachten (34). Dahingegen konnte im Mausmodell des Beatmungs-induzierten Lungenschadens eine Reduktion des Lungenödems und der Proteinmenge in der BALF gezeigt werden, wenn HC-067047 über zwei Stunden kontinuierlich intravenös infundiert wurde (121). *In vitro*-Studien konnten ebenfalls Effekte von HC-067047 auf neutrophile Granulozyten und die endotheliale Barriere nachweisen, die in der vorliegenden *in vivo*-Studie bei intraperitonealer Applikation dieser Substanz jedoch nicht gezeigt werden konnten (177, 178). Für zukünftige Untersuchungen der Wirksamkeit von HC-067047 beim Pneumokokken-induzierten Lungenschaden wäre demzufolge der Versuch einer kontinuierlichen intravenösen Applikation sinnvoll. Zur Pharmakokinetik der Substanz im Mausmodell gibt es kaum verfügbare Informationen, insbesondere nicht in Bezug auf die Unterschiede zwischen intraperitonealer und intravenöser Applikationsform. Möglicherweise sind weitere intraperitoneale Applikationen zu noch früheren Zeitpunkten nötig, um einen präventiven Effekt von HC-067047 beim Pneumokokken-induzierten Lungenversagen zu zeigen.

Als weitere mögliche Einflussgröße muss die geringe Löslichkeit der Substanz in Wasser gewertet werden. Denkbar wäre eine deutliche Reduktion der Konzentration von in Lösung befindlichem HC-067047, nachdem die in Ethanol gelöste Substanz in 0,9%-Natriumchlorid-Lösung verdünnt wurde. Dies könnte durch Kristallisationsprozesse der Substanz in der physiologischen Kochsalzlösung geschehen sein. Dieser Aufbereitungsschritt war jedoch notwendig, damit die Substanz in einem ausreichend hohen Injektionsvolumen vorlag. Um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden, sollte den Tieren eine möglichst geringe Menge an Ethanol appliziert werden.

Chronische Hypoxie erhöht die TRPV4-Expression und spielt in der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie eine Rolle (179). Dies lässt auch vermuten, dass der TRPV4-Kanal am physiologisch vorkommenden *von Euler-Liljestrand*-Mechanismus beteiligt ist, der für eine höhere Durchblutung stärker ventilierter Lungenareale im Vergleich zu geringer ventilierten sorgt (180). Da das ARDS topografisch unregelmäßige Schädigungsmuster der Lunge hervorruft, könnten der *von Euler-Liljestrand*-Mechanismus und der TRPV4-Kanal für physiologische Kompensationsmechanismen des gestörten Ventilations-Perfusions-Verhältnisses beim ARDS von Bedeutung sein. Dies könnte eine therapeutische Inhibition des TRPV4-Kanals mit der Absicht, die alveolo-kapilläre Barrierestörung beim ARDS zu behandeln, limitieren, wie bereits Morty und Kolleg*innen spekulierten (180). Zukünftige Studien zur Untersuchung von TRPV4-Inhibitoren sollten dies berücksichtigen.

Als weitere zu untersuchende Substanz für die Behandlung der alveolo-kapillären Barrierestörung kommt der TRPV4-Inhibitor GSK2798745 in Betracht. GSK2798745 ist bereits Gegenstand mehrerer klinischer Phase I und II Studien an gesunden und kranken Probanden (143). Ein Vorteil ist die Möglichkeit der oralen Applikation. Es zeigten sich bei gesunden und an chronischer Herzinsuffizienz erkrankten Probanden eine gute Verträglichkeit und stabile Pharmakokinetik (181). Eine Studie zur Behandlung von chronischem Husten mit GSK2798745 wurde abgebrochen, da sich keine Unterschiede zwischen der Placebo- und der Interventions-Gruppe zeigten. Eine Studie zum Einsatz der Substanz beim LPS-induzierten Lungenschaden in gesunden Probanden wurde ebenfalls vorzeitig beendet, da sich keine Tendenz für eine Wirksamkeit zeigte. Eine Studie zur Wirksamkeit bei chronischer Herzinsuffizienz wurde kürzlich beendet und befand sich zum Zeitpunkt dieser Studie noch in der Auswertung. Es ist durchaus denkbar, dass dieser Inhibitor beim Pneumonie-assoziierten Lungenversagen wirksam sein könnte, daher sollte er in zukünftigen Studien in Betracht gezogen werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Erfinanda L, Lin Z, Gutbier B, Reppe K, Lienau J, Hocke A, Liedtke W, Witzenrath M, Kuebler WM. Loss of CFTR causes endothelial barrier failure in pneumonia via inhibition of WNK1 and TRPV4 activation. *European Respiratory Journal* 2017;50(suppl 61):PA1874. doi: 10.1183/1393003.congress-2017.PA1874
2. Schneider B, Gutbier B, Reppe K, Lienau J, Michalik L, Erfinanda L, Lask A, Suttorp N, Kübler WM, Witzenrath M. Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 for the Development of Acute Lung Injury in Pneumococcal Pneumonia. *Pneumologie* 2018;72(S 01):V474. doi: 10.1055/s-0037-1619300
3. Erfinanda L, Schneider B, Gutbier B, Zou L, Reppe K, Lienau J, Hocke AC, Liedtke W, Witzenrath M, Kuebler WM. Loss of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Drives Lung Endothelial Barrier Failure in Pneumonia-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). A51 CRITICAL CARE: SHE BLINDED ME WITH SCIENCE - INSIGHTS FROM EXPERIMENTAL AND ANIMAL STUDIES IN ARDS AND SEPSIS2018:A1851-A51.
4. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie. Thieme 2012:348-365.
5. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. PROMETHEUS Innere Organe: LernAtlas Anatomie. Thieme 2018:136-148.
6. Speckmann EJ, Hescheler J, Köhling R. Physiologie: Das Lehrbuch. Elsevier Health Sciences 2019:454-467.
7. Pape HC. Physiologie. G. Thieme 2014:340-346.
8. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Garau J, Huchon G, Ieven M, Ortqvist A, Schaberg T, Torres A, van der Heijden G, Read R, Verheij TJM. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections - Full version. *Clinical Microbiology and Infection* 2011;17:E1-E59. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03672.x
9. Disease burden and mortality estimates: Summary tables of mortality estimates by cause, age and sex, globally and by region, 2000–2016 [Internetseite]. WHO 2016. Abgerufen am 19.10.2020 von: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/
10. Die 10 häufigsten Todesursachen insgesamt - Sterbefälle insgesamt nach der ICD-10 im Jahr 2015 [Internetseite]. Statistisches Bundesamt 2015. Abgerufen am 05.04.2017 von: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>
11. Ewig S, Höffken G, Kern WV, Rohde GG, Flick H, Krause R, Ott S. S3-Leitlinie Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention – Update 2016. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, Deutsche Gesellschaft für Infektiologie, Kompetenznetzwerk CAPNETZ, Österreichische

- Gesellschaft für Pneumologie, Österreichische Gesellschaft für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin, Schweizerische Gesellschaft für Pneumologie (Hrsg) 2016:9-36.
12. Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax* 2012;67(1):71-9. doi: 10.1136/thx.2009.129502
13. Welte T, Marre R, Suttorp N, Kompetenznetzwerk "Ambulant Erworbene P. [What is new in the treatment of community-acquired pneumonia?]. *Med Klin (Munich)* 2006;101(4):313-20. doi: 10.1007/s00063-006-1040-x
14. Calix JJ, Nahm MH. A New Pneumococcal Serotype, 11E, Has a Variably Inactivated *wcjE* Gene. *The Journal of Infectious Diseases* 2010;202(1):29-38. doi: 10.1086/653123
15. Ständige Impfkommision am Robert Koch Institut. *Epidemiologisches Bulletin*. 2016;34:303.
16. Ewig S, Birkner N, Strauss R, Schaefer E, Pauletzki J, Bischoff H, Schraeder P, Welte T, Hoeffken G. New perspectives on community-acquired pneumonia in 388 406 patients. Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax* 2009;64(12):1062-69. doi: 10.1136/thx.2008.109785
17. Moore MR, Gertz RE, Jr., Woodbury RL, Barkocy-Gallagher GA, Schaffner W, Lexau C, Gershman K, Reingold A, Farley M, Harrison LH, Hadler JL, Bennett NM, Thomas AR, McGee L, Pilishvili T, Brueggemann AB, Whitney CG, Jorgensen JH, Beall B. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. *J Infect Dis* 2008;197(7):1016-27. doi: 10.1086/528996
18. Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. Capsule Enhances Pneumococcal Colonization by Limiting Mucus-Mediated Clearance. *Infection and immunity* 2007;75(1):83-90. doi: 10.1128/IAI.01475-06
19. Simpson SQ, Singh R, Bice DE. Heat-killed pneumococci and pneumococcal capsular polysaccharides stimulate tumor necrosis factor-alpha production by murine macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1994;10(3):284-9. doi: 10.1165/ajrcmb.10.3.8117447
20. Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, Hemsley C, Albiger B, Kanth A, Dahlberg S, Fernebro J, Moschioni M, Masignani V, Hultenby K, Taddei AR, Beiter K, Wartha F, von Euler A, Covacci A, Holden DW, Normark S, Rappuoli R, Henriques-Normark B. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(8):2857-62. doi: 10.1073/pnas.0511017103
21. Poulsen K, Reinholdt J, Kilian M. Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* immunoglobulin A1 protease gene (*iga*) and its translation product. *Infection and immunity* 1996;64(10):3957-66.
22. Dockrell DH, Whyte MKB, Mitchell TJ. Pneumococcal Pneumonia: Mechanisms of Infection and Resolution. *Chest* 2012;142(2):482-91. doi: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.12-0210>

23. Feldman C, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ, Read RC, Todd HC, Cole PJ, Wilson R. The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microbial pathogenesis* 1990;9(4):275-84.
24. Bonev BB, Gilbert RJ, Andrew PW, Byron O, Watts A. Structural analysis of the protein/lipid complexes associated with pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *The Journal of biological chemistry* 2001;276(8):5714-9. doi: 10.1074/jbc.M005126200
25. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(4):1966-71. doi: 10.1073/pnas.0435928100
26. Witznath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B. The NLRP3 Inflammasome Is Differentially Activated by Pneumolysin Variants and Contributes to Host Defense in Pneumococcal Pneumonia. *The Journal of Immunology* 2011;187(1):434-40. doi: 10.4049/jimmunol.1003143
27. McNeela EA, Burke Á, Neill DR, Baxter C, Fernandes VE, Ferreira D, Smeaton S, El-Rachkidy R, McLoughlin RM, Mori A, Moran B, Fitzgerald KA, Tschopp J, Pétrilli V, Andrew PW, Kadioglu A, Lavelle EC. Pneumolysin Activates the NLRP3 Inflammasome and Promotes Proinflammatory Cytokines Independently of TLR4. *PLOS Pathogens* 2010;6(11):e1001191. doi: 10.1371/journal.ppat.1001191
28. Harvey RM, Ogunniyi AD, Chen AY, Paton JC. Pneumolysin with low hemolytic activity confers an early growth advantage to *Streptococcus pneumoniae* in the blood. *Infection and immunity* 2011;79(10):4122-30. doi: 10.1128/iai.05418-11
29. Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, Porat N, Shainberg B, Pinco E, Keller N, Rubinstein E. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family settings. *Clin Infect Dis* 2004;38(5):632-9. doi: 10.1086/381547
30. Sjöstrom K, Spindler C, Ortqvist A, Kalin M, Sandgren A, Kuhlmann-Berenzon S, Henriques-Normark B. Clonal and capsular types decide whether pneumococci will act as a primary or opportunistic pathogen. *Clin Infect Dis* 2006;42(4):451-9. doi: 10.1086/499242
31. Weinberger DM, Harboe ZB, Sanders EA, Ndiritu M, Klugman KP, Ruckinger S, Dagan R, Adegbola R, Cutts F, Johnson HL, O'Brien KL, Scott JA, Lipsitch M. Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2010;51(6):692-9. doi: 10.1086/655828
32. Janoff EN, Rubins JB. Invasive pneumococcal disease in the immunocompromised host. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)* 1997;3(3):215-32. doi: 10.1089/mdr.1997.3.215

33. Askim A, Mehl A, Paulsen J, DeWan AT, Vestrheim DF, Asvold BO, Damas JK, Solligard E. Epidemiology and outcome of sepsis in adult patients with *Streptococcus pneumoniae* infection in a Norwegian county 1993-2011: an observational study. *BMC infectious diseases* 2016;16:223. doi: 10.1186/s12879-016-1553-8
34. Yin J, Michalick L, Tang C, Tabuchi A, Goldenberg N, Dan Q, Awwad K, Wang L, Erfinanda L, Nouailles G, Witzenrath M, Vogelzang A, Lv L, Lee WL, Zhang H, Rotstein O, Kapus A, Szaszi K, Fleming I, Liedtke WB, Kuppe H, Kuebler WM. Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 in Neutrophil Activation and Acute Lung Injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2016;54(3):370-83. doi: 10.1165/rcmb.2014-0225OC
35. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *Jama* 2012;307(23):2526-33. doi: 10.1001/jama.2012.5669
36. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. Incidence and outcomes of acute lung injury. *The New England journal of medicine* 2005;353(16):1685-93. doi: 10.1056/NEJMoa050333
37. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, Gattinoni L, van Haren F, Larsson A, McAuley DF, Ranieri M, Rubenfeld G, Thompson BT, Wrigge H, Slutsky AS, Pesenti A. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *Jama* 2016;315(8):788-800. doi: 10.1001/jama.2016.0291
38. Hendrickson CM, Howard BM, Kornblith LZ, Conroy AS, Nelson MF, Zhuo H, Liu KD, Manley GT, Matthay MA, Calfee CS, Cohen MJ. The acute respiratory distress syndrome following isolated severe traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg* 2016;80(6):989-97. doi: 10.1097/ta.0000000000000982
39. Elder AS, Saccone GT, Dixon DL. Lung injury in acute pancreatitis: mechanisms underlying augmented secondary injury. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP)* [et al] 2012;12(1):49-56. doi: 10.1016/j.pan.2011.12.012
40. Michalska A, Jurczyk AP, Machala W, Szram S, Berent J. [Pulmonary contusion and acute respiratory distress syndrome (ARDS) as complications of blunt chest trauma]. *Archiwum medycyny sadowej i kryminologii* 2009;59(2):148-54.
41. Gregorakos L, Markou N, Psalida V, Kanakaki M, Alexopoulou A, Sotiriou E, Damianos A, Myrianthefs P. Near-drowning: clinical course of lung injury in adults. *Lung* 2009;187(2):93-7. doi: 10.1007/s00408-008-9132-4
42. Putzke C, Max M, Geldner G, Wulf H. [Severe ARDS following perioperative aspiration of gastric content associated with the use of a "ProSeal" laryngeal mask airway]. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* 2005;40(8):487-9. doi: 10.1055/s-2004-826198
43. Faymonville ME, Lamy M, Duchateau J, Adam A, Deby-Dupont G, Micheels J, Jacquemin D. Biochemical Mediators in Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)

after Burning Injury. In: Paubert-Braquet M, Braquet P, Demling B, et al., eds. *Lipid Mediators in the Immunology of Shock*. Boston, MA: Springer US 1987:43-55.

44. Mikkelsen ME, Shah CV, Meyer NJ, Gaieski DF, Lyon S, Miltiades AN, Goyal M, Fuchs BD, Bellamy SL, Christie JD. The epidemiology of acute respiratory distress syndrome in patients presenting to the emergency department with severe sepsis. *Shock (Augusta, Ga)* 2013;40(5):375-81. doi: 10.1097/SHK.0b013e3182a64682

45. Hardaway RM. A brief overview of acute respiratory distress syndrome. *World journal of surgery* 2006;30(10):1829-34; discussion 35. doi: 10.1007/s00268-006-0030-8

46. Umbrello M, Formenti P, Bolgiaghi L, Chiumello D. Current Concepts of ARDS: A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2017;18(1):64. doi: 10.3390/ijms18010064

47. Thille AW, Esteban A, Fernandez-Segoviano P, Rodriguez JM, Aramburu JA, Vargas-Erazuriz P, Martin-Pellicer A, Lorente JA, Frutos-Vivar F. Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies. *The Lancet Respiratory medicine* 2013;1(5):395-401. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70053-5

48. Bachofen M, Weibel ER. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *The American review of respiratory disease* 1977;116(4):589-615. doi: 10.1164/arrd.1977.116.4.589

49. Pugin J, Verghese G, Widmer MC, Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine* 1999;27(2):304-12.

50. Anderson WR, Thielen K. Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light, scanning, and transmission electron microscopy. *Ultrastructural pathology* 1992;16(6):615-28.

51. Martin C, Papazian L, Payan MJ, Saux P, Gouin F. Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome. A study in mechanically ventilated patients. *Chest* 1995;107(1):196-200.

52. Rocco PR, Souza AB, Faffe DS, Passaro CP, Santos FB, Negri EM, Lima JG, Contador RS, Capelozzi VL, Zin WA. Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(6):677-84. doi: 10.1164/rccm.200302-256OC

53. Gunther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, Temmesfeld B, Walmrath D, Morr H, Seeger W. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(1):176-84. doi: 10.1164/ajrccm.153.1.8542113

54. Gattinoni L, Pesenti A. The concept of "baby lung". *Intensive Care Med* 2005;31(6):776-84. doi: 10.1007/s00134-005-2627-z

55. Laurent T, Markert M, Feihl F, Schaller MD, Perret C. Oxidant-antioxidant balance in granulocytes during ARDS. Effect of N-acetylcysteine. *Chest* 1996;109(1):163-6.
56. Martin TR. Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture. *Chest* 1999;116(1 Suppl):2s-8s.
57. Goodman ER, Kleinstein E, Fusco AM, Quinlan DP, Lavery R, Livingston DH, Deitch EA, Hauser CJ. Role of interleukin 8 in the genesis of acute respiratory distress syndrome through an effect on neutrophil apoptosis. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 1998;133(11):1234-9.
58. Calfee CS, Janz DR, Bernard GR, May AK, Kangelaris KN, Matthay MA, Ware LB. Distinct molecular phenotypes of direct vs indirect ARDS in single-center and multicenter studies. *Chest* 2015;147(6):1539-48. doi: 10.1378/chest.14-2454
59. Muller-Redetzky H, Lienau J, Suttorp N, Witzenrath M. Therapeutic strategies in pneumonia: going beyond antibiotics. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 2015;24(137):516-24. doi: 10.1183/16000617.0034-2015
60. Wiedemann HP, Wheeler AP, Bernard GR, Thompson BT, Hayden D, deBoisblanc B, Connors AF, Jr., Hite RD, Harabin AL. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *The New England journal of medicine* 2006;354(24):2564-75. doi: 10.1056/NEJMoa062200
61. Papazian L, Forel JM, Gacouin A, Penot-Ragon C, Perrin G, Loundou A, Jaber S, Arnal JM, Perez D, Seghboyan JM, Constantin JM, Courant P, Lefrant JY, Guerin C, Prat G, Morange S, Roch A. Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine* 2010;363(12):1107-16. doi: 10.1056/NEJMoa1005372
62. Kim W-Y, Hong S-B. Sepsis and Acute Respiratory Distress Syndrome: Recent Update. *Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2016;79(2):53-57. doi: 10.4046/trd.2016.79.2.53
63. Brower RG, Matthay MA, Morris A, Schoenfeld D, Thompson BT, Wheeler A. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine* 2000;342(18):1301-8. doi: 10.1056/nejm200005043421801
64. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, Takagaki TY, Carvalho CR. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine* 1998;338(6):347-54. doi: 10.1056/nejm199802053380602
65. Calfee CS, Delucchi K, Parsons PE, Thompson BT, Ware LB, Matthay MA. Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: latent class analysis of data from two randomised controlled trials. *The Lancet Respiratory medicine* 2014;2(8):611-20. doi: 10.1016/s2213-2600(14)70097-9

66. Taylor RW, Zimmerman JL, Dellinger RP, Straube RC, Criner GJ, Davis K, Jr., Kelly KM, Smith TC, Small RJ. Low-dose inhaled nitric oxide in patients with acute lung injury: a randomized controlled trial. *Jama* 2004;291(13):1603-9. doi: 10.1001/jama.291.13.1603
67. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Confalonieri M, De Gaudio R, Keh D, Kupfer Y, Oppert M, Meduri GU. Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *Jama* 2009;301(22):2362-75. doi: 10.1001/jama.2009.815
68. Barrowcliffe MP, Jones JG. Solute permeability of the alveolar capillary barrier. *Thorax* 1987;42(1):1-10.
69. Garcia JG, Schaphorst KL. Regulation of endothelial cell gap formation and paracellular permeability. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 1995;43(2):117-26.
70. Dudek SM, Garcia JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 2001;91(4):1487-500.
71. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of Cell Science* 2008;121(13):2115-22. doi: 10.1242/jcs.017897
72. Vestweber D, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends in Cell Biology*;19(1):8-15. doi: 10.1016/j.tcb.2008.10.001
73. Simon AM, Goodenough DA. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol* 1998;8(12):477-83.
74. Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R, Engel J. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *European journal of biochemistry* 1994;223(3):1019-26.
75. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 2004;84(3):869-901. doi: 10.1152/physrev.00035.2003
76. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999;96(17):9815-20. doi: 10.1073/pnas.96.17.9815
77. Principal interactions of structural proteins at cadherin-based adherens junction. Freigegeben unter der „Public Domain“-Lizenz zur Verwendung für jeden Zweck.: Mariana Ruiz in Wikipedia Commons 2010. Abgerufen am 25.10.2020 von: https://en.wikipedia.org/wiki/Adherens_junction#/media/File:Adherens_Junctions_structural_proteins.svg

78. Broermann A, Winderlich M, Block H, Frye M, Rossaint J, Zarbock A, Cagna G, Linnepe R, Schulte D, Nottebaum AF, Vestweber D. Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 2011;208(12):2393-401. doi: 10.1084/jem.20110525
79. Shasby DM, Shasby SS, Sullivan JM, Peach MJ. Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability. *Circulation research* 1982;51(5):657-61.
80. Nguyen LT, Lum H, Tiruppathi C, Malik AB. Site-specific thrombin receptor antibodies inhibit Ca²⁺ signaling and increased endothelial permeability. *The American journal of physiology* 1997;273(5 Pt 1):C1756-63.
81. Sandoval R, Malik AB, Minshall RD, Kouklis P, Ellis CA, Tiruppathi C. Ca²⁺ signalling and PKC α activate increased endothelial permeability by disassembly of VE—cadherin junctions. *The Journal of Physiology* 2001;533(Pt 2):433-45. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0433a.x
82. Ying X, Minamiya Y, Fu C, Bhattacharya J. Ca²⁺ waves in lung capillary endothelium. *Circulation research* 1996;79(4):898-908.
83. Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, Malik AB. Role of Ca²⁺ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascular Pharmacology* 2002;39(4–5):173-85. doi: [https://doi.org/10.1016/S1537-1891\(03\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S1537-1891(03)00007-7)
84. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *Journal of Cell Science* 2012;125(8):1855-64. doi: 10.1242/jcs.098087
85. Shen Q, Rigor RR, Pivetti CD, Wu MH, Yuan SY. Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function. *Cardiovascular research* 2010;87(2):272-80. doi: 10.1093/cvr/cvq144
86. Tinsley JH, De Lanerolle P, Wilson E, Ma W, Yuan SY. Myosin light chain kinase transference induces myosin light chain activation and endothelial hyperpermeability. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2000;279(4):C1285-C89.
87. Ramchandran R, Mehta D, Vogel SM, Mirza MK, Kouklis P, Malik AB. Critical role of Cdc42 in mediating endothelial barrier protection in vivo. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2008;295(2):L363-L69.
88. Baumer Y, Spindler V, Werthmann RC, Bunemann M, Waschke J. Role of Rac 1 and cAMP in endothelial barrier stabilization and thrombin-induced barrier breakdown. *Journal of cellular physiology* 2009;220(3):716-26. doi: 10.1002/jcp.21819
89. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase). *Science* 1996;273(5272):245-48. doi: 10.1126/science.273.5272.245

90. Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, Kaibuchi K, Garcia JG, Verin AD. Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvascular research* 2004;67(1):64-77.
91. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992;70(3):389-99.
92. Hippenstiel S, Tannert-Otto S, Vollrath N, Krull M, Just I, Aktories K, von Eichel-Streiber C, Suttorp N. Glucosylation of small GTP-binding Rho proteins disrupts endothelial barrier function. *The American journal of physiology* 1997;272(1 Pt 1):L38-43.
93. Sanchez T, Skoura A, Wu MT, Casserly B, Harrington EO, Hla T. Induction of Vascular Permeability by the Sphingosine-1-Phosphate Receptor-2 (S1P2R) and its Downstream Effectors ROCK and PTEN. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2007;27(6):1312-18. doi: 10.1161/atvbaha.107.143735
94. Lucas R, Yang G, Gorshkov BA, Zemskov EA, Sridhar S, Umapathy NS, Jezierska-Drutel A, Alieva IB, Leustik M, Hossain H, Fischer B, Catravas JD, Verin AD, Pittet JF, Caldwell RB, Mitchell TJ, Cederbaum SD, Fulton DJ, Matthay MA, Caldwell RW, Romero MJ, Chakraborty T. Protein kinase C- α and arginase I mediate pneumolysin-induced pulmonary endothelial hyperpermeability. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2012;47(4):445-53. doi: 10.1165/rcmb.2011-0332OC
95. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997;389(6654):990-4. doi: 10.1038/40187
96. Jin L, Ying Z, Webb RC. Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2004;287(4):H1495-500. doi: 10.1152/ajpheart.01006.2003
97. Mong PY, Wang Q. Activation of Rho Kinase Isoforms in Lung Endothelial Cells during Inflammation. *The Journal of Immunology* 2009;182(4):2385-94. doi: 10.4049/jimmunol.0802811
98. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome biology* 2011;12(3):218. doi: 10.1186/gb-2011-12-3-218
99. Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 1969;224(5216):285-7.
100. Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nature cell biology* 2000;2(10):695-702. doi: 10.1038/35036318
101. Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, AndrejŠali, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S. Vanilloid Receptor-Related Osmotically Activated Channel

(VR-OAC), a Candidate Vertebrate Osmoreceptor. *Cell* 2000;103(3):525-35. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00143-4

102. Delany NS, Hurle M, Facer P, Alnadaf T, Plumpton C, Kinghorn I, See CG, Costigan M, Anand P, Woolf CJ, Crowther D, Sanseau P, Tate SN. Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiological genomics* 2001;4(3):165-74.

103. White JP, Cibelli M, Urban L, Nilius B, McGeown JG, Nagy I. TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. *Physiol Rev* 2016;96(3):911-73. doi: 10.1152/physrev.00016.2015

104. Kunert-Keil C, Bisping F, Krüger J, Brinkmeier H. Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* 2006;7:159-59. doi: 10.1186/1471-2164-7-159

105. Alvarez DF, King JA, Weber D, Addison E, Liedtke W, Townsley MI. Transient receptor potential vanilloid 4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury. *Circulation research* 2006;99(9):988-95. doi: 10.1161/01.res.0000247065.11756.19

106. Damann N, Owsianik G, Li S, Poll C, Nilius B. The calcium-conducting ion channel transient receptor potential canonical 6 is involved in macrophage inflammatory protein-2-induced migration of mouse neutrophils. *Acta physiologica (Oxford, England)* 2009;195(1):3-11. doi: 10.1111/j.1748-1716.2008.01918.x

107. Hamanaka K, Jian M-Y, Townsley MI, King JA, Liedtke W, Weber DS, Eyal FG, Clapp MM, Parker JC. TRPV4 channels augment macrophage activation and ventilator-induced lung injury. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 2010;299(3):L353-L62. doi: 10.1152/ajplung.00315.2009

108. Michalick L. TRPV4 in Ventilator-induced Lung Injury – Mechanisms of Endothelial Mechanotransduction and Barrier Regulation in the Lung 2017:43. doi: 10.17169/refubium-12514

109. Matthews BD, Thodeti CK, Tytell JD, Mammoto A, Overby DR, Ingber DE. Ultra-rapid activation of TRPV4 ion channels by mechanical forces applied to cell surface beta1 integrins. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 2010;2(9):435-42. doi: 10.1039/c0ib00034e

110. Hartmannsgruber V, Heyken WT, Kacik M, Kaistha A, Grgic I, Harteneck C, Liedtke W, Hoyer J, Kohler R. Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression. *PloS one* 2007;2(9):e827. doi: 10.1371/journal.pone.0000827

111. Hamanaka K, Jian MY, Weber DS, Alvarez DF, Townsley MI, Al-Mehdi AB, King JA, Liedtke W, Parker JC. TRPV4 initiates the acute calcium-dependent permeability increase during ventilator-induced lung injury in isolated mouse lungs. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007;293(4):L923-32. doi: 10.1152/ajplung.00221.2007

112. Güler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M. Heat-Evoked Activation of the Ion Channel, TRPV4. *The Journal of Neuroscience* 2002;22(15):6408-14.
113. Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 2003;424(6947):434-8. doi: 10.1038/nature01807
114. Loot AE, Popp R, Fisslthaler B, Vriens J, Nilius B, Fleming I. Role of cytochrome P450-dependent transient receptor potential V4 activation in flow-induced vasodilatation. *Cardiovascular research* 2008;80(3):445-52. doi: 10.1093/cvr/cvn207
115. Du J, Wang X, Li J, Guo J, Liu L, Yan D, Yang Y, Li Z, Zhu J, Shen B. Increasing TRPV4 expression restores flow-induced dilation impaired in mesenteric arteries with aging. *Sci Rep* 2016;6:22780. doi: 10.1038/srep22780
116. Bubolz AH, Mendoza SA, Zheng X, Zinkevich NS, Li R, Gutterman DD, Zhang DX. Activation of endothelial TRPV4 channels mediates flow-induced dilation in human coronary arterioles: role of Ca²⁺ entry and mitochondrial ROS signaling. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2012;302(3):H634-42. doi: 10.1152/ajpheart.00717.2011
117. Bonvini SJ, Adcock JJ, Grace MS, Baker KE, Birrell MA, Belvisi MG. Activation of TRPV4 causes bronchoconstriction: A possible role in respiratory disease? *European Respiratory Journal* 2013;42(Suppl 57)
118. Liedtke W, Friedman JM. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(23):13698-703. doi: 10.1073/pnas.1735416100
119. Jin M, Berrout J, Chen L, O'Neil RG. Hypotonicity-induced TRPV4 function in renal collecting duct cells: modulation by progressive cross-talk with Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Cell calcium* 2012;51(2):131-9. doi: 10.1016/j.ceca.2011.11.011
120. Peng H, Lewandrowski U, Muller B, Sickmann A, Walz G, Wegierski T. Identification of a Protein Kinase C-dependent phosphorylation site involved in sensitization of TRPV4 channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(4):1721-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.12.140
121. Michalick L, Erfinanda L, Weichelt U, van der Giet M, Liedtke W, Kuebler WM. Transient Receptor Potential Vanilloid 4 and Serum Glucocorticoid-regulated Kinase 1 Are Critical Mediators of Lung Injury in Overventilated Mice In Vivo. *Anesthesiology* 2017;126(2):300-11. doi: 10.1097/aln.0000000000001443
122. Strotmann R, Schultz G, Plant TD. Ca²⁺-dependent potentiation of the nonselective cation channel TRPV4 is mediated by a C-terminal calmodulin binding site. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(29):26541-9. doi: 10.1074/jbc.M302590200
123. McCormick JA, Ellison DH. The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions. *Physiological reviews* 2011;91(1):177-219. doi: 10.1152/physrev.00017.2010

124. Fu Y, Subramanya A, Rozansky D, Cohen DM. WNK kinases influence TRPV4 channel function and localization. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290(6):F1305-14. doi: 10.1152/ajprenal.00391.2005
125. Piala AT, Moon TM, Akella R, He H, Cobb MH, Goldsmith EJ. Chloride sensing by WNK1 involves inhibition of autophosphorylation. *Sci Signal* 2014;7(324):ra41. doi: 10.1126/scisignal.2005050
126. Trinh NT, Bilodeau C, Maille E, Ruffin M, Quintal MC, Desrosiers MY, Rousseau S, Brochiero E. Deleterious impact of *Pseudomonas aeruginosa* on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function and rescue in airway epithelial cells. *Eur Respir J* 2015;45(6):1590-602. doi: 10.1183/09031936.00076214
127. Londino JD, Lazrak A, Noah JW, Aggarwal S, Bali V, Woodworth BA, Bebok Z, Matalon S. Influenza virus M2 targets cystic fibrosis transmembrane conductance regulator for lysosomal degradation during viral infection. *FASEB J* 2015;29(7):2712-25. doi: 10.1096/fj.14-268755
128. Brown MB, Hunt WR, Noe JE, Rush NI, Schweitzer KS, Leece TC, Moldobaeva A, Wagner EM, Dudek SM, Poirier C, Presson RG, Jr., Gulbins E, Petrache I. Loss of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impairs lung endothelial cell barrier function and increases susceptibility to microvascular damage from cigarette smoke. *Pulmonary circulation* 2014;4(2):260-8. doi: 10.1086/675989
129. Mihara H, Suzuki N, Muhammad JS, Nanjo S, Ando T, Fujinami H, Kajiura S, Hosokawa A, Sugiyama T. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) silencing in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelium. *Helicobacter* 2017;22(2):e12361. doi: 10.1111/hel.12361
130. Bhargave G, Woodworth BA, Xiong G, Wolfe SG, Antunes MB, Cohen NA. Transient receptor potential vanilloid type 4 channel expression in chronic rhinosinusitis. *American Journal of Rhinology* 2008;22(1):7-12. doi: 10.2500/ajr.2008.22.3125
131. Yin J, Hoffmann J, Kaestle SM, Neye N, Wang L, Baeurle J, Liedtke W, Wu S, Kuppe H, Pries AR, Kuebler WM. Negative-feedback loop attenuates hydrostatic lung edema via a cGMP-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 4. *Circulation research* 2008;102(8):966-74. doi: 10.1161/circresaha.107.168724
132. Villalta PC, Rocic P, Townsley MI. Role of MMP2 and MMP9 in TRPV4-induced lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2014;307(8):L652-L59. doi: 10.1152/ajplung.00113.2014
133. Balakrishna S, Song W, Achanta S, Doran SF, Liu B, Kaelberer MM, Yu Z, Sui A, Cheung M, Leishman E, Eidam HS, Ye G, Willette RN, Thorneloe KS, Bradshaw HB, Matalon S, Jordt SE. TRPV4 inhibition counteracts edema and inflammation and improves pulmonary function and oxygen saturation in chemically induced acute lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2014;307(2):L158-72. doi: 10.1152/ajplung.00065.2014
134. Scheraga RG, Abraham S, Niese KA, Grove LM, Southern BD, Bonfield TL, Zhao C, Hamilton TA, Olman MA. Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Mediates

Macrophage Phagocytosis, Cytokine Production, And Infection-Associated Lung Injury/Resolution In A Stiffness Dependent Manner. C93 IMMUNE REGULATION OF INFECTION: BUILT IN PROTECTION: Am Thoracic Soc 2016:A6132-A32.

135. Maishan M, Lamb D, Lee WL, Kuebler WM. Heterogeneity of TRPV4 Expression and Function in Endothelial Cells of Different Vascular Beds. *The FASEB Journal* 2017;31(1 Supplement):837.14.

136. Phuong TTT, Redmon SN, Yarishkin O, Winter JM, Li DY, Križaj D. Calcium influx through TRPV4 channels modulates the adherens contacts between retinal microvascular endothelial cells. *The Journal of Physiology* 2017;595(22):6869-85. doi:10.1113/JP275052

137. Wu S, Jian M-Y, Xu Y-C, Zhou C, Al-Mehdi A-B, Liedtke W, Shin H-S, Townsley MI. Ca²⁺ entry via α 1G and TRPV4 channels differentially regulates surface expression of P-selectin and barrier integrity in pulmonary capillary endothelium. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2009;297(4):L650-L57. doi:10.1152/ajplung.00015.2009

138. Adapala Rk, OHANYAN VA, Cappelli HC, Kanugula AK, Luli J, Thoppil RJ, Paruchuri S, Meszaros GJ, THODETI CK. Abstract 19870: TRPV4 Channel Deletion Improves Cardiac Remodeling Following Pressure-Overload via Modulation of Mechanosensitive Rho/MRTF-A Pathway. *Circulation* 2016;134(Suppl 1):A19870-A70.

139. Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P, Vriens J, Cairns W, Wissenbach U, Prenen J, Flockerzi V, Droogmans G, Benham CD, Nilius B. Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(16):13569-77. doi: 10.1074/jbc.M200062200

140. Cheung M, Bao W, Behm DJ, Brooks CA, Bury MJ, Dowdell SE, Eidam HS, Fox RM, Goodman KB, Holt DA, Lee D, Roethke TJ, Willette RN, Xu X, Ye G, Thorneloe KS. Discovery of GSK2193874: An Orally Active, Potent, and Selective Blocker of Transient Receptor Potential Vanilloid 4. *ACS medicinal chemistry letters* 2017;8(5):549-54. doi: 10.1021/acsmedchemlett.7b00094

141. Thorneloe KS, Cheung M, Bao W, Alsaid H, Lenhard S, Jian MY, Costell M, Maniscalco-Hauk K, Krawiec JA, Olzinski A, Gordon E, Lozinskaya I, Elefante L, Qin P, Matasic DS, James C, Tunstead J, Donovan B, Kallal L, Waszkiewicz A, Vaidya K, Davenport EA, Larkin J, Burgert M, Casillas LN, Marquis RW, Ye G, Eidam HS, Goodman KB, Toomey JR, Roethke TJ, Jucker BM, Schnackenberg CG, Townsley MI, Lepore JJ, Willette RN. An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure. *Science translational medicine* 2012;4(159):159ra48. doi: 10.1126/scitranslmed.3004276

142. Dalsgaard T, Sonkusare SK, Teuscher C, Poynter ME, Nelson MT. Pharmacological inhibitors of TRPV4 channels reduce cytokine production, restore endothelial function and increase survival in septic mice. *Scientific Reports* 2016;6:33841. doi: 10.1038/srep33841

143. ClinicalTrials.gov Search Function Results for GSK2798745. [Internetseite]. Bethesda, Maryland, USA: U.S. National Library of Medicine, 2018. Abgerufen am

11.05.2018

von:

<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=GSK2798745&cntry=&state=&city=&dist=>

144. Everaerts W, Zhen X, Ghosh D, Vriens J, Gevaert T, Gilbert JP, Hayward NJ, McNamara CR, Xue F, Moran MM, Strassmaier T, Uykal E, Owsianik G, Vennekens R, De Ridder D, Nilius B, Fanger CM, Voets T. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107(44):19084-89. doi: 10.1073/pnas.1005333107

145. Duncton MAJ. Chapter 12 - Small Molecule Agonists and Antagonists of TRPV4. TRP Channels as Therapeutic Targets - From Basic Science to Clinical Use. Boston: Academic Press 2015:211-12.

146. Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 2006;440(7083):463-69.

147. Costa R, Bicca MA, Manjavachi MN, Segat GC, Dias FC, Fernandes ES, Calixto JB. Kinin Receptors Sensitize TRPV4 Channel and Induce Mechanical Hyperalgesia: Relevance to Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy in Mice. *Molecular neurobiology* 2017 doi: 10.1007/s12035-017-0475-9

148. Chen Y, Kanju P, Fang Q, Lee SH, Parekh PK, Lee W, Moore C, Brenner D, Gereau RWt, Wang F, Liedtke W. TRPV4 is necessary for trigeminal irritant pain and functions as a cellular formalin receptor. *Pain* 2014;155(12):2662-72. doi: 10.1016/j.pain.2014.09.033

149. Zhang LP, Kline RHt, Deevska G, Ma F, Nikolova-Karakashian M, Westlund KN. Alcohol and high fat induced chronic pancreatitis: TRPV4 antagonist reduces hypersensitivity. *Neuroscience* 2015;311:166-79. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.10.028

150. Dong Q, Li J, Wu QF, Zhao N, Qian C, Ding D, Wang BB, Chen L, Guo KF, Fu D, Han B, Liao YH, Du YM. Blockage of transient receptor potential vanilloid 4 alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Sci Rep* 2017;7:42678. doi: 10.1038/srep42678

151. Okada Y, Shirai K, Miyajima M, Reinach PS, Yamanaka O, Sumioka T, Kokado M, Tomoyose K, Saika S. Loss of TRPV4 Function Suppresses Inflammatory Fibrosis Induced by Alkali-Burning Mouse Corneas. *PloS one* 2016;11(12):e0167200. doi: 10.1371/journal.pone.0167200

152. Ying L, Becard M, Lyell D, Han X, Shortliffe L, Husted CI, Alvira CM, Cornfield DN. The transient receptor potential vanilloid 4 channel modulates uterine tone during pregnancy. *Science translational medicine* 2015;7(319):319ra204. doi: 10.1126/scitranslmed.aad0376

153. Sand CA, Starr A, Nandi M, Grant AD. Blockade or deletion of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is not protective in a murine model of sepsis. *F1000Research* 2015;4:93. doi: 10.12688/f1000research.6298.1

154. Ahl J, Littorin N, Forsgren A, Odenholt I, Resman F, Riesbeck K. High incidence of septic shock caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3--a retrospective epidemiological study. *BMC infectious diseases* 2013;13:492. doi: 10.1186/1471-2334-13-492
155. von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R, Vogt K, Volk HD, Muller KM, Wendel A, Uhlig S. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(1):263-72. doi: 10.1164/ajrccm.157.1.9608052
156. Szymanski KV, Toennies M, Becher A, Fatykhova D, N'Guessan PD, Gutbier B, Klauschen F, Neuschaefer-Rube F, Schneider P, Rueckert J, Neudecker J, Bauer TT, Dalhoff K, Drömann D, Gruber AD, Kershaw O, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC. *Streptococcus pneumoniae*-induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue. *European Respiratory Journal* 2012;40(6):1458-67. doi: 10.1183/09031936.00186911
157. Berger S. Analyse der Hyperinflammation im Verlauf der murinen Pneumokokken-Pneumonie unter besonderer Berücksichtigung des Neutrophile-rekrutierenden Chemokins CXCL5. Technische Universität Berlin 2019:70. doi: 10.14279/depositonce-7836
158. Kuebler WM, Yang Y, Samapati R, Uhlig S. Vascular Barrier Regulation by PAF, Ceramide, Caveolae, and NO - an Intricate Signaling Network with Discrepant Effects in the Pulmonary and Systemic Vasculature. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2010;26(1):29-40.
159. Scheraga R, Abraham S, Grove L, Southern B, Crish J, Hamilton T, McDonald C, Olman M. Macrophage Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Mediates the Host Defense Response to Bacterial Pneumonia in an Inflammasome-Independent Manner. B15 IMMUNE PATHWAYS IN LUNG INJURY AND REPAIR: American Thoracic Society 2018:A2702-A02.
160. Scheraga RG, Abraham S, Grove L, Southern BD, Crish J, Hamilton T, McDonald C, Olman MA. Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Regulates the Host Defense Response to Bacterial Pneumonia Through a MAPK Molecular Switch. D21 HOST RESPONSE TO LUNG INFECTIONS: American Thoracic Society 2019:A5918-A18.
161. Morimoto K, Amano H, Sonoda F, Baba M, Senba M, Yoshimine H, Yamamoto H, Ii T, Oishi K, Nagatake T. Alveolar macrophages that phagocytose apoptotic neutrophils produce hepatocyte growth factor during bacterial pneumonia in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2001;24(5):608-15. doi: 10.1165/ajrcmb.24.5.4292
162. Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris NA, Pater J, van Rooijen N, van der Poll T. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(2):171-9. doi: 10.1164/rccm.200207-698OC

163. Scheraga RG, Abraham S, Niese KA, Southern BD, Grove LM, Hite RD, McDonald C, Hamilton TA, Olman MA. TRPV4 Mechanosensitive Ion Channel Regulates Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage Phagocytosis. *The Journal of Immunology* 2016;196(1):428-36. doi: 10.4049/jimmunol.1501688
164. Bast DJ, Yue M, Chen X, Bell D, Dresser L, Saskin R, Mandell LA, Low DE, de Azavedo JCS. Novel Murine Model of Pneumococcal Pneumonia: Use of Temperature as a Measure of Disease Severity To Compare the Efficacies of Moxifloxacin and Levofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004;48(9):3343-48. doi: 10.1128/aac.48.9.3343-3348.2004
165. Remick DG, Bolgos G, Copeland S, Siddiqui J. Role of Interleukin-6 in Mortality from and Physiologic Response to Sepsis. *Infection and immunity* 2005;73(5):2751-57. doi: 10.1128/iai.73.5.2751-2757.2005
166. Stewart CR, Landseadel JP, Gurka MJ, Fairchild KD. Hypothermia increases interleukin-6 and interleukin-10 in juvenile endotoxemic mice*. *Pediatric Critical Care Medicine* 2010;11(1):109-16. doi: 10.1097/PCC.0b013e3181b01042
167. Jones MR, Simms BT, Lupa MM, Kogan MS, Mizgerd JP. Lung NF- κ B Activation and Neutrophil Recruitment Require IL-1 and TNF Receptor Signaling during Pneumococcal Pneumonia. *The Journal of Immunology* 2005;175(11):7530-35. doi: 10.4049/jimmunol.175.11.7530
168. Pairet N, Mang S, Fois G, Keck M, Kühnbach M, Gindele J, Frick M, Dietl P, Lamb DJ. TRPV4 inhibition attenuates stretch-induced inflammatory cellular responses and lung barrier dysfunction during mechanical ventilation. *PLoS one* 2018;13(4):e0196055. doi: 10.1371/journal.pone.0196055
169. Hol J, Wilhelmsen L, Haraldsen G. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *Journal of Leukocyte Biology* 2010;87(3):501-08. doi: 10.1189/jlb.0809532
170. Herbold W, Maus R, Hahn I, Ding N, Srivastava M, Christman JW, Mack M, Reutershan J, Briles DE, Paton JC, Winter C, Welte T, Maus UA. Importance of CXC chemokine receptor 2 in alveolar neutrophil and exudate macrophage recruitment in response to pneumococcal lung infection. *Infection and immunity* 2010;78(6):2620-30. doi: 10.1128/iai.01169-09
171. Alpizar YA, Boonen B, Sanchez A, Jung C, Lopez-Requena A, Naert R, Steelant B, Luyts K, Plata C, De Vooght V, Vanoirbeek JAJ, Meseguer VM, Voets T, Alvarez JL, Hellings PW, Hoet PHM, Nemery B, Valverde MA, Talavera K. TRPV4 activation triggers protective responses to bacterial lipopolysaccharides in airway epithelial cells. *Nat Commun* 2017;8(1):1059. doi: 10.1038/s41467-017-01201-3
172. Tomlinson G, Chimalapati S, Pollard T, Lapp T, Cohen J, Camberlein E, Stafford S, Periselneris J, Aldridge C, Vollmer W, Picard C, Casanova J-L, Noursadeghi M, Brown J. TLR-Mediated Inflammatory Responses to *Streptococcus pneumoniae* Are Highly Dependent on Surface Expression of Bacterial Lipoproteins. *The Journal of Immunology* 2014;193(7):3736-45. doi: 10.4049/jimmunol.1401413

173. Scheraga RG, Southern BD, Grove LM, Olman MA. The Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 in Pulmonary Inflammatory Diseases. *Frontiers in immunology* 2017;8:503. doi: 10.3389/fimmu.2017.00503
174. Ermert L, Duncker HR, Rosseau S, Schütte H, Seeger W. Morphometric analysis of pulmonary intracapillary leukocyte pools in ex vivo-perfused rabbit lungs. *The American journal of physiology* 1994;267(1 Pt 1):L64-70. doi: 10.1152/ajplung.1994.267.1.L64
175. AlJanahi AA, Danielsen M, Dunbar CE. An Introduction to the Analysis of Single-Cell RNA-Sequencing Data. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 2018;10:189-96. doi: 10.1016/j.omtm.2018.07.003
176. Macosko Evan Z, Basu A, Satija R, Nemesh J, Shekhar K, Goldman M, Tirosh I, Bialas Allison R, Kamitaki N, Martersteck Emily M, Trombetta John J, Weitz David A, Sanes Joshua R, Shalek Alex K, Regev A, McCarroll Steven A. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell* 2015;161(5):1202-14. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.002
177. Michalick L, Mertens M, Liedtke W, Kuebler WM. Transient receptor potential cation channel vanilloid (TRPV) 4 in ventilator-induced lung injury (VILI). *The FASEB Journal* 2013;27(1_supplement):914.12-14.12. doi: 10.1096/fasebj.27.1_supplement.914.12
178. Erfinanda L, Lin Z, Gutbier B, Reppe K, Lienau J, Hocke A, Liedtke W, Witzentrath M, Kuebler WM. Loss of CFTR causes endothelial barrier failure in pneumonia via inhibition of WNK1 and TRPV4 activation. *European Respiratory Journal* 2017;50(suppl 61) doi: 10.1183/1393003.congress-2017.PA1874
179. Yang X-R, Lin AHY, Hughes JM, Flavahan NA, Cao Y-N, Liedtke W, Sham JSK. Upregulation of osmo-mechanosensitive TRPV4 channel facilitates chronic hypoxia-induced myogenic tone and pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 2012;302(6):L555-L68. doi: 10.1152/ajplung.00005.2011
180. Morty RE, Kuebler WM. TRPV4: an exciting new target to promote alveolocapillary barrier function. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2014;307(11):L817-21. doi: 10.1152/ajplung.00254.2014
181. Goyal N, Skrdla P, Schroyer R, Kumar S, Fernando D, Oughton A, Norton N, Sprecher DL, Cheriyan J. Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of a Novel, First-in-Class TRPV4 Ion Channel Inhibitor, GSK2798745, in Healthy and Heart Failure Subjects. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 2019;19(3):335-42. doi: 10.1007/s40256-018-00320-6

8 Anhang

8.1 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Bill Schneider, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung des TRPV4-Kanals für die Entstehung der pulmonalen Barrierestörung bei Pneumokokken-Pneumonie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Ort und Datum:

Unterschrift:

8.2 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Bill Schneider hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Schneider B, Gutbier B, Reppe K, Lienau J, Michalik L, Erfinanda L, Lask A, Suttorp N, Kübler WM, Witzenrath M. Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 for the Development of Acute Lung Injury in Pneumococcal Pneumonia. *Pneumologie* 2018;72(S 01):V474.

Beitrag im Einzelnen: Bill Schneider war an der Durchführung von Tierexperimenten mit Wildtyp- und TRPV4-KO-Tieren, deren Monitoring, der Injektion, Präparation sowie der Probengewinnung und Probenanalyse unter anderem zur laborchemischen Quantifizierung der Barrierestörung, Differenzierung von Immunzellen in Blut und Lungenspülflüssigkeit, Bestimmung von Bakterienlasten beteiligt. Er war auch an der statistischen Datenauswertung und Korrektur des Abstracts beteiligt.

Publikation 2: Erfinanda L, Schneider B, Gutbier B, Zou L, Reppe K, Lienau J, Hocke AC, Liedtke W, Witzenrath M, Kuebler WM. Loss of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Drives Lung Endothelial Barrier Failure in Pneumonia-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *A51 CRITICAL CARE: SHE BLINDED ME WITH SCIENCE - INSIGHTS FROM EXPERIMENTAL AND ANIMAL STUDIES IN ARDS AND SEPSIS* 2018:A1851-A5.

Beitrag im Einzelnen: Bill Schneider war an der Durchführung von Tierexperimenten mit Wildtyp- und TRPV4-KO-Tieren, deren Monitoring, der Injektion, der Präparation sowie der Probengewinnung und Probenanalyse unter anderem zur laborchemischen Quantifizierung der Barrierestörung beteiligt. Er war auch an der statistischen Datenauswertung dieses Versuchsteils beteiligt.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

8.3 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.4 Publikationsliste

Abstracts:

- Schneider B, Gutbier B, Reppe K, Lienau J, Michalik L, Erfinanda L, Lask A, Suttrop N, Kübler WM, Witzenrath M. Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 for the Development of Acute Lung Injury in Pneumococcal Pneumonia. *Pneumologie* 2018;72(S 01):V474.
- Erfinanda L, Schneider B, Gutbier B, Zou L, Reppe K, Lienau J, Hocke AC, Liedtke W, Witzenrath M, Kuebler WM. Loss of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Drives Lung Endothelial Barrier Failure in Pneumonia-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *A51 CRITICAL CARE: SHE BLINDED ME WITH SCIENCE - INSIGHTS FROM EXPERIMENTAL AND ANIMAL STUDIES IN ARDS AND SEPSIS* 2018:A1851-A5.

Vortrag und Poster-Präsentation:

- Poster-Präsentation zur Dissertation auf der Herbsttagung der Sektion Zellbiologie und Infektiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie Beatmungsmedizin (DGP) im November 2017.
- Vortrag zur Dissertation auf dem 59. Kongress der DGP im März 2018 (im Zusammenhang mit dem oben genannten Abstract).

8.5 Danksagung

Prof. Dr. Martin Witzenrath danke ich für die Überlassung des Themas, den fachlichen Rat bei der Planung, Ausführung und Auswertung der Experimente und die wertvollen Diskussionen in allen Phasen des Projektes. Trotz umfangreicher klinischer Tätigkeit hat er sich immer für das Projekt und meine Anliegen Zeit genommen.

Ich danke Dr. Birgitt Gutbier, die mich mit ansteckender Leidenschaft in die verschiedenen experimentellen Methoden eingeführt hat und mich in allen Phasen dieser Arbeit fachlich begleitet hat. Ich bin dankbar für ihre große Geduld und ständige Bereitschaft, auf meine Fragen und Ideen einzugehen. Von ihr habe ich gelernt, welche Ansprüche ein*e gute*r Wissenschaftler*in an ihre oder seine Arbeit stellt.

Des weiteren danke ich Dr. Jasmin Lienau ganz besonders für ihre Arbeit an den Versuchsanträgen, ihre Hilfe bei der Planung und Auswertung der Experimente sowie die umfangreichen Hinweise zu der Monografie.

Dr. Katrin Reppe danke ich für die umfangreiche Mitarbeit und Hilfe bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente. Denise Barthel danke ich für ihre große Unterstützung bei den Tierversuchen, aber auch bei vielen anderen Experimenten. Dr. Diana Fatykhova danke ich für ihren wertvollen fachlichen Rat beim Western Blot. Ich danke Dr. Sandra Wienhold für die Hilfe bei der Infektion von Versuchstieren, und Dr. Geraldine Nouailles für die Unterstützung bei der Durchflusszytometrie. Ich danke der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Kübler, insbesondere Dr. Laura Michalick und Dr. Lasti Erfinanda für die gute Zusammenarbeit und den erteilten Rat in vielen Phasen des Projektes. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Sven Hammerschmidt von der Universität Greifswald für die zur Verfügung gestellten Bakterienstämme.

Außerdem danke ich meinen Mit-Doktorand*innen Aina Lask, Kristin Hofmann, Sarah Berger, Cengiz Gökeri, Markus Brack und Luiz Gustavo Teixeira Alves für die angenehme, kollegiale, fröhliche Zusammenarbeit im Labor und die gegenseitige Hilfe.

Schließlich danke ich Anja, Jacob, Jendrik, Judith, Linda und all meinen anderen lieben Freunden. Ihr habt mir viel mehr geholfen, als es euch vielleicht bewusst ist.

Meinen Eltern Christina und Jens danke ich von ganzem Herzen, dass sie mit ihrer liebevollen Erziehung den Grundstein für meine Neugierde gelegt haben. Neben viel emotionaler Unterstützung haben sie mir außerdem eine finanziell sorgenfreie Zeit während meines Studiums und während dieses Vorhabens ermöglicht.