

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Functional relevance of the sodium-potassium-chloride
cotransporter NKCC1 in alveolar fluid clearance and the
development of cardiogenic pulmonary edema

**Funktion des Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporters
NKCC1 in der alveolären Flüssigkeitsresorption und der
Entwicklung des kardiogenen Lungenödems**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Delia Isabel Langner

aus Berlin

Datum der Promotion: 23.03.2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Abstract	VIII
Zusammenfassung	X
1 Einleitung	1
1.1 Lungenödem	1
1.1.1 Pathophysiologie des Lungenödems	2
1.1.2 Therapie des Lungenödems	9
1.2 Flüssigkeitstransport im Alveolarepithel	13
1.3 Gestörter Flüssigkeitstransport	15
1.4 Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Kotransporter (NKCC)	19
1.4.1 Regulation des NKCC1-Transporters	24
1.4.2 Die Rolle von WNK bei der NKCC1-Phosphorylierung	27
1.5 Ziel des Projekts	30
2 Methodik	32
2.1 <i>Ex vivo</i> Experimente	32
2.1.1 Tiere	32
2.1.2 Modell der isoliert perfundierten Lunge (IPL)	32
2.1.3 Versuchsvorbereitung und Präparation des Versuchstiers	33
2.2 <i>In vitro</i> Experimente	35
2.2.1 Zellkultur	35
2.2.2 Stimulation der Zielzellen	36
2.2.3 Regulation des Kotransporters NKCC1 über ENaC und WNK1	36
2.2.4 Inflammatorische Stimulierung	37
2.3 Biochemische und molekularbiologische Methoden	37
2.3.1 Western Blot	37
2.3.2 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	39
2.3.3 Genotypisierung	40
2.4 Statistische Analyse	42
2.5 Materialien und Substanzen	43
2.5.1 Puffer	43

2.5.2	Stimulantien und Inhibitoren	44
2.5.3	Antikörper	44
2.5.4	Kommerziell erworbene Kits	45
3	Ergebnisse	46
3.1	NKCC1-Expressionsmuster der <i>Slc12a2</i> -Mauslinie	46
3.2	NKCC1 trägt zur Entstehung des kardiogenen Lungenödems bei.	48
3.3	Der heterozygote Verlust von WNK1 wirkt protektiv auf die Bildung des kardiogenen Lungenödems <i>ex vivo</i>	49
3.4	Die Hemmung von ENaC durch Amilorid führt nicht zur Phosphorylierung von NKCC1 <i>in vitro</i>	50
3.5	Die NKCC1-Phosphorylierung ändert sich <i>in vitro</i> durch Stimulation mit Cytomix oder LPS nicht.	52
3.6	Beitragsnachweis	54
4	Diskussion	55
4.1	NKCC1 fördert die Bildung des kardiogenen Lungenödems	55
4.2	WNK1 ist an der Entstehung des kardiogenen Lungenödems beteiligt	60
4.3	Amilorid führt <i>in vitro</i> nicht zu einer vermehrten NKCC1-Phosphorylierung.....	63
4.4	NKCC1 wird durch ARDS-assoziierte Zytokine <i>in vitro</i> nicht vermehrt phosphoryliert.	69
4.5	Limitationen	75
5	Fazit und Ausblick.....	78
6	Literaturverzeichnis.....	80
7	Anhang	97
	Eidesstattliche Erklärung	99
	Curriculum vitae.....	101
	Publikationsliste.....	102
	Danksagung	103
	Bescheinigung Statistisches Gutachten	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Physiologie des mikrovaskulären Flüssigkeitstransport in der Lunge (modifiziert nach Lorraine B. Ware, M.D. und Michael A. Matthay, M.D., NEJM, 2005).....	4
Abbildung 1-2: Pathophysiologie des mikrovaskulären Flüssigkeitstransport im Lungenödem (modifiziert nach Lorraine B. Ware, M.D. und Michael A. Matthay, M.D., NEJM, 2005).....	8
Abbildung 1-3: Repräsentative Röntgen-Thorax-Aufnahmen (anterior-posteriorer Strahlengang) von Patienten mit kardiogenem (A) und nicht-kardiogenem (B) Lungenödem (Reproduced with permission from Lorraine B. Ware, M.D. and Michael A. Matthay, M.D., NEJM, 2005; Copyright Massachusetts Medical Society).....	9
Abbildung 1-4: Vereinfachtes Schema der alveolären Flüssigkeitsresorption (AFC) in der gesunden Lunge.....	15
Abbildung 1-5: Konzeptionsvorschlag des alveolären Flüssigkeitstransports beim kardiogenen Lungenödem.....	17
Abbildung 1-6: Vereinfachtes Schema der NKCC1-Regulation.....	28
Abbildung 2-1: Versuchsaufbau der isoliert perfundierten Mauslunge	35
Abbildung 3-1: Verteilung der Genotypen der <i>Slc12a2</i> -Mäuse von 03/2019 bis 09/2019	46
Abbildung 3-2: NKCC1-Expression in <i>Slc12a2</i> /NKCC1-Mäusen	47
Abbildung 3-3: Hydrostatische Lungenödembildung in der IPL von <i>Slc12a2</i> ^{+/-} und C57BL/6J Mäusen mit und ohne Furosemid	48
Abbildung 3-4: Hydrostatische Lungenödembildung in IPL von <i>Wnk1</i> ^{+/-} -Mäusen	50
Abbildung 3-5: NKCC1-Phosphorylierung in A549 Zellen nach Stimulation durch Amilorid oder Amilorid+WNK463.....	51
Abbildung 3-6: NKCC1-Phosphorylierung und mRNA-Expression unter inflammatorischer Stimulation	53
Abbildung 4-1: Die Rolle der Kationen-Chlorid-Kotransporter (CCCs) in der WNK-abhängigen Osmoregulation von Zellen.....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Funktionen von NKCC1 (modifiziert nach Nicolas Markadieu und Eric Delpire, Eur J Physiol, 2014).....	21
Tabelle 2-1:	Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele	39
Tabelle 2-2:	Auflistung der Primer für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (qRT-PCR).....	40
Tabelle 2-3:	Komponenten des PCR-Mix zur NKCC1-Genotypisierung der verdünnten DNA-Proben.....	41
Tabelle 2-4:	NKCC1-Primer zur Genotypisierung	41
Tabelle 2-5:	Amplifikationsprogramm der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für den NKCC1-Primer	42
Tabelle 7-1:	Kommerzielles Kit zur DNA-Extraktion und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von WNK1	97
Tabelle 7-2:	WNK1-Primer zur Genotypisierung	97
Tabelle 7-3:	Amplifikationsprogramm der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für <i>Wnk1</i> WT	97
Tabelle 7-4:	Amplifikationsprogramm der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für <i>Wnk1</i> KO.....	98

Abkürzungsverzeichnis

[Ion] _i	Intrazelluläre Ionenkonzentration
AFC	<i>Alveolar fluid clearance</i> , alveoläre Flüssigkeitsresorption
AFS	<i>Alveolar fluid secretion</i> , alveoläre Flüssigkeitssekretion
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AQP	Aquaporin-Kanal
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i> , Akuter Lungenschaden
AT I	<i>Alveolar epithelial cells type I</i> , Alveoläre Epithelzelle bzw. Pneumozyt Typ I
AT II	<i>Alveolar epithelial cells type II</i> , Alveoläre Epithelzelle bzw. Pneumozyt Typ II
AZV	Atemzugvolumen
BALTI	<i>Beta-agonist lung injury trial</i>
BCA	Bicinchonininsäure Assay
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C-	Carboxy-terminal
Cab39	<i>Calcium binding protein-39</i> , auch MO25
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCC	<i>Cation-chloride cotransporters</i> , Kationen-Chlorid-Kotransporter
cDNA	Komplementäre DNA
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CINC-1	<i>Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant</i> , \cong human GRO (<i>growth related oncogene/CXCL1</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CPE	<i>Cardiogenic pulmonary edema</i> , kardiogenes Lungenödem
C _t	<i>Cycle threshold</i>
Cytomix	Zytokin-Mix aus TNF- α , IFN- γ , IL-1 β
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
Δ	Druckgradient
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELF	<i>Epithelial lining fluid</i> , Epithelialer Flüssigkeitsfilm
ENaC	<i>Epithelial sodium channel</i> , Epithelialer Natrium-Kanal
FCS	Fetales Kälberserum
for	<i>Forward</i>
H ₂ O	Wasser
hAELVi	<i>Human Alveolar Epithelial Lentivirus immortalized</i>

HAPE	<i>High Altitude Pulmonary Edema</i> , Höhenlungenödem
HARP	<i>Hydroxymethylglutaryl-conenzyme A reductase inhibition with Simvastatin in acute lung injury to reduce pulmonary dysfunction trial</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HotSHOT	<i>Hot sodium hydroxide and tris</i>
IL	Interleukin
IPL	Isoliert perfundierte Lunge
KCC	K ⁺ -Cl ⁻ -Kotransporter
K_f	Filtrationskoeffizient für Flüssigkeit
KG	Körpergewicht
KO	<i>Knockout</i>
Ktr.	Kontrolle
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
ML-7	<i>Myosin light chain kinase inhibitor 7</i>
MO25	<i>Mouse protein-25</i> , auch Cab39
N-	Amino-terminal
N	Anzahl
Na,K-ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCC	Natrium-Chlorid-Kotransporter
NH ₄ ⁺	Ammonium
NKCC	Natrium-Kalium-2 Chlorid-Symporter
NO	Stickstoffmonoxid
OSR1	<i>Oxidative Stress Responsive Kinase</i>
P	Hydrostatischer Druck
P_{PA}	Pulmonalarterieller Druck
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
π	Onkotischer Druck
PEEP	<i>Positive end expiratory pressure</i> , positiver endexpiratorischer Druck
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PHA	Pseudohypoaldosteronismus
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH Kinase
PKA	Proteinkinase A
P_{LA}	<i>Left atrial pressure</i> , linksatrialer Druck
p-NKCC1	Phosphoryliertes NKCC1
qPCR	Quantitative PCR
rev	<i>Reverse</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>

RQ	Relative Quantifizierung
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative PCR</i> , quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RVI	<i>Regulatory volume increase</i>
SAILS	<i>Statins for acutely injured lungs from sepsis study</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SGLTs	<i>Sodium-dependent glucose transporters</i> , Natrium-abhängige Glucosetransporter
σ	Standardabweichung
σ_p	Permeabilität des Endothels für Proteine
SLC	<i>Solute carrier</i>
SNATs	<i>Sodium-coupled amino acid transporters</i> , Natrium-gekoppelte Aminosäuretransporter
SPAK	<i>Ste20p-related Proline Alanine-rich Kinase</i>
Ste20p	<i>Sterile 20 protein</i>
TAE	Tris Acetat EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalz-Lösung
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalz-Lösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Thr	Threonin
TLR-4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TM	Transmembranäre alpha-Helices
TMZ	Temozolomid
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> , Tumornekrosefaktor α
T-NKCC1	Totales NKCC1
TRALI	<i>Transfusion-related Acute Lung Injury</i> , Reperfusionsödem
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPV	<i>Transient receptor potential vanilloid channel</i> , transiente Rezeptor-Potential-Kationenkanäle
<i>wet/dry-ratio</i>	Auch W/D, <i>wet-to-dry lung weight ratio</i> , Feucht-Trocken-Quotient des Lungengewichts
WNK	<i>With No Lysine Kinase</i>
WNK463	WNK1-Inhibitor
WT	Wildtyp
\bar{x}	Arithmetisches Mittel

Abstract

Cardiogenic pulmonary edema (CPE) is a serious complication of acute left-sided heart failure with a mortality rate of 15%. The major hallmark of CPE is the accumulation of protein-poor extravascular fluid first in the lung interstitium and subsequently also in the air space (“alveolar flooding”) leading to impaired gas exchange and respiratory failure. In the intact lung active Na^+ and Cl^- absorption protects the distal airspace from excessive fluid accumulation. However, this physiological protection against alveolar flooding by active alveolar fluid clearance (AFC) is lost in CPE. Previously, we have shown that increased hydrostatic pressure not only blocks AFC, but also reverses transepithelial fluid transport resulting in active fluid secretion (AFS), thus promoting CPE formation. Here, we hypothesized that AFS and the resulting formation of CPE may be driven by the basolaterally expressed Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransporter 1 (NKCC1), which can be pharmacologically blocked by loop diuretics like furosemide.

Here, we analyzed CPE formation in response to hydrostatic stress (left atrial pressure P_{LA} elevation from 2.5 to 7 cmH_2O) in isolated perfused mouse lungs (IPL) of heterozygous NKCC1-deficient (*Slc12a2*^{+/-}) mice or wildtype (WT) mice after furosemide treatment. To assess the role of the With No Lysine Kinase 1 (WNK1), which regulates NKCC1 activity by phosphorylation, CPE formation was analyzed in IPLs of heterozygous WNK1-deficient (*Wnk1*^{+/-}) mice. Furthermore, we examined the expression of NKCC1 *in vitro* after stimulation with amiloride, an inhibitor of the epithelial Na^+ channel (ENaC) previously proposed to stimulate AFS, and WNK463 which blocks WNK1. To explore a potential role of NKCC1 also in permeability type PE as seen in the acute respiratory distress syndrome, activation and expression of NKCC1 in A549 epithelial cells was determined at basal conditions and after stimulation with Cytomix (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) and LPS.

In IPLs, wet-to-dry lung weight ratios (W/D) were increased in response to hydrostatic stress in lungs of WT mice. *Slc12a2*^{+/-} lungs and furosemide-treated lungs showed significantly reduced W/D as compared to control lungs. In parallel, W/D was reduced in *Wnk1*^{+/-} as compared to WT mice in response to elevated P_{LA} . In A549 cells, neither stimulation with amiloride nor WNK463 resulted in detectable changes in protein expression and phosphorylation of NKCC1. Similarly, NKCC1 phosphorylation did not differ in response to Cytomix and LPS in A549 cells.

Here, we identify an important function for NKCC1 in AFS and CPE formation. Our findings provide a novel, extrarenal explanation for the rapid anti-edematous effects of loop diuretics, and suggest that targeted inhibition of NKCC1 may alleviate, reverse or delay the development of CPE. Partial loss of WNK1 similarly reduces CPE, presumably by inhibiting NKCC1, pointing to an important role of WNK1 in AFS and their potential use as therapeutic targets for the treatment of PE.

Zusammenfassung

Das kardiogene Lungenödem (CPE) ist eine schwerwiegende Komplikation des akuten Linksherzversagens. Hauptmerkmal ist die Ansammlung Protein-armer extravaskulärer Flüssigkeit im Interstitium und im Verlauf auch im Alveolarraum, die zu einem gestörten pulmonalen Gasaustausch und respiratorischer Insuffizienz führt. In der intakten Lunge schützt die alveoläre Flüssigkeitsresorption (AFC) durch aktiven Wasser- und Ionen-Transport den distalen Alveolarraum vor übermäßiger Flüssigkeitsansammlung. Dieser physiologische Schutz wird jedoch durch hydrostatischen Stress gehemmt. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass erhöhter hydrostatischer Druck nicht nur die AFC blockiert, sondern auch den transepithelialen Flüssigkeitstransport in eine aktive alveoläre Flüssigkeitssekretion (AFS) umkehrt und damit die Bildung eines CPE fördert. Diese Arbeit untersuchte, ob die CPE-Bildung und AFS durch den basolateral exprimierten $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter 1 (NKCC1) angetrieben werden könnten.

NKCC1 kann pharmakologisch durch Schleifendiuretika wie Furosemid inhibiert werden. Die NKCC1-Aktivität wird durch die With No Lysine Kinase 1 (WNK1) über Phosphorylierung reguliert.

In isoliert perfundierten Lungen (IPL) heterozygot-defizienter NKCC1-Mäuse (*Slc12a2*^{+/-}), von Wildtypen (WT) nach Furosemidgabe sowie heterozygot-defizienter WNK1-Mäuse (*Wnk1*^{+/-}) wurde die Ödembildung durch hydrostatischen Stress (Erhöhung des linksatrialen Druckes P_{LA} von 2,5 auf 7 cmH₂O) untersucht. Außerdem wurde die NKCC1-Expression *in vitro* nach Stimulation mit Amilorid, welches den epithelialen Na^+ -Kanal (ENaC) hemmt, und dem WNK1-Inhibitor WNK463 analysiert. Um darüber hinaus eine mögliche NKCC1-Beteiligung am Lungenödem vom Permeabilitätstyp zu erproben, wurde die NKCC1-Expression und -Aktivität in A549 Epithelzellen unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit Cytomix (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) und LPS bestimmt. Die Feucht-Trocken-Quotienten des Lungengewichts (W/D) der WT-IPLs waren unter hydrostatischem Stress erhöht. Die W/D der *Slc12a2*^{+/-}-Lungen und der mit Furosemid behandelten WT-Lungen waren im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Auch die W/D der *Wnk1*^{+/-}-Lungen waren verglichen mit denen der WT vermindert. In A549-Zellen führte weder die Stimulation mit Amilorid noch mit WNK463 zu detektierbaren Veränderungen in der Proteinexpression oder Phosphorylierung von NKCC1. Auch durch Cytomix oder LPS änderte sich die NKCC1-Phosphorylierung *in vitro* nicht.

Die vorliegende Arbeit weist die zentrale Rolle von NKCC1 bei der Bildung des CPE nach. Die Ergebnisse liefern eine neue, extrarenale Erklärung für die schnelle antiödematöse Wirkung von Schleifendiuretika und legen nahe, dass eine gezielte NKCC1-Hemmung die Entwicklung des CPE lindern, umkehren oder verzögern kann. Darüber hinaus reduziert auch der partielle WNK1-Verlust die CPE-Bildung, was die Rolle von WNK1 an der AFS und ihren potenziellen Nutzen als therapeutischen Angriffspunkt des Lungenödems hervorhebt.

1 Einleitung

1.1 Lungenödem

Als Lungenödem (pulmonales Ödem) bezeichnet man die Akkumulation von Flüssigkeit in den extravaskulären Kompartimenten der Lunge. Pathophysiologisch lässt sich das pulmonale Ödem in i) ein kardiogenes oder hydrostatisches Lungenödem und ii) ein nicht-kardiogenes Lungenödem oder Permeabilitätsödem unterteilen, wobei die Unterscheidung auf der Klinik des Patienten und den radiologischen Befunden basiert (1). Eine Differenzierung der zwei Ödemtypen ist essenziell, denn auch wenn sie sich in der klinischen Symptomatik nicht immer voneinander abgrenzen lassen, unterscheiden sie sich aufgrund ihrer verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen doch stark in der Therapie der Patienten. Das kardiogene Lungenödem ist eine häufige und lebensbedrohliche Komplikation des akuten Linksherzversagens (2) und damit das Resultat einer Erhöhung des hydrostatischen Druckes in den Lungenkapillaren. Die häufigste Ursache hierfür ist eine akute Dekompensation einer bestehenden Herzinsuffizienz (3), zumeist durch einen akuten Myokardinfarkt. Ein hydrostatisches Ödem kann jedoch auch als Folge einer Aortenstenose, bei Klappendestruktion als Komplikation einer Endokarditis oder angeboren durch einen Ventrikelseptumdefekt entstehen, die im Verlauf alle zu einer übermäßigen Volumenbelastung des linken Herzens führen, was schließlich in einem Blutrückstau in den Lungenkreislauf resultiert. Die steigende Inzidenz der Herzinsuffizienz mit 5-10 Fälle pro 1000 Einwohner pro Jahr und eine Prävalenz von 1-2 % in der westlichen Bevölkerung, die bei über 70-Jährigen auf > 10 % steigt, werden in Zukunft sowohl in alternden als auch in wachsenden Gesellschaften eine zunehmende wirtschaftliche Belastung darstellen (4, 5). Hinzu kommt die weiterhin schlechte Prognose der akuten Herzinsuffizienz: Eine Studie in den USA zwischen 1995 und 2004 ergab eine 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 1 von 3 Patienten nach Hospitalisierung (6). Daher ist die Erforschung der akuten und chronischen Herzinsuffizienz sowie ihrer Komorbiditäten inklusive des kardiogenen Lungenödems wichtig, um eine Senkung von Morbidität und Mortalität dieser Erkrankung durch die Entdeckung und Entwicklung neuer therapeutischer Interventionen zu erreichen.

Das nicht-kardiogene Lungenödem vom Permeabilitätstyp entsteht durch einen Anstieg der Permeabilität der Lungenkapillaren für Flüssigkeit und Proteine als Folge direkter oder indirekter Schäden des Gefäßendothels und/oder des Alveolarepithels. Am häufigsten tritt es in Form des akuten Lungenschadens (ARDS - *Acute Respiratory Distress Syndrome*) durch inflammatorische Prozesse im Rahmen einer Sepsis, Pneumonie oder bei Aspiration von Magensäure auf, durch die es zu einem diffusiven, alveolären Schaden und einer Verletzung des Kapillarendothels kommt. Ätiologisch werden viele weitere Formen des Permeabilitätsödems unterschieden wie z.B. das neurogene Lungenödem, das Höhenlungenödem (*High Altitude Pulmonary Edema*, HAPE), das Reperfusionsödem oder der Transfusions-induzierte Lungenschaden (*Transfusion-related Acute Lung Injury*, TRALI), die bei Verdacht auf ein ARDS differentialdiagnostisch abgeklärt werden sollten. Allen Formen ist jedoch gemeinsam, dass sie eine schnelle klinische Diagnose und Therapie benötigen, da sie rasch und mit schwerem Verlauf voranschreiten. Die Mortalität des Permeabilitätsödems variiert je nach Ätiologie und liegt beim ARDS in der Regel bei 40 % (7). In der *Coronavirus disease 2019* (COVID-19)-Pandemie zeigte sich schnell, dass sich die schweren Verläufe der viralen Infektionskrankheit mit dem *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) überwiegend als Pneumonie-induziertes ARDS manifestieren (8). Das COVID-19 ARDS scheint eine noch höhere Mortalität als andere ätiologische ARDS-Formen zu haben: Sie schwankt zwischen 26 % und 61,5 % und bei Patienten, die einer mechanischen Ventilation bedürfen, sogar zwischen 65,7 % und 94 % (9). Große geografische Unterschiede in der Inzidenz des ARDS zeigten sich bereits vor der COVID19-Pandemie: In Europa betrug sie 17,9 pro 100.000 Menschen pro Jahr, wohingegen es in den USA zu 78,9 Neuerkrankungen pro 100.000 Menschen pro Jahr kam. Das ARDS in seinen unterschiedlichen Formen ist nicht selten, wird aber teilweise immer noch nicht schnell genug erkannt oder gar unterschätzt. Das weltweite Etablieren einer allgemeinen therapeutischen Strategie könnte diese Zahlen einander angleichen und minimieren (10).

1.1.1 Pathophysiologie des Lungenödems

Der Flüssigkeitstransport zwischen zwei Kompartimenten über eine semipermeable Membran ist abhängig von drei Faktoren: dem hydrostatischen Druck, dem onkotischen

Druckgradienten und der Membranpermeabilität. Er wird durch die Starling-Gleichung beschrieben.

$$\text{Flüssigkeitstransport} = K_f \times [(P_k - P_i) - \sigma_p (\pi_k - \pi_i)]$$

- K_f - Filtrationskoeffizient
- σ_p - Permeabilität des Endothels für Proteine
- P - Hydrostatischer Druck
- Π - Onkotischer Druck
- k - kapillär
- I - interstitiell

Die Starling-Gleichung erklärt, warum auch in der gesunden Lunge kontinuierlich Flüssigkeit filtriert wird und veranschaulicht, wie Veränderungen des hydrostatischen Druckes oder der Membranpermeabilität den Flüssigkeitstransport beeinflussen können. Durch den hydrostatischen Druckgradienten (ΔP) wird eine Auswärtsfiltration von Flüssigkeit forciert, da der kapilläre Blutdruck (P_k) im Lungenkreislauf ca. 10 mmHg (11) beträgt, während der hydrostatische Druck im Interstitium (P_i) nahezu bei null liegt. Der kolloidosmotische (onkotische) Druckgradient ($\Delta \Pi$) wirkt dem hydrostatischen Druckgradienten entgegen. Onkotisch wirksame Teilchen innerhalb der Kapillare (π_k) wirken reabsorptiv und entziehen dem Interstitium Flüssigkeit. Die beiden Druckgradienten gleichen sich über das kapilläre Netz zwischen Arteriolen und Venolen nahezu aus, jedoch überwiegt die Filtration in geringem Maße. Die Menge der filtrierten Flüssigkeit ist jedoch nicht nur von der Größe dieser entgegengesetzten Druckgradienten abhängig, sondern auch von der Permeabilität der semipermeablen Membran für Flüssigkeit (K_f) und Proteine (σ_p). Außerdem spielt der Lymphabfluss eine kompensatorische Rolle bei dem Abtransport von extravaskulär akkumulierter Flüssigkeit und kann diese dem vaskulären System in gewissem Maße zurückführen (Abbildung 1-1).

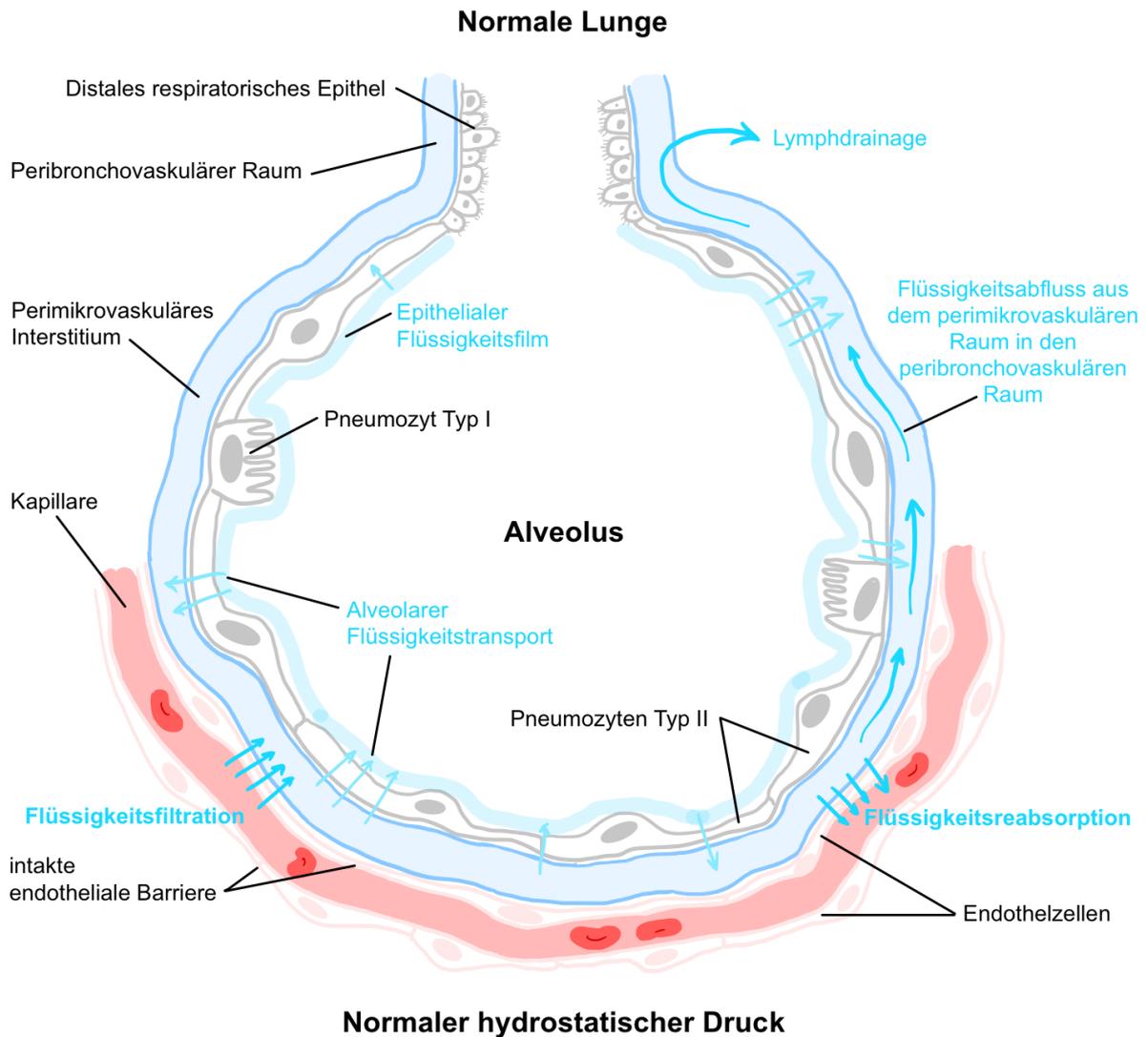


Abbildung 1-1: Physiologie des mikrovaskulären Flüssigkeitstransport in der Lunge (modifiziert nach Lorraine B. Ware, M.D. und Michael A. Matthay, M.D., NEJM, 2005)

In der normalen Lunge wird aufgrund der Differenz zwischen hydrostatischem und onkotischem Druck sowie in Abhängigkeit der Permeabilität des Kapillarendothels kontinuierlich Flüssigkeit aus den Gefäßen in den interstitiellen Raum filtriert. Über die Lymphe kann die vom perimikrovaskulären in das peribronchovaskuläre Interstitium abfließende akkumulierte Flüssigkeit drainiert und wieder in die Zirkulation zurückgeführt werden (12). Innerhalb des Alveolus verbleibt immer ein dünner epithelialer Flüssigkeitsfilm (*epithelial lining fluid* = ELF) auf den Pneumozyten (*alveolar epithelial type I and II cells*, AT I und AT II). Die ELF wird durch auf den Pneumozyten exprimierte Ionentransporter konstant gehalten.

Kardiogenes Lungenödem:

Durch Erkrankungen des Herzens, die zu einer Volumenüberlastung des linken Ventrikels führen, kommt es zum Rückstau des Blutes in die Gefäße des kleinen Kreislaufes mit einer daraus resultierenden Druckerhöhung im pulmonalen Gefäßsystem.

Das Gleichgewicht des Flüssigkeitstransports der Alveolarkapillaren verschiebt sich in Richtung der Auswärtsfiltration, kann zunächst aber noch durch das Lymphsystem kompensiert werden. Übersteigt die hydrostatische Druckdifferenz die onkotische Druckdifferenz zwischen Gefäßen und Interstitium so weit, dass das Missverhältnis der beiden Druckgradienten zwischen kapillärem und alveolärem Raum nicht durch das Lymphsystem oder die anderen Stellschrauben der Starling-Gleichung ausgeglichen werden kann, kommt es zur exzessiven Flüssigkeitseinlagerung und Bildung eines Ödems (1, 13) (Abbildung 1-2 A):

Zunächst entsteht ein interstitielles Ödem, bei dem der peribronchiale Raum mit 300-400 ml des Auswärtsfiltrats gefüllt werden kann, bevor es durch weiter zunehmenden intravasalen Druck zum Flüssigkeitsübertritt in die Alveolen kommt (*alveolar flooding*). Das interstitielle Lungenödem bildet sich zuerst im Bereich der Lungenbasis aus, da dieser Bereich aufgrund der Schwerkraft stärker durchblutet wird. Die dadurch verlängerte Diffusionsstrecke und damit einhergehende schlechtere Oxygenierung führt über den von Euler-Liljestrand-Mechanismus zu einer Umverteilung der Lungenperfusion in obere Areale. Der von Euler-Liljestrand-Mechanismus ist ein physiologischer Reflex zur Reduktion pulmonaler Shunts in minderbelüfteten Lungenarealen. Regionale Hypoxie im Lungengewebe führt dabei über die Vasokonstriktion pulmonaler Gefäße zu einer Umverteilung der Perfusion in besser belüftete Areale, was röntgenologisch an einer Kranialisierung¹ zu erkennen ist. Die interstitielle Flüssigkeitseinlagerung ist radiologisch weiterhin an peribronchialen Verdickungen („*cuffing*“) und Kerley-A- und B-Linien² diagnostizierbar, die als retikuläres Verschattungsmuster imponieren (Abbildung 1-3 A). Wenn die Kapazität des interstitiellen Raums überschritten wird, tritt Flüssigkeit zusätzlich in die Alveolen über. Das alveoläre Ödem zeichnet sich entsprechend durch ein azinäres Verschattungsmuster aus, bei dem sich die luftgefüllten Bronchialräume dunkel gegenüber den hellen, konfluierenden und flüssigkeitsgefüllten Alveolen abgrenzen (positives Bronchopneumogramm) (13, 14).

¹ Röntgenologisch vermehrte Gefäßzeichnung in apikalen Bereichen der Lunge durch Blutumverteilung bei erhöhtem pulmonalen Venendruck z.B. bei dekompensierter Linksherzinsuffizienz.

² Streifenschatten im Röntgenbild bei kardialer Stauung: Typ A in den Lungenoberfeldern, Typ B (am häufigsten) in der Peripherie der Unterlappen („markierte“ interlobuläre Septen) als Zeichen eines interstitiellen Lungenödems.

Permeabilitätsödem:

Das ARDS – eine akut lebensbedrohliche Erkrankung der Lunge - ist durch die Entwicklung eines Permeabilitätsödems gekennzeichnet (15). Das Syndrom zeichnet sich durch ein akutes Einsetzen oder eine rapide Verschlechterung der respiratorischen Symptome; radiologisch nachweisbare, bilaterale Lungeninfiltrate, für die eine kardiogene Ursache in der Echokardiographie ausgeschlossen werden kann; sowie einen Horowitz-Quotienten ($P_{aO_2}^3 / F_{iO_2}^4$) ≤ 300 mmHg aus. Nach der sogenannten Berlin-Definition werden nach dem Ausmaß der Reduktion des Horowitz-Quotienten die drei Schweregrade mild ($200 \text{ mmHg} < P_{aO_2} / F_{iO_2} \leq 300 \text{ mmHg}$), moderat ($100 \text{ mmHg} < P_{aO_2} / F_{iO_2} \leq 200 \text{ mmHg}$) und schwer ($P_{aO_2} / F_{iO_2} \leq 100 \text{ mmHg}$) unter Beatmung mit einer *positive end expiratory pressure* PEEP ≥ 5 cmH₂O unterschieden (16), die mit entsprechend steigender Mortalität assoziiert sind.

Anders als beim kardiogenen Lungenödem sind im ARDS für die Ödembildung nicht primär die Starling-Kräfte ausschlaggebend, sondern Schäden in der alveolar-kapillären Barriere, die mit erhöhter Gefäßpermeabilität einhergehen (Abbildung 1-2 B). Durch direkte und indirekte Lungenschäden strömt Protein-reiche Flüssigkeit in das Interstitium und die Alveolen ein, was u.a. einen Anstieg des interstitiellen onkotischen Druckes (π_i) nach sich zieht. Über die geschädigte Barriere kann sich der π_i immer mehr dem intravasalen Protein-osmotischen Druck (π_k) angleichen und den protektiv reabsorptiven Druckgradienten, der in der gesunden Lunge einen Teil der hydrostatisch auswärtsfiltrierten Flüssigkeit wieder dem Gefäßsystem zuführen würde, aufheben. Der Flüssigkeitseinstrom sowohl im interstitiellen als auch im alveolären Raum und die verminderte Reabsorptionsfähigkeit des alveolären Epithels führen zur Ödembildung (7, 13). Die daraus resultierende Verlängerung der Diffusionstrecke und Verkleinerung der Gasaustauschfläche aufgrund der mit Wasser gefüllten Alveolen führt zu einer zunehmenden Beeinträchtigung des Gasaustausches mit Hypoxämie, die sich beim Patienten symptomatisch in Dyspnoe und Tachykardie äußert. Zusätzlich kommt es bei ARDS-Patienten durch eine Dysfunktion des Surfactants zu Atelektasen (17, 18) und einer Erhöhung des Totraumvolumens, was zusammen mit dem von Euler-Liljestrand-

³ arterieller Sauerstoffpartialdruck

⁴ Volumenanteil von Sauerstoff am inspiratorischen Sauerstoffgemisch

Mechanismus die Hypoxämie weiter verstärkt. Surfactant-Proteine sind in den Alveolen u.a. wichtig für die antibakterielle Immunabwehr, sowie die Stabilisierung der Surfactant-Phospholipide, mit denen sie gemeinsam das Kollabieren der Alveolen während der Expiration verhindern (17). Bei fortschreitendem ARDS wird das Endothel sowie das Epithel der Blut-Luft-Barriere zunehmend durch inflammatorische Prozesse weiter geschädigt (19). Durch den Barrierschaden können neben Protein-reicher Flüssigkeit auch Immunzellen wie neutrophile Granulozyten aus dem vaskulären Raum in die Alveolen einwandern. Zusammen mit aktivierten Alveolarmakrophagen können diese durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine die Chemotaxis und Aktivierung weiterer Immunzellen fördern (Abbildung 1-2 B). Die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, darunter Interleukin 1- β (IL-1 β), IL-8, *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) und *transforming growth factor- β* (TGF- β), hemmen die Funktion und Expression wichtiger Ionen-Transporter der alveolären Epithelzellen und inhibieren damit den resorptiven Flüssigkeitstransport des Alveolarepithels (20).

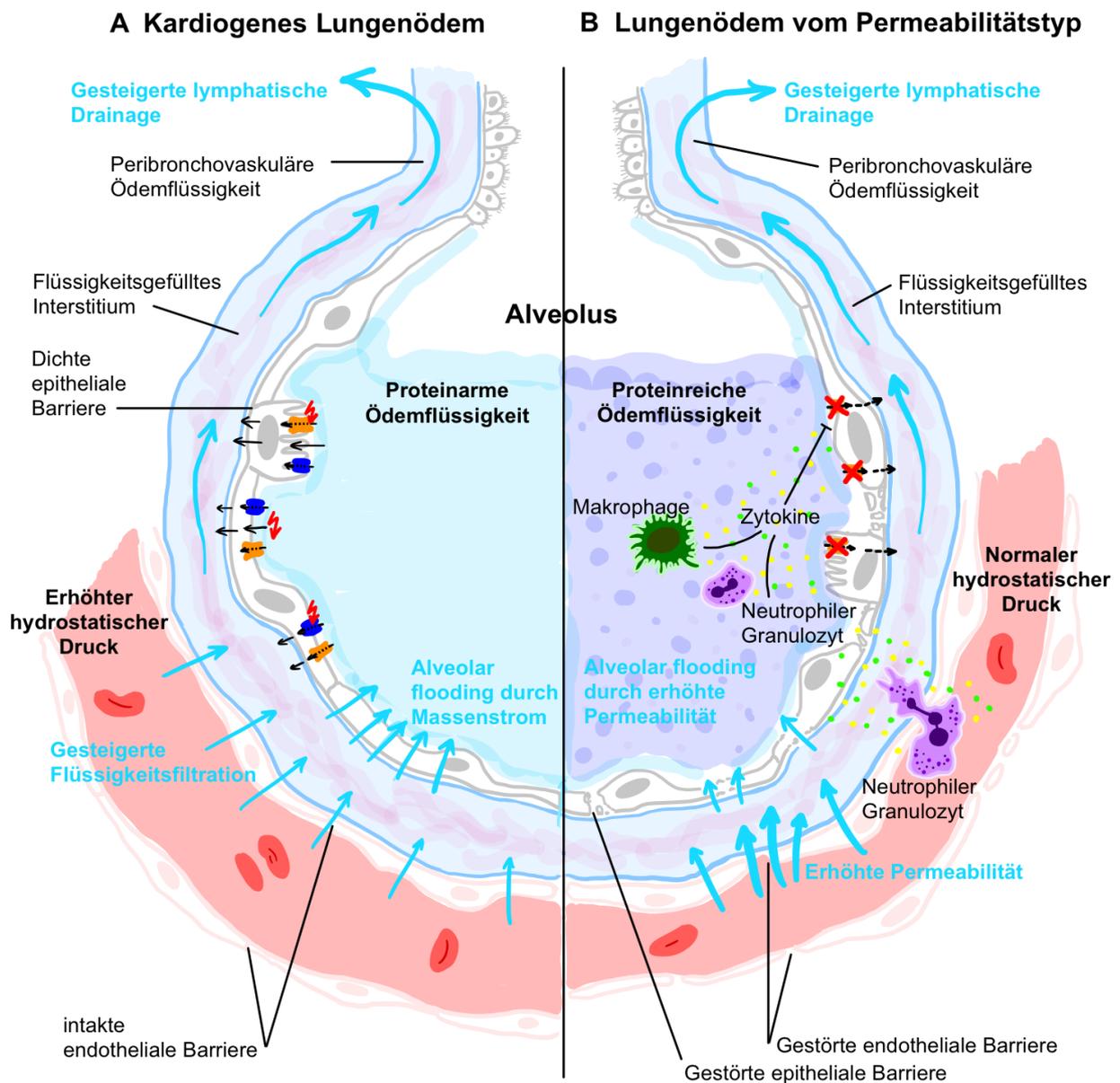


Abbildung 1-2: Pathophysiologie des mikrovasculären Flüssigkeitstransport im Lungenödem (modifiziert nach Lorraine B. Ware, M.D. und Michael A. Matthay, M.D., NEJM, 2005)

In der gesunden Lunge ist der epitheliale Flüssigkeitsfilm streng reguliert. Die Flüssigkeitsreabsorption aus den Alveoli und die Flüssigkeitsfiltration in die Lunge gleichen sich entlang des kapillären Verlaufs nahezu aus. Steigt der hydrostatische Druck in den Lungenkapillaren, nimmt die transvaskuläre Filtrationsrate zu (A). Wenn der interstitielle Druck der Lunge den der Pleura übersteigt und das Flüssigkeitsüberangebot nicht von den Lymphgefäßen abgefangen werden kann, entstehen durch den Übertritt der Flüssigkeit in die Pleurahöhle Pleuraergüsse. Die Ödemflüssigkeit ist aufgrund des intakten Endothels Protein-arm. Die Resorption alveolärer Flüssigkeit unterliegt dem aktiven Transport von Natrium und Chlorid über die Luft-Blut-Schranke. Apikale Transporter der alveolären Epithelzellen Typ I (AT I) und Typ II (AT II) reabsorbieren unter physiologischen Bedingungen Ionen aus den Alveolen und erzeugen somit einen Gradienten für Wasser, welches passiv über Wasserkanäle oder parazellulär zur vaskulären Seite abfließt. Im kardio-genen Lungenödem ist dieser protektive Flüssigkeitstransport gestört (21, 22) (rote Blitze, gestrichelte Transportpfeile). Ein nicht-kardio-gen oder Permeabilitäts-Typ Ödem (B) tritt bei einer Permeabilitäts-erhöhung der mikrovasculären Membran durch direkte oder indirekte Lungenschäden (z.B. *Acute Respiratory Distress Syndrome - ARDS*) auf, die zu einem Einstrom Protein-reicher Flüssigkeit in die Alveolen führen, da durch den Barrierschaden größere Moleküle wie Plasmaproteine nicht mehr im Gefäßraum zurückgehalten werden können. Des Weiteren kommt es zu einer Migration neutrophiler Granulozyten vom vaskulären in den alveolären Raum. Alveolarmakrophagen sezernieren proinflammatorische Zytokine, die eine Chemotaxis neutrophiler Granulozyten sowie die Produktion

weiterer Zytokine zusätzlich antreiben und dadurch die alveoläre Flüssigkeitsresorption durch eine verminderte Expression oder Aktivität der beteiligten Ionenkanäle und -transporter im Alveolarepithel schwächen (rote Kreuze, gestrichelte Transportpfeile). Das Ausmaß der Ödemausprägung hängt davon ab, ob und wie stark das alveoläre Epithel geschädigt ist, sowie dessen Kapazität, das Ödem aktiv aufzulösen (12).

Radiologisch imponiert das Permeabilitätsödem als Schmetterlingsödem und zeigt im Gegensatz zum kardiogenen Ödem von Beginn an eine alveoläre Flüssigkeitsakkumulation (Abbildung 1-3 B), da pathognomonisch meist nicht nur das Endothel der Lungenkapillaren geschädigt, sondern auch die Integrität des alveolären Epithels durch inflammatorische Prozesse gestört ist (1, 13).

Eine genaue Evaluation der klinischen Präsentation von Patienten mit Permeabilitätsödem im Rahmen des ARDS in Abgrenzung zum kardiogenen Lungenödem ist - trotz teilweise schwieriger Unterscheidung der ähnlichen Klinik - wichtig, da sich die Therapie und Prognose des Lungenödems bei kardialer und nicht-kardialer Ursache voneinander in erheblichem Maße unterscheiden (12).

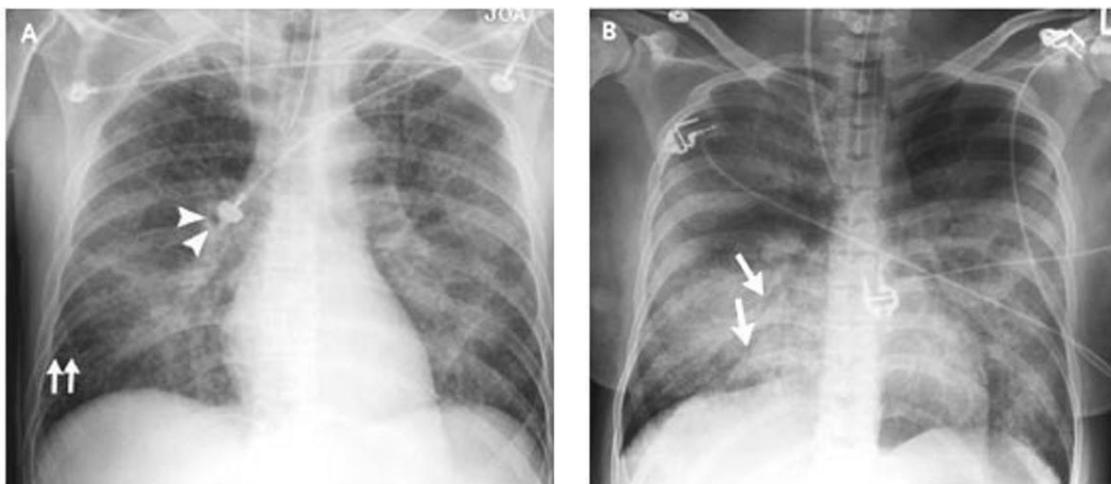


Abbildung 1-3: Repräsentative Röntgen-Thorax-Aufnahmen (anterior-posteriorer Strahlengang) von Patienten mit kardiogenem (A) und nicht-kardiogenem (B) Lungenödem (Reproduced with permission from Lorraine B. Ware, M.D. and Michael A. Matthay, M.D., NEJM, 2005; Copyright Massachusetts Medical Society)

(A) Patient mit akutem kardiogenem Lungenödem nach einem Myokardinfarkt. Typisch für diesen Ödemtyp sind die peribronchovaskulären Verdickungen (Pfeilspitzen) sowie Kerley-B-Linien (Pfeile). Einige Bereiche zeigen bereits ein azinäres Verschattungsmuster, während die Peripherie relativ ausgespart bleibt.

(B) Patient mit *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) durch eine von *Streptococcus pneumoniae* ausgelöste Sepsis. Röntgenologisch zeigen sich charakteristisch, jedoch auch unspezifisch diffuse alveoläre Infiltrate mit unregelmäßiger, bilateraler Verteilung und positivem Aerobronchogramm (Pfeile) als Zeichen einer Pneumonie (12).

1.1.2 Therapie des Lungenödems

Das Wissen über die Ursache eines akuten Lungenödems ist entscheidend für dessen Therapie: Während beim hydrostatischen Lungenödem die Behandlung mit Diuretika und

Nitraten (Senkung der Vorlast) sowie die Senkung der Nachlast im Vordergrund steht, ist beim Permeabilitätsödem v.a. die mechanische, Lungen-protective Ventilation von Bedeutung. Bei beiden Ödemtypen muss die Therapie der Behandlung der Grunderkrankung angepasst werden, z.B. beim kardiogenen Typ durch Revaskularisation der Koronarien nach Myokardinfarkt oder durch Ersatz bzw. Rekonstruktion der Klappen bei Mitralklappeninsuffizienz. Patienten mit nicht-kardiogenem Lungenödem werden bei einer ursächlichen Pneumonie antibiotisch behandelt (12), während beim Lungenschaden durch Säureaspiration auch eine Bronchoskopie indiziert sein kann, um aspirierte Partikel aus dem Bronchialsystem zu entfernen (23).

Derzeitig steht beim akuten Lungenödem die symptomatische Therapie im Vordergrund. Die Erforschung kausaler Therapieansätze, die an den pathophysiologischen Mechanismen der alveolären und interstitiellen Flüssigkeitsakkumulation angreifen, könnte in der klinischen Anwendung die allgemein schlechte Prognose und relativ hohe Mortalität des Lungenödems in der Zukunft verbessern.

Kardiogenes Lungenödem:

Die Flüssigkeitsakkumulation in den Alveolen führt durch lokale Hypoxämie zum Kardinalsymptom des kardiogenen Lungenödems: Dyspnoe. Die akute kardiale Dekompensation birgt die Gefahr der respiratorischen Insuffizienz, da durch das Lungenödem die pulmonale Diffusionskapazität sowie das Ventilations-Perfusions-Verhältnis gestört sind. Durch den beeinträchtigten Gasaustausch wird das pulmonal-arterielle Blut schlechter oxygeniert und es kommt zur Hypoxämie. Symptomatisch tritt bei Patienten z.B. eine Orthopnoe oder ein Asthma cardiale⁵ auf. Die pulmonale Flüssigkeitsüberladung lässt sich im Stadium des alveolären Ödems oder bei Pleuraergüssen als feuchte Rasselgeräusche auskultieren. Die Verbesserung der aus dem akuten Linksherzversagen resultierenden, charakteristischen klinischen Zeichen, sowie der Symptome der Stauung stehen neben der Behandlung der Grundkrankheit als therapeutische Ziele im Vordergrund (24, 25). Die Ausschwemmung des Ödems wird pharmakologisch über die Nieren forciert. Diuretika erhöhen das Urinvolumen durch

⁵ Hustenanfälle mit Dyspnoe durch Verengung der Atemwege infolge des interstitiellen Lungenödems, die v.a. nächtlich auftreten, da die Lungenstauung im Liegen begünstigt wird.

Inhibition luminaler Ionentransporter und -kanäle im Tubulussystem der Niere, über die das filtrierte Natrium rückresorbiert wird. Die Diuretika werden nach ihrem spezifischem Wirkmechanismus und -ort in verschiedene Gruppen unterteilt. Schleifendiuretika hemmen den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter 2 (NKCC2) im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife. Leitsubstanz der Wirkstoffgruppe ist Furosemid, weitere Vertreter sind Torasemid und Bumetanid. Unter den verschiedenen Diuretikaklassen besitzen sie die höchste natriuretische Wirkung. Da die durch Diuretika gesteigerte NaCl Ausscheidung massiv Wasser (H_2O) mit sich zieht, haben Schleifendiuretika neben der Ausschwemmung von Ödemen auch eine antihypertensive Wirkung. Das osmotische Wirkprinzip der Schleifendiuretika hat einen positiven Nebeneffekt auf die Alveolen: Der von ihnen aufgebaute elektrochemische Gradient wirkt wasserziehend und verringert bei intravenöser Applikation in hohen Dosen das Extrazellulärvolumen, wodurch der Gasaustausch über die Blut-Luft-Schranke in der flüssigkeitsgefüllten Lunge optimiert werden kann. Schleifendiuretika aktivieren außerdem die intrarenale Prostaglandinsynthese und wirken zusätzlich vorlastsenkend über den verminderten Tonus der Kapazitätsgefäße (26). Furosemid wird als Standardtherapeutikum bei akut dekompensierter Herzinsuffizienz eingesetzt (27) und führt bei frühzeitiger venöser Injektion innerhalb der ersten Stunde nach klinischer Präsentation in der Notaufnahme zu einer signifikant geringeren *In-Hospital* Mortalität (2,3 %) im Vergleich zu Patienten mit verzögerter Behandlung (6,0 %) (28). Meta-Analysen zeigen zudem, dass Diuretika auch bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz im Vergleich zur Placebogruppe die Mortalität bzw. die Verschlechterung des Krankheitszustands tendenziell senken und im Vergleich zur *active controlled trial* (Kontrollgruppe mit vergleichbarer Standardtherapie) die körperliche Leistungsfähigkeit verbessern (29, 30).

Permeabilitätsödem:

Patienten mit diesem Ödemtyp versterben meist an einem Multi-Organ-Versagen oder Sepsis-Syndrom bzw. ihrer zugrundeliegenden Erkrankung (31, 32). Daher steht die Behandlung der Grundkrankheit, wie zuvor erwähnt, an vorderster Stelle. Jedoch ist die refraktäre Hypoxie durch das Ödem bereits *per se* eine lebensbedrohliche Komplikation, die es frühzeitig zu behandeln gilt. Bei akuter respiratorischer Insuffizienz kann der pulmonale Gasaustausch durch eine Beatmungstherapie in Bauchlage (33) mit PEEP und einem reduzierten Atemzugvolumen (AZV) von maximal 6 mL/kg *predicted body*

*weight*⁶ verbessert werden (34). Symptomatisch und supportiv sollte die Therapie an die Herz-Kreislauf-Funktion und den Flüssigkeitshaushalt angepasst werden. Als Ultima-ratio kann ein extrakorporales Lungenersatzverfahren die Lungenfunktion des Patienten übernehmen (35). Pathophysiologisch sind u.a. das alveolo-kapilläre Leck, die verminderte alveoläre *Clearance* und der Mangel an wirksamen Surfactant durch die diffuse Entzündungsreaktion der Lunge wichtige pathophysiologische Ansatzpunkte, um die Bildung von Atelektasen und eine daraus resultierende schwere Hypoxämie im ARDS zu verhindern.

Bislang sind trotz guter vorklinischer Daten alle pharmakologischen Studien zum ARDS in der Klinik gescheitert (36-38). Ein therapeutischer Ansatz war die Verwendung beta-adrenerger Agonisten, da diese über drei Mechanismen ein Lungenödem beim akuten Lungenschaden eindämmen können: Sie stimulieren die alveoläre Flüssigkeitsresorption, wirken anti-inflammatorisch und bronchodilatatorisch (39). Im *beta-agonist lung injury trial* (BALTI), einer randomisierten Placebo-kontrollierten klinischen Studie, reduzierte eine intravenöse Salbutamolgabe bei ARDS-Patienten die extravaskuläre Lungenflüssigkeit im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant (40). Im BALTI 2 wurde die Patientenrekrutierung jedoch nach Zwischenanalysen abgebrochen, da die Mortalität der Salbutamol-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant erhöht war (34 % vs. 23 %) (37, 41). Von einer routinemäßigen Behandlung mit dem β 2-Agonisten Salbutamol wird daher abgeraten. Auch die Anwendung des aerosolisierten β 2-Agonisten Albuterol verbesserte das klinische *Outcome* von ARDS-Patienten nicht (42). Positive Effekte erhoffte man sich ebenfalls durch die ARDS-Therapie mit Statinen, da Simvastatin im Mausmodell des Endotoxin-induzierten Lungenschadens eine inflammatorische Reaktion reduzieren konnte (43). Die randomisiert-kontrollierte klinische Studie zur Hemmung der Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase⁷ beim akuten Lungenschaden (HARP) untersuchte, ob Simvastatin das physiologische und biologische *Outcome* bei Patienten mit akutem Lungenschaden verbessern kann. In der bronchoalveolären Lavage der Simvastatin-Gruppe war das proinflammatorische Zytokin IL-8 signifikant reduziert. Tendenziell besserten sich in der Interventionsgruppe die Oxygenierung, die Atemmechanik sowie nicht-pulmonale Organdysfunktionen (44). In

⁶ Rechnerisch vorhergesagtes, sog. Ideales Körpergewicht für die patientengerechte Einstellung der Beatmung; Berechnung mittels Körpergröße und Geschlecht

⁷ Geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Cholesterinbiosynthese

der HARP-2 Studie zeigte sich jedoch kein besseres klinisches *Outcome* von ARDS-Patienten unter der Simvastatin-Therapie im Vergleich zur Placebo-Gruppe, da es weder einen signifikanten Unterschied der Ventilations-freien Tage noch der 28-Tage-Mortalität zwischen den Gruppen gab (45). Zu ähnlichen Ergebnissen kam die *Statins for acutely injured lungs from sepsis* (SAILS) Studie unter der Anwendung von Rosuvastatin (38) – auch hier war die Zahl der Ventilations-freien Tage und die Mortalität nicht reduziert. Aufgrund der bisher fehlenden klinischen Erfolge ist die Suche nach einem kausalen Therapieansatz weiterhin Gegenstand intensiver klinischer Forschung.

Für das *Outcome* der Therapie des Lungenödems könnte der Flüssigkeitstransport im Alveolarepithel ein vielversprechendes *Target* sowohl beim kardiogenen als auch beim Permeabilitätstyp sein.

1.2 Flüssigkeitstransport im Alveolarepithel

Jede Zelle unseres Körpers ist auf die kontinuierliche O₂-Versorgung angewiesen. Die Lunge sorgt mit ihren rund 500 Mio. Alveolen (46) und einer Gasaustauschfläche von 80-140 m² für dessen Aufnahme aus der Atemluft und die Abgabe des Kohlenstoffdioxids (CO₂) aus dem Blut. Dabei erfolgt die Diffusion der Gase über die alveolarkapilläre Barriere. Diese 0,3 µm dicke Schicht (47) aus respiratorischem Epithel, Endothelzellen, einer gemeinsamen Basallamina (48) und dem Epithel-bedeckenden Flüssigkeitsfilm begrenzt die Alveoli als Septen.

Im epithelialen Anteil unterscheidet man zwei Zelltypen, die die Alveolen auskleiden: Pneumozyten Typ I (*alveolar epithelial cells type I* = AT I) sind große, flache Zellen, die mit 95 % den größten Teil der Oberfläche bedecken (49) und eine minimale Diffusionsstrecke für den Gasaustausch bereitstellen. Die in annähernd gleicher Zahl vorkommenden Pneumozyten Typ II (*alveolar epithelial cells type II* = AT II) kleiden hingegen nur 5 % der Blut-Gas-Schranke aus (49). Letztere sind kleine, kubische Zellen, welche die grenzflächenaktive Substanz Surfactant synthetisieren, sezernieren und recyceln. Surfactant setzt die Oberflächenspannung kleiner Alveolen herab, was ein Kollabieren eben jener bei der Expiration verhindert (50). Außerdem fungieren AT II Zellen als Progenitorzellen, die der Regeneration des Alveolarepithels dienen, und gewährleisten den Ionen- und Flüssigkeitstransport zwischen Luft- und

Blutkompartiment (51). Entgegen der ehemals passiv vermuteten Rolle der AT I Zellen an der Flüssigkeitshomöostase in der Lunge, spricht der Expressionsnachweis der Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase (Na,K-ATPase), des epithelialen Natrium Kanals (ENaC), des *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) und weiterer Transportproteine in AT I Zellen für deren Beitrag am alveolären Flüssigkeitstransport (51-53). Die Barrierefunktion des Alveolarepithels wird durch Zell-Zell-Kontakte, die *tight junctions*, Zonula adherens und Desmosomen realisiert, die die Pneumozyten eng miteinander verknüpfen (54). Luminal sind die Alveolen von einem dünnen Flüssigkeitsfilm (*Epithelial lining fluid* = ELF) bedeckt, der die erste Barriere zwischen der Lunge und der Umwelt darstellt (55). Da die Diffusion einen optimalen Gasaustausch nur über geringe Distanzen erlaubt, muss das Volumen der ELF streng kontrolliert werden (56). Dafür sorgt ein ständiger Flüssigkeitstransport, der je nach Bedingungen ein- oder auswärtsgerichtet abläuft und eng reguliert wird. Entscheidend in der intakten Lunge ist die alveoläre Flüssigkeitsresorption (*alveolar fluid clearance* = AFC), die durch aktiven Wasser- und Ionentransport kontinuierlich Flüssigkeit aus den Alveolen über verschiedene Ionenkanäle in den interstitiellen Raum transportiert (57) (Abbildung 1-4). Der apikale ENaC nimmt dabei eine zentrale Rolle unter den Transportern der AFC ein, da er ~40-60 % des gesamten Na⁺ aus den Alveolen resorbiert (58-60). Die basolaterale Na,K-ATPase (61) baut den dafür notwendigen Gradienten für Na⁺ auf. Zusätzlich zu ENaC tragen weitere apikale Ionentransporter u.a. die *sodium-dependent glucose transporters* (SGLTs) (62, 63) und *sodium-coupled neutral amino acid transporters* (SNATs) (64) durch ihre aktive alveoläre Na⁺-Resorption dazu bei, dass ein osmotischer und elektrochemischer Gradient von apikal nach basolateral aufgebaut wird. Er führt dazu, dass H₂O über Aquaporin-5 Kanäle (AQP5) (65) und parazellulär in Richtung der Blutseite folgt. Zur Wahrung der Elektroneutralität wird Cl⁻ passiv v.a. über CFTR (66, 67) oder parazellulär aus dem Alveolarraum absorbiert.

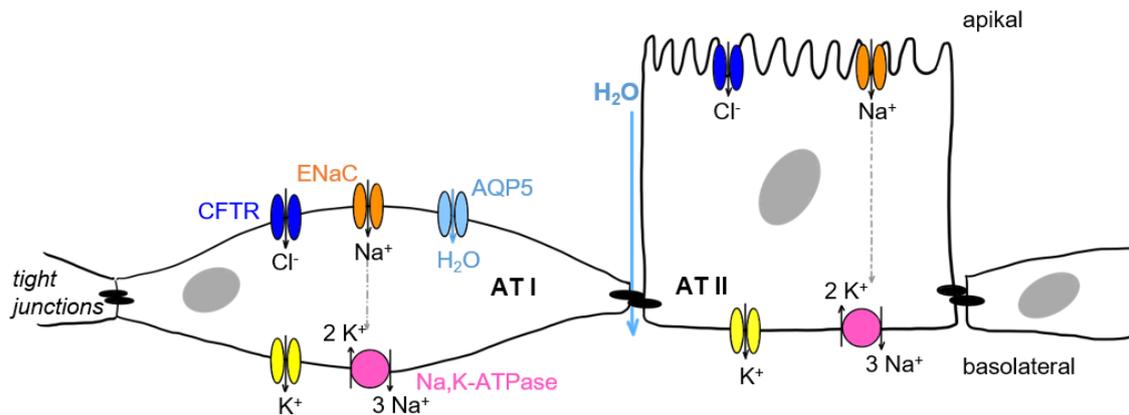


Abbildung 1-4: Vereinfachtes Schema der alveolären Flüssigkeitsresorption (AFC) in der gesunden Lunge

Die Alveolarepithelzellen Typ I (AT I) und Typ II (AT II), die über *tight junctions* miteinander verbunden sind, gewährleisten den Flüssigkeitstransport im alveolären Epithel. In der gesunden Lunge überwiegt die AFC. An der apikalen Seite der Zellen wird Na^+ aus den Alveolen hauptsächlich durch den Epithelialen Na^+ -Kanal (ENaC) resorbiert. Basolateral erzeugt die Na,K-ATPase den entsprechenden Gradienten. Cl^- und H_2O folgen dem elektrochemischen und osmotischen Gradienten von apikal nach basolateral entweder parazellulär oder durch entsprechende Cl^- Kanäle (*cystic fibrosis conductance regulator* CFTR) oder H_2O Kanäle (AQP5).

Die Inhibition oder der Verlust einzelner oder mehrerer Ionenkanäle des regulierenden Netzwerks alveolärer Flüssigkeitstransporte kann zu einer verminderten AFC und damit schließlich zur Bildung eines Lungenödems führen.

1.3 Gestörter Flüssigkeitstransport

Traditionell wird die Pathophysiologie des kardiogenen Lungenödems mit Hilfe der Starling-Gleichung beschrieben (1.1.1). Jedoch spielt auch die alveoläre Flüssigkeitsregulation durch Ionentransporter und Kanäle eine kritische Rolle (61, 68). Vorherige Arbeiten zeigten, dass die Bildung des kardiogenen Lungenödems durch aktive Signalprozesse gefördert wird. Dabei scheint die Regulation der Ionentransporter entlang der Luft-Blut-Schranke einen entscheidenden Beitrag zur Pathophysiologie zu leisten (21, 22). Unter physiologischen Bedingungen überwiegt beim Flüssigkeitstransport in der Lunge die alveoläre Flüssigkeitsresorption, die durch eine Na^+ -Resorption v.a. über ENaC angetrieben wird. Eine Erhöhung des linksatrialen Druckes (P_{LA}), die im Rahmen verschiedener Herzerkrankungen auftritt, steigert den Druck im pulmonalen Gefäßsystem und führt zu einer vermehrten Flüssigkeitsfiltration nach luminal. Eine erhöhte Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion im vaskulären Endothel

durch die druckbedingte Dehnung der kapillaren Endothelzellen hemmt zudem die protektive AFC (22, 69). Das freigesetzte NO inhibiert die alveoläre Na⁺- und Flüssigkeitsresorption des epithelialen ENaC durch sowohl cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP)-abhängige und cGMP-unabhängige Effekte (22, 70-73). Erschwerend kommt hinzu, dass ein erhöhter hydrostatischer Druck aber nicht nur die aktive alveoläre Flüssigkeitsabsorption hemmt, sondern vielmehr den transepithelialen Flüssigkeitstransport umkehrt, was zu einer effektiven alveolären Flüssigkeitssekretion (*alveolar fluid secretion* - AFS) führt. Dies wurde in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in einem Modell des kardiogenen Lungenödems an isoliert perfundierten Rattenlungen, bei denen hydrostatischer Stress zunächst zu einer Hemmung der ENaC-vermittelten epithelialen Na⁺ Absorption und damit der AFC führte, nachgewiesen (21). Die abnehmende intrazelluläre Na⁺-Konzentration durch Hemmung des ENaC generiert dabei einen Gradienten für den basolateralen Na⁺-Eintritt, der nun die Triebkraft für die AFS bildet. Die Hemmung des ENaCs spielt in diesem Konzept eine Schlüsselrolle, was durch Untersuchungen mit dem ENaC-Inhibitor Amilorid im Modell des hydrostatischen Lungenödems bestätigt werden konnte. Amilorid führte in der Tat bereits unter Normalbedingungen ($P_{LA} = 5 \text{ cmH}_2\text{O}$) zu einer Umkehr des pulmonalen Flüssigkeitstransports und damit zu einer aktiven AFS (21).

Der apikale Cl⁻-Kanal CFTR ermöglicht eine bidirektionale Transportrichtung von Cl⁻-Ionen über das Alveolarepithel (74). Im Rahmen der AFC wirkt er einwärtsgerichtet und reabsorbiert Cl⁻-Ionen aus dem Alveolarraum. Die Bedeutung des Cl⁻-Transports für den alveolären Flüssigkeitstransport und seine Rolle bei der Ödembildung wurde von Solyosi und Kollegen in weiteren Untersuchungen an isoliert perfundierten Rattenlungen mit alveolärer Instillation bzw. vaskulärer Perfusion Cl⁻-freier Flüssigkeit unter normalem oder erhöhtem hydrostatischen Druck nachgewiesen (21). Die Cl⁻-freie Instillation der Alveolen reduzierte die AFC nur bei normalen Druckwerten, während die Cl⁻-freie Lungenperfusion die AFS bei erhöhtem P_{LA} hemmte. Dies weist darauf hin, dass die AFS bei erhöhtem P_{LA} durch einen umgekehrten transepithelialen Cl⁻-Transport angetrieben wird, die Transportrichtung des Cl⁻ über den CFTR also in die Alveolen gerichtet ist (21).

Eine Inhibition der Na,K-ATPase mit Ouabain hemmt sowohl die AFC unter Normalbedingungen als auch die AFS bei erhöhtem hydrostatischen Druck (21). Dies zeigt, dass die Flüssigkeitsakkumulation in den Alveolen beim hydrostatischen

Lungenödem nicht nur passiv und durch parazellulären Transport erfolgt, sondern dass sekundär aktive Ionentransporter, die durch eben diese Na,K-ATPase angetrieben werden, zur Lungenödembildung beitragen.

Zusammenfassend kommt es bei der Ausbildung eines kardiogenen Lungenödems infolge eines erhöhten P_{LA} durch einen funktionellen Verlust der ENaC-Kanäle zu einem basolateralen Na^+ -Einstrom in die Zelle und durch eine Cl^- -angetriebene apikale AFS über CFTR zu einem Cl^- -Gradienten von basolateral nach apikal (Abbildung 1-5). Die veränderten Ionengradienten, welche die AFS für die Ödembildung nach Linksherzversagen antreiben, erfordern somit einen basolateralen Na^+ - und Cl^- -Eintritt durch einen sekundär-aktiven Transporter. Dieser Ionentransport könnte über den Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -Kotransporter 1 (NKCC1) reguliert sein (Abbildung 1-5). Bei erhöhtem hydrostatischen Druck ($\uparrow P_{LA}$) würde NKCC1 durch den einwärtsgerichteten, basolateralen Na^+ - und Cl^- -Transport die aufgrund des ENaC-Ausfalls abnehmende intrazelluläre Na^+ -Konzentration wieder ausgleichen und die alveolär-gerichtete Cl^- -Sekretion über CFTR fördern. Somit trüge der Kotransporter durch den Aufbau eines osmotischen Gradienten und dem daraus resultierenden Flüssigkeitsstrom entscheidend zur kardiogenen Ödembildung bei.

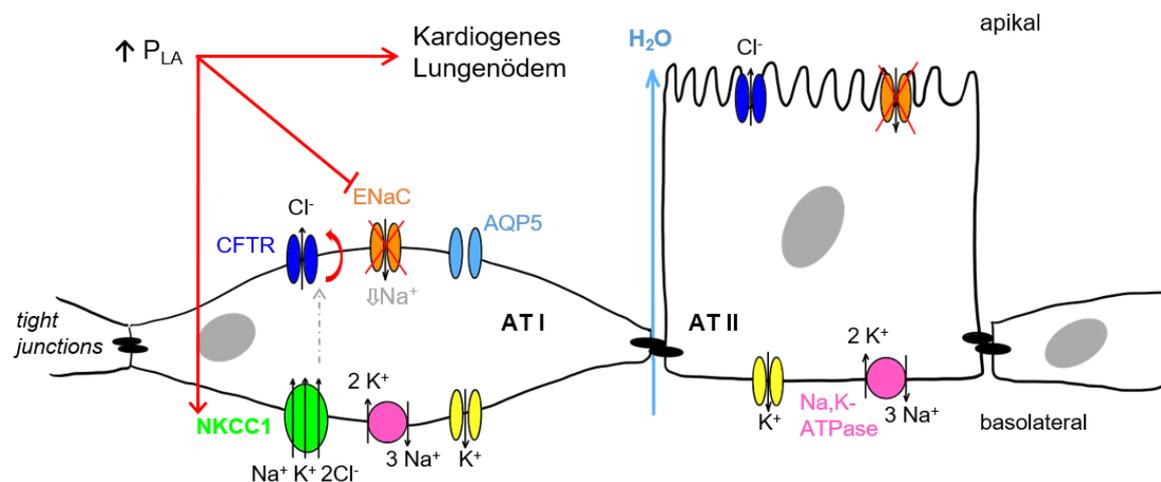


Abbildung 1-5: Konzeptionsvorschlag des alveolären Flüssigkeitstransports beim kardiogenen Lungenödem

Beim kardiogenen Lungenödem führt der erhöhte linksatriale Druck (P_{LA}) des Herzens zu einer Umkehr der alveolären Flüssigkeitsresorption (AFC) in eine alveoläre Flüssigkeitssekretion (AFS). Die Resorption des alveolären Na^+ durch apikale Transporter, insbesondere durch den epithelialen Natrium-Kanal ENaC, ist dabei vermindert. Es entsteht ein Gradient für die basolaterale Na^+ -Aufnahme. Dadurch kehrt sich auch die Transportrichtung des *cystic fibrosis conductance regulator* (CFTR) nach apikal um. Der basolaterale Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -Kotransporter (NKCC1) könnte der limitierende Schritt der apikalen Cl^- -Sekretion sein und würde durch einen erhöhten P_{LA} aktiviert werden. Der

osmotische Gradient würde zum Übertritt von Wasser über die Epithelbarriere in den Alveolarraum und je nach Ausmaß zum Lungenödem führen.

Auch beim akuten Lungenschaden mit Permeabilitätsödem trägt eine beeinträchtigte alveoläre Flüssigkeitsreabsorption wesentlich zur Ödembildung bei. So führt die Abnahme der Na⁺- und Cl⁻-Transporter auf Gen- und Proteinebene in humanen AT II Zellen zu einem verminderten vektoriellen absorptiven Flüssigkeitstransport (75). Ursächlich für die Herunterregulierung der Transporter und Kanäle ist vermutlich die Inflammation beim ARDS bzw. je nach Ursache des ARDS z.B. eine virale Infektion bei COVID-19 (76, 77) oder Influenza (78, 79). In der alveolären, Protein-reichen Ödemflüssigkeit von ARDS Patienten konnten verschiedene proinflammatorische Mediatoren, darunter IL-1 β , IL-8, TNF- α und TGF- β detektiert werden (75). Zusätzlich sezernieren Alveolarmakrophagen proinflammatorische Zytokine, mit denen sie andere Immunzellen z.B. neutrophile Granulozyten aktivieren und deren Chemotaxis sowie die Produktion weiterer Zytokine stimulieren. Die freigesetzten inflammatorischen Mediatoren hemmen den alveolären Flüssigkeitstransport, indem sie die Expression und Aktivität der verschiedenen Ionentransporter beeinflussen. TNF- α , TGF- β und IL-1 β reduzieren die Expression von ENaC, dessen verminderte Aktivität die AFC reduziert (20, 80). Auch Hypoxie und Volutrauma⁸ können über die Herunterregulation der Aktivität der Na,K-ATPase den für die AFC notwendigen transepithelialen Natriumtransport mindern (81). Das Zusammenspiel zwischen CFTR-Expression/-Aktivität und inflammatorischen Zytokinen ist weitaus komplizierter (20). Lee und Kollegen (75) zeigten eine Abnahme der Expression und Aktivität von CFTR in AT II Zellen unter der Behandlung mit Ödemflüssigkeit aus dem akuten Lungenschaden. In den submukösen Drüsen des Luftwegepithels aktivierten die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α andererseits cAMP-abhängig CFTR, was eine Sekretion von Flüssigkeit stimuliert (82). Eventuell lässt sich die entgegengesetzte Regulation von CFTR im akuten Lungenschaden durch das Modell von Shamsuddin und Quinton (83) erklären, das die Organisation der kleinen Luftwege in absorptive und sezernierende Areale innerhalb Akkordeon-ähnlicher Falten entlang des Atemweglumens beschreibt. Demnach könnte der Flüssigkeitstransport in absorptiven Bereichen gehemmt sein, während sezernierende Abschnitte weiterhin aktiv sind oder gar verstärkt werden (20). Des

⁸ Überdehnung der Lunge durch Einwirkung hoher Atemzugvolumina

Weiteren beeinflusst die inflammatorische Umgebung der Lunge im akuten Lungenschaden auch die Expression und Aktivität von NKCC1 (84, 85). Mäuse mit fehlender NKCC1-Expression sind bei bakterieller Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* vor Bakteriämie und hypothermer Sepsis geschützt und weisen eine verminderte vaskuläre Permeabilität auf (84). Umgekehrt führte die Infektion mit *Leptospirosis* in einem Modell des Lungenödems von Andrade und Kollegen (85) bei Hamstern zu einer Hochregulation der NKCC1-Expression und zu einer Abnahme der ENaC Expression mit Dysregulation des Flüssigkeitstransports in der Lunge. Beide Studien legen nahe, dass auch beim Permeabilitätsödem eine Dysregulation des NKCC1-Kotransporters eine Rolle bei der alveolären Flüssigkeitsakkumulation spielen könnte.

1.4 Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporter (NKCC)

Die elektroneutralen NKCC-Symporter gehören zur *SLC12* Familie der *solute carrier* Membrantransporter. NKCCs transportieren sekundär aktiv 1 Na⁺, 1 K⁺ und 2 Cl⁻ (1:1:2 Stöchiometrie) über eine Membran. Dabei werden zwei Isotypen der Na⁺-gekoppelten Cl⁻-Transporter unterschieden: NKCC1 liegt enkodiert durch das *SLC12A2* Gen auf Chromosom 5 und NKCC2 (*SLC12A1*) auf Chromosom 15. Auf Proteinebene sind 58 % ihrer Aminosäuren identisch. NKCC1 ist mit 131,4 kDa etwas größer als NKCC2 mit einer molekularen Größe von 121,3 kDa. Der Größenunterschied ergibt sich hauptsächlich durch ein längeres Amino (N)-terminales Ende im NKCC1-Transporter, dies ist zugleich der Teil des Proteins mit der geringsten Übereinstimmung zu NKCC2. Der zytosolische N-Terminus ist v.a. wichtig für die Kotransport-Funktion. Er enthält zwei Subdomänen mit einer Bindungsstelle für Kinasen und einer Phosphorylierungsstelle zur Aktivierung des Transporters. Die erste Subdomäne interagiert mit zwei spezifischen *Sterile 20* (Ste20)-verwandten Kinasen: *Ste20p-related Proline Alanine-rich Kinase* (SPAK) und *Oxidative Stress responsive Kinase* (OSR1). Diese können das NKCC-Molekül durch Phosphorylierung der zweiten Subdomäne an verschiedenen Threonin (Thr)- und/oder Serin (Ser)-Resten aktivieren. Weiterhin setzt sich der Transporter aus einem transmembranären Teil und einem Carboxy (C)-terminalen Ende zusammen. Der transmembranäre Teil des NKCC besteht aus 12 hydrophoben transmembranären alpha-Helices (TM) und einer großen extrazellulären Schleife zwischen TM7 und TM8. Diese große extrazelluläre Schleife kann posttranslational glykosyliert werden, was zu einer

Erhöhung der zuvor beschriebenen Molekülmasse führt (86). Außerdem ist diese Schleife essenziell für die Membranexpression, die Transportaktivität und die Affinität für Schleifendiuretika (87). Die Bindung der Ionen und Schleifendiuretika wird anderen transmembranen Domänen zugeschrieben (88, 89). Das zytosolische C-terminale Ende dient der Reifung, Dimerisierung (90) und dem Transport des Proteins an die Plasmamembran. Die Dimerisierung von NKCC-Monomeren wird durch TM9 und TM12 ermöglicht (91). Über die Dimerisierung des Proteins kann der C-Terminus ergänzend zu den Phosphorylierungsstellen des N-terminalen Endes Einfluss auf die Regulation der Transporteraktivität nehmen (92). Wie genau die Konformationsänderungen die Proteinaktivierung beeinflussen, ist jedoch noch unklar (93). NKCC1 enthält ein Di-Leucin Motiv im Exon 21, das die basolaterale Zuordnung ermöglicht. Da im *SLC1A1* Gen dieses Motiv durch alternatives Splicing fehlt, wird NKCC2 an der apikalen Membran exprimiert (88). Der Expressionsort in polaren Zellen bestimmt dabei, ob NKCC sekretorisch oder absorptiv wirkt. Für den Symport der Na⁺, K⁺, und Cl⁻-Ionen ist ein funktionierendes Netzwerk weiterer Transportsysteme notwendig. Dazu zählen Cl⁻ und K⁺-Kanäle sowie die Na,K-ATPase als treibende Kraft des Ionentransports. Funktionell dient die *SLC12*-Transporterfamilie der Regulation des Zellvolumens und der intrazellulären Cl⁻-Konzentration (94-96). Beide Typen der Kationen-Chlorid Transporterfamilie sind in der Lage, auch andere Ionen zu transportieren. Hervorzuheben ist dabei Ammonium (NH₄⁺), das anstelle von K⁺ im Symport mit Na⁺ und Cl⁻ über die Membran transportiert werden kann, um in der Niere sowie intestinal den Säure-Basen-Haushalt zu regulieren (86).

NKCC1 wird ubiquitär auf der basolateralen Seite vieler flüssigkeitsregulierenden Epithelien, sowie Nerven-, Muskel- und Endothelzellen in Kollokalisierung mit der Na,K-ATPase exprimiert (95, 97) und auch als „sekretorische“ NKCC-Isoform bezeichnet (89). NKCC1-*Knockout*-Mäuse sind trotz der vielen Funktionen des Transporters (Tabelle 1-1) lebensfähig, weisen aber einen typischen Phänotyp auf und werden als mittelgradig belastet eingestuft.

Tabelle 1-1: Funktionen von NKCC1 (modifiziert nach Nicolas Markadieu und Eric Delpire, Eur J Physiol, 2014)

Lokalisation	Funktion
Innenohr	Hören und Balance
Sensorische Neuronen	Filtern sensorischer Störfaktoren
ZNS-Neurone	proepileptisch oder krampf lösend
Epithelzellen der Speicheldrüse	Speichelproduktion
intestinale interstitielle Cajal-Zellen	Peristaltik
vaskuläre glatte Muskelzellen	Gefäßtonus
Testes	Spermatogenese
Epithelzellen der Atemwege	Reifung der fetalen Lunge
Distales Kolon	NH ₄ ⁺ Sekretion

Am auffälligsten zeigt sich ein Verlust des NKCC1 in Form einer Taubheit und von Gleichgewichtsstörungen der Tiere. In der Cochlea des Innenohres befindet sich in der zentralen Scala media ein mehrschichtiges Transportepithel, die Stria vascularis. NKCC1 und die Na,K-ATPase werden auf der basolateralen Membran der Stria vascularis exprimiert. Den Gradienten für den Ionen-Einstrom erzeugt wiederum die Na,K-Pumpe. NKCC1 vermittelt hier jedoch nicht wie in den meisten Epithelien die Cl⁻-Sekretion, sondern ist an der Sekretion von K⁺-Ionen über entsprechende apikale Kanäle in die Endolymphe der Scala media beteiligt. Die Ko-transportierten Na⁺- und Cl⁻-Ionen rezirkulieren in die Zellen der Stria vascularis. Die daraus resultierende hohe K⁺-Konzentration der Endolymphe (~150 mmol) erzeugt ein positives endocochleäres Potential (+85 bis +100 mV) gegenüber den anderen beiden flüssigkeitsgefüllten Räumen (Scala tympani und Scala vestibuli) der Cochlea. Während der Schallausbreitung kommt es zur Bewegung der Flüssigkeit in der Scala media (Endolymphe), die eine Auslenkung der Haarbündel der Sinneszellen verursacht. Dies führt zur direkten Öffnung mechanisch sensibler Kationenkanäle der *transient receptor potential* (TRP) Familie. Aufgrund des elektrochemischen Gradienten kommt es in Folge zu einem depolarisierenden Einwärtsstrom von K⁺-Ionen in die Haarzellen über die Transduktionskanäle (88, 98). Man bezeichnet diesen für die Schallverarbeitung essenziellen Prozess als

mechanoelektrische Transduktion. NKCC1-*Knockout*-Mäuse zeigen eine verminderte K⁺-Sekretion der Striae vascularis in die Endolymphe, was deren Taubheit erklärt (99, 100). Auch der Einsatz von Schleifendiuretika, die nicht-spezifisch NKCC1 und NKCC2 hemmen, kann aufgrund der cochleären NKCC1-Expression zu ototoxischen Effekten bis hin zur Taubheit führen (101, 102). Außerdem zeigen die NKCC1-*Knockout*-Mäuse eine ungewöhnliche, schnell wackelnde Kopfhaltung und bewegen sich kreisend fort. Dieser Gleichgewichtsstörung liegt ein vergleichbarer Prozess der gestörten mechanoelektrischen Transduktion in den Bogengängen des Vestibularapparats zugrunde wie durch die veränderte Zusammensetzung der Endolymphe im Hörorgan.

In vaskulären Endothelzellen hält NKCC1 das Zellvolumen und die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration ($[Cl^-]_i$) aufrecht. Die basal hohe Kotransport-Aktivität im Endothel bietet die Möglichkeit, über NKCC1 schnell auf eine Abnahme des intrazellulären Volumens und niedrige $[Cl^-]_i$ zu reagieren, um die vaskuläre Integrität zu gewährleisten (103). Akar et al. (104) zeigten, dass die NKCC1-Aktivität in vaskulären glatten Muskelzellen der Aorta von Ratten durch Vasokonstriktoren wie Phenylephrin (Sympathomimetikum) oder Angiotensin II und Vasodilatoren wie NO oder Nitroprussid entgegengesetzt reguliert wird. In Gefäßmuskelzellen aus der Aorta von Ratten aktiviert Phenylephrin NKCC1. Der NKCC-Inhibitor Bumetanid reduzierte die Phenylephrin-induzierte Kontraktion der Rattenaorta signifikant. Der kontraktile Zustand der glatten Gefäßmuskulatur könnte also zusätzlich an der NKCC1-Regulation beteiligt sein (105). Dass Veränderungen der NKCC1-Aktivität einen Einfluss auf den Tonus der vaskulären glatten Muskulatur haben, unterstützt auch der beobachtete reduzierte mittlere arterielle Blutdruck in NKCC1-*Knockout*-Mäusen (106). Umgekehrt kann der Blutdruck auch die NKCC1-Aktivität und -Funktion regulieren (107): So wird in spontan hypertensiven Ratten unter der Hypertonieentwicklung die Expression des normalerweise methylierten NKCC1-Transporters in den glatten Gefäßmuskelzellen durch Hypomethylierung gesteigert (108). Auch während der postnatalen Entwicklung einer Hypertonie wird die NKCC1-Expression epigenetisch hochreguliert (109).

Durch die breite Verteilung des NKCC1-Proteins in verschiedenen Geweben kommt es zu einer Vielzahl weiterer Auffälligkeiten in NKCC1-*Knockout*-Mäusen: In den Azinuszellen der Speicheldrüsen ist NKCC1 der Hauptmechanismus für die basolaterale Cl⁻-Aufnahme. Seine Transportfunktion ist daher ein entscheidender Faktor der

Speichelproduktion und Sekretion von Flüssigkeit. Der funktionale Verlust von NKCC1 resultiert entsprechend in einer > 60%igen Reduktion des sezernierten Speichelvolumens nach muscarinergen Stimuli (110). Des Weiteren zeigt sich bei NKCC1-*Knockout*-Tieren in Ussing-Kammer-Experimenten zur Messung von Kurzschlussströmen als Maß des Netto-Ionentransports über Epithelzellen eine Verringerung der durch cyclisches Adenosinmonophosphat (*cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) induzierten Kurzschlussströme im Jejunum und Appendix (106), sowie in der Trachea (111). Phänotypisch macht sich der NKCC1-*Knockout* im Intestinum durch eine verminderte Flüssigkeitssekretion und Peristaltik bemerkbar, welche zur geringeren KG-Zunahme der *Slc12a2*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren führt.

Eine weitere Schlüsselrolle spielt der Symporter auch in der inhibitorischen synaptischen Neurotransmission (88), da NKCC1 die [Cl]_i sensorischer Neurone reguliert (112, 113). Eine hohe Cl⁻-Akkumulation in präsynaptischen Neuronen der Spinalganglien kann von GABA-Rezeptoren genutzt werden, um durch Depolarisation die synaptische Transmission zu inhibieren, z.B. um unwichtige sensorische Hintergrundinformationen nicht wahrzunehmen (114). NKCC1 legt dabei die Richtung und Stärke der GABA- und/oder Glycin-vermittelten Cl⁻-Ströme fest.

Den Isotyp NKCC2 findet man hingegen nur in der Niere (115). Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife reabsorbiert der Transporter 20 % bis 30 % des primär filtrierten Natriumchlorids (NaCl) (116). Da dieser Teil des Tubulussystems für H₂O impermeabel ist, führt NKCC2 zu einer Verdünnung des Urins im Tubuluslumen (117). NKCC2 wird außerdem in der apikalen Membran der Macula densa des distalen Nephrons exprimiert und dient so dem juxtaglomerulären Apparat als NaCl-Sensor (118). Über lokale Mechanismen kann die Macula densa entsprechend die renale Filtration der tubulären Na⁺ Konzentration anpassen. Eine *loss-of-function* Mutation im *SLC12A1* Gen, wie sie beim Bartter-Syndrom auftritt, führt durch eine gestörte Tubulusfunktion zu einem Salz- und Wasserverlust, der sich in Polyurie, Hypotonie und Dehydratation äußert (119, 120).

Pharmakologisch können beide NKCC-Isotypen spezifisch und reversibel durch Schleifendiuretika wie Furosemid und Bumetanid inhibiert werden (115). Kürzlich wurde zudem auch ein selektiver NKCC1-Inhibitor entwickelt: ARN23746 (121). In präklinischen Studien konnte das Schleifendiuretikum Bumetanid, welches in Deutschland nicht

zugelassen ist, im *Off-label Use* positive Effekte bei den neurologischen Erkrankungen Epilepsie, Autismus und Schizophrenie erzielen. Ein pathophysiologischer Erklärungsansatz der aufgezählten Krankheitsbilder ist die abnormale Funktionalität von NKCC1 im Gehirn und einer damit verbundenen Veränderung neuronaler Cl⁻Konzentrationen (122). Die Suche nach einem Medikament, das selektiv NKCC1 hemmt, ohne dabei durch eine Inhibition des Isotyps NKCC2 unerwünschte Nebenwirkungen im Elektrolyt- und Wasserhaushalt zu verursachen, war daher Gegenstand intensiver Forschung (123). Mit ARN23746 könnte zukünftig klinisch ein Medikament ohne diuretische Nebenwirkungen an der Pathophysiologie von Krankheitsbildern ansetzen, deren Entstehung mit der Aktivität von NKCC1 zusammenhängt (121).

Erst vor kurzem wurde auch über Krankheiten berichtet, denen eine *loss-of-function* Mutation oder ein kompletter Verlust des NKCC1-Ionentransporters zugrunde liegt (124). Da NKCC1 in so vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert wird, führt seine Dysfunktion zu komplexen Symptomen, die bislang keiner eindeutigen Ursache zugeschrieben werden konnten. Phänotypen wie Taubheit, Hypotonie und Mukusobstruktion in der Lunge und dem Interstitium sind bereits aus dem NKCC1-KO-Mausmodell bekannt (siehe oben) und sollten beim Menschen eine genetische Testung veranlassen (124). Es gibt bislang zwar keine standardisierte Therapie für Patienten mit NKCC1-Mutation, dennoch könnte die Aufdeckung und Untersuchung weiterer Fälle, in denen NKCC1 krankheits-verursachend ist, die Erforschung von neuen Behandlungsmöglichkeiten voranbringen.

1.4.1 Regulation des NKCC1-Transporters

Über die transkriptionelle Regulation des *SLC12A2* Gens ist relativ wenig bekannt (88). *SLC12A2* wird durch 28 Exons codiert, unter denen das Exon 21 durch alternatives Splicing die Lokalisation in polaren Zellen bestimmt. *SLC12A2* enthält für Haushaltsgene charakteristische Promotorsequenzen (TATA, Sp1, AP-2) (125, 126), die auch in Zellprozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Karzinogenese involviert sind (127). Die NKCC1 mRNA Expression kann sich unter verschiedenen physiologischen Bedingungen verändern. In einer Studie zu intestinalen T84 Zellen des Kolons wurde gezeigt, dass Hypoxie zu einer Abnahme der intestinalen Cl⁻-Sekretion

führt, der eine genomische und posttranskriptionelle Herunterregulation des NKCC1-Kotransporters zugrunde liegt (128).

Posttranslational gibt es zahlreiche Faktoren, die die NKCC1-Aktivität beeinflussen. Hierzu zählen Änderungen des Zellvolumens, Hormone, Wachstumsfaktoren, die O₂-Bedingungen und weitere Faktoren (129). NKCC1 kann sich zu Dimeren oder Tetrameren formieren, um hochmolekulare Molekülkomplexe zu bilden (88). Die Bindung dieser Komplexe an andere Mitglieder der Kationen-Chlorid-Kotransporter Familie, Zytoskelettproteine oder Enzyme regulatorischer Signalkaskaden kann unterschiedliche Auswirkungen auf die Transportaktivität haben (129). Zu den wichtigsten und gleichzeitig miteinander verknüpften Stimuli einer NKCC1-Aktivierung zählen die Zunahme der extrazellulären Osmolarität bzw. die Abnahme des Zellvolumens und die Abnahme der intrazellulären Cl⁻-Konzentration (88). Eine Zunahme der extrazellulären Osmolarität lässt Zellen durch H₂O-Ausstrom zum Konzentrationsausgleich schrumpfen, wodurch gleichzeitig aufgrund der abnehmenden Verdünnung die Konzentration des intrazellulären Chlorids ansteigt. Beide Stimuli wirken entgegengesetzt auf NKCC1. Während die Volumenabnahme NKCC1 aktiviert, hemmt die steigende [Cl⁻]_i den Transporter (130). Initial überwiegt die Hemmung des Transporters, denn die regulatorische Volumenzunahme, die bei einer hohen intrazellulären Cl⁻-Konzentration zu erwarten wäre, bleibt bei den meisten Zellen zunächst aus. Eine Volumenzunahme tritt in der Regel erst ein, wenn die geschrumpfte, mit Cl⁻ konzentrierte Zelle wieder in einer extrazellulär isoosmotischen Umgebung ist, die dann im Vergleich hypo-osmolar erscheint. NKCC1 wird durch die nun abnehmende [Cl⁻]_i während der regulatorischen Zellschwellung aktiviert und stellt letztlich wieder eine physiologische [Cl⁻]_i her (88, 103, 130, 131). In rektalen Drüsen von Haien als Prototyp Cl⁻-sezernierender Epithelien wurde der Aktivitätszustand des NKCC1-Proteins in Verbindung mit dessen Phosphorylierungsstatus untersucht. Durch die Stimulation mit cAMP-abhängigen Sekretagen⁹ oder die osmotische Veränderung des Zellvolumens wird die Aktivität des Transporters mittels reversibler Phosphorylierung an Ser- und Thr-Resten gesteigert (132). Wie zuvor beschrieben (1.4) besteht das NKCC1-Molekül aus 12 transmembranen Domänen, die den Ionentransport ermöglichen (133). Die

⁹ Substanzen, die eine Sekretion stimulieren

Phosphoakzeptoren Thr¹⁸⁹, Thr¹⁸⁴ und Thr²⁰² im N-Terminus fungieren in den Tubuli von Haifisch-Rektaldrüsen als regulatorische Domänen des Symporters (134, 135). Darman und Forbush (134) erforschten die Rolle jedes einzelnen dieser Phosphoakzeptoren, indem sie Punktmutationen im *SLC12A2* Gen von Haien in HEK-293 Zellen testeten. Sie fanden heraus, dass Thr¹⁸⁹ absolut notwendig für die Aktivierung des Kotransporters ist, während Thr¹⁸⁴ und Thr²⁰² eher für modulatorische Veränderungen, wie eine optimale Sensitivität und die vollständige Aktivierung des NKCC1-Transporters wichtig sind (134). Die Phosphoakzeptoren Thr¹⁸⁴ und Thr¹⁸⁹ aus Haien korrespondieren mit humanem Thr²¹² und Thr²¹⁷ (135). NKCC1 besitzt zur Aktivierung neben den Phospho-Threoninen auch Phospho-Serine (132, 136). Die Gruppe um Darman und Forbush geht davon aus, dass der basolaterale NKCC1-Kotransporter in sekretorischen Zellen inaktiv ist, bis durch Sekretagogen und Zellschrumpfung eine Phosphorylierungs-abhängige Aktivierung erfolgt. Demnach bestehe ein kausaler Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung des Kotransporters und seiner Aktivität (134). Die Abnahme der Na⁺-K⁺-Cl⁻ Transportaktivität in Riesentintenfisch-Axonen unter ATP-Depletion untermauert die Phosphoaktivierung der NKCC-Transporter (137). In vielen Zellen erhöhen Agonisten der Proteinkinase A (PKA) die NKCC-Kotransporter-Aktivität über die Stimulation apikaler Cl⁻-Kanäle, ohne dabei den Transporter direkt zu phosphorylieren (134). Wie man heute weiß, ist die intrazellulär abnehmende Cl⁻-Konzentration jedoch der eigentliche Stimulus, der zu einer NKCC1-Phosphorylierung führt. Lange Zeit war nicht bekannt, durch welche Proteinkinasen NKCCs phosphoryliert werden. Die Identifikation der Ste20-verwandten Ser-Thr-Kinasen SPAK und OSR1 als Schlüsselkinasen in der Phosphorylierung von Kation-Cl⁻-Transportern erfolgte erst 2002 durch Piechotta und Kollegen (138). Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass die Expression inaktiver SPAKs die NKCC1-Aktivität drastisch reduziert, was diese Kinasen mit der Aktivierung und Phosphorylierung von NKCC1 in Verbindung bringt (139). Über die Ste20-zugehörigen Kinasen SPAK und OSR1, die wiederum zuvor durch *With No Lysine Kinases* (WNKs) phosphoryliert und damit aktiviert werden, erfolgt die NKCC1-Aktivierung und -Phosphorylierung bei Zellschrumpfung oder abnehmender intrazellulärer Cl⁻-Konzentration (132, 140, 141). Auf die WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-Aktivierungskaskade wird im Folgenden eingegangen.

1.4.2 Die Rolle von WNK bei der NKCC1-Phosphorylierung

Die Regulation des Volumen-sensitiven NKCC1 erfolgt in Abhängigkeit zweier Protein-Kinase Familien; den WNKs und den Ste20-verwandten Kinasen, die durch Zellschrumpfung aktiviert und Zellschwellung inhibiert werden, um nachgeschaltete Transportproteine zu regulieren (142).

Die vier WNK-Isotypen bilden eine Familie der Ser/Thr Protein-Kinasen. WNKs bestehen aus einer N-terminalen Kinase-Domäne, einer autoinhibitorischen Domäne zur Suppression intrinsischer Kinaseaktivität und Inhibition anderer Isoformen, Domänen zur Oligomerisierung sowie mehreren SPAK- und OSR1-Bindungsmotiven (143). Das katalytische Lysin der Kinase-Domäne, welches für die ATP-Bindung und den Phosphatgruppentransfer erforderlich ist, ist bei *With No Lysine* Kinasen atypisch lokalisiert und gab der neuartigen Kinase-Familie ihren Namen (144). Aufgrund der untypischen Anordnung der Kinase-Domäne kann jedoch Cl⁻ direkt an das katalytische Zentrum binden und dort die Autophosphorylierung und Aktivierung der Kinase blockieren. Die Stabilisierung der inaktiven WNK1-Konformation durch Cl⁻ macht die Kinase somit zum intrazellulären Cl⁻-Sensor (145). Neben WNK1 fungiert auch der Isotyp WNK4 als Cl⁻-Sensor, während WNK3 das Zellvolumen reguliert (96). Osmotischer Stress oder Änderungen der Cl⁻-Konzentration aktivieren die Ser/Thr Kinasen durch Autophosphorylierung eines Serin-Restes (146). WNKs aktivieren sodann die Kinasen SPAK und OSR1 und induzieren damit Signalwege, die den transepithelialen Ionen-Transports, die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration (147) oder den Blutdruck (143) regulieren. Die Aktivierung von SPAK und OSR1 erfolgt wiederum über die Phosphorylierung an hoch konservierten Thr- und Ser-Resten der beiden Ste20-verwandten Kinasen (142). Diese phosphorylieren letztlich die Threonin- und Serin-Reste von Ionenkanälen wie z.B. im regulatorischen N-Terminus von NKCC1 und nehmen so Einfluss auf die Volumenregulation und intrazelluläre Ionenkonzentration (148-150) (Abbildung 1-6). Das Calcium-bindende Protein 39 (*calcium binding protein-39* Cab39), auch *mouse protein-25* (MO25) genannt, scheint als „*master regulator*“ ebenfalls eine Rolle bei der Kotransporter-Aktivierung zu spielen, indem es ein stabilisierendes Gerüst für die Ste20-verwandten Kinasen bildet (151). In Anwesenheit von MO25 kann WNK4 zudem unabhängig von SPAK/OSR1 direkt NKCC1 aktivieren (152).

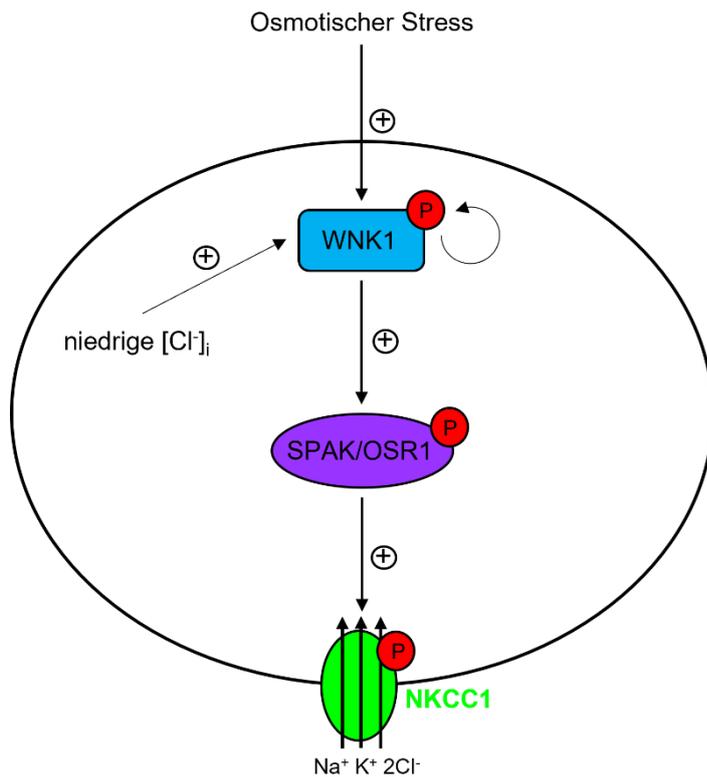


Abbildung 1-6: Vereinfachtes Schema der NKCC1-Regulation

Die WNK1 wird durch osmotischen Stress oder eine abnehmende intrazelluläre Chloridkonzentration aktiviert. Sie phosphoryliert sich selbst sowie die Kinasen SPAK und OSR1, die wiederum NKCC1 durch Phosphorylierung aktivieren und so die Transportaktivität des Kcotransporters steigern (143).

WNKs regulieren die Aktivität einer Vielzahl von Transportproteinen, darunter die *SLC12A* Kationen-Cl⁻-Kotransporter Familie, sowie der renale K⁺-Kanal ROMK1, ENaC, CFTR und die Subtypen 4 und 5 der transienten Rezeptor-Potential-Kationenkanäle vom Vanilloid-Typ (TRPV) (130). Aktivierende Mutationen in den Genen, die die WNK-Kinasen 1 und 4 kodieren, führen zum klinischen Syndrom des Pseudohypoaldosteronismus (PHA) Typ II (*Gordon's Syndrome*) mit Hypertonus und hohen K⁺-Konzentrationen im Serum. Umgekehrt führt ein heterozygoter WNK1-Defizit bei Mäusen zu einem Hypotonus, während der homozygote WNK1-Verlust embryonal letal verläuft (153). Zambrowicz und Kollegen (153) vermuten, dass eine inkomplette WNK1-Inhibition auch beim Menschen einen signifikant antihypertensiven Effekt hätte, da heterozygote WNK1-Mäuse trotz einer zweiten funktionellen Genkopie einen deutlich verringerten Blutdruck vorweisen. Der erniedrigte Blutdruck sowie der weitestgehende Verlust der druckabhängigen Gefäßkontraktilität in *Wnk1^{+/-}*-Arterien heterozygoter WNK1-Mäuse ist mit einer verringerten Phosphorylierung der WNK1 Substrate - SPAK

und NKCC1 - assoziiert (154). Dies weist darauf hin, dass umgekehrt die Überfunktion von WNK bei arterieller Hypertonie ebenfalls Einfluss auf die Regulation der Transporter, die durch WNKs reguliert werden, haben könnte. WNKs und die Substrate ihrer Signalkaskade stellen daher neue Zielstrukturen für die antihypertensive Therapie dar (155). Thiazid-Diuretika, die den Na⁺-Cl⁻-Kotransporter (NCC) im fröhdistalen Tubulus der Niere hemmen, sind aktuell Bestandteil der antihypertensiven Basistherapie der arteriellen Hypertonie. Aber auch Schleifendiuretika, die das Substrat NKCC des WNK-Signalwegs angreifen, können den Blutdruck verringern und weisen sogar mögliche Vorteile z.B. ein zu bevorzugendes Nebenwirkungsprofil gegenüber den Thiaziden auf (156). Dennoch ist die Behandlung der unkomplizierten arteriellen Hypertonie mit Schleifendiuretika derzeit nicht empfohlen, da ihnen die Thiazide und Thiazidanaloga bei intakter Nierenfunktion überlegen sind (157). Bei eingeschränkter Nierenfunktion oder zusätzlicher Flüssigkeitsüberladung sind Schleifendiuretika in der Therapie der arteriellen Hypertonie allerdings angezeigt (158). Weitere Studien sind notwendig, um grundlagenorientiert die Krankheitsbilder, die pathophysiologisch mit dem WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-Signalweg zusammenhängen, zu erforschen und in Zukunft neue, zielgerichtete Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

Im kardiovaskulären und renalen System erfüllen WNKs eine regulatorische Kontrollfunktion zur Aufrechterhaltung der Homöostase bei Änderungen des hydrostatischen Druckes (159). Die Assoziation von WNK 1- und 4-Mutationen mit sowohl arterieller Hypertonie als auch Hypotonie (160), sowie die reduzierte myogene Reaktion auf α_1 -adrenerge Rezeptoraktivierung bei *Wnk1^{+/-}*-Mäusen verdeutlicht dies (154). Eine entsprechende homöostatisch-regulatorische Rolle bei Änderungen des hydrostatischen Druckes durch WNKs an der alveolokapillaren Membran könnte dergleichen potenzielle protektive Effekte gegen das hydrostatische Lungenödem bei Linksherzversagen haben; ein entsprechender Mechanismus ist bislang allerdings nicht untersucht. Ob WNK im hydrostatischen Ödem aktiviert wird und wie eine solche Aktivierung ablaufen würde, ist ebenfalls noch unklar. Doch die Veränderungen der [Cl]_i oder des Zellvolumens aufgrund von auf die Lungenkapillaren einwirkendem, erhöhten hydrostatischen Druck mit Beeinträchtigung des Ionentransports über das Alveolarepithel sind ein naheliegender Ansatz, wie eine WNK-Phosphorylierung in diesem Krankheitsmodell induziert werden könnte.

1.5 Ziel des Projekts

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind in Deutschland die häufigste Todesursache¹⁰ (161). Wenn im Rahmen einer akuten koronaren Ischämie, einer dekompensierten Herzinsuffizienz, durch Arrhythmien oder akute Herzklappenkrankheiten die linksventrikulären Füllungsdrücke plötzlich ansteigen, kann es zur Flüssigkeitsakkumulation in den Alveolen kommen. Die Bildung eines kardiogenen Lungenödems ist eine akut lebensbedrohliche Komplikation der akuten Herzinsuffizienz.

Zunehmend rückt für die Therapie des hydrostatischen Lungenödems die pathophysiologische Rolle der Flüssigkeitsregulation durch alveoläre Transportmechanismen in den Vordergrund. Der Transporter NKCC1 wird in den Alveolarepithelzellen exprimiert und arbeitet mit anderen Transportern wie ENaC, der Na,K-ATPase und CFTR in einem aktiv regulierten Netzwerk zusammen, durch das unter physiologischen Bedingungen eine intakte AFC aufrecht erhalten wird. Diese gewährt einen optimalen Gasaustausch über die Diffusionsbarriere und eine kontrollierte Regulation bei Veränderungen der Zellgröße oder Ionenkonzentration. Beim kardiogenen Lungenödem kehrt sich der Nettoflüssigkeitstransport hingegen zur AFS um. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass eine ENaC-Inhibition eine AFS induziert (21). Ein wichtiger Regulator der Umkehr einer protektiven AFC in eine dominierende AFS könnte der Transporter NKCC1 sein, der durch die basolaterale Aufnahme von 1 Na⁺, 1 K⁺ und 2 Cl⁻-Ionen der limitierende Schritt der alveolär-gerichteten Cl⁻-Sekretion beim Lungenödem vom hydrostatischen Typ sein könnte. Die potenzielle Rolle von NKCC1 in der Entwicklung des kardiogenen Lungenödems durch den Aufbau eines osmotischen Gradienten könnte eine Erklärung für extrarenale Effekte der Schleifendiuretika in der Therapie des akuten Lungenödems bieten (162, 163). Die Regulation von NKCC1 erfolgt maßgeblich durch WNKs sowie SPAK/OSR1 (138, 164, 165). Daher könnte auch diesen Kinasen eine wichtige Rolle als Stellschrauben in der Lungenödembildung zukommen.

Da das kardiogene Lungenödem klinisch teilweise schwer vom Permeabilitätstyp zu

¹⁰ 338.001 Tote im Jahr 2020

differenzieren ist, stellt sich zusätzlich die Frage, ob es auf Ebene des Flüssigkeitstransports eventuell Gemeinsamkeiten in deren Pathophysiologie gibt. Die Aktivität des NKCC1 in Abhängigkeit verschiedener Stimuli wurde bislang kaum untersucht. Typisch für die Ödemflüssigkeit von ARDS-Patienten ist die Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine, die eine Dysregulation der alveolären Ionenhomöostase vermitteln können (20). Eine Regulation von Transportern des Flüssigkeitstransports entlang des Alveolarepithels durch das inflammatorische Umfeld im Lungenödem vom Permeabilitätstyp ist vorstellbar und kann einen Fortschritt bei der Suche nach einer kausalen Therapie des Permeabilitätsödems darstellen, die unter der aktuellen Covid-19 Pandemie an großer Bedeutung gewinnt. Daher sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Hypothesen untersucht werden:

1. Der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ -Transporter 1 fördert die Entstehung des kardiogenen Lungenödems und dessen Inhibition oder Deletion wirkt protektiv der pulmonalen Flüssigkeitsakkumulation entgegen.
2. Die Aktivität der *With No Lysine Kinase* fördert *downstream* über NKCC1-Aktivierung/Phosphorylierung die kardiogen bedingte Lungenödembildung.
3. NKCC1 wird *in vitro* durch WNK1, ENaC-Inhibition oder inflammatorische Stimulierung durch Phosphorylierung aktiviert.

2 Methodik

2.1 *Ex vivo* Experimente

2.1.1 Tiere

Die Tierexperimente wurden an weiblichen und männlichen C57BL/6J Mäusen (Charles River Laboratories) mit einem Körpergewicht (KG) von 24-32 g, sowie Mäusen der NKCC1 (*Slc12a2*)-*Knockout* (KO)- und WNK1-KO-Linie durchgeführt. Der *Slc12a2*-Mausstamm (FVB.Cg-*Slc12a2*^{tm1^{Ges}}/Mmjax) wurde durch Insertion des Zielvektors in das Exon 6 des *Slc12a2* Gens auf Chromosom 18 generiert. Der homozygote Verlust von NKCC1 (*Slc12a2*^{-/-}) führt zu Taubheit, Wachstumsretardierung, Gleichgewichtsstörungen und Hyperaktivität. Des Weiteren weisen *Slc12a2*^{-/-}-Mäuse einen geringeren Körperfettanteil auf und ihre Sterblichkeitsrate liegt bei 30 % innerhalb der ersten Lebenswoche (106). Aufgrund der hohen Belastung der homozygoten KO-Mäuse fokussierten sich die Zucht und die Untersuchungen im Sinne der 3R Prinzipien (*reduce, refine, replace*) auf heterozygot-defiziente NKCC1-Mäuse (*Slc12a2*^{+/-}) und ihren korrespondierenden Wildtyp (WT), deren KG zwischen 21 und 36 g betrug.

Der WNK1-KO-Mausstamm (*Wnk1*^{-/-}) wurde mittels Genfallenvektoren aus einem C57BL/6J Hintergrundmausstamm generiert. Die Insertion des Zielvektors erfolgte in das Intron 1 des WNK1 Gens auf Chromosom 6 (166). Homozygote WNK1-Mäuse (*Wnk1*^{-/-}) sind nicht überlebensfähig, weshalb für die folgenden Experimente wiederum heterozygote Tiere (*Wnk1*^{+/-}) und deren entsprechende WT (KG 21-49 g) Kontrollen verwendet wurden.

Alle Tierexperimente wurden nach den Richtlinien der Charité -Universitätsmedizin Berlin unter der Beachtung der 3R Prinzipien durchgeführt und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) unter der Registrierungsnummer T0279/13 genehmigt.

2.1.2 Modell der isoliert perfundierten Lunge (IPL)

Das Modell ermöglicht es, die Lunge isoliert vom Körperkreislauf unter kontrollierten Ventilations- und/oder Perfusionsbedingungen zu untersuchen. Im vorliegenden Vorhaben wurden so extrarenale Effekte des unspezifischen NKCC-Inhibitors Furosemid

auf die Lunge bei kardialer Ödembildung, sowie die Rolle des NKCC1-Transporters und der WNK1-Kinase im kardialen Lungenödem durch Verwendung von Lungen heterozygoter *Knockout*-Stämme untersucht.

2.1.3 Versuchsvorbereitung und Präparation des Versuchstiers

Bei dem Tötungsvorhaben T0279/13 handelt es sich um die Präparation des *ex vivo* Modells der isoliert-perfundierten Lunge.¹¹ Männliche und weibliche Mäuse wurden vor der Präparation mit 10 mL/kg KG einer Mischung aus 100 mg/kg KG Ketamin und 20 mg/kg KG Xylazin (1:2:12 NaCl) durch intraperitoneale Injektion analgosediert. Nach Euthanasie durch zervikale Dislokation in Vollnarkose wurden die Tiere sofort in Rückenlage in einer auf 37°C regulierten Kammer mit Wasserummantelung platziert (Hugo Sachs Elektronik HAVARD Apparatus). Nach erfolgter Tracheotomie wurde die Trachealkanüle eingeführt und durch eine Ligatur fixiert. Die mechanische Beatmung wurde kontinuierlich mittels des Maus Ventilators MiniVent Type 845 (Hugo Sachs Elektronik HAVARD Apparatus) mit Raumluft (78 % N₂, 21 % O₂, 0,04 % CO₂) bei einer Atemfrequenz von 150/min durchgeführt. Der positiv endexpiratorische Druck (PEEP) zur Verhinderung des Kollapses der Atemwege betrug 1 cm Wassersäule. Zur Vorbereitung der Herzperfusion wurde der Brustkorb durch Schnitte entlang des Sternums und unterhalb des Diaphragmas zunächst weiträumig mobilisiert und die Rippenbögen zu den Seiten hin aufgeklappt und fixiert. Die Pleurahöhlen wurden ohne Verletzung der Lungen durch Aufschneiden des Diaphragmas eröffnet. Um eine Gerinnung zu unterbinden, wurden 100 µL Heparin in das Herz injiziert. Nach Überprüfung der Beatmung wurde die Aorta durchtrennt, um eine vollständige ventilations- und perfusionsseitige Trennung vom Körperkreislauf zu erzielen. Perikard und Fettgewebe wurden entfernt und die großen intrathorakalen Gefäße frei präpariert, sodass die Pulmonalarterie mithilfe eines Fadens von der Aorta getrennt werden konnte. Über eine Inzision im Ausflusstrakt der rechten Herzkammer wurde der blasenfrei mit Perfusionslösung gefüllte pulmonalarterielle Katheter eingeführt und durch die vorbereiteten Knoten fixiert. Ein zweiter Katheter wurde im Bereich des Apex des linken Ventrikels eingesetzt (Abbildung 2-1). Nach Start der PULMODYN Data Acquisition Software (HAVARD Apparatus) zur Überwachung der hämodynamischen Drücke in

¹¹ Die Tierversuchsanzeige T0279/13 wurde am 17.10.2013 genehmigt.

Pulmonalarterie und linkem Vorhof wurden die Lungen kontinuierlich durch eine Rollerpumpe (ISM828, Ismatec™) mit 1 ml/min Perfusionslösung (37°C; pH 7,35-7,45), bestehend aus Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, +Ca²⁺, Mg²⁺, Gibco) und 20 % fetalem Kälberserum (FCS) perfundiert. Sobald der Status einer Blutleere erreicht wurde (Abfluss des linksventrikulären Katheters zeigte kein sichtbares Blut mehr) und sich ein konstanter pulmonalarterieller Druck (P_{PA}) einstellte, wurde der Zirkulationskreislauf durch Verbindung des Schlauchs des linksventrikulären Katheters mit dem Perfusatresevoir geschlossen (5-10 min). Der Ausgangsdruck des linken Atriums (P_{LA}) wurde auf 2,5 cmH₂O durch Höhenjustierung des an den linksventrikulären Katheter angeschlossenen Perfusatresevoirs eingestellt. Die Bildung eines kardiogenen Lungenödems durch hydrostatischen Druck wurde durch Anheben dieses Reservoirbehälters mit resultierender Erhöhung des P_{LA} auf 7 cmH₂O induziert. Der unspezifische NKCC-Inhibitor Furosemid (500 µmol/L) wurde dem Perfusat einer Versuchsgruppe nach Einstellung des entsprechen P_{LA} hinzugegeben. Während des Experiments wurden die isoliert-perfundierten Lungen durchgehend überwacht und deren P_{PA} und P_{LA} kontinuierlich mittels Differential-Niedrigdruckumformer gemessen. Nach 30 min wurde das Experiment beendet und die linke Lunge für die Ermittlung des Feucht-Trocken-Quotienten (*wet-to-dry lung weight ratio*, auch *wet/dry-ratio*) als Indikator einer Lungenödembildung gesammelt. Die rechten Lungen der NKCC1-Mäuse wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die Analyse der Protein- und RNA-Expression verwendet. Um einen Anstieg der *wet/dry ratios* durch andere Ursachen, wie z.B. eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes (P_{PA}) auszuschließen, wurde dieser über die Dauer des Versuchs kontinuierlich überwacht und gegebenenfalls nachjustiert.

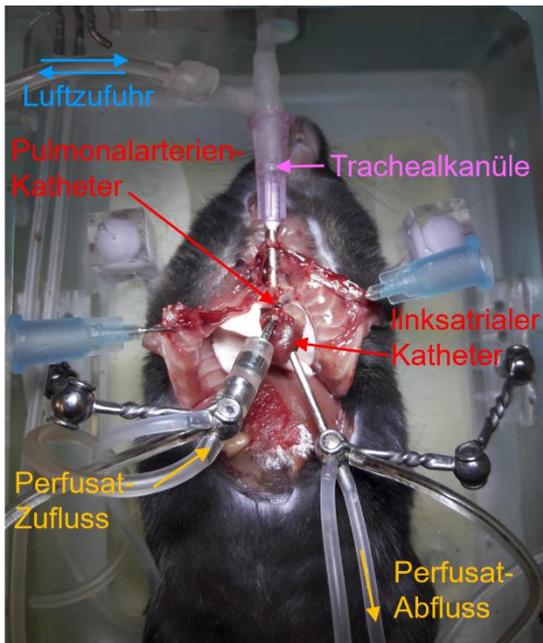


Abbildung 2-1: Versuchsaufbau der isoliert perfundierten Mauslunge

Die Ventilation der Lunge (blaue Pfeile) erfolgt durch den Mouseventilator MiniVent Type 845 (Hugo Sachs Elektronik HAVARD Apparatus) über eine Trachealkanüle (rosa). Für den extrakorporalen Kreislauf wurde ein Katheter in den Truncus pulmonalis am Abgang der Pulmonalarterien eingeführt und ein Perfusat als Blutersatz verwendet. Der zweite Katheter schließt im linken Atrium diesen Perfusionskreislauf (rote Pfeile). Die mit den Kathetern verbundenen, flüssigkeitsgefüllten Schläuche (gelb) sind über ein Perfusatreservoir (im Bild nicht gezeigt) am Ende des Perfusatabflusses miteinander verbunden. Durch Anheben des Reservoirbehälters lässt sich der hydrostatische Druck im linksatrialen Katheter erhöhen, wodurch die Induktion eines kardiogenen Lungenödems modelliert werden kann. Über die PULMODYN Data Acquisition Software (HAVARD Apparatus) lassen sich die hämodynamischen Drücke an den Kathetern kontinuierlich überwachen, bis zum Ende des Experiments die Lunge zur Bestimmung der Feucht-Trocken-Quotienten (*wet-to-dry lung weight ratio* bzw. *wet/dry-ratio*) entnommen wird.

2.2 *In vitro* Experimente

Für Untersuchungen zur Regulation von NKCC1 in Zellkultur wurden Lungenepithelzellen der Linie A549 verwendet, die ursprünglich einem Adenokarzinom der Lunge eines 58-jährigen kaukasischen Mannes entstammen (167). *In vitro* wachsen sie als Monolayer mit charakteristischer AT II Morphologie (168) und werden vor allem für Transportstudien eingesetzt.

2.2.1 Zellkultur

Pulmonale Epithelzellen der humanen Adenokarzinom Zelllinie A549 wurden in T75-Flaschen bei 37°C in befeuchteter Atmosphäre und 5 % CO₂ in einem Standardinkubator kultiviert. Als Medium wurde steril filtrierte Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-*high glucose*) unter Zusatz von 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin-

Lösung (Pen/Strep) genutzt. Nach Erreichen einer Semi-Konfluenz von 80 % wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen subkultiviert, um weitere Passagen zu generieren. Dafür wurden die Zellen nach dem Waschen mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) durch Hinzugabe von 2 ml Trypsin (0,05 %) -Ethyldiamintetraacetat (EDTA) (0,53 mM) getrennt und vereinzelt. Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei 37°C waren die Zellen dissoziiert und konnten nach Resuspension im Standardmedium in der gewünschten Verdünnung (1:3, 1:5, 1:10) erneut in einer T75-Flasche oder in 6-Well-Kulturplatten für die *in vitro*-Experimente ausgesät werden.

Zellzählung: Für die *in vitro* Experimente erfolgte vorbereitend die Quantifizierung der Zellen mit Hilfe eines Hämozytometers. Die Dissoziation der adhärenen Lungenepithelzellen wurde nach dem obigen Protokoll durchgeführt. Lebensfähige Zellen wurden durch fehlende Anfärbung mit Trypanblau lichtmikroskopisch gezählt. Dafür wurden 10 µL einer 1:1 Mischung der Zellsuspension mit 0,4 % Trypanblau in die Zählkammer pipettiert und die Zellen bezüglich ihrer Färbung quantifiziert. Tote Zellen nehmen den Farbstoff durch die gestörte Zellmembran auf und färben sich blau. Blau gefärbte Bestandteile wurden nicht gezählt. Aus dem bekannten Volumen und der ermittelten Zellzahl ergab sich die Konzentration lebender Zellen pro ml in der Suspension.

2.2.2 Stimulation der Zielzellen

Für die *in vitro* Versuche wurden 50.000 Zellen/cm² auf einer 6-Well-Kulturplatte in 2 ml Standardmedium ausgesät. Während des Heranwachsens wurde das verbrauchte Medium täglich gewechselt. Nach Erreichen einer Konfluenz ($\pm 1,2 \times 10^6$ Zellen) wurden die Zielzellen für 2 h in 500 µl FCS-freiem basalem Medium (DMEM + 1 % Pen/Strep) bei 37°C inkubiert, bevor die Behandlung durch die im Folgenden spezifizierten Substanzen zur Untersuchung der Regulation des NKCC1-Kotransporters durchgeführt wurde.

2.2.3 Regulation des Kotransporters NKCC1 über ENaC und WNK1

Um den Einfluss von ENaC und WNK1 auf die NKCC1-Aktivierung zu testen, wurden kultivierte A549 Zellen für 1 h mit 10 µM ENaC-Inhibitor Amilorid mit oder ohne 10 µM WNK-Inhibitor WNK463 stimuliert. Als Lösungsmittelkontrolle wurde eine Dimethylsulfoxid (DMSO)-Gruppe mitgeführt, da die genannten Substanzen in DMSO

gelöst wurden. Für die Analyse der Änderungen in der Expression des totalen und phosphorylierten NKCC1 (T-NKCC1, p-NKCC1) bzw. der NKCC1-mRNA wurden die Zellen lysiert und die Proteine für den Western Blot (2.3.1) bzw. die mRNA für die qRT-PCR (2.3.2) extrahiert.

2.2.4 Inflammatorische Stimulierung

Um die mögliche Regulation des NKCC1-Transporters beim akuten Lungenschaden zu untersuchen, wurden A549 Zellen wie zuvor beschrieben (2.2.2) kultiviert und entweder mit 50 ng/ml Zytokin Mix (Cytomix: TNF- α , IFN- γ , IL-1 β), 100 ng/ml Lipopolysaccharide (LPS) oder einer Kombination beider proinflammatorischer Stimuli für 4 h inkubiert. Veränderungen in der NKCC1-Protein- und RNA-Expression wurden nach Zelllyse mittels Western Blot (2.3.1) bzw. qRT-PCR (2.3.2) untersucht.

2.3 Biochemische und molekularbiologische Methoden

2.3.1 Western Blot

Um Veränderungen der Proteinexpression im Lungengewebe von Mäusen oder pulmonalen Epithelzellen der Line A549 zu analysieren, wurden die Proteine extrahiert. Die Zellen wurden dafür nach beendeter Zellstimulation direkt in 200 μ l eiskaltem Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) Puffer lysiert. Das Lungengewebe der Maus wurde zunächst in kleine Stücke zerschnitten und in 500 μ l RIPA Puffer mit einem Dispergierer (IKA T 10 Basic Ultra Turrax) homogenisiert. Von den gesammelten Zelllysaten wurde nach Zentrifugation (12.000 g, 10 min bei 4°C) der Überstand entnommen und die Proteinkonzentration mittels Bicinchonininsäure Assay (BCA) bestimmt (Pierce™ BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific). Die kolorimetrische Quantifizierung erfolgte durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm in einem 96-Well Mikrotiterplatten-Photometer (Sunrise™, TECAN). Zur Reduktion des Gel-Beladungspuffers wurden 10 μ g Protein einer jeden Probe mit 6x Laemmli Probenpuffer (BIO-RAD) gemixt (Endkonzentration 1x) und bei 95°C für 5 min denaturiert. Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung der Proteine wurde das Mini-PROTEAN® Elektrophorese System (BIO-RAD) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V für 10 min im 5%igen

Sammelgel (Tabelle 2-1) und für weitere 60-90 min bei 120 V im 8- oder 10%igen Trenngel (Tabelle 2-1). Unter Verwendung des Tank-Blot-Verfahrens wurden die entstandenen Proteinbanden auf eine Nitrozellulose-Membran (BIO-RAD) unter Anlegung einer 90 V Spannung für 90 min bei 4°C übertragen. Eine unspezifische, reversible Anfärbung aller Proteine mit dem Säurefarbstoff Ponceau S (Sigma Aldrich) diente der Überprüfung des Proteintransfers. Außerdem konnten angefärbte Membranen unter Zuhilfenahme des Proteinmarkers (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, ThermoFisher) auf Höhe der Bandengröße 70 kDa vor dem Blocken durch Schneiden geteilt werden, um die Inkubation der Membran mit den spezifischen primären Antikörpern Anti-NKCC1 (Proteingröße 140 kDa) und Anti-β-Aktin (Proteingröße 42 kDa) im weiteren Verlauf parallel auf dem entsprechend abgetrennten Membranabschnitt durchzuführen. Auf das „Stripping“ bzw. „Reprobing“ der Membran konnte dadurch verzichtet werden. Nach anschließendem Waschen wurden die unspezifischen Bindungsstellen für Proteine auf der Membran in Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)-gepufferter Kochsalz-Lösung (TBS) mit 0,1 % Tween 20 (TBS-T) und 5 % Magermilchpulver für 1 h bei Raumtemperatur (RT) geblockt. Die Blockierungslösung des phosphorylierten Antikörpers setzte sich aus 5 % Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) in TBS-T zusammen. Die spezifischen primären Antikörper (2.5.3) wurden 1:1000 in TBS-T mit 3 % BSA gelöst und auf die geblockte Membran gegeben. Diese wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 5 min die Membran mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase (horseradish, HSR) -gekoppelten sekundären Antikörper (2.5.3) bei RT für 1 h inkubiert. Es folgten abschließend erneut drei Waschschritte für 5 min in TBS-T. Die Immunodetektion der Zielproteine durch Chemilumineszenz (ECL Western Blotting Detection Kit, Amersham) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die gefärbten Proteinbanden durch den Chemiluminescence- und Fluorescence-Imager Celvin® S (Biostep®) erfasst. Die Proteinexpression der visualisierten Banden wurde mithilfe der Software ImageJ quantifiziert.

Vor der erneuten Inkubation einer Membran mit neuen Antikörpern z.B. zur Ladekontrolle mussten bereits gebundene Antikörper von der Membran durch „Stripping“ entfernt werden. Dafür wurde diese für 30 min bei RT in einem Stripping Puffer (CANDOR Bioscience) inkubiert. Danach konnte die Membran, wie zuvor beschrieben, erneut geblockt und mit einem Antikörper inkubiert werden.

Tabelle 2-1: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Reagenz	Sammelgel (2 ml)	Trenngel (10 ml)	
	5 %	8 %	10 %
30 % Acrylamid Mix	0,33 ml	2,6 ml	3,3 ml
dH ₂ O		4,6 ml	4 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8		2,5 ml	
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	0,25 ml		
10 % SDS	20 µl	100 µl	
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	20 µl	100 µl	
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	2 µl	5 µl	

2.3.2 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Veränderungen der Genexpression im Lungengewebe der Maus und in den Lungenepithelzellen der Linie A549 wurden durch qRT-PCR untersucht. Zunächst erfolgte die RNA-Isolation nach dem Protokoll des RNeasy mini Kit (Qiagen). Dafür wurden die Zellen in 350 µl RLT Puffer lysiert. Das Lungengewebe der Maus wurde wie zuvor beschrieben (2.3.1) in 500 µl RLT Puffer homogenisiert. Das Mikrovolumen-Spektralphotometer NanoDrop™ Lite diente der Konzentrationsbestimmung der RNA jeder Probe. Aus 500 ng der auf 50 ng/µl verdünnten RNA erfolgte im Anschluss die Synthese der komplementären DNA (cDNA) nach dem Protokoll des First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Für die Bestimmung der Genexpression mittels RT-qPCR wurde das QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) verwendet und nach dem zugehörigen Protokoll mit Hilfe des QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Es wurden folgende Primer verwendet (Tabelle 2-2):

Tabelle 2-2: Auflistung der Primer für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (qRT-PCR)

<i>Slc12a2</i> /NKCC1 (Maus)	for 5'- GGTTCTCCAAACTCACGG -3' rev 5'- GTCTTGCCATCCTCTTCCTC -3'
<i>Slc12a2</i> /NKCC1 (human)	for 5'- CCGGCAGATCAGGTAAATG -3' rev 5'- ACCATGCCATGTAGAGAGCAC -3'
β -Aktin (Maus)	for 5'-TCCATCATGAAGTGTGACGT -3' rev 5'-GAGCAATGATCTTGATCTTCAT -3'
β -Aktin (human)	for 5'-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT -3' rev 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT -3'

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte über relative Quantifizierung (RQ). Dabei wurde die Änderung des Zielgens NKCC1 zu einer internen Kontrolle -dem Haushaltsgen β -Aktin- relativiert und als n-fache Expression gegenüber diesem angegeben. Grundlage der Berechnung war die $\Delta\Delta C_t$ (cycle threshold, Schwellenwert-Zyklus) Methode (169).

2.3.3 Genotypisierung

Für die Genotypisierung der *Slc12a2*-Mäuse wurden Ohrbiopsien oder Schwanzspitzen verwendet. Die DNA-Extraktion erfolgte nach der *HotSHOT* (hot sodium hydroxide and tris) Methode (170). Jede Probe wurde nach Zugabe von 250 μ l 50 mM Natriumhydroxid (NaOH) für 30 min bei 95°C gekocht und nach Durchmischen mittels Vortexer für 15 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 250 μ l 0,5 M Tris-HCl (pH 5,5) hinzugegeben und kurz abzentrifugiert, um Ablagerungen zu sedimentieren. Nach Verdünnung der Proben 1:10 in dH₂O wurden 2 μ l für die PCR eingesetzt. Weitere Komponenten des PCR-Mix sind untenstehend aufgelistet (Tabelle 2-3).

Tabelle 2-3: Komponenten des PCR-Mix zur NKCC1-Genotypisierung der verdünnten DNA-Proben

PCR H ₂ O	2 µl
GoTaq® Master Mix (Promega)	5 µl
Primer for (allgemein)	0,5 µl
Primer rev (WT/KO)	0,5 µl

Es wurden 0,5 µM der folgenden Primer (Tabelle 2-4) eingesetzt:

Tabelle 2-4: NKCC1-Primer zur Genotypisierung

<i>Slc12a2</i> allgemein	GGAACATTCCATACTTATGATAGATG
<i>Slc12a2</i> KO	GACAATAGCAGGCATGCTGG
<i>Slc12a2</i> WT	CTCACCTTTGCTTCCCCTCCATTCC

Die extrahierte DNA wurde in einem Standard PCR Gerät (MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler, Marshall Scientific) nach dem folgenden Programm (Tabelle 2-5) amplifiziert.

Tabelle 2-5: Amplifikationsprogramm der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für den NKCC1-Primer

Initiale Denaturierung	94°C	5 min
Loop 1: 10x		
Denaturierung	94°C	20 s
Annealing	65°C	15 s
Elongation	68°C	10 s
Loop 2: 28x		
Denaturierung	94°C	15 s
Annealing	50°C	15 s
Elongation	72°C	10 s
Finale Elongation	72°C	2 min

Schließlich wurde ein 2%iges Agarose Gel, das 1x GelRed® (Biotium) als fluoreszierenden Nukleinsäurefarbstoff enthielt, mit jeweils 10 µl der amplifizierten DNA beladen und diese durch Anlegen einer 100 V Spannung mit Tris Acetat EDTA (TAE) als Laufpuffer aufgetrennt. Für die Auswertung wurde die DNA mit einem UV-Transluminator (Dark Hood DH-50, Biostep) dargestellt.

2.4 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse wurden mit der Software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Inc.) statistisch ausgewertet. Der statistische Vergleich zwischen zwei bzw. mehreren Gruppen erfolgte mithilfe des T-Tests für unverbundene Stichproben, sowie einfacher und zweifacher Varianzanalyse (englisch: one-way/two-way analysis of variance, kurz: ANOVA). Signifikante Unterschiede galten bei p-Werten kleiner als 0,05. In allen Abbildungen wird das arithmetische Mittel (\bar{x}) ± Standardabweichung (σ) gezeigt.

2.5 Materialien und Substanzen

2.5.1 Puffer

Puffer	Komponenten
RIPA Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl 1 % Nonidet P-40 0,1 % SDS 1x Phosphatase- und Protease-Inhibitor pH auf 7,5 eingestellt
10x SDS PAGE Laufpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1 % SDS pH auf 7,5 eingestellt
10x Transferpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 0,1 % SDS (dem 1x Puffer wird 20 % Ethanol hinzugefügt)
10x TBS	0,05 M Tris 0,1 M NaCl pH auf 7,4 eingestellt
50x TAE Puffer	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA

2.5.2 Stimulantien und Inhibitoren

Name	Katalognummer	Hersteller
Furosemid NKCC-Inhibitor	F 4381	Sigma Aldrich
Amilorid Hydrochlorid Hydrat ENaC-Inhibitor	A7410	Sigma Aldrich
WNK463 WNK1-Inhibitor	HY-100626	MedChemExpress
Temozolomid WNK1-OSR1-NKCC1-Signalweg- Stimulans	14163	Cayman Chemical

2.5.3 Antikörper

Primäre Antikörper	Katalognummer	Hersteller
Anti-NKCC1 extrazellulär (Hase)	ANT-071	Alomone labs
Anti-phospho-NKCC1 Thr212/Thr217 (Hase)	ABS1004	EMD Millipore
Anti- β -Aktin (Hase)	ab179467	Abcam

Sekundärer Antikörper	Katalognummer	Hersteller
Anti-Hase IgG HRP (Ziege)	ab205718	Abcam

2.5.4 Kommerziell erworbene Kits

Name	Katalognummer	Hersteller
Pierce™ BCA protein assay Kit	23227	Thermo Fisher Scientific
RNeasy® Mini Kit	74106	Qiagen
First Strand cDNA Synthesis Kit	K1612	Thermo Fisher Scientific
QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit	20456	Qiagen
GoTaq® Master Mix	M7122	Promega

3 Ergebnisse

3.1 NKCC1-Expressionsmuster der *Slc12a2*-Mauslinie

Um im Folgenden die funktionelle Rolle des NKCC1-Kotransporters am alveolären Flüssigkeitstransport und der kardial bedingten Bildung eines Lungenödems zu untersuchen, wurden die folgenden Experimente in einer *Slc12a2*/NKCC1-*Knockout*-Mauslinie durchgeführt. Aufgrund der hohen Belastung der homozygoten *Slc12a2*^{-/-}-Mäuse durch deren körperliche Beeinträchtigungen, der damit einhergehenden geringen Wurfrate mit einem Wurfanteil von nur 2 % in der Zucht (Abbildung 3-1), sowie der erschwerten Präparation bei der Durchführung der IPL aufgrund deren verminderter Körpergröße wurden die Experimente an heterozygoten *Slc12a2*^{+/-}-Mäusen durchgeführt.

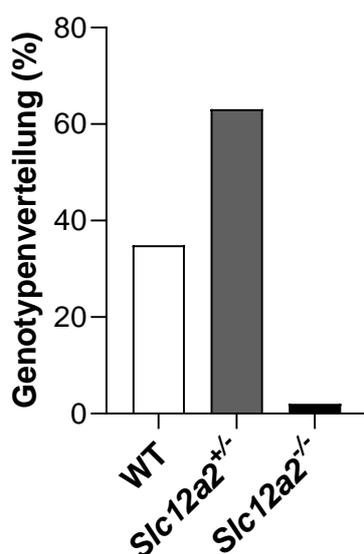
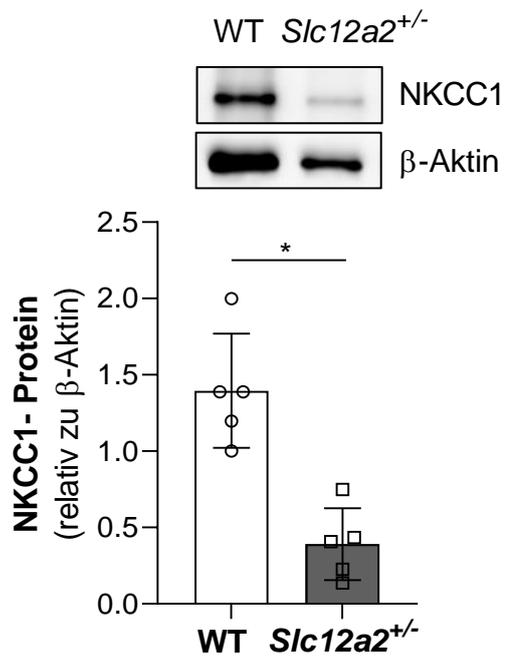


Abbildung 3-1: Verteilung der Genotypen der *Slc12a2*-Mäuse von 03/2019 bis 09/2019

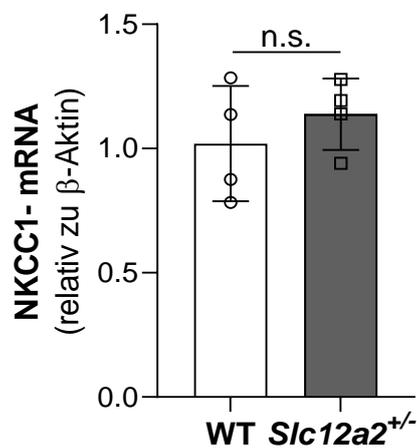
N=149: WT=34,9 % ($n_1 = 52$), Heterozygote (*Slc12a2*^{+/-}) = 63,1 % ($n_2 = 94$), KO (*Slc12a2*^{-/-}) = 2,0 % ($n_3 = 3$)

Heterozygote *Slc12a2*^{+/-}-Mäuse weisen eine signifikant reduzierte NKCC1-Expression auf Proteinebene (Abbildung 3-2 A), jedoch nicht auf Ebene der mRNA-Expression (Abbildung 3-2 B) auf. Letzteres wird durch die Entwicklung der Mauslinie erklärt, bei der die Genabschaltung durch Insertion des Zielvektors in einem Exon statt im entsprechenden Intron des Transporters erfolgte (2.1.1).

A



B

Abbildung 3-2: NKCC1-Expression in *Slc12a2*/NKCC1-Mäusen

Proteine und mRNA wurden aus den Lungen der *Slc12a2*^{+/-}-Mäuse und ihrem korrespondierendem WT isoliert. Veränderungen in der Expression des NKCC1-Proteins oder der mRNA wurden entsprechend durch Western Blot oder qRT-PCR bestimmt. (A) In *Slc12a2*^{+/-}-Mäusen war die Expression des NKCC1-Proteins deutlich reduziert. (B) Die Expression der NKCC1-mRNA zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen *Slc12a2*^{+/-}-Tieren und deren WT. Die Ergebnisse sind als $\bar{x} \pm \sigma$ dargestellt. * $p < 0,05$. Für (A) und (B) wurde jeweils ein ungepaarter T-Test mit $n = 5$ in (A) und $n = 4$ in (B) durchgeführt.

3.2 NKCC1 trägt zur Entstehung des kardiogenen Lungenödems bei.

Die Messung der *wet/dry ratios* isoliert perfundierter Mauslungen wurde als Maß für die Beurteilung der Flüssigkeitsakkumulation im Sinne einer Ödembildung in den Lungen herangezogen. Durch Anheben des linksatrialen hydrostatischen Druckes (P_{LA} von 2,5 auf 7,0 cmH₂O) wurde die Bildung eines kardiogenen Lungenödems im IPL-Modell induziert. Dies führte bei WT-Mäusen zu einer deutlichen Erhöhung der *wet/dry ratio*. Durch den unspezifischen NKCC-Inhibitor Furosemid (0,03 M), der zu Beginn des 30-minütigen Experimentes in das Perfusat hinzugegeben wurde, konnte dieser Effekt bei C57BL/6J Mäusen signifikant vermindert werden. Heterozygote *Slc12a2*^{+/-}-Mäuse zeigten ebenfalls eine signifikant geringere Ausprägung des Lungenödems als ihre WT-Kontrolle bei $P_{LA} = 7,0$ cmH₂O (Abbildung 3-3).

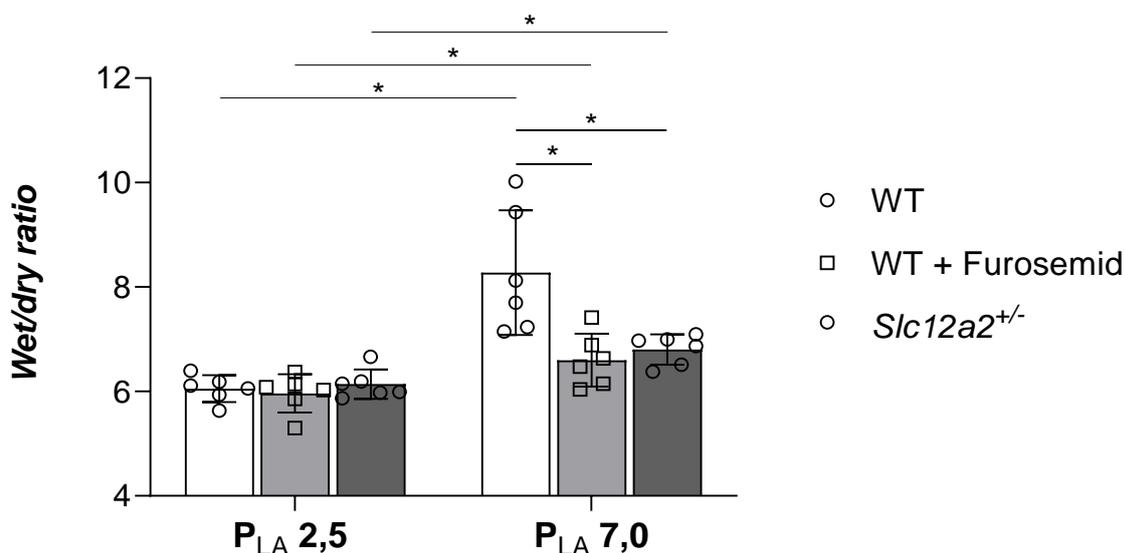


Abbildung 3-3: Hydrostatische Lungenödembildung in der IPL von *Slc12a2*^{+/-} und C57BL/6J Mäusen mit und ohne Furosemid

Nach 5 min basaler Perfusion und Ventilation wurde durch Erhöhung des linksatrialen hydrostatischen Druckes (P_{LA} von 2,5 auf 7,0 cmH₂O) ein kardiogenes Lungenödem in Lungen von WT- und *Slc12a2*^{+/-}-Mäusen induziert. Bei einem Teil der WT-Lungen wurde die IPL unter pharmakologischer Intervention durch einmalige Zugabe von 0,03 M Furosemid in das Perfusat zu Beginn des Experiments durchgeführt. Anschließend wurden die Lungen für 30 min kontinuierlich beatmet und mit HBSS + 20 % FCS (bzw. + 0,03 M Furosemid) perfundiert. Hydrostatischer Stress führte in allen Gruppen zu erhöhten *wet/dry ratios* im Vergleich zum Ausgangsdruck $P_{LA} = 2,5$ cmH₂O. Die *wet/dry ratios* in *Slc12a2*^{+/-}-Mäusen oder nach Behandlung mit Furosemid waren im Vergleich zur unbehandelten Wildtyp-Kontrolle bei $P_{LA} = 7,0$ cmH₂O reduziert. Die Ergebnisse sind als $\bar{x} \pm \sigma$ dargestellt. * $p < 0,05$. Als statistischer Test wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*two-way ANOVA*) durchgeführt, $n = 6$ je Gruppe.

Sowohl nach pharmakologischer Hemmung durch Furosemid als auch bei Lungen von Mäusen mit partiellem NKCC1-Verlust bewirkt die verminderte NKCC1-Funktion eine

deutlich geringere Entwicklung des kardiogenen Lungenödems. Dabei ist bereits ein heterozygoter NKCC1-Verlust ausreichend, um die *wet/dry ratios* deutlich zu senken. Zwischen der pharmakologischen Blockierung und dem unvollständigen *Knockout* der heterozygoten *Slc12a2^{+/-}*-Mäuse besteht kein signifikanter Unterschied in der Ödemausprägung. Obwohl die Lungenödembildung in beiden Gruppen (WT + Furosemid und *Slc12a2^{+/-}*) im Vergleich zum WT bei erhöhtem hydrostatischen Druck signifikant geringer war, führte die Anhebung des hydrostatischen Druckes auf $P_{LA} = 7,0 \text{ cmH}_2\text{O}$ zu einer signifikanten Erhöhung der *wet/dry ratios* verglichen mit den korrespondierenden *wet/dry ratios* bei $P_{LA} = 2,5 \text{ cmH}_2\text{O}$ (Abbildung 3-3).

3.3 Der heterozygote Verlust von WNK1 wirkt protektiv auf die Bildung des kardiogenen Lungenödems *ex vivo*

Da WNK1 durch Phosphorylierung der Phosphokinasen SPAK und OSR1 entscheidend an der Aktivierung von NKCC1 beteiligt ist (171), wurde nachfolgend die kardial bedingte Ödembildung bei *Wnk1^{+/-}*-Mäusen und deren korrespondierenden WT bei physiologischen P_{LA} -Werten ($2,5 \text{ cmH}_2\text{O}$) und erhöhtem hydrostatischen Druck ($P_{LA} = 7,0 \text{ cmH}_2\text{O}$) untersucht. Eine Erhöhung des P_{LA} führte bei WT-Mäusen zu einer ausgeprägten Akkumulation von Flüssigkeit in den Lungen, gemessen als signifikant erhöhte *wet/dry ratios*. Heterozygote *Wnk1^{+/-}*-Mäuse zeigten hingegen keinen Unterschied der *wet/dry ratios* zwischen niedrigen ($P_{LA} = 2,5 \text{ cmH}_2\text{O}$) und erhöhten hydrostatischen Drücken ($P_{LA} = 7,0 \text{ cmH}_2\text{O}$) (Abbildung 3-4). Entsprechend war die Ausprägung des Lungenödems bei hohen hydrostatischen Drücken in heterozygoten Tieren im Vergleich zu den korrespondierenden WT signifikant reduziert (Abbildung 3-4).

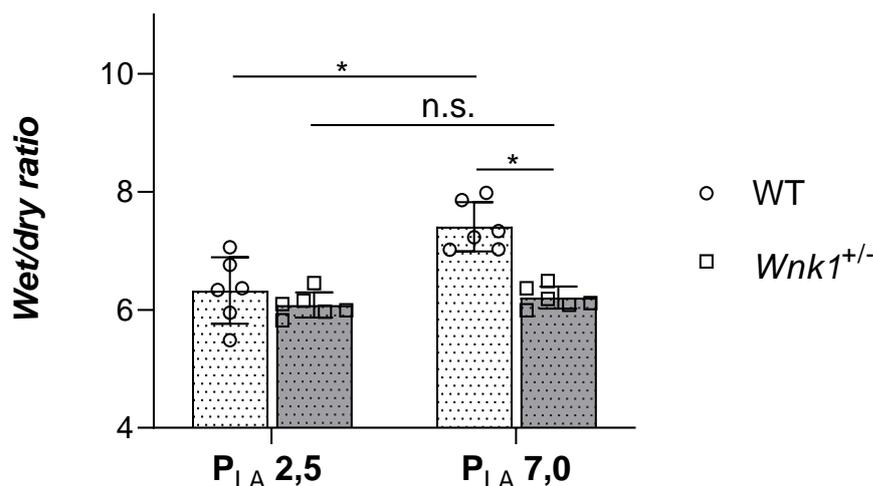


Abbildung 3-4: Hydrostatische Lungenödembildung in IPL von *Wnk1^{+/-}*-Mäusen

Nach 5 min basaler Perfusion und Ventilation wurde durch Anheben des linksatrialen hydrostatischen Druckes ($P_{LA} = 7,0$ cmH₂O) ein kardiales Lungenödem in Lungen von *Wnk1^{+/-}*-Mäusen und ihrem korrespondierendem WT induziert. Für 30 min wurden die Lungen kontinuierlich beatmet und mit HBSS + 20 % FCS perfundiert. Die in den entnommenen Lungen ermittelte *wet/dry ratio* stieg in der WT-Kontrolle unter hydrostatischem Stress, während in *Wnk1^{+/-}*-Mäusen die *wet/dry ratios* im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle signifikant reduziert waren. Die Ergebnisse sind als $\bar{x} \pm \sigma$ dargestellt. * $p < 0,05$. Als statistischer Test wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*two-way ANOVA*) durchgeführt, $n = 6$ je Gruppe.

3.4 Die Hemmung von ENaC durch Amilorid führt nicht zur Phosphorylierung von NKCC1 *in vitro*.

Hydrostatischer Stress aktiviert mechanosensitive Ionenkanäle im Gefäßendothel, wodurch die endotheliale NO-Produktion in den pulmonalen Kapillaren gesteigert wird (69). Das entstehende Stickstoffmonoxid inhibiert den apikalen Natrium-Transporter ENaC und hemmt so die alveoläre Flüssigkeitsresorption (22). Eine ENaC Inhibition in Anwesenheit einer funktionierenden Na_sK-ATPase könnte einen elektrochemischen Gradienten für Na⁺ in die Zelle über andere Transporter generieren, z.B. den basolateralen NKCC1-Kotransporter (21). Eine Phosphorylierung des NKCC1 wäre nach dem Konzept von Darman und Forbush (134), demzufolge der NKCC1-Kotransporter unter basalen Bedingungen inaktiv ist, eine Grundvoraussetzung für die in vorangegangenen Untersuchungen beschriebene Amilorid-induzierte AFS (21). Um die Möglichkeit einer Amilorid-induzierten NKCC1-Phosphorylierung, die dann auch bessere Möglichkeiten als die IPL zu weiteren mechanistischen *in vitro* Untersuchungen bieten würde, zu testen, wurden A549 Zellen für 1 h mit Amilorid (10 μ M) oder zusätzlich mit

dem WNK1-Inhibitor WNK463 (10 μ M) inkubiert. Unter ENaC Inhibition durch Amilorid wurde ein Anstieg des aktiven, phosphorylierten NKCC1 (p-NKCC1) erwartet. Die Zugabe von WNK463 sollte die Phosphorylierung von NKCC1 wiederum reduzieren. Diese Hypothese konnte jedoch nicht bestätigt werden. Bei der Quantifizierung des Verhältnisses von p-NKCC1 zu totalem NKCC1 (T-NKCC1) ergaben sich keine Unterschiede im Expressionsmuster nach Stimulation mit Amilorid oder WNK463 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 3-5).

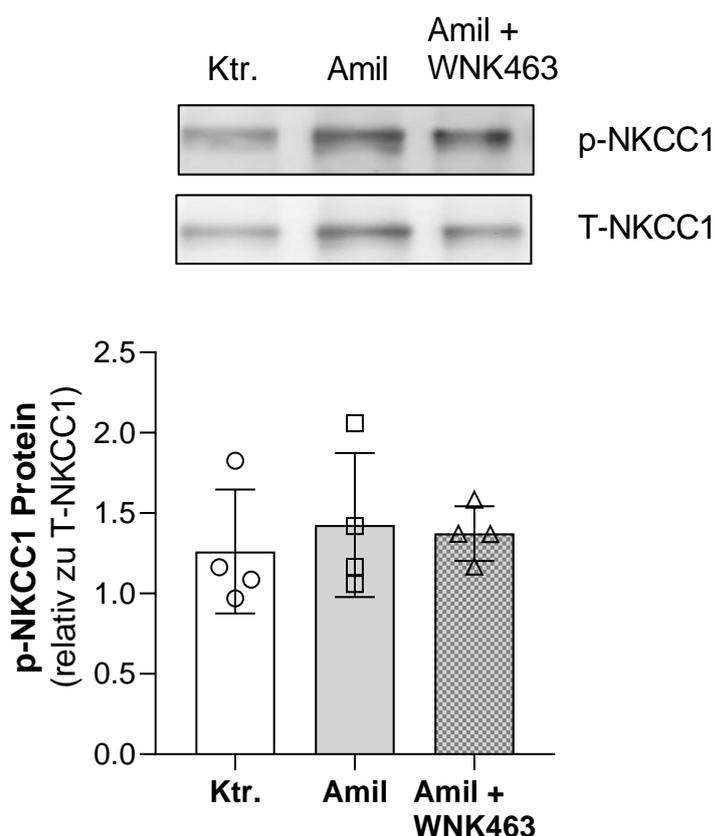


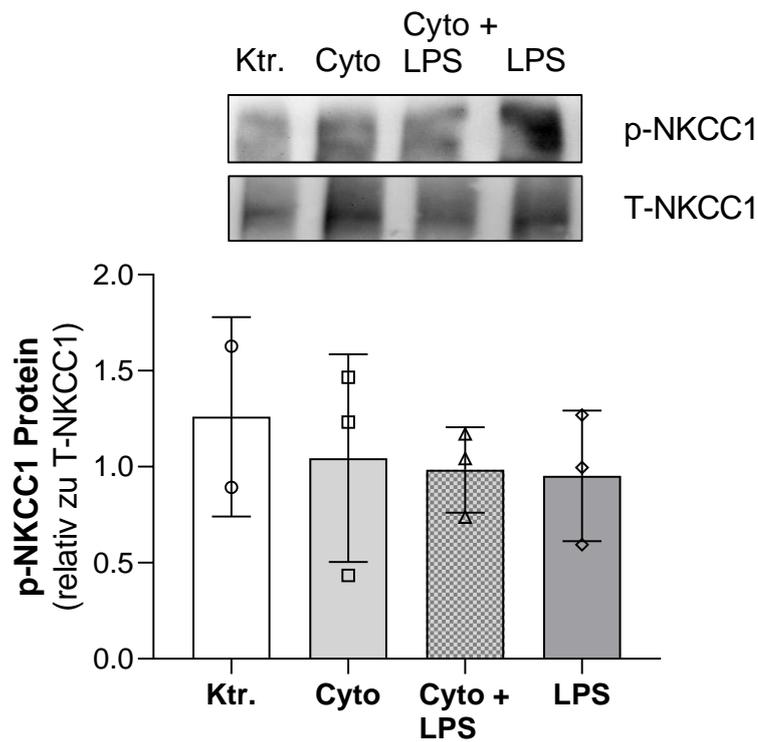
Abbildung 3-5: NKCC1-Phosphorylierung in A549 Zellen nach Stimulation durch Amilorid oder Amilorid+WNK463

A549 Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M Amilorid (Amil) oder jeweils 10 μ M Amilorid und WNK463 (Amil + WNK463) inkubiert. Veränderungen der Expression der Proteine wurden durch Western Blot bestimmt. Als Maß der Proteinphosphorylierung wurde p-NKCC1 in Relation zu T-NKCC1 bestimmt. Die Ergebnisse sind als $\bar{x} \pm \sigma$ dargestellt. Als statistischer Test wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, n = 4 je Gruppe.

3.5 Die NKCC1-Phosphorylierung ändert sich *in vitro* durch Stimulation mit Cytomix oder LPS nicht.

Um neben dem hydrostatisch bedingten Typ des Lungenödems auch eine mögliche Beteiligung von NKCC1 am Permeabilitätsödem zu testen, wurde das NKCC1-Expressionsmuster unter inflammatorischen Bedingungen, die charakteristisch für den akuten Lungenschaden sind, untersucht. Proinflammatorische Zytokine sind wichtige Regulatoren für den aktiven Ionentransport und die alveoläre Flüssigkeitsresorption (20, 75, 172). Daher wurden A549 Zellen für 4 h entweder mit LPS allein oder einem Zytokin-Cocktail bestehend aus TNF- α , IFN- γ und IL-1 β (Cytomix), jeweils mit oder ohne LPS inkubiert. Diese inflammatorische Stimulation änderte die Expression des phosphorylierten Proteins relativ zum totalen NKCC1 allerdings nicht, sodass eine Aktivierung des Transporters durch Phosphorylierung unter diesen Bedingungen nicht erfolgte. Des Weiteren führte die Behandlung mit proinflammatorischen Mediatoren auch zu keiner Änderung der NKCC1-mRNA-Expression (Abbildung 3-6).

A



B

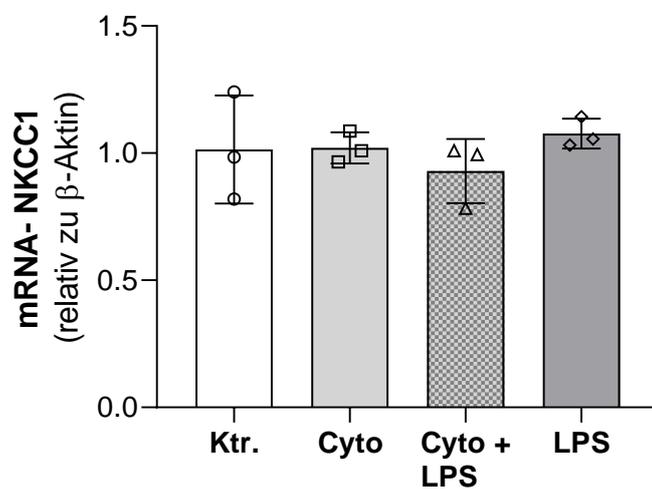


Abbildung 3-6: NKCC1-Phosphorylierung und mRNA-Expression unter inflammatorischer Stimulation

A549 Zellen wurden für 4 h mit einem Zytokin Cocktail (Cytomix) bestehend aus 50 ng/ml TNF- α , IFN- γ und IL-1 β (Cyto), 100 ng/ml LPS oder einer Kombination aus beidem (Cyto + LPS) inkubiert. Änderungen in der Expression der Proteine oder der mRNA wurden durch Western Blot und qRT-PCR ermittelt. (A) Repräsentative Immunoblots zu T-NKCC1 und p-NKCC1 wurden zunächst zur β -Aktin Kontrolle relativiert und anschließend diese Verhältnisse miteinander verglichen. Inflammatorische Mediatoren führten zu keiner Phosphorylierung des Proteins NKCC1 und

veränderten nicht dessen mRNA-Expression (B). Die Ergebnisse sind als $\bar{x} \pm \sigma$ dargestellt. Als statistischer Test wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, n = 3 je Gruppe.

3.6 Beitragsnachweis

Alle Experimente wurden im Institut für Physiologie – Charité Universitätsmedizin Berlin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. W.M. Kübler durchgeführt. Dr. Sarah Weidenfeld übernahm die Einführung in das Projekt, sowie die Einweisung in alle durchgeführten Labortechniken.

Erste IPL-Daten an NKCC1-Mäusen wurden durch Cecile Chupin und Dr. Sarah Weidenfeld erhoben. Diese zeigten, dass es keine Unterschiede in der *wet/dry ratio* zwischen männlichen und weiblichen Tieren, unterschiedlichen Altersgruppen oder C57BL/6J und *Slc12a2* WT gab. WNK1-Mäuse und deren Genotypisierung wurde durch Dr. Lasti Erfinanda Fuaadi bereitgestellt. Entsprechende Primer und das Genotypisierungsprotokoll sind dem Anhang zu entnehmen (siehe 7).

4 Diskussion

Diese Arbeit identifiziert den Natrium-Kalium-Chlorid-Symporter NKCC1 als wichtigen Regulator bei der Entstehung des kardiogenen Lungenödems. So führte der heterozygote Verlust sowie die pharmakologische Hemmung von NKCC1 in einem Modell des hydrostatischen Lungenödems an isoliert perfundierten Mauslungen zu einer verminderten Lungenödembildung im Vergleich zu den entsprechenden WT-Kontrolltieren.

WNK1-induzierte Signalkaskaden können NKCC1 durch Phosphorylierung aktivieren und spielen daher vermutlich auch bei der Lungenödembildung eine entscheidende Rolle. Dies zeigen die Ergebnisse der Maus IPL Untersuchungen, in denen ein heterozygoter Verlust von WNK1 protektiv im Modell des hydrostatischen Lungenödems wirkte. Der hydrostatische Stress bzw. dessen Auswirkungen auf die zelluläre Homöostase im Rahmen des akuten Linksherzversagens könnten über die WNK1-SPAK/OSR1-NKCC1-Signalkaskade zum Antrieb der AFS führen. Dies soll im Folgenden diskutiert werden.

Die Hypothese, dass eine ENaC-Hemmung durch Amilorid *in vitro* zu einer Phosphorylierung des NKCC1-Transporters führt, konnte im epithelialen Zellkultursystem der Zelllinie A549 nicht bestätigt werden. Des Weiteren konnte eine vermutete NKCC1-Phosphorylierung nach Stimulation mit den inflammatorische Mediatoren TNF- α , IFN- γ , IL-1 β und LPS im *in vitro* Modell des Permeabilitätsödems nicht nachgewiesen werden.

4.1 **NKCC1 fördert die Bildung des kardiogenen Lungenödems**

Die lebensnotwendige Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff sowie der Abtransport des bei der Zellatmung entstehenden Kohlenstoffdioxids erfolgt über die Blut-Luft-Barriere in den Alveolen und den sie umgebenden Lungenkapillaren. Dabei setzt sich die Diffusionsstrecke der Gase aus den Endothelzellen der Kapillarwand, dem Interstitium, dem Alveolarepithel und dem Flüssigkeits-Surfactant-Film zusammen. Letzterer überzieht die Alveole und ist eine Stellschraube in der Modulation der Länge der Diffusionsstrecke. Für einen optimalen Gasaustausch ist eine streng regulierte ELF eine wichtige Voraussetzung. Dafür ist eine Vielzahl von Ionentransportern verantwortlich,

deren Ionen-Absorption und -Sekretion die ELF aufrechterhält. Des Weiteren schützen diese Transporter die Lunge durch aktive Na^+ - und Cl^- -Absorption vor exzessiver Flüssigkeitsakkumulation in den Alveolen. Die Balance zwischen Flüssigkeitssekretion und -reabsorption wird von den alveolären Epithelzellen streng reguliert. Die treibende Kraft der alveolären Flüssigkeitsreabsorption (AFC) ist dabei die Na^+ -Aufnahme aus den Alveolen in die Pneumozyten. Na^+ wird u.a. durch den apikal exprimierten Kanal ENaC resorbiert und über die basolaterale Na,K-ATPase aus der Zelle entfernt. Der aktiven Na^+ -Reabsorption folgt eine apikale Cl^- -Reabsorption über CFTR zum elektrochemischen Konzentrationsausgleich. Der erzeugte osmotische Gradient eliminiert überschüssige Flüssigkeit aus dem Alveolarraum in das pulmonale Interstitium und den vaskulären Raum. Der Schutz vor einer alveolären Flüssigkeitsakkumulation durch die AFC fehlt im kardiogenen Lungenödem, bei dem es durch akutes Linksherzversagen zu einer Erhöhung des hydrostatischen Druckes in den Lungenkapillaren kommt. Dabei kommt es nicht nur zu einer vermehrten Flüssigkeitsfiltration, sondern es kehrt sich durch den hydrostatischen Stress die aktive AFC auch in eine Cl^- -getriebene aktive AFS um (21). Insbesondere verbleiben Na^+ -Ionen durch eine druckbedingte ENaC-Hemmung in der ELF, die den Alveolarepithelzellen aufliegt. Weiterhin transportiert der bidirektionale CFTR die Cl^- -Ionen nun in entgegengesetzter Richtung im Sinne der Elektroneutralität in die Alveolen. Beides führt osmotisch zur exzessiven Flüssigkeitsakkumulation in der Lunge. Die Voraussetzung einer solch nachgewiesenen aktiven AFS wäre aber der basolaterale Eintritt von Cl^- -Ionen, der aufgrund des Na^+ -Gradienten bei ENaC-Inhibition und der Umkehr des Cl^- -Transportes durch den CFTR nach luminal am ehesten über NKCC1 erfolgen könnte. Dann wäre der NKCC1-Transporter ein wichtiger Antrieb für die Cl^- -getriebene AFS durch hydrostatischen Stress.

In isoliert perfundierten WT-Mauslungen führte die Erhöhung des hydrostatischen Druckes (von $P_{\text{LA}} = 2,5 \text{ cmH}_2\text{O}$ auf $P_{\text{LA}} = 7,0 \text{ cmH}_2\text{O}$) zur massiven Ödembildung in der Lunge. In dieser Arbeit wurden erstmals ein pharmakologischer Inhibitor und ein genetisch defizientes Mausmodell parallel verwendet, um den Stellenwert des NKCC1-Transporters an der kardiogenen Ödembildung zu untersuchen. Der Einsatz des Schleifendiuretikums Furosemid, welches klinisch zur Ausschwemmung von Ödemen benutzt wird, wirkte im Vergleich zur WT-Kontrolle protektiv auf die Lungenödembildung unter hydrostatischem Druck. Die partielle NKCC1-Deletion in heterozygoten *Slc12a2*^{+/-}

Mäusen führte ebenfalls zu einer starken Verminderung des kardiogenen Lungenödems verglichen mit WT-Mäusen bei $P_{LA} = 7,0 \text{ cmH}_2\text{O}$. Beide Ergebnisse unterstreichen die wichtige Rolle des Ionentransporters an der pulmonalen Flüssigkeitsakkumulation beim kardiogenen Ödem. Die signifikant reduzierten *wet/dry ratios* der mit Furosemid behandelten WT bei hydrostatischem Stress im Vergleich zur WT-Kontrolle lassen sich im verwendeten Modell nicht durch eine renale Diurese erklären, da Lungen und Herz isoliert untersucht wurden und es sich somit bei der verminderten Lungenödembildung um einen extrarenalen Effekt handeln muss. Die symptomatische Therapie des Lungenödems mit Schleifendiuretika wirkt also nicht nur durch eine allgemeine Wasserausschwemmung über die Nieren positiv entlastend auf Herz und Lungen, sondern erreicht direkt in der Lunge flüssigkeitseliminierende Effekte. Dies bedeutet einen Paradigmenwechsel für den pharmakologischen Wirkmechanismus einer etablierten und klinisch häufig eingesetzten Substanzklasse – den Schleifendiuretika.

Generell werden Schleifendiuretika in der Therapie von Ödemen, chronischer Herzinsuffizienz, arterieller Hypertonie und Aszites verwendet (173). Deren dortige Effekte werden bislang meist durch einen Anstieg der forcierten Diurese aufgrund der NKCC2-Inhibition im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife erklärt. Aufgrund der schnellen Linderung der Symptome des akuten Herzversagens nach intravenöser Applikation von Furosemid werden allerdings häufig neben der gesteigerten Diurese auch extrarenale Effekte von Furosemid postuliert (174). So konnte bei Patienten mit akutem Linksherzversagen als ursächlich für den Abfall des linksventrikulären Füllungsdruckes nach systemischer Gabe von Furosemid die vaskuläre Wirkung des Schleifendiuretikums identifiziert werden, da es zu einem Anstieg der venösen Kapazität führt (175). In einer Studie an hypervolämischen Hunden mit ligierten Ureteren bewirkte Furosemid ebenfalls eine rapide Reduktion des pulmonal-kapillären Druckes und eine Zunahme der venösen Compliance (176), ohne dass dafür ein vermehrter Urin- und Elektrolytauswurf ursächlich sein konnte. Die Tatsache, dass es keine aktuelleren Studien zu den extrarenalen Effekten der Schleifendiuretika gibt, zeigt den Bedarf an Forschung zu dieser Medikamentenklasse. Für die Therapie des akuten Lungenversagens in der Neugeborenen-Intensivmedizin gehören Schleifendiuretika zu den am häufigsten verwendeten Medikamenten. Furosemid wird häufig in der Behandlung von Säuglingen mit chronischer Lungenerkrankung und klinischen Zeichen eines Lungenödems oder des

symptomatischen, persistierenden Ductus arteriosus Botalli¹² eingesetzt (177). Die Vielzahl der extrarenalen Effekte durch Schleifendiuretika in unterschiedlichen Organsystemen beruht auf der Hemmung des ubiquitär exprimierten NKCC1 (177). Die IPL-Experimente im Mausmodell des akuten hydrostatischen Lungenödems zeigen, dass der Einsatz des Schleifendiuretikums Furosemid einen wichtigen Beitrag zur Auflösung des pulmonalen Ödems leistet. Die parallele Verwendung eines Inhibitors und einem genetisch defizienten Mausmodell für NKCC1 weist hier erstmals direkt nach, dass Schleifendiuretika bei der Anwendung im kardiogenen Lungenödem pharmakologisch v.a. extrarenal über die Hemmung des NKCC1-Isotyps in der Lunge eine schnelle pulmonale Entwässerung forcieren.

Die akute Luftnot der Patienten mit kardiogenem Lungenödem kann durch Schleifendiuretika verbessert werden. Der Beitrag der renalen (NKCC2) und extrarenalen (NKCC1) Effekte am Therapieerfolg kann bislang nicht voneinander getrennt abgeschätzt werden. Mithilfe spezifischer Inhibitoren könnten Unterschiede in klinischen Effekten bei verschiedenen Krankheitsbildern untersucht und potenzielle Nebenwirkungen des anderen NKCC-Isotypen vermindert werden. Die häufigsten Nebenwirkungen von Furosemid beruhen vor allem auf dessen starker natriuretischer und wasserziehender Wirkung aufgrund der NKCC2-Blockade in den Nieren, die zu einer Hämokonzentration, Dehydratation, Hypotonie, Elektrolytverschiebungen und einer metabolischen Alkalose führen kann (178). Eine alleinige NKCC1-Inhibition würde diese unerwünschten Wirkungen aufgrund der bislang unspezifischen Blockierung beider NKCC-Isotypen beim kardiogenen Lungenödem vermutlich verhindern.

Der Einsatz einer *Slc12a2/NKCC1-Knockout*-Mauslinie ermöglichte es, spezifisch die Rolle eines NKCC1-Verlustes auf die Lungenödembildung zu testen. Ein homozygoter Verlust von NKCC1 in *Slc12a2*^{-/-}-Mäusen äußert sich in einem Phänotyp mit u.a. sensoneuraler Taubheit aufgrund einer veränderten Sekretion der Endolympe, verminderter Speichelproduktion, Abnormalitäten in der Sinneswahrnehmung, Infertilität und einem leicht verminderten Blutdruck im Vergleich zu WT-Tieren (179). Da die heterozygoten Mäuse im Vergleich eine geringere Belastung zeigten, einen größeren Anteil in der Zucht ausmachten und die NKCC1-Proteinexpression bereits in *Slc12a2*^{+/-}-

¹² Gefäßverbindung zwischen Aorta und Truncus pulmonalis im fetalen Blutkreislauf, die normalerweise nach der Geburt obliteriert

Mäusen signifikant vermindert war, wurden die Auswirkungen eines heterozygoten NKCC1-Verlustes auf die Lungenödembildung untersucht. Die signifikante Reduktion der *wet/dry ratios* durch eine partielle NKCC1-Deletion in heterozygoten *Slc12a2^{+/-}*-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen bei erhöhtem linksatrialen Druck ($P_{LA} = 7,0 \text{ cmH}_2\text{O}$) unterstreicht die wichtige Rolle des Ionentransporters an der pulmonalen Flüssigkeitsakkumulation beim kardiogenen Lungenödem. Bei normalem hydrostatischen Druck ergaben sich keine Unterschiede der Feucht-Trocken-Quotienten isoliert perfundierter Lungen zwischen WT-Mäusen mit oder ohne Furosemid-Behandlung und *Slc12a2^{+/-}*-Mäusen. Das bedeutet, dass unter basalen Bedingungen NKCC1 keinen entscheidenden Effekt auf den Flüssigkeitstransport zu haben scheint und eine Stimulation bzw. Aktivierung erst das Resultat des einwirkenden hydrostatischen Druckes oder des veränderten apikalen Flüssigkeitstransports ist. Unter basalen Bedingungen dominiert die AFC den Flüssigkeitstransport der Lunge. Ausschlaggebend dafür ist vor allem die Na^+ -Resorption durch ENaC und andere apikale Transporter. Wir konnten bereits zeigen, dass hydrostatischer Druck über eine ENaC-Inhibition den Na^+ -Gradienten und durch die elektrochemisch daran eng gekoppelte Transportrichtung von Cl^- -Ionen auch die AFC in eine AFS umkehrt (21). Für die Cl^- -getriebene AFS bei der Bildung des kardiogenen Lungenödems ist ein basolateraler Cl^- -Eintritt notwendig, der am ehesten über NKCC1 erfolgen könnte. Die signifikant reduzierte Ödembildung nach akutem Linksherzversagen in sowohl mit Furosemid behandelten als auch heterozygot NKCC1-defizienten Mauslungen könnte durch eine reduzierte alveoläre Flüssigkeitssekretion bedingt sein, wenn durch die NKCC1-Hemmung oder den heterozygoten NKCC1-Verlust der für die AFS notwendige basolaterale Cl^- -Eintritt vermindert ist. Der parallele Ansatz dieser Arbeit mit einem pharmakologischen Inhibitor und einem genetischen *Knockout*-Modell ist hier besonders robust, da nicht spezifische Effekte des Inhibitors wie auch Adaptationsvorgänge an den KO *in vivo* effektiv mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit auszuschließen sind.

Vermutlich lassen sich die starken Effekte der partiellen Deletion oder Inhibition von NKCC1 beim kardiogenen Lungenödem im IPL-Modell also durch eine Cl^- -getriebene AFS mit der Notwendigkeit des basolateral aktivierten Kotransporters begründen. Unterstützt wird dieser Erklärungsansatz durch IPL-Daten unserer Arbeitsgruppe von Ratten, die zeigten, dass die AFS bei erhöhtem P_{LA} durch NKCC1-Inhibition mittels Schleifendiuretika komplett gehemmt und eine physiologische AFC wiederhergestellt

werden konnte (21). Dass NKCC1 die alveoläre Flüssigkeitssekretion fördert, würde nicht nur den pulmonalen Furosemid-Effekt erklären, sondern wäre bedeutender Weise auch eine Art Rückversetzung in den ontogenetischen Zustand der fetalen Lunge: Das fetale Lungenwachstum ist abhängig von pulmonaler Flüssigkeitssekretion (180), an der NKCC1 beteiligt ist (181). Die Transition des fetalen Lungenepithels von einer präpartalen Flüssigkeitssekretion der intrauterinen Lunge in eine peri- und postpartale Flüssigkeitsreabsorption der extrauterinen Lunge erfordert Anpassungen in der Expression epithelialer Ionentransporter, die entsprechend Gradienten für Flüssigkeitstransporte erzeugen und die Lunge für einen optimalen Gasaustausch von Flüssigkeit befreien (180). Kurz vor der Geburt werden daher Amilorid-sensitive epitheliale Na^+ -Kanäle (ENaCs) hochreguliert (182). Ist die ENaC-Aktivität zur Geburt vermindert, resultiert das im Atemnotsyndrom des Neugeborenen (183). Im kardiogenen Lungenödem wird durch ENaC-Inhibition bei pathologisch erhöhten hydrostatischen Drücken also genauso Flüssigkeit über NKCC1 in den Alveolarraum sezerniert wie intrauterin in der fetalen Lunge bei präpartal noch pulmonaler Abwesenheit von ENaC. Unsere Ergebnisse zum Beitrag von NKCC1 an der Entstehung des kardiogenen Lungenödems könnten in der Klinik ein neues Bewusstsein für dessen frühzeitige Therapie und Eindämmung schaffen sowie die Forschung nach einem selektiv inhibierenden Therapeutikum mit NKCC1 als Zielstruktur oder dessen Signalweges vorantreiben.

4.2 WNK1 ist an der Entstehung des kardiogenen Lungenödems beteiligt

In Epithelzellen sind Na^+ , K^+ und Cl^- -Kotransporter (*cation-chloride cotransporters*, CCCs), zu denen auch NKCC1 zählt, für den Transport gelöster Substanzen und H_2O unverzichtbar, um eine physiologische Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten wie z.B. des Blutes, des zerebrospinalen Liquors, der Endolymph, des Spermas oder der ELF aufrecht zu erhalten (184). Die Aktivität der CCCs wird durch Änderungen der $[\text{Cl}]_i$, der extrazellulären Osmolarität und des Zellvolumens durch den WNK-SPAK/OSR1 Kinasen-Komplex moduliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf der Grundlage der zuvor nachgewiesenen funktionellen Rolle von NKCC1 beim kardiogenen Lungenödem und der bekannten

NKCC1-Regulation durch WNKs die Rolle von WNK1 bei der Bildung des kardiogenen Lungenödems in isoliert-perfundierten Lungen heterozygot-defizienter WNK1-Mäuse (*Wnk1^{+/-}*) untersucht. Der heterozygote Verlust von WNK1 wirkte bei erhöhtem hydrostatischen Druck protektiv auf die Lungenödembildung. So zeigten die *Wnk1^{+/-}*-Mäuse unter hydrostatischem Stress in der IPL nicht nur signifikant geringere *wet/dry ratios* verglichen mit WT-Mäusen bei $P_{LA} = 7,0 \text{ cmH}_2\text{O}$, durch den partiellen WNK1-*Knockout* kam es trotz der Erhöhung des P_{LA} von 2,5 cmH_2O auf 7,0 cmH_2O zu keiner signifikanten Flüssigkeitsakkumulation in den heterozygoten Mauslungen.

WNKs regulieren nicht nur die Funktionalität und Expression von NKCC1, sondern auch weiterer Transporter, die für den zellulären Flüssigkeitstransport wichtig sind (185). WNK1 fungiert als zellulärer Cl^- -Sensor, der bei Abnahme der $[\text{Cl}^-]_i$, extrazellulärer Hypertonizität bzw. Zellschrumpfung die Kinasen SPAK und OSR1 phosphoryliert, die wiederum die CCCs durch Phosphorylierung aktivieren oder deaktivieren (186) (Abbildung 4-1). Die Cl^- -importierenden, Na^+ -getriebenen NKCCs sind in der phosphorylierten Form aktiv (164), während die K^+ -getriebenen Cl^- -sezernierenden KCCs durch Phosphorylierung inhibiert werden (179, 184). Die am weitesten verbreitete Isoform der KCCs ist der hauptsächlich basolateral exprimierte Transporter KCC1 (187).

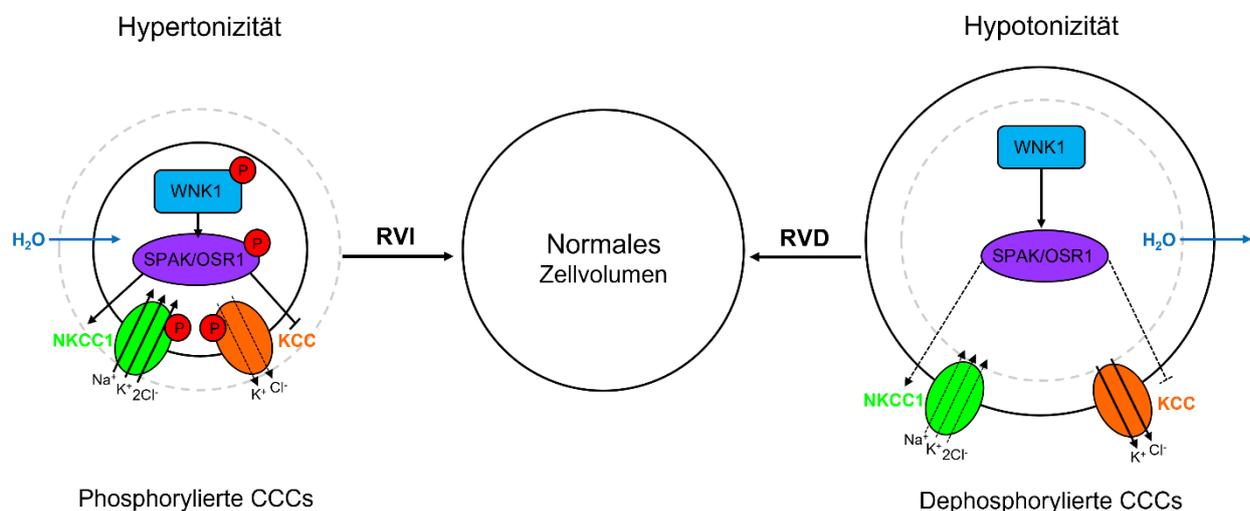


Abbildung 4-1: Die Rolle der Kationen-Chlorid-Kotransporter (CCCs) in der WNK-abhängigen Osmoregulation von Zellen

WNKs sind die Hauptregulatoren der CCCs. WNK1 ist ein Sensor für die Abnahme der intrazellulären Chloridkonzentration oder für Hypertonizität bzw. Zellschrumpfung und setzt diese Informationen in die Regulation der CCCs durch den WNK1-SPAK/OSR1-Signalweg um. Cl^- -importierende Na^+ -getriebene CCCs (NCCs, NKCCs) werden durch Phosphorylierung aktiviert, während K^+ -getriebene Cl^- -sezernierende CCCs (KCCs) im phosphorylierten Zustand inaktiv sind. Die Balance zwischen den wechselseitig regulierten N(K)CCs und KCCs ist unerlässlich für die Cl^- -Homöostase der Zellen und hat über den transepithelialen Wassertransport Auswirkungen auf das Zellvolumen. Die Reaktion auf eine Zellschrumpfung bei extrazellulärer Hypertonizität ist eine regulatorische Volumenzunahme

(*regulatory volume increase*, RVI). Der NKCC1-abhängige Na⁺, K⁺ und Cl⁻ Einstrom wird durch Phosphorylierung aktiviert und stellt zusammen mit dem nachströmenden Wasser das Ausgangsvolumen der Zelle wieder her. Im Gegensatz dazu stimuliert eine Zellschwellung unter hypotonem Stress die regulatorische Volumenabnahme (*regulatory volume decrease*, RVD). Der WNK1-SPAK/OSR1-Signalweg verbleibt inaktiv und die CCCs sind dephosphoryliert. Dies führt zu einer KCC-Desinhibition mit einem K⁺ und Cl⁻ Ausstrom, während dephosphoryliertes NKCC1 inaktiv ist. Wasser strömt aus der Zelle aus (186, 188).

Die entgegengesetzte Phosphoregulation der flüssigkeitsregulierenden Transporter NKCC1 und KCC1 durch WNK1 könnte der Grund dafür sein, warum der WNK1-Effekt einen größeren Einfluss auf die pulmonale Flüssigkeitsakkumulation im hydrostatischen Ödem hatte als der heterozygote NKCC1-*Knockout* oder die NKCC1-Hemmung mittels Furosemid. Denn während sich die *wet/dry ratios* in *Slc12a2*^{+/-}-Mäusen und WT mit Furosemid zwischen einem P_{LA} von 2,5 cmH₂O und 7,0 cmH₂O signifikant unterscheiden, es also trotz des protektiven heterozygoten *Knockouts* bzw. der pharmakologischen NKCC1-Hemmung zu einer geschwächten aber dennoch signifikanten Lungenödembildung kam, blieb diese in der IPL mit *Wnk1*^{+/-}-Mauslungen bei erhöhtem hydrostatischen Druck aus: Die *wet/dry ratios* in *Wnk1*^{+/-}-Mäusen bei P_{LA} = 7,0 cmH₂O sind im Vergleich zu denen bei normalem hydrostatischen Druck (P_{LA} = 2,5 cmH₂O) nicht signifikant erhöht.

Ist WNK1 nicht aktiv, wird NKCC1 nicht durch den WNK1-SPAK/OSR1-Signalweg phosphoryliert und aktiviert. KCC1 bleibt jedoch durch die fehlende Phosphorylierung aktiv (Abbildung 4-1). Für das abgeschwächte kardiogene Lungenödem in heterozygoten *Wnk1*^{+/-}-Mäusen könnte diese komplexe, entgegengesetzt koordinierte Regulation bedeuten, dass auf der einen Seite die verminderte NKCC1-Aktivität zu einer geringeren AFS mit geschwächter Ödemausbildung führt und zum anderen durch aktiviertes KCC1 im nicht phosphorylierten Zustand ein Gradient für die AFC geschaffen wird, da KCC1 Cl⁻- und K⁺-Ionen aus den alveolären Epithelzellen in das perimikrovaskuläre Interstitium ausschleust, denen H₂O osmotisch folgt. So hätte der Einsatz von Bumetanid als alternatives Schleifendiuretikum anstelle von Furosemid eventuell stärkere Effekte bei der hydrostatischen Ödembildung im IPL-Mausmodell erzielt, denn während Furosemid ungefähr die gleiche Potenz für NKCCs und KCCs hat, besitzt Bumetanid eine 500-fach höhere Affinität für NKCCs und kann daher als spezifischer NKCC-Inhibitor wirken (189), ohne dass die protektive basolaterale Cl⁻-Ausschleusung durch KCCs gehemmt wird.

Die Beteiligung der WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-Kaskade an pathologischen Prozessen wurde bereits an einigen neurologischen Krankheitsbildern erforscht. Beispielsweise führt

ein ischämischer Schlaganfall durch Störung des zellulären Ionen-Gleichgewichts zu einer pathologischen Zellschwellung im Gehirn. Die Inhibition der WNK-SPAK-CCC-Kaskade kann die Zellschwellung durch Inhibition des NKCC-vermittelten Ioneneinstroms und Stimulation des KCC-vermittelten Ionenausstroms reduzieren (179). Das zytotoxische Hirnödem nach einem ischämischen Schlaganfall aufgrund der Okklusion der *Arteria cerebri media* ist entsprechend bei WNK3 KO-, heterozygoten SPAK- und SPAK-KO-Mäusen deutlich geringer ausgeprägt als bei WT-Mäusen (190). Beide Studien verdeutlichen den wichtigen Beitrag der WNK-SPAK-CCC-Achse zur zellulären Flüssigkeitsregulation und unter pathologischen Veränderungen an der Entstehung verschiedener Typen des Hirnödems.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Blockierung des WNK-SPAK/OSR1-CCC-Signalweges im kardiogenen Lungenödem potenter sein könnte als die alleinige Stimulation/Inhibition der nachgeschalteten CCCs der WNK-SPAK/OSR1-Signalkaskade, da durch Inhibition des Signalweges simultan der NKCC-vermittelte Cl⁻-Einstrom in die Zelle inhibiert und die KCC-vermittelte Cl⁻-Extrusion gefördert würde (179).

4.3 Amilorid führt *in vitro* nicht zu einer vermehrten NKCC1-Phosphorylierung

Die Endothelzellen der pulmonalen Gefäße fungieren als Sensoren hämodynamischer Kräfte und bilden eine Signalbrücke in der Kommunikation zwischen dem auf die Kapillare einwirkenden hydrostatischen Druck, dem Alveolarraum und der resorptiven Kapazität der Pneumozyten (22). Eine Erhöhung des hydrostatischen Druckes im IPL-Modell führt in mikrovaskulären Endothelzellen über Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)-abhängige Mechanismen zur NO-Bildung (69). Das freigesetzte NO hemmt die AFC durch Inhibition des Amilorid-sensitiven Na⁺-Transports über cGMP-vermittelte und cGMP-unabhängige Signalwege (22, 73). Die Na⁺-Resorption in den Pneumozyten kann demnach durch die druckforcierte, endotheliale NO-Produktion gehemmt werden, wodurch der erhöhte hydrostatische Druck die protektive AFC in den Lungenkapillaren einschränkt. Da die Kapazität für die Aufnahme von alveolärer Flüssigkeit im vaskulären Raum aufgrund des Linksherzversagens ab einem gewissen Punkt trotz einer

gesteigerten Lymphdrainage und dem vermehrten Flüssigkeitsabfluss aus dem perivaskulären in den peribronchovaskulären Raum ausgelastet ist (vgl. Abbildung 1-2), wirkt die Minderung der Resorptionskapazität des alveolären Epithels einer weiteren perivaskulären Volumenzunahme entgegen (22), was aber im Umkehrschluss bedeutet, dass die abnehmende AFC ihre Funktion als Ödemschutz verliert. Die verminderte Reabsorption bringt das Gleichgewicht des Flüssigkeitstransports in eine Schiefelage, so dass die ELF nicht mehr optimal reguliert werden kann. Für einen funktionierenden Gasaustausch kommt erschwerend hinzu, dass sich durch erhöhten hydrostatischen Druck der transepitheliale Flüssigkeitstransport von der normalerweise dominierenden aktiven AFC in eine aktive AFS umkehrt. *Ex vivo* konnte unsere Gruppe dafür bereits einen Amilorid-induzierten alveolären Cl⁻-Einstrom in den Alveolarraum nachweisen, der die Entstehung des kardiogenen Lungenödems fördert (21). Die alveoläre Cl⁻- und Flüssigkeitssekretion konnte wiederum durch NKCC1- oder CFTR-Inhibitoren verhindert werden (21). Daraus entstand die Hypothese, dass im hydrostatischen Lungenödem die druckbedingte Inhibition von ENaC zunächst zu einer NKCC1-Stimulation führt, die dann die Cl⁻-getriebene AFS antreibt und in einer verstärkten alveolären Flüssigkeitsakkumulation resultiert. Das hydrostatische Lungenödem kann *in vitro* nur schwer bis gar nicht simuliert werden. Unser Ziel war es daher, in alveolären Epithelzellen durch ENaC-Inhibition eine Aktivierung von NKCC1 zu replizieren, um im Anschluss zu untersuchen, ob die NKCC1-Phosphorylierung wie hypothetisiert WNK1-abhängig abläuft. In der Lungenepithelzelllinie A549 kam es nach ENaC-Inhibition mittels Amilorid jedoch zu keiner Aktivitätszunahme in Form einer Phosphorylierung des NKCC1-Transporters. Auch die Inkubation der Zellen mit dem WNK-Inhibitor WNK463 führte nicht zu der erwarteten Verringerung der phospho-NKCC1-Expression. Die Ergebnisse schließen eine Rolle von NKCC1 an der AFS dennoch nicht aus, zumal ja bereits durch Solymosi et. al (21) die Amilorid-induzierte AFS in IPL von Ratten nachgewiesen wurde. Vielmehr weisen sie darauf hin, dass Amilorid kein geeigneter Stimulus ist, um NKCC1 zu phosphorylieren, und dass – glaubt man Darman und Forbush (134), dass ein aktiver NKCC1-Transporter phosphoryliert sein muss – dann entweder bereits unter basalen Bedingungen oder zumindest unter hydrostatischem Stress in der Lunge eine Amilorid-unabhängige Grundaktivierung von NKCC1 besteht. *In vivo* unterschieden sich die *wet/dry ratios* aus den IPLs zwischen WT, WT + Furosemid und *Slc12a2*^{+/-} unter basalen Bedingungen ($P_{LA} = 2,5 \text{ cmH}_2\text{O}$) nicht. *In vitro* hatte die alleinige Stimulation der A549-

Zellen mit Amilorid keinen Einfluss auf die p-NKCC1-Expression. Es kann sein, dass die NKCC1-Phosphorylierung auf Mechanismen oder Mediatoren beruht, die in diesem *in vitro* Modell fehlen. Auch wenn NKCC1 bei normalem hydrostatischen Druck phosphoryliert sein sollte, resultiert daraus *in vivo* kein für die Lungenödembildung flüssigkeitsrelevanter Ionentransport. Bestünde eine basale NKCC1-Phosphorylierung, hätte *in vitro* allerdings zumindest die WNK-Inhibition durch WNK463 einen Effekt auf die Expression des phosphorylierten NKCC1 in den A549 Zellen haben sollen. Widerspricht man dem Konzept der für die NKCC1-Aktivierung notwendigen Phosphorylierung (134), wäre es alternativ denkbar, dass der durch ENaC-Inhibition erzeugte luminale Na⁺-Gradient als Stimulus per se ausreichend für einen basolateralen Ionentransport über NKCC1 ist, ohne dass der Kotransporter phosphoryliert würde. Dagegen spricht allerdings, dass eine ATP-Depletion in den Axonen von Riesentintenfischen zu einer signifikanten Reduktion des Bumetanid-sensitiven Cl⁻-Transportes führte (137). Außerdem sorgte in isoliert perfundierten Rattenlungen die Hemmung der Na,K-ATPase mittels Ouabain für eine signifikant reduzierte AFS, die zuvor über eine Inhibition der apikalen Na⁺-Aufnahme durch Amilorid induziert wurde (21). Die verschiedenen, teils entgegengesetzten Ansätze zur NKCC1-Regulation im hydrostatischen Lungenödem zeigen, wie eng die Phosphorylierung und die Ionentransportaktivität von NKCC1 miteinander verbunden sind und sie trotzdem nicht gleichzusetzen sind. Da WNKs als Schlüsselkinasen für die NKCC1-Phosphorylierung gelten (147, 186), wäre es interessant – wenn man die Theorie der basalen Grundaktivität bzw. der unter hydrostatischem Stress von Amilorid unabhängigen NKCC1-Aktivierung durch Phosphorylierung *in vivo* weiterverfolgt –, ob die NKCC1-Phosphorylierung in *Wnk1*^{+/-}-Lungen im Vergleich zu WT-Lungen vermindert ist.

Die Lungenödembildung ist ein komplexer Prozess, der verschiedene Transporter und Zelltypen miteinbezieht. Den Transporter ENaC oder die Kinase WNK1 als solitäre Faktoren in der NKCC1-Aktivierung *in vitro* zu betrachten ist nachweislich unzureichend, da funktionelle und möglicherweise auch strukturelle Interaktionen mit anderen Proteinen und Zellen in der Regulation des Flüssigkeitstransportes und Gasaustausches berücksichtigt werden müssen. Die ENaC-Inhibition durch NO infolge hydrostatischen Stresses führt zu einer Abnahme der intrazellulären Na⁺-Konzentration, die mit einer verminderten AFC einhergeht (22). Neben ENaC wird auch CFTR durch ein erhöhtes Zellvolumen oder hydrostatischen Druck aktiviert (191). Bei erhöhtem hydrostatischen

Druck zeigte sich in Ussing-Kammer-Experimenten eine erhöhte CFTR-Aktivität an Epithelmembranen aus Lungen des Krallenfrosches *Xenopus*. Dabei kam es sowohl bei apikal oder basolateral erhöhter Flüssigkeitssäule, das heißt unabhängig von der Richtung des Druckgradienten zur CFTR-Stimulation (191). Außerdem ist CFTR im respiratorischen Epithel den permanenten Atembewegungen während der Ventilation ausgesetzt. Zhang und Kollegen (192) zeigten in Ussing-Kammer-Experimenten an humanen Calu-3 Lungenepithelzellen, dass CFTR durch Membrandehnung aktiviert wird. Die Fluktuation des Druckes in der Lunge zwischen normobaren Verhältnissen der Atemwege in Ruhe, hypobaren Verhältnissen unter Belastung, beim Fliegen oder in hohen Höhenlagen, sowie erhöhtem hydrostatischen Druck im Kapillarnetz der Alveolen beim Lungenödem oder im submukösem Ödem bei Asthma bronchiale beeinflusst daher immer auch den mechanosensitiven CFTR über Dehnungsstress der epithelialen Membran (192). Da der CFTR-abhängige Cl⁻-Transport im Lungenepithel andere Ionenporter in ihrer Aktivität beeinflusst, hat dessen mechanische Stimulation vermutlich einen weitreichenden Einfluss auf den Flüssigkeitstransport in der Lunge. Auch Ergebnisse unseres Labors zeigen, dass die CFTR-Phosphorylierung bei erhöhtem hydrostatischen Druck gegenüber basalen Bedingungen gesteigert ist und durch einen NO-Synthase-Inhibitor blockiert wird (21). Die Aktivitätssteigerung des bidirektionalen CFTR unter hydrostatischem Stress gilt dabei aber nicht der Reabsorption, sondern der Sekretion von Cl⁻-Ionen (191). CFTR beeinflusst über die [Cl⁻]_i die WNK1-Aktivität und damit indirekt auch NKCC1 (und KCC1). Es ist anzunehmen, dass durch die veränderte Transportrichtung des CFTR zunächst die [Cl⁻]_i sinkt und damit WNK1 aktiviert wird. Der für die AFS erforderliche basolaterale Cl⁻-Eintritt in die Zellen könnte so durch NKCC1-Transporter ermöglicht werden, die von den WNK-Substraten SPAK und OSR1 zur Aktivierung phosphoryliert werden müssen. Für die Umkehr der AFC in eine Cl⁻-getriebene AFS beim kardiogenen Lungenödem kann neben der NO-bedingten ENaC-Inhibition also ebenso die direkte Aktivitätssteigerung des CFTR durch hydrostatischen Druck und nachfolgender Cl⁻-abhängiger Signalwege ursächlich sein. Dieser Aspekt wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Zukünftige Experimente könnten untersuchen, ob eine CFTR-Stimulation erhöhte p-NKCC1-Level im Zellkulturmodell nach sich zieht.

Hydrostatischer Stress könnte auch über ENaC- und CFTR-unabhängige Mechanismen *in vivo* eine NKCC1-Phosphorylierung induzieren. Die Vertreter der WNK-Familie sind als

Cl⁻-Sensoren und Wächter der zellulären Homöostase bekannt, die auf eine sich ändernde [Cl⁻]_i oder eine hyper- bzw. hypotone Umgebung der Zelle eine regulatorische Volumenzunahme oder -abnahme der Zelle vermitteln. Radha Akella und Kollegen zeigten (159), dass die Autophosphorylierung und Aktivierung der intrazellulären Proteinkinasen WNK3 und WNK1 direkt durch hydrostatischen Druck induziert werden kann. In der Kristallstruktur ihrer unphosphorylierten inaktiven Kinasedomäne kann WNK1 neben Chloridkonzentrations- auch Druckänderungen wahrnehmen. Die Aktivierung durch hydrostatischen Druck erfordert dabei eine Anpassung der Konformation vom inaktiven Dimer zum Monomer mit Autophosphorylierungskomponente (159). Unabhängig von CFTR und ENaC sowie deren Einfluss auf das Zellvolumen und die [Cl⁻]_i könnte also auch die direkte WNK1-Aktivierung durch hydrostatischen Druck relevant für die Entstehung des kardiogenen Lungenödems über den WNK1-SPAK/OSR1-NKCC1-Signalweg sein.

Zuletzt können neben der NKCC1-Phosphorylierung, die der vermutlich bedeutendste Stimulus zur Transporteraktivierung ist (129), andere Prozesse ebenfalls regulierend auf den Ionentransport wirken. Hannemann und Flatman (193) untersuchten in HEK-293 Zellen, die NKCC1 und NKCC2 durch molekulare Klonierung aus Frettchenieren stabil exprimierten, den Bumetanid-sensitiven K⁺-Transport sowie die Phosphorylierung der N-Termini beider Transporter. Dafür wurden u.a. die Auswirkungen des Phosphatase-Inhibitors Calyculin A und des Thyrosinkinase-Inhibitors PP1 auf die Phosphorylierung und die Transportaktivität beider Kotransporter-Isotypen verglichen. Eine Kinase-Inhibition reduzierte die NKCC-Phosphorylierung und den NKCC-Ionentransport. Außerdem wurde der Transport nur dann stimuliert, wenn die NKCC-Phosphorylierung zunahm. Jedoch folgte nicht auf jede Phosphorylierung eine Stimulation des Ionentransports. Sie schlussfolgerten daraus, dass die Phosphorylierung des N-Terminus nur die mögliche Kapazität, also die reine Fähigkeit des Ionentransports beeinflusst und die tatsächliche Aktivität im Sinne der Quantität des Ionentransports auch von anderen Faktoren abhängig ist (193). Eine Phosphorylierung wäre demnach für den Ionentransport notwendig, aber nicht ausreichend. Ausgehend von dieser Beobachtung könnte der Effekt der NKCC1-Phosphorylierung durch Protein-Protein-Interaktionen z.B. zwischen dem Kotransporter und Bestandteilen des Zytoskeletts überboten oder gar aufgehoben und das Maß des Ionentransports beeinflusst werden (129). Klein und

O'Neill (194) zeigten, dass die Inhibition der Myosin¹³-Leichtketten-Kinase in vaskulären Endothelzellen mit dem *Myosin light chain kinase inhibitor 7* (ML-7) sowohl die Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten als auch die Aktivierung des Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Kotransports über NKCC1 unter Hypertonizität, das heißt bei Zellschrumpfung, verhindert. Wie bereits beschrieben phosphoryliert WNK1 als Reaktion auf eine Zellschrumpfung bei extrazellulärer Hypertonizität u.a. NKCC1, um eine regulatorische Volumenzunahme (RVI) über eine für den transepithelialen Wassertransport relevante Cl⁻-Aufnahme in die Zelle zu realisieren. ML-7 hatte zwar keinen Einfluss auf diese durch Zellschrumpfung induzierte Kotransporter-Phosphorylierung, wohl aber auf die Transportaktivität (194). Die NKCC1-Phosphorylierung spiegelt sich also nicht immer in einer Änderung der Kotransporter-Aktivität wider.

Eine NKCC1-Phosphorylierung könnte eine basale Transportaktivität gewährleisten, die den Kotransporter dazu befähigt, hohe Bedarfsspitzen z.B. bei der Anpassung der [Cl⁻]_i oder der zellulären Volumenregulation durch Zunahme des Ionentransports zu bewältigen (193). Diese Anpassung könnte Phosphorylierungs-unabhängig durch das Zytoskelett initiiert werden oder aber Signalwege umfassen, die an alternativen Phosphorylierungsstellen angreifen. NKCC1 besitzt eine Vielzahl an verschiedenen Ser- und Thr-Phosphoakzeptoren (129, 134, 135, 193), von denen bislang mindestens vier Thr-Resten im N-Terminus von humanem NKCC1 (Thr²⁰³, Thr²⁰⁷, Thr²¹² und Thr²¹⁷) eine regulatorische Funktion bei der Transportaktivität zugeschrieben werden kann (195). Der WNK-SPAK/OSR1-Signalweg vermittelt über die Phosphorylierung eben dieser Thr-Bindungsstellen eine erhöhte NKCC1-Aktivität (195). In den *in vitro* Versuchen zur Regulation von NKCC1 im hydrostatischen und inflammatorischen Zellkulturmodell wurde ein Anti-phospho-NKCC1-Antikörper verwendet, der an phosphoryliertes Thr²¹²/Thr²¹⁷ bindet. Wie stark der Anteil der vier Phosphoakzeptoren jeweils an der NKCC1-Phosphorylierung durch die verwendeten Stimuli ist, ist nicht bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Thr²¹² und Thr²¹⁷ im Zellmodell zum Lungenödem nicht signifikant vermehrt phosphoryliert wurden. Eventuell ist der verwendete Antikörper für nur marginale Expressionsänderungen in den Western Blots aber auch nicht sensitiv genug. Warum Amilorid und WNK463 *in vitro* keinen Effekt auf die NKCC1-Phosphorylierung hatten, muss letztlich also auch methodenkritisch betrachtet werden.

¹³ Motorprotein des Zytoskeletts, welches für die Vorgänge bei der Muskelkontraktion verantwortlich ist.

Wie schnell oder langsam die NKCC1-Phosphorylierung in A549-Zellen abläuft, ist ebenfalls nicht bekannt. Vielleicht wurde im *in vitro* Versuch also eine ungeeignete Stimulationsdauer bzw. der falsche Zeitpunkt für die Auswertung gewählt. Schließlich weiß man auch nicht, wie groß der Effekt des einen hier untersuchten Mechanismus ist. Zumindest erscheint es unwahrscheinlich, dass es nur einen gemeinsamen Signalweg gibt. Viel eher werden *in vivo* parallel verschiedene Aktivierungswege ablaufen und auch die Phosphorylierung wird nicht nur über „den einen Weg“ vonstattengehen. Für die *in vitro* Versuche ist weiterhin nicht zu vernachlässigen, dass A549 Zellen natürlich ein primitives Surrogat für den alveolarepithelialen Ionen- und Flüssigkeitstransport darstellen und ihr Ursprung in Karzinomzellen liegt, die den normalen Aufbau des Alveolarepithels nur unzureichend abbilden können. Abschließend kann man davon ausgehen, dass sich die NKCC1-Transportaktivität nicht allein durch die Verwendung phosphospezifischer Antikörper bei der Auswertung von Zelllysaten ableiten lässt und die NKCC1-Phosphorylierung von vielen Aspekten des Versuchsaufbaus abhängt. Die fehlenden Änderungen der NKCC1-Phosphorylierung durch Amilorid oder WNK463 würden demnach nicht widerspiegeln, wie sich die Kotransporter-Aktivität *in vitro* verändert hat und eine Rolle von NKCC1 an der AFS und Lungenödembildung auch nicht ausschließen. Die Untersuchungen zur NKCC1 Regulation im Lungenepithel sind also bei Weitem noch nicht abgeschlossen und welche Mechanismen die Kapazität und Aktivität des Kotransporters wie beeinflussen, muss weiter differenziert werden.

4.4 NKCC1 wird durch ARDS-assoziierte Zytokine *in vitro* nicht vermehrt phosphoryliert.

Das Lungenödem vom Permeabilitätstyp zeichnet sich durch die Akkumulation Proteinreicher Flüssigkeit in den Alveolen aus und tritt vor allem im Rahmen von schweren pulmonalen oder systemischen Infektionen auf. Eine gestörte bzw. unterbrochene alveolär-kapilläre Barriere, z.B. durch inflammatorische Prozesse, führt zu einer erhöhten Permeabilität für Proteine und der Unfähigkeit, Flüssigkeit aus den Alveolen abzutransportieren (196, 197). Ursächlich für das Unvermögen des alveolären Epithels, den „gefluteten“ Luftraum von dem Übermaß an Flüssigkeit zu befreien, kann sowohl eine erhöhte parazelluläre Permeabilität aufgrund des Verlustes interzellulärer Verbindungen z.B. der *tight junctions* als auch eine Beeinträchtigung der epithelialen Transportkapazität

sein (196). Über die gestörte Barriere können Immunzellen leichter in die Alveolen einwandern. Zum einen kann das protektive Effekte haben, wenn durch die erhöhte Anzahl an Abwehrzellen Pathogene schneller eliminiert werden und dadurch die pulmonale Infektion limitiert wird. Zum anderen induzieren die proinflammatorischen Zytokine, die von zirkulierenden Immunzellen und eingewanderten Neutrophilen sezerniert werden, Signalwege, welche die Funktionalität und Expression flüssigkeitsregulierender Ionentransporter beeinflussen (20). So reduziert TGF- β 1 in humanen AT II Zellen die Amilorid-sensitive Na⁺-Aufnahme und vermindert die α -ENaC mRNA- und Proteinexpression über eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) (198). Auch IL-1 β reduziert im Lungenepithel den Ionen- und Wassertransport über eine p38 MAPK-vermittelte Abnahme der α -ENaC-Expression (199). Das proinflammatorische *Cytokine-induced neutrophil chemoattractant* (CINC-1) in Ratten - ein Analogon des *human growth related oncogene* (GRO/CXCL1) (200), welches strukturell mit dem IL-8/CXCL8 verwandt ist (201) - hemmt den Cl⁻- und Nettoflüssigkeitstransport in AT II Zellen über eine Verringerung der CFTR-Aktivität und -Biosynthese. Die Inhibition von CINC-1 im Rattenmodell des akuten Lungenschadens vermochte entsprechend die protektive AFC wiederherzustellen (202). Zu dem Einfluss von TNF- α auf die Amilorid-sensitive Na⁺-Resorption und damit auch auf die AFC wurden hingegen widersprüchliche Effekte beschrieben: In einem *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonie-Modell war die AFC über TNF- α abhängige und Amilorid-sensitive Mechanismen hochreguliert (203), während im Gegensatz dazu in alveolären Epithelzellen auch von einer herabgesetzten ENaC-Aktivität und Expression durch TNF- α berichtet wird (204). Lee und Kollegen (75) konnten zeigen, dass die Ödemflüssigkeit von Patienten mit akutem Lungenschaden die Expression von ENaC und CFTR sowie deren Aktivierung in AT II Zellen verringert und zu einer Abnahme der AFC führt. Eine andere Studie berichtete von einer Stimulation der CFTR-abhängigen AFS durch IL-1 β und TNF- α über den cAMP-PKA-Signalweg in submukösen Atemwegsdrüsen (82).

Im Gegensatz zu dieser relativen Fülle von Studien zu den Auswirkungen inflammatorischer Mediatoren auf ENaC und CFTR in der Lunge ist über entsprechende Effekte auf den NKCC1-Transporter bislang wenig bekannt. Für diese Arbeit wurde die NKCC1-Phosphorylierung nach Stimulation durch LPS mit oder ohne den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , INF- γ , IL-1 β untersucht. Das Glykolipid LPS ist

eines der am meist erforschten Oberflächenmoleküle gram-negativer Bakterien und löst beim Absterben der Bakterien als Endotoxin toxische Reaktionen beim Wirt aus (205). Die Auswahl der Zytokine imitiert die Zusammensetzung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von ARDS Patienten (206). Überraschenderweise führte die Stimulation mit LPS und Zytokinen weder zu einer Änderung der NKCC1-Genexpression noch zu einer vermehrten NKCC1-Phosphorylierung. Die *in vitro* Detektion von Änderungen der mRNA und Proteinexpression ist von vielen Faktoren abhängig. Der Zelltyp, das Zeitfenster, die Auswahl des Stimulus sowie mögliche Kostimulationen zwischen den verschiedenen Zytokinen beeinflussen zusammen das Ergebnis. Vielleicht blieben die erwarteten Ergebnisse im *in vitro* Versuch dieser Arbeit aus, weil in der ARDS-Pathogenese der direkte Einfluss des Pathogens auf die Ionentransporter der alveolär-kapillären Barriere entscheidender ist als die ausgeschütteten Entzündungsmediatoren der Abwehrsysteme des Organismus. Dafür spräche, dass Lee und Kollegen (75) den Effekt, den die Ödemflüssigkeit eines akuten, Sepsis-induzierten Lungenschadens auf alveoläre Epithelzellen hatte, nicht durch die Inkubation der Zellen mit einzelnen Zytokinen replizieren konnten. So führten die Zytokine allein zu keinen Veränderungen der ENaC- und CFTR-Expression in AT II Zellen, die unter der Inkubation mit Ödemflüssigkeit aus dem akuten Lungenschaden jeweils signifikant verringert waren. Ein direkter Effekt von Pathogenen auf die Aktivität von Ionentransportern ist insbesondere bei Viren bekannt. J.D. Brand et al. (207) zeigten in murinem respiratorischen und alveolären Epithel, dass das Influenza A Virus die ENaC- und CFTR-Funktion herabsetzt und dass die Ionentransporter-Dysfunktion nur Zellen mit aktiver Infektion betrifft. Sie schlossen daraus, dass die Ionenkanalaktivität unabhängig von parakrinen und anderen exogenen Faktoren direkt durch das Influenza A Virus verringert wird. Vielleicht fehlte dem hier verwendeten *in vitro*-Versuch das Zusammenspiel zwischen Immunzellen, Pathogenen und Entzündungsmediatoren bzw. die tatsächliche Infektion mit einem Pathogen, um die Phosphorylierung als Stimulation des NKCC1-Transporters im Rahmen einer Wirtsreaktion hervorzurufen. Andererseits schließt auch die mangelnde Phosphorylierung von NKCC1 durch die verwendeten Zytokine eine Beteiligung des WNK-SPAK/OSR1-NKCC1-Signalweges beim Permeabilitätsödem nicht aus, da (siehe oben beim *in vitro* Modell des kardiogenen Lungenödems, 4.3) entweder der Ionentransport durch NKCC1 nicht zwingend der Phosphorylierung bedarf, oder bereits

eine basale NKCC1-Aktivierung besteht oder NKCC1 beim ARDS über Zytokin- und LPS-unabhängige Mechanismen aktiviert werden könnte.

Die Regulation des NKCC1-Transporters unter inflammatorischen Bedingungen ist komplex und wenig erforscht. Für die Regulation von NKCC1 durch inflammatorische Mediatoren sprechen Untersuchungen in einem Hamstermodell des Leptospirose-induzierten Lungenschaden, in denen eine erhöhte NKCC1-Expression und eine gleichzeitig verringerte α -ENaC Expression in den infizierten Lungen zu einer verschlechterten Flüssigkeitsregulation führte (85). Die Abnahme des apikalen Na^+ -Einstrom in die Epithelzellen und die Zunahme des basolateralen Na^+ -Einstrom aus dem Interstitium in die Epithelzellen verringerten gemeinsam den osmotischen Gradienten für die Na^+ Rückresorption und folglich die AFC in den mit Leptospirose infizierten Lungen (85). Diese Erkenntnis weist Parallelen zu der Pathogenese des kardiogenen Lungenödems auf, bei dem eine reduzierte ENaC-vermittelte Na^+ -Reabsorption den Transport von H_2O aus den Alveolen in das Interstitium verringert und damit auch den osmotischen Gradienten für die AFC reduziert (21).

Im zentralen und peripheren Nervensystem spielt NKCC1 eine bedeutende Rolle für die Einstellung der intrazellulären Chloridkonzentration ($[\text{Cl}^-]_i$) der Neurone (208). Die folgenden Beispiele zeigen, dass im Nervensystem exprimierte NKCC1-Transporter durch inflammatorische Signalwege in ihrer Aktivität beeinflusst werden können. Im peripheren Nervensystem ist NKCC1 für die hohe $[\text{Cl}^-]_i$ im Vergleich zu zentralen Neuronen verantwortlich (209). Ein Anstieg der $[\text{Cl}^-]_i$ bei sich regenerierenden sensorischen Neuronen beschleunigt deren Wachstumsrate in einem Modell des peripheren Nervenschadens (210). Pieraut und Kollegen (211) zeigten, dass nach peripherer Axotomie¹⁴ das Neuritenwachstum durch das proinflammatorische Interleukin 6 (IL-6) vermittelt wird. Eine autokrine¹⁵ neuronale IL-6-Schleife führt zu einer Zunahme der NKCC1-Phosphorylierung und nimmt durch neuronale Chloridakkumulation auf die Nervenreparatur Einfluss. Inflammatorisch stimuliertes NKCC1 ist durch seinen Einfluss auf die Cl^- -Homöostase daher für die neuronale Regeneration von Bedeutung. Im Gehirn reguliert NKCC1 im Rahmen der regulatorischen Volumenerhöhung (*regulatory volume increase*, RVI) bei extrazellulärer

¹⁴ iatrogene Durchtrennung eines Axons (Nervenzellfortsatz)

¹⁵ Sekretionsmodus, bei dem der sezernierte Faktor auf die sezernierende Zelle selbst wirkt

Hypertonizität oder geringer $[Cl]_i$; das Gleichgewicht des zellulären Volumens durch Erhöhung der intrazellulären K^+ - und Cl^- -Verhältnisse (212). Dass NKCC1 im Gehirn auch inflammatorisch stimuliert werden kann, zeigten Karimy und Kollegen (213) in einem Modell zur intraventrikulären Blutung, die am häufigsten sekundär bei hämorrhagischen Schlaganfällen entsteht. Als Ursache für den als Komplikation auftretenden post-hämorrhagischen Hydrozephalus wurde eine inflammatorisch bedingte Hypersekretion der zerebrospinalen Flüssigkeit (*cerebrospinal fluid*, CSF) aus dem Plexus choroideus detektiert. Dabei führt die intraventrikuläre Blutung über eine *Toll-like receptor 4* (TLR-4)- und NF- κ B-vermittelte inflammatorische Reaktion zu einer Bumetanid-sensitiven CSF-Hypersekretion. In der Tat aktiviert TLR-4 SPAK, welche anschließend NKCC1 in der apikalen Membran des Plexus choroideus Epithels bindet, phosphoryliert und stimuliert. Die beschriebene TLR4-SPAK-Stimulation mit CSF-Hypersekretion beim post-hämorrhagischen Hydrozephalus, die letztlich NKCC1 aktiviert, könnte analog auch in der Genese des ARDS eine Rolle spielen. Eine inflammatorische NKCC1-Stimulation durch Zytokine und Endotoxine könnte entsprechend die AFS im Lungenepithel induzieren und so ein Permeabilitätsödem verursachen bzw. verstärken. Leider existieren bisher keine Daten, ob und wenn ja durch welche proinflammatorischen Zytokine die NKCC1-Aktivität und -Expression im Lungenepithel beeinflusst wird.

Da neben den Lungenepithelzellen auch Endothelzellen eine hohe NKCC1-Expression aufweisen (97) und diese ein fester Bestandteil der Blut-Luft-Schranke sind, könnte der Kotransporter sowohl über den alveolären Flüssigkeitstransport als auch über den Zusammenhalt der endothelialen Barriere Einfluss auf die Genese des Permeabilitätsödems nehmen. Die inflammatorische Stimulation endothelialer Transporter wäre ein denkbarer Mechanismus, wie im akuten Lungenschaden die kapilläre Permeabilität verändert wird.

Lan et. al zeigten, dass die vaskuläre Hyperpermeabilität im Mausmodell des durch Ischämie-Reperfusion-induzierten Lungenschadens durch die Gabe von Bumetanid reduziert wird (214). Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Neutrophilen über die Dissoziation junktionaler Zellkontakte eine endotheliale Dysfunktion verursacht, die sich in einer parazellulären Hyperpermeabilität manifestiert (215). Die pharmakologische NKCC1-Hemmung im Ischämie-Reperfusions-Modell verminderte die Verweildauer der Neutrophilen (Sequestration) in den Lungenkapillaren und reduzierte außerdem die Protein- und Zytokinkonzentration in der BALF, die Aktivierung des NF κ B-Signalweges

und den Schweregrad (reduzierte *wet/dry ratios*) des akuten Lungenschadens (214). Auch in einem Modell des akuten Lungenschadens, in dem Mäuse mit *Klebsiella pneumoniae* infiziert wurden, war die für das ARDS typischerweise erhöhte vaskuläre Permeabilität nach genetischer Ausschaltung von NKCC1 in *Slc12a2*^{-/-}-Mäusen vermindert (84). Das *Klebsiella pneumoniae*-Modell zeigt, dass NKCC1 die Immunantwort beeinflussen kann, denn in *Slc12a2*^{-/-} Mauslungen war die Kolonisation mit *Klebsiella pneumoniae* massiv reduziert (84). Weiterhin schützte der KO des NKCC1 Transporters jene Mäuse nach einer pulmonalen Infektion durch *Klebsiella pneumoniae* vor hypothemer Sepsis und Bakteriämie (84). Die intratracheale LPS-Applikation ist eine häufig verwendete Methode, um einen inflammatorisch bedingten Lungenschaden zu induzieren (216). In *Slc12a2*^{-/-}-Mäusen waren die *wet/dry ratios* als Indikator zur Beurteilung einer Lungenödembildung nach LPS-Instillation signifikant reduziert (84). Bei C57BL/6J Mäusen war die LPS-induzierte Erhöhung der *wet/dry ratios* durch die intratracheale Applikation eines Bumetanid-Sprays zur pharmakologischen NKCC1-Hemmung ebenfalls reduziert (217). Die LPS-induzierte Neutrophileninfiltration und Zytokinproduktion in den Mauslungen war durch NKCC1-Inhibition mittels Bumetanid deutlich verringert (217). Hung und Kollegen (217) sehen für die inflammatorische Reaktion nach LPS-Gabe NKCC1-exprimierende Alveolarmakrophagen als verantwortlich, da aktivierte NKCC1-Transporter zu einer Zellschwellung der Alveolarmakrophagen führen und damit deren proinflammatorische Wirkung und Zytokinsekretion verstärken. Eine NKCC1-Inhibition beim akuten Lungenschaden hätte dementsprechend eine antiinflammatorische Wirkung und könnte nützlich sein, um das Ausmaß eines ARDS zu mildern.

Die Bildung des Permeabilitätsödems ist ein Zusammenspiel vieler Zellen u.a. aus dem Parenchym, verschiedenen Immunzellpopulationen und dem Endothel. Durch die ubiquitäre NKCC1-Expression wird ein eindimensionaler Erklärungsansatz mit Fokussierung auf nur einen Zelltypus - ob alveoläre Epithelzellen, Endothelzellen oder Alveolarmakrophagen – dem tatsächlichen multizellulären Geschehen im akuten Lungenschaden nicht gerecht. Dass NKCC1 einen entscheidenden Einfluss auf die alveolär-kapilläre Barriere hat, ist aus den diskutierten Arbeiten abzuleiten. Die Untersuchung der Auswirkungen von Inflammation auf alveoläre Transportprozesse, die endotheliale Barriere und die pulmonale Immunreaktion im Rahmen des ARDS bedarf

daher weiteren Untersuchungen, um dieses Krankheitsbild in Zukunft besser zu verstehen und vor allem auch besser behandeln zu können.

4.5 Limitationen

In der vorhergehenden Diskussion wurden bereits einzelne Punkte, die als limitierende Faktoren bezüglich des Aufbaus, der Durchführung oder der entstandenen Ergebnisse bei deren Interpretation berücksichtigt werden müssen, angesprochen.

Aufgrund der niedrigen Wurfrate der *Slc12a2*^{-/-}-Mäuse und dem damit einhergehenden geringen Anteil der KO-Mäuse an der Zucht beschränkten sich die IPL-Experimente auf den Vergleich heterozygoter *Slc12a2*^{+/-}-Mäuse mit korrespondierenden Wildtyp-Kontrollen. Durch die Wachstumsretardierung und damit kleinere Körpergröße der *Slc12a2*^{-/-}-Mäuse (2.1.1) war die Katheterisierung der Pulmonalarterie kaum möglich, ohne diese dabei zu verletzen.

Im Zellkulturmodell des kardiogenen Lungenödems könnte wie bereits diskutiert die alleinige ENaC-Inhibition ein ungeeigneter Ansatzpunkt für die NKCC1-Aktivierung gewesen sein. Da die NKCC1-Aktivität auch von der Funktion und Transportrichtung des CFTR-Transports abhängt und sowohl ENaC als auch CFTR durch NO-vermittelte Signalwege reguliert werden können, wäre auch eine direkte Änderung der NKCC1-Expression oder -Phosphorylierung durch Stickstoffmonoxid denkbar. Auch bei der zuletzt angesprochenen inflammatorisch-vermittelten NKCC1-Regulation *in vitro* könnte anstatt des isolierten LPS-Zytokin-Mix die BALF von ARDS-Patienten zur Stimulation genutzt werden, um eine Organismus-nähere Wirtsreaktion abzubilden. Wie zuvor ausführlich diskutiert wurde, widerspricht die Tatsache, dass Amilorid oder LPS/Cytomix den NKCC1-Kotransporter *in vitro* nicht phosphorylieren, nicht grundsätzlich einer Rolle von NKCC1 beim hydrostatischen oder Permeabilitätsödem. Die Regulation der Phosphorylierung und der Transportaktivität von NKCC1 sind nur komplexer, als wir es in unseren *in vitro*-Modellen abzubilden versuchten. Es reichte entsprechend nicht aus, einen einzelnen Ionentransporter als solitären Faktor beim alveolären Flüssigkeitstransport zu betrachten. Vermutlich interagieren verschiedene Transporter der alveolarkapillären Barriere funktionell über elektrochemische Gradienten und eventuell auch strukturell über Protein-Protein-Interaktionen miteinander. Hierzu wären insbesondere Untersuchungen zur NKCC1-Phosphorylierung in unseren IPL-Lungen

interessant. Eine solche Untersuchung wird aber leider dadurch erschwert, dass die diesbezüglich gefragten Alveolarepithelzellen nur einen kleinen Teil des Gesamtgewebes der Mauslungen ausmachen, den man im Western Blot bzw. bei der Phosphoproteomik-Analyse nicht separat identifizieren kann.

Weitere Limitationen können sich durch das verwendete Zellsystem ergeben. Die kultivierten Lungenepithelzellen der Linie A549 entsprechen morphologisch am ehesten AT II Zellen (168), die jedoch flächenmäßig nur 5 % der Alveolen auskleiden, während die flachen und platten AT I Zellen 95 % der Alveolarfläche bedecken (49). A549 Zellen sind eine Karzinomlinie und dadurch als initiales Screeningtool für das Alveolarepithel nützlich, da sie über mehrere Subkulturen hinweg einen stabilen Phänotyp haben, einfach zu kultivieren, reproduzierbar und relativ unlimitiert verfügbar sind (218, 219). Sie weisen zwar einige Eigenschaften von AT II Zellen auf, aber A549 Zellen können zum Beispiel keine Barriere bilden (220). Da die Karzinomzellen nicht alle Eigenschaften von AT II Zellen abbilden, können sie den physiologischen Zustand des Alveolarepithels *in vivo* natürlich nicht vollständig reproduzieren (219, 221, 222). Ursprünglich ging man davon aus, dass der Ionentransport hauptsächlich über AT II Zellen stattfindet. Mittlerweile weiß man aber, dass auch AT I Zellen durch ihre Expression von Transportproteinen einen signifikanten Beitrag zur Flüssigkeitsbalance und der Auflösung von Ödemen im Alveolarraum leisten (51). Fraglich ist, ob Experimente an hAELVi (*human Alveolar Epithelial Lentivirus immortalized*) Zellen, welche Typ-1-ähnliche Eigenschaften aufweisen und auch die essenziellen Eigenschaften der Luft-Blut-Barriere reflektieren (220), zu den gleichen Ergebnissen führen würden wie mit A549 Zellen. Allerdings würde die Physiologie der alveolären Transport- und Regulationsmechanismen am besten durch den Einsatz von Primärzellen mit einer Kokultur aus AT I und AT II wiedergespiegelt werden. Ebenfalls zu bedenken ist, dass unser Modell lediglich die isolierten Regulationsmechanismen innerhalb der Epithelzellen aufgreift und nicht die wichtige Kommunikation zwischen Lungenepithelzellen und Endothelzellen (bzw. anderen parenchymatösen oder inflammatorischen Zellen) abbilden kann. Die Verwendung von Transwell® Zellkultureinsätzen würde für alveoläre Lungenepithelzellen im *air liquid interface* mit einem hohen basolateralen Flüssigkeitsspiegel und einem dünnen apikalen Flüssigkeitsfilm eine Umgebung schaffen, die dem *in vivo*-Zustand sehr nahekäme und in Kombination mit

mikrovaskulären Endothelzellen als Kokultur-System die Luft-Blut-Schranke *in vitro* gut nachzubilden vermag (223).

Da weder Amilorid noch Cytomix/LPS zu einem Anstieg der NKCC1-Phosphorylierung in den Lungenepithelzellen der Karzinomlinie A549 führten, sollte in der vorliegenden Arbeit durch direkte Stimulation oder Inhibition der übergeordneten WNK1-Kinase während einer einstündigen Inkubation der A549-Zellen mit jeweils einzeln 10 μ M Temozolomid (TMZ) und WNK463 überprüft werden, ob der WNK-SPAK/OSR1-Signalweg in der verwendeten Zellkultur NKCC1 phosphorylieren kann. WNK463 inhibiert WNK1 und hemmt damit ihre nachgeschalteten Signalwege. Das alkylierende Zytostatikum TMZ aktiviert hingegen den WNK1/OSR1/NKCC1-Signalweg (224). Weil die Aufnahme von repräsentativen Immunoblots des phospho-NKCC1 auch nach wiederholten Versuchen nicht möglich war, zeigen die Ergebnisse der Western Blot Analysen des entsprechenden Experimentes ausschließlich eine Quantifizierung des T-NKCC1 in Relation zu β -Aktin Kontrolle und wurden daher nicht in diese Arbeit mitaufgenommen. Auch hier sind entsprechende Limitationen wie unter anderen die Auswahl der Zelllinie oder die Dauer der Inkubation mit TMZ bzw. WNK463 zu nennen. Mögliche Veränderungen in der Aktivität des Kotransporters über den beschriebenen Signalweg können nur durch die Relativierung der Proteinexpression des p-NKCC1 zu T-NKCC1 abgebildet werden, da die T-NKCC1 Proteinexpression allein durch TMZ und WNK463 nicht beeinflusst wird. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich daher noch keine Aussage darüber treffen, ob TMZ über WNK1 zu einer NKCC1-Aktivierung durch Phosphorylierung in A549 Zellen führt bzw. die WNK1-Inhibition mittels WNK463 eine Phosphorylierung des Transporters in der Lunge unterbindet. Die Erforschung des WNK1-SPAK/OSR1-NKCC1-Signalwegs sollte auf das Lungenepithel ausgeweitet werden und seinen potenziellen Beitrag am alveolären Ionentransport untersuchen.

5 Fazit und Ausblick

Für die Entstehung des kardiogenen Lungenödems durch akutes Linksherzversagen ist der Kotransporter NKCC1 von entscheidender Bedeutung. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass hydrostatischer Stress die protektive AFC in eine Ödem-verstärkende AFS umwandelt. Letztere wird durch einen von basolateral nach apikal gerichteten Osmogradienten angetrieben, der wahrscheinlich durch aktivierte NKCC1-Transporter auf der basolateralen Seite und apikale CFTR-Transporter aufgebaut wird. Der parallele Ansatz aus einem pharmakologischen Inhibitor und einem genetischen NKCC1-KO-Modell ist hier besonders robust, da er nicht-spezifische Effekte nahezu komplett ausschließt. Dass in isoliert perfundierten Mauslungen bei erhöhtem P_{LA} sowohl der heterozygote NKCC1-Verlust als auch die NKCC1-Inhibition mit Furosemid die *wet/dry ratios* signifikant zu reduzieren vermochte, beweist die funktionelle Rolle von NKCC1 bei der Entstehung des kardiogenen Lungenödems. WNK1, die als Cl⁻-Sensor und Osmoregulator fungiert, phosphoryliert und aktiviert über ihre nachgeschalteten Kinasen SPAK und OSR1 den NKCC1-Kotransporter sowie auch KCC1 und andere Mitglieder der CCCs. Bei *Wnk1*^{+/-}-Mauslungen kam es bei erhöhtem hydrostatischen Druck zu keiner signifikanten Ödembildung. Die Unterschiede der *wet/dry ratios* zwischen *Slc12a2*^{+/-} und *Wnk1*^{+/-} könnten am ehesten auf der WNK-SPAK/OSR1-Signalkaskade beruhen, durch die nicht nur NKCC1 sondern auch andere Mitglieder der CCC-Familie reguliert werden. Die Ergebnisse heben die klinisch bedeutende Rolle von NKCC1 als extrarenalen Angriffspunkt von Schleifendiuretika in der Therapie des kardiogenen Lungenödems hervor und bringen mit WNK1 ein neues pharmakologisches *Target* zur Ödemprävention bzw. -behandlung in die Diskussion ein. Molekularbiologisch ist in Zukunft die Regulation von NKCC1 durch WNK1 und hydrostatischen Stress im Alveolarepithel nachzuweisen, um die funktionellen Ergebnisse aus den IPL-Experimenten auch vertieft auf ihrer mechanistischen Ebene untersuchen zu können.

Da sich die vorliegende Arbeit vor allem auf das kardiogene Lungenödem bezieht, sollten die IPL-Experimente an *Slc12a2*^{+/-}-Mäusen künftig auch auf entsprechende Untersuchungen in einem präklinischen ARDS-Modell ausgeweitet werden, um mögliche Änderungen der *wet/dry ratios* z.B. im LPS-induzierten akuten Lungenschaden in Abhängigkeit von NKCC1 zu untersuchen. Da es bislang kaum Studien zur Regulation

von NKCC1 durch Zytokine im Alveolarepithel gibt, sollten die bereits durchgeführten Experimente nach Optimierung des Versuchsaufbaus, bezogen auf die Zelllinie, die proinflammatorischen Stimuli und das untersuchte Zeitfenster, wiederholt werden. Außerdem scheint sich der WNK-SPAK/OSR1-Signalweg mit seiner Ubiquität und Regulation zahlreicher Ionenkanäle und Transporter mehr und mehr zu einem zentralen Dreh- und Angelpunkt der epithelialen und endothelialen Homöostase zu entwickeln. Aufgrund unserer Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass WNK1 relevant für eine hydrostatische Lungenödembildung ist. Ob eine WNK1-induzierte NKCC1-Aktivierung auch im inflammatorischen Permeabilitätsödem relevant sein könnte, ist bisher nicht erforscht. Untersuchungen zur Funktion der WNK-SPAK/OSR1-Signalkaskade in der gesunden oder erkrankten Lunge sind bislang kaum vorliegend und könnten zur Entwicklung neuer vielversprechender Therapieansätze in der Behandlung des kardiogenen und Permeabilitätsödems beitragen.

6 Literaturverzeichnis

1. Sureka B, Bansal K, Arora A. Pulmonary edema - cardiogenic or noncardiogenic? *J Family Med Prim Care*. 2015;4(2):290.
2. Platz E, Jhund PS, Campbell RT, McMurray JJ. Assessment and prevalence of pulmonary oedema in contemporary acute heart failure trials: a systematic review. *Eur J Heart Fail*. 2015;17(9):906-16.
3. King KC GS. Congestive Heart Failure And Pulmonary Edema. In: StatPearls, editor. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.
4. Cook C, Cole G, Asaria P, Jabbour R, Francis DP. The annual global economic burden of heart failure. *Int J Cardiol*. 2014;171(3):368-76.
5. Dharmarajan K, Rich MW. Epidemiology, Pathophysiology, and Prognosis of Heart Failure in Older Adults. *Heart Fail Clin*. 2017;13(3):417-26.
6. Joffe SW, Webster K, McManus DD, Kiernan MS, Lessard D, Yarzebski J, Darling C, Gore JM, Goldberg RJ. Improved survival after heart failure: a community-based perspective. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(3):e000053.
7. Clark SB, Soos MP. Noncardiogenic Pulmonary Edema. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2019.
8. Torres Acosta MA, Singer BD. Pathogenesis of COVID-19-induced ARDS: implications for an ageing population. *Eur Respir J*. 2020;56(3).
9. Gibson PG, Qin L, Puah SH. COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS. *Med J Aust*. 2020;213(2):54-6.e1.
10. Rezoagli E, Fumagalli R, Bellani G. Definition and epidemiology of acute respiratory distress syndrome. *Ann Transl Med*. 2017;5(14):282.
11. HELLEMS HK, HAYNES FW, DEXTER L. Pulmonary capillary pressure in man. *J Appl Physiol*. 1949;2(1):24-9.
12. Ware LB, Matthay MA. Clinical practice. Acute pulmonary edema. *N Engl J Med*. 2005;353(26):2788-96.
13. Murray JF. Pulmonary edema: pathophysiology and diagnosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15(2):155-60, i.
14. Mewis C, Riessen R, Spyridopoulos I. 3.4 Herzinsuffizienz. 2006. In: *Kardiologie compact* [Internet]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 2., unveränderte Auflage. Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/lookinside/10.1055/b-0034-24167>.
15. Diamond M, Peniston Feliciano HL, Sanghavi D, Mahapatra S. Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.

16. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS, Force ADT. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012;307(23):2526-33.
17. Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, Hull W, Whitsett JA, Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson LD, Martin TR. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(6):1843-50.
18. Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(1):218-33.
19. Tomashefski JF, Jr. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med*. 2000;21(3):435-66.
20. Weidenfeld S, Kuebler WM. Cytokine-Regulation of Na. *Front Immunol*. 2017;8:393.
21. Solymosi EA, Kaestle-Gembardt SM, Vadász I, Wang L, Neye N, Chupin CJ, Rozowsky S, Ruehl R, Tabuchi A, Schulz H, Kapus A, Morty RE, Kuebler WM. Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(25):E2308-16.
22. Kaestle SM, Reich CA, Yin N, Habazettl H, Weimann J, Kuebler WM. Nitric oxide-dependent inhibition of alveolar fluid clearance in hydrostatic lung edema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(4):L859-69.
23. Raghavendran K, Nemzek J, Napolitano LM, Knight PR. Aspiration-induced lung injury. *Crit Care Med*. 2011;39(4):818-26.
24. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola VP, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P, Group ESD. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2016;37(27):2129-200.
25. Purvey M, Allen G. Managing acute pulmonary oedema. *Aust Prescr*. 2017;40(2):59-63.
26. Graefe KH. Diuretika. In: Bönisch H, editor. *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie*. 2., vollständig überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2016.
27. Mullens W, Damman K, Harjola VP, Mebazaa A, Brunner-La Rocca HP, Martens P, Testani JM, Tang WHW, Orso F, Rossignol P, Metra M, Filippatos G, Seferovic PM, Ruschitzka F, Coats AJ. The use of diuretics in heart failure with congestion - a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail*. 2019;21(2):137-55.

28. Matsue Y, Damman K, Voors AA, Kagiya N, Yamaguchi T, Kuroda S, Okumura T, Kida K, Mizuno A, Oishi S, Inuzuka Y, Akiyama E, Matsukawa R, Kato K, Suzuki S, Naruke T, Yoshioka K, Miyoshi T, Baba Y, Yamamoto M, Murai K, Mizutani K, Yoshida K, Kitai T. Time-to-Furosemide Treatment and Mortality in Patients Hospitalized With Acute Heart Failure. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(25):3042-51.
29. Faris R, Flather M, Purcell H, Henein M, Poole-Wilson P, Coats A. Current evidence supporting the role of diuretics in heart failure: a meta analysis of randomised controlled trials. *Int J Cardiol.* 2002;82(2):149-58.
30. Faris RF, Flather M, Purcell H, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Diuretics for heart failure. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012(2):CD003838.
31. Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, Hudson LD. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1985;132(3):485-9.
32. Frutos-Vivar F, Nin N, Esteban A. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care.* 2004;10(1):1-6.
33. Gattinoni L, Vagginelli F, Carlesso E, Taccone P, Conte V, Chiumello D, Valenza F, Caironi P, Pesenti A. Decrease in PaCO₂ with prone position is predictive of improved outcome in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2003;31(12):2727-33.
34. Fichtner F, Moerer O, Laudi S, Weber-Carstens S, Nothacker M, Kaisers U. Mechanical Ventilation and Extracorporeal Membrane Oxygenation in Acute Respiratory Insufficiency. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115(50):840-7.
35. al. Ae. S3-Leitlinie: Invasive Beatmung und Einsatz extrakorporaler Verfahren bei akuter respiratorischer Insuffizienz: Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGA); 2017 [Available from: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/001-021.html>].
36. Zhang LN, Sun JP, Xue XY, Wang JX. Exogenous pulmonary surfactant for acute respiratory distress syndrome in adults: A systematic review and meta-analysis. *Exp Ther Med.* 2013;5(1):237-42.
37. Gao Smith F, Perkins GD, Gates S, Young D, McAuley DF, Tunnicliffe W, Khan Z, Lamb SE, investigators B-s. Effect of intravenous β -2 agonist treatment on clinical outcomes in acute respiratory distress syndrome (BALTI-2): a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet.* 2012;379(9812):229-35.
38. Truwit JD, Bernard GR, Steingrub J, Matthay MA, Liu KD, Albertson TE, Brower RG, Shanholtz C, Rock P, Douglas IS, deBoisblanc BP, Hough CL, Hite RD, Thompson BT, National Heart Ln, and Blood Institute ARDS Clinical Trials Network. Rosuvastatin for sepsis-associated acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2014;370(23):2191-200.
39. Groshaus HE, Manocha S, Walley KR, Russell JA. Mechanisms of beta-receptor stimulation-induced improvement of acute lung injury and pulmonary edema. *Crit Care.* 2004;8(4):234-42.

40. Perkins GD, McAuley DF, Thickett DR, Gao F. The beta-agonist lung injury trial (BALTI): a randomized placebo-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(3):281-7.
41. Gates S, Perkins GD, Lamb SE, Kelly C, Thickett DR, Young JD, McAuley DF, Snaith C, McCabe C, Hulme CT, Gao Smith F. Beta-Agonist Lung injury Trial-2 (BALTI-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial and economic evaluation of intravenous infusion of salbutamol versus placebo in patients with acute respiratory distress syndrome. *Health Technol Assess.* 2013;17(38):v-vi, 1-87.
42. Matthay MA, Brower RG, Carson S, Douglas IS, Eisner M, Hite D, Holets S, Kallet RH, Liu KD, MacIntyre N, Moss M, Schoenfeld D, Steingrub J, Thompson BT. Randomized, placebo-controlled clinical trial of an aerosolized β_2 -agonist for treatment of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(5):561-8.
43. Grommes J, Vijayan S, Drechsler M, Hartwig H, Mörgelin M, Dembinski R, Jacobs M, Koeppel TA, Binnebösel M, Weber C, Soehnlein O. Simvastatin reduces endotoxin-induced acute lung injury by decreasing neutrophil recruitment and radical formation. *PLoS One.* 2012;7(6):e38917.
44. Craig TR, Duffy MJ, Shyamsundar M, McDowell C, O'Kane CM, Elborn JS, McAuley DF. A randomized clinical trial of hydroxymethylglutaryl- coenzyme a reductase inhibition for acute lung injury (The HARP Study). *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(5):620-6.
45. McAuley DF, Laffey JG, O'Kane CM, Perkins GD, Mullan B, Trinder TJ, Johnston P, Hopkins PA, Johnston AJ, Murphy L, McNally C, Agus AM, McDowell C, Jackson C. Simvastatin to reduce pulmonary dysfunction in patients with acute respiratory distress syndrome: the HARP-2 RCT. 2018.
46. Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, Richter J, Gundersen HJ. The number of alveoli in the human lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169(1):120-4.
47. LOW FN. The pulmonary alveolar epithelium of laboratory mammals and man. *Anat Rec.* 1953;117(2):241-63.
48. Maina JN, West JB. Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood-gas barrier. *Physiol Rev.* 2005;85(3):811-44.
49. Stone KC, Mercer RR, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992;6(2):235-43.
50. Goerke J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1408(2-3):79-89.
51. Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L, Barbry P, Dobbs LG. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(4):1966-71.

52. Johnson MD. Ion transport in alveolar type I cells. *Mol Biosyst.* 2007;3(3):178-86.
53. Ridge KM, Olivera WG, Saldias F, Azzam Z, Horowitz S, Rutschman DH, Dumasius V, Factor P, Sznajder JI. Alveolar type 1 cells express the alpha2 Na,K-ATPase, which contributes to lung liquid clearance. *Circ Res.* 2003;92(4):453-60.
54. Mason RJ, Dobbs LG. Alveolar Epithelium and Pulmonary Surfactant. In: V. Courtney Broaddus RJM, Joel D. Ernst, Talmadge E. King, Stephen C. Lazarus, John F. Murray, Jay A. Nadel, Arthur S. Slutsky, Michael B. Gotway,, editor. *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine.* 1. 6 ed: W.B. Saunders; 2016. p. 134-49.e5.
55. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol.* 2015;16(1):27-35.
56. Fronius M, Clauss WG, Althaus M. Why Do We have to Move Fluid to be Able to Breathe? *Front Physiol.* 2012;3:146.
57. Hollenhorst MI, Richter K, Fronius M. Ion transport by pulmonary epithelia. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:174306.
58. Mutlu GM, Sznajder JI. Mechanisms of pulmonary edema clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289(5):L685-95.
59. Sakuma T, Okaniwa G, Nakada T, Nishimura T, Fujimura S, Matthay MA. Alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150(2):305-10.
60. Trac PT, Thai TL, Linck V, Zou L, Greenlee M, Yue Q, Al-Khalili O, Alli AA, Eaton AF, Eaton DC. Alveolar nonselective channels are ASIC1a/ α -ENaC channels and contribute to AFC. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017;312(6):L797-l811.
61. Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev.* 2002;82(3):569-600.
62. Basset G, Crone C, Saumon G. Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium. *J Physiol.* 1987;384:325-45.
63. de Prost N, Saumon G. Glucose transport in the lung and its role in liquid movement. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;159(3):331-7.
64. Brown SE, Kim KJ, Goodman BE, Wells JR, Crandall ED. Sodium-amino acid cotransport by type II alveolar epithelial cells. *J Appl Physiol* (1985). 1985;59(5):1616-22.
65. Wittekindt OH, Dietl P. Aquaporins in the lung. *Pflugers Arch.* 2019;471(4):519-32.
66. Collawn JF, Matalon S. The role of CFTR in transepithelial liquid transport in pig alveolar epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;303(6):L489-91.

67. Fang X, Song Y, Hirsch J, Galiotta LJ, Pedemonte N, Zemans RL, Dolganov G, Verkman AS, Matthay MA. Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(2):L242-9.
68. Folkesson HG, Matthay MA. Alveolar epithelial ion and fluid transport: recent progress. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35(1):10-9.
69. Kuebler WM, Uhlig U, Goldmann T, Schael G, Kerem A, Exner K, Martin C, Vollmer E, Uhlig S. Stretch activates nitric oxide production in pulmonary vascular endothelial cells in situ. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(11):1391-8.
70. Lazrak A, Samanta A, Matalon S. Biophysical properties and molecular characterization of amiloride-sensitive sodium channels in A549 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;278(4):L848-57.
71. Jain L, Chen XJ, Brown LA, Eaton DC. Nitric oxide inhibits lung sodium transport through a cGMP-mediated inhibition of epithelial cation channels. *Am J Physiol*. 1998;274(4):L475-84.
72. Althaus M, Pichl A, Clauss WG, Seeger W, Fronius M, Morty RE. Nitric oxide inhibits highly selective sodium channels and the Na⁺/K⁺-ATPase in H441 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(1):53-65.
73. Hardiman KM, McNicholas-Bevensee CM, Fortenberry J, Myles CT, Malik B, Eaton DC, Matalon S. Regulation of amiloride-sensitive Na⁽⁺⁾ transport by basal nitric oxide. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;30(5):720-8.
74. Riordan JR. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:701-18.
75. Lee JW, Fang X, Dolganov G, Fremont RD, Bastarache JA, Ware LB, Matthay MA. Acute lung injury edema fluid decreases net fluid transport across human alveolar epithelial type II cells. *J Biol Chem*. 2007;282(33):24109-19.
76. Kryvenko V, Vadász I. Molecular mechanisms of Na,K-ATPase dysregulation driving alveolar epithelial barrier failure in severe COVID-19. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2021;320(6):L1186-L93.
77. Ahmad S, Matalon S, Kuebler WM. Understanding COVID-19 susceptibility and presentation based on its underlying physiology. *Physiol Rev*. 2022;102(4):1579-85.
78. Lazrak A, Iles KE, Liu G, Noah DL, Noah JW, Matalon S. Influenza virus M2 protein inhibits epithelial sodium channels by increasing reactive oxygen species. *FASEB J*. 2009;23(11):3829-42.
79. Kunzelmann K, Beesley AH, King NJ, Karupiah G, Young JA, Cook DI. Influenza virus inhibits amiloride-sensitive Na⁺ channels in respiratory epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(18):10282-7.
80. Wong JJM, Leong JY, Lee JH, Albani S, Yeo JG. Insights into the immunopathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Ann Transl Med*. 2019;7(19):504.

81. Morty RE, Eickelberg O, Seeger W. Alveolar fluid clearance in acute lung injury: what have we learned from animal models and clinical studies? *Intensive Care Med.* 2007;33(7):1229-40.
82. Baniak N, Luan X, Grunow A, Machen TE, Ianowski JP. The cytokines interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate CFTR-mediated fluid secretion by swine airway submucosal glands. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;303(4):L327-33.
83. Shamsuddin AK, Quinton PM. Surface fluid absorption and secretion in small airways. *J Physiol.* 2012;590(15):3561-74.
84. Nguyen M, Pace AJ, Koller BH. Mice lacking NKCC1 are protected from development of bacteremia and hypothermic sepsis secondary to bacterial pneumonia. *J Exp Med.* 2007;204(6):1383-93.
85. Andrade L, Rodrigues AC, Jr., Sanches TR, Souza RB, Seguro AC. Leptospirosis leads to dysregulation of sodium transporters in the kidney and lung. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(2):F586-92.
86. Nezu A, Parvin MN, Turner RJ. A conserved hydrophobic tetrad near the C terminus of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) is required for its correct intracellular processing. *J Biol Chem.* 2009;284(11):6869-76.
87. Paredes A, Plata C, Rivera M, Moreno E, Vázquez N, Muñoz-Clares R, Hebert SC, Gamba G. Activity of the renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter is reduced by mutagenesis of N-glycosylation sites: role for protein surface charge in Cl⁻ transport. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290(5):F1094-102.
88. Markadieu N, Delpire E. Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters. *Pflugers Arch.* 2014;466(1):91-105.
89. Russell JM. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev.* 2000;80(1):211-76.
90. Parvin MN, Turner RJ. Identification of Key Residues Involved in the Dimerization of the Secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter NKCC1. *Biochemistry.* 2011;50(45):9857-64.
91. Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y, Gouaux E. Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature.* 2005;437(7056):215-23.
92. Moore-Hoon ML, Turner RJ. The structural unit of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) is a homodimer. *Biochemistry.* 2000;39(13):3718-24.
93. Hartmann AM, Nothwang HG. Molecular and evolutionary insights into the structural organization of cation chloride cotransporters. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:470.
94. Chew TA, Orlando BJ, Zhang J, Latorraca NR, Wang A, Hollingsworth SA, Chen DH, Dror RO, Liao M, Feng L. Structure and mechanism of the cation-chloride cotransporter NKCC1. *Nature.* 2019;572(7770):488-92.
95. Haas M, Forbush B. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:515-34.

96. de Los Heros P, Pacheco-Alvarez D, Gamba G. Role of WNK Kinases in the Modulation of Cell Volume. *Curr Top Membr.* 2018;81:207-35.
97. Haas M. Properties and diversity of (Na-K-Cl) cotransporters. *Annu Rev Physiol.* 1989;51:443-57.
98. Zdebik AA, Wangemann P, Jentsch TJ. Potassium ion movement in the inner ear: insights from genetic disease and mouse models. *Physiology (Bethesda).* 2009;24:307-16.
99. Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T. Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet.* 1999;22(2):192-5.
100. Dixon MJ, Gazzard J, Chaudhry SS, Sampson N, Schulte BA, Steel KP. Mutation of the Na-K-Cl co-transporter gene *Slc12a2* results in deafness in mice. *Hum Mol Genet.* 1999;8(8):1579-84.
101. Ikeda K, Oshima T, Hidaka H, Takasaka T. Molecular and clinical implications of loop diuretic ototoxicity. *Hear Res.* 1997;107(1-2):1-8.
102. Rybak LP. Ototoxicity of loop diuretics. *Otolaryngol Clin North Am.* 1993;26(5):829-44.
103. O'Neill WC, Steinberg DF. Functional coupling of Na(+)-K(+)-2Cl- cotransport and Ca(2+)-dependent K+ channels in vascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 1995;269(1 Pt 1):C267-74.
104. Akar F, Skinner E, Klein JD, Jena M, Paul RJ, O'Neill WC. Vasoconstrictors and nitrovasodilators reciprocally regulate the Na+-K+-2Cl- cotransporter in rat aorta. *Am J Physiol.* 1999;276(6):C1383-90.
105. Akar F, Jiang G, Paul RJ, O'Neill WC. Contractile regulation of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281(2):C579-84.
106. Flagella M, Clarke LL, Miller ML, Erway LC, Giannella RA, Andringa A, Gawenis LR, Kramer J, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, Yamoah EN, Cardell EL, Shull GE. Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *J Biol Chem.* 1999;274(38):26946-55.
107. Jiang G, Akar F, Cobbs SL, Lomashvilli K, Lakkis R, Gordon FJ, Sutliff RL, O'Neill WC. Blood pressure regulates the activity and function of the Na-K-2Cl cotransporter in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(4):H1552-7.
108. Lee HA, Baek I, Seok YM, Yang E, Cho HM, Lee DY, Hong SH, Kim IK. Promoter hypomethylation upregulates Na+-K+-2Cl- cotransporter 1 in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396(2):252-7.
109. Cho HM, Lee HA, Kim HY, Han HS, Kim IK. Expression of Na+-K+ -2Cl- cotransporter 1 is epigenetically regulated during postnatal development of hypertension. *Am J Hypertens.* 2011;24(12):1286-93.

110. Evans RL, Park K, Turner RJ, Watson GE, Nguyen HV, Dennett MR, Hand AR, Flagella M, Shull GE, Melvin JE. Severe impairment of salivation in Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC1)-deficient mice. *J Biol Chem.* 2000;275(35):26720-6.
111. Grubb BR, Pace AJ, Lee E, Koller BH, Boucher RC. Alterations in airway ion transport in NKCC1-deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;281(2):C615-23.
112. Sung KW, Kirby M, McDonald MP, Lovinger DM, Delpire E. Abnormal GABAA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *J Neurosci.* 2000;20(20):7531-8.
113. Alvarez-Leefmans FJ, Gamiño SM, Giraldez F, Noguerón I. Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. *J Physiol.* 1988;406:225-46.
114. Willis WD, Jr. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res.* 1999;124(4):395-421.
115. Payne JA, Forbush B. Molecular characterization of the epithelial Na-K-Cl cotransporter isoforms. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7(4):493-503.
116. Ares GR, Caceres PS, Ortiz PA. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;301(6):F1143-59.
117. Bennett CM, Brenner BM, Berliner RW. Micropuncture study of nephron function in the rhesus monkey. *J Clin Invest.* 1968;47(1):203-16.
118. Kaplan MR, Plotkin MD, Lee WS, Xu ZC, Lytton J, Hebert SC. Apical localization of the Na-K-Cl cotransporter, rBSC1, on rat thick ascending limbs. *Kidney Int.* 1996;49(1):40-7.
119. Calò LA. Vascular tone control in humans: insights from studies in Bartter's/Gitelman's syndromes. *Kidney Int.* 2006;69(6):963-6.
120. Kleta R, Bockenhauer D. Bartter syndromes and other salt-losing tubulopathies. *Nephron Physiol.* 2006;104(2):p73-80.
121. Savardi A, Borgogno M, Narducci R, La Sala G, Ortega JA, Summa M, Armirotti A, Bertorelli R, Contestabile A, De Vivo M, Cancedda L. Discovery of a Small Molecule Drug Candidate for Selective NKCC1 Inhibition in Brain Disorders. *Chem.* 2020;6(8):2073-96.
122. Kharod SC, Kang SK, Kadam SD. Off-Label Use of Bumetanide for Brain Disorders: An Overview. *Front Neurosci.* 2019;13:310.
123. Lykke K, Töllner K, Feit PW, Erker T, MacAulay N, Löscher W. The search for NKCC1-selective drugs for the treatment of epilepsy: Structure-function relationship of bumetanide and various bumetanide derivatives in inhibiting the human cation-chloride cotransporter NKCC1A. *Epilepsy Behav.* 2016;59:42-9.
124. Koumangoye R, Bastarache L, Delpire E. NKCC1: Newly Found as a Human Disease-Causing Ion Transporter. *Function (Oxf).* 2021;2(1):zqaa028.

125. Randall J, Thorne T, Delpire E. Partial cloning and characterization of Slc12a2: the gene encoding the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol.* 1997;273(4):C1267-77.
126. Dietz KJ, Vogel MO, Viehhauser A. AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma.* 2010;245(1-4):3-14.
127. Pellikainen JM, Kosma VM. Activator protein-2 in carcinogenesis with a special reference to breast cancer--a mini review. *Int J Cancer.* 2007;120(10):2061-7.
128. Ibla JC, Houry J, Kong T, Robinson A, Colgan SP. Transcriptional repression of Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 by hypoxia-inducible factor-1. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291(2):C282-9.
129. Flatman PW. Regulation of Na-K-2Cl cotransport by phosphorylation and protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1566(1-2):140-51.
130. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev.* 2009;89(1):193-277.
131. Breitwieser GE, Altamirano AA, Russell JM. Osmotic stimulation of Na(+)-K(+)-Cl⁻ cotransport in squid giant axon is [Cl⁻]_i dependent. *Am J Physiol.* 1990;258(4 Pt 1):C749-53.
132. Lytle C, Forbush B. The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation. *J Biol Chem.* 1992;267(35):25438-43.
133. Isenring P, Forbush B. Ion and bumetanide binding by the Na-K-Cl cotransporter. Importance of transmembrane domains. *J Biol Chem.* 1997;272(39):24556-62.
134. Darman RB, Forbush B. A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37542-50.
135. Flemmer AW, Gimenez I, Dowd BF, Darman RB, Forbush B. Activation of the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37551-8.
136. Lytle C. Activation of the avian erythrocyte Na-K-Cl cotransport protein by cell shrinkage, cAMP, fluoride, and calyculin-A involves phosphorylation at common sites. *J Biol Chem.* 1997;272(24):15069-77.
137. Altamirano AA, Breitwieser GE, Russell JM. Vanadate and fluoride effects on Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport in squid giant axon. *Am J Physiol.* 1988;254(4 Pt 1):C582-6.
138. Piechotta K, Lu J, Delpire E. Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *J Biol Chem.* 2002;277(52):50812-9.
139. Dowd BF, Forbush B. PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J Biol Chem.* 2003;278(30):27347-53.

140. Tanimura A, Kurihara K, Reshkin SJ, Turner RJ. Involvement of direct phosphorylation in the regulation of the rat parotid Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransporter. *J Biol Chem.* 1995;270(42):25252-8.
141. Haas M, McBrayer D, Lytle C. [Cl⁻]_i-dependent phosphorylation of the Na-K-Cl cotransport protein of dog tracheal epithelial cells. *J Biol Chem.* 1995;270(48):28955-61.
142. Rodan AR, Jenny A. WNK Kinases in Development and Disease. *Curr Top Dev Biol.* 2017;123:1-47.
143. Richardson C, Alessi DR. The regulation of salt transport and blood pressure by the WNK-SPAK/OSR1 signalling pathway. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 20):3293-304.
144. Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH. WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem.* 2000;275(22):16795-801.
145. 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.
146. Dbouk HA, Weil LM, Perera GK, Dellinger MT, Pearson G, Brekken RA, Cobb MH. Actions of the protein kinase WNK1 on endothelial cells are differentially mediated by its substrate kinases OSR1 and SPAK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(45):15999-6004.
147. Kahle KT, Rinehart J, Ring A, Gimenez I, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP. WNK protein kinases modulate cellular Cl⁻ flux by altering the phosphorylation state of the Na-K-Cl and K-Cl cotransporters. *Physiology (Bethesda).* 2006;21:326-35.
148. Gagnon KB, England R, Delpire E. Characterization of SPAK and OSR1, regulatory kinases of the Na-K-2Cl cotransporter. *Mol Cell Biol.* 2006;26(2):689-98.
149. Lin SH, Yu IS, Jiang ST, Lin SW, Chu P, Chen A, Sytwu HK, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Yang SS. Impaired phosphorylation of Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter by oxidative stress-responsive kinase-1 deficiency manifests hypotension and Bartter-like syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(42):17538-43.
150. Algharabil J, Kintner DB, Wang Q, Begum G, Clark PA, Yang SS, Lin SH, Kahle KT, Kuo JS, Sun D. Inhibition of Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter isoform 1 accelerates temozolomide-mediated apoptosis in glioblastoma cancer cells. *Cell Physiol Biochem.* 2012;30(1):33-48.
151. Filippi BM, de los Heros P, Mehellou Y, Navratilova I, Gourlay R, Deak M, Plater L, Toth R, Zeqiraj E, Alessi DR. MO25 is a master regulator of SPAK/OSR1 and MST3/MST4/YSK1 protein kinases. *Embo j.* 2011;30(9):1730-41.

152. Ponce-Coria J, Markadiou N, Austin TM, Flammang L, Rios K, Welling PA, Delpire E. A novel Ste20-related proline/alanine-rich kinase (SPAK)-independent pathway involving calcium-binding protein 39 (Cab39) and serine threonine kinase with no lysine member 4 (WNK4) in the activation of Na-K-Cl cotransporters. *J Biol Chem.* 2014;289(25):17680-8.
153. Zambrowicz BP, Abuin A, Ramirez-Solis R, Richter LJ, Piggott J, BeltrandelRio H, Buxton EC, Edwards J, Finch RA, Friddle CJ, Gupta A, Hansen G, Hu Y, Huang W, Jaing C, Key BW, Jr., Kipp P, Kohlhauff B, Ma ZQ, Markesich D, Payne R, Potter DG, Qian N, Shaw J, Schrick J, Shi ZZ, Sparks MJ, Van Sligtenhorst I, Vogel P, Walke W, Xu N, Zhu Q, Person C, Sands AT. Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14109-14.
154. Bergaya S, Faure S, Baudrie V, Rio M, Escoubet B, Bonnin P, Henrion D, Loirand G, Achard JM, Jeunemaitre X, Hadchouel J. WNK1 regulates vasoconstriction and blood pressure response to α 1-adrenergic stimulation in mice. *Hypertension.* 2011;58(3):439-45.
155. Wilson FH, Disse-Nicodème S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science.* 2001;293(5532):1107-12.
156. Malha L, Mann SJ. Loop Diuretics in the Treatment of Hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2016;18(4):27.
157. Araoye MA, Chang MY, Khatri IM, Freis ED. Furosemide compared with hydrochlorothiazide. Long-term treatment of hypertension. *JAMA.* 1978;240(17):1863-6.
158. Sica DA, Carter B, Cushman W, Hamm L. Thiazide and loop diuretics. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2011;13(9):639-43.
159. Akella R, Sekulski K, Pleinis JM, Liwocha J, Jiou J, He H, Humphreys JM, Schellinger JN, Joachimiak L, Cobb M, Rodan AR, Goldsmith EJ. Anatomy of a pressure sensing protein kinase. 2018.
160. Murthy M, Kurz T, O'Shaughnessy KM. WNK signalling pathways in blood pressure regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(7):1261-80.
161. Daten zur Todesursachenstatistik Deutschland 2020, Tabelle 23211-0002 [Internet]. Available from: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=previous&levelindex=1&step=1&titel=Ergebnis&levelid=1670675310830&acceptscookies=false#abreadcrumb>.
162. Ali J, Chernicki W, Wood LD. Effect of furosemide in canine low-pressure pulmonary edema. *J Clin Invest.* 1979;64(5):1494-504.
163. Biddle TL, Yu PN. Effect of furosemide on hemodynamics and lung water in acute pulmonary edema secondary to myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1979;43(1):86-90.

164. Vitari AC, Thastrup J, Rafiqi FH, Deak M, Morrice NA, Karlsson HK, Alessi DR. Functional interactions of the SPAK/OSR1 kinases with their upstream activator WNK1 and downstream substrate NKCC1. *Biochem J.* 2006;397(1):223-31.
165. Thastrup JO, Rafiqi FH, Vitari AC, Pozo-Guisado E, Deak M, Mehellou Y, Alessi DR. SPAK/OSR1 regulate NKCC1 and WNK activity: analysis of WNK isoform interactions and activation by T-loop trans-autophosphorylation. *Biochem J.* 2012;441(1):325-37.
166. Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Alessi DR, Uchida S. Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/ SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. *Clin Exp Nephrol.* 2012;16(4):530-8.
167. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1417-23.
168. Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res.* 1998;243(2):359-66.
169. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
170. Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques.* 2000;29(1):52, 4.
171. Moriguchi T, Urushiyama S, Hisamoto N, Iemura S, Uchida S, Natsume T, Matsumoto K, Shibuya H. WNK1 regulates phosphorylation of cation-chloride-coupled cotransporters via the STE20-related kinases, SPAK and OSR1. *J Biol Chem.* 2005;280(52):42685-93.
172. Peteranderl C, Sznajder JI, Herold S, Lecuona E. Inflammatory Responses Regulating Alveolar Ion Transport during Pulmonary Infections. *Front Immunol.* 2017;8:446.
173. Ruß A. 2.2 Diuretika. *Arzneimittel pocket.* 24. Auflage ed. Deutschland: Börm Bruckmeier Verlag GmbH; 2018. p. S. 55.
174. Dormans TP, Pickkers P, Russel FG, Smits P. Vascular effects of loop diuretics. *Cardiovasc Res.* 1996;32(6):988-97.
175. Dikshit K, Vyden JK, Forrester JS, Chatterjee K, Prakash R, Swan HJ. Renal and extrarenal hemodynamic effects of furosemide in congestive heart failure after acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1973;288(21):1087-90.
176. Bourland WA, Day DK, Williamson HE. The role of the kidney in the early nondiuretic action of furosemide to reduce elevated left atrial pressure in the hypervolemic dog. *J Pharmacol Exp Ther.* 1977;202(1):221-9.
177. Cotton R, Suarez S, Reese J. Unexpected extra-renal effects of loop diuretics in the preterm neonate. *Acta Paediatr.* 2012;101(8):835-45.

178. Antes LM, Fernandez PC. Principles of diuretic therapy. *Dis Mon.* 1998;44(6):254-68.
179. Huang H, Song S, Banerjee S, Jiang T, Zhang J, Kahle KT, Sun D, Zhang Z. The WNK-SPAK/OSR1 Kinases and the Cation-Chloride Cotransporters as Therapeutic Targets for Neurological Diseases. *Aging Dis.* 2019;10(3):626-36.
180. Hooper SB, Harding R. Fetal lung liquid: a major determinant of the growth and functional development of the fetal lung. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995;22(4):235-47.
181. Gillie DJ, Pace AJ, Coakley RJ, Koller BH, Barker PM. Liquid and ion transport by fetal airway and lung epithelia of mice deficient in sodium-potassium-2-chloride transporter. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25(1):14-20.
182. Matalon S, Bartoszewski R, Collawn JF. Role of epithelial sodium channels in the regulation of lung fluid homeostasis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;309(11):L1229-38.
183. Smith DE, Otulakowski G, Yeger H, Post M, Cutz E, O'Brodovich HM. Epithelial Na(+) channel (ENaC) expression in the developing normal and abnormal human perinatal lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(4 Pt 1):1322-31.
184. Kahle KT, Rinehart J, Lifton RP. Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(12):1150-8.
185. Farinha CM, Swiatecka-Urban A, Brautigan DL, Jordan P. Regulatory Crosstalk by Protein Kinases on CFTR Trafficking and Activity. *Front Chem.* 2016;4:1.
186. Alessi DR, Zhang J, Khanna A, Hochdörfer T, Shang Y, Kahle KT. The WNK-SPAK/OSR1 pathway: master regulator of cation-chloride cotransporters. *Sci Signal.* 2014;7(334):re3.
187. Garneau AP, Slimani S, Tremblay LE, Fiola MJ, Marcoux AA, Isenring P. K(+)-Cl(-) cotransporter 1 (KCC1): a housekeeping membrane protein that plays key supplemental roles in hematopoietic and cancer cells. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):74.
188. Josiah SS, Meor Azlan NF, Zhang J. Targeting the WNK-SPAK/OSR1 Pathway and Cation-Chloride Cotransporters for the Therapy of Stroke. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3).
189. Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci.* 2003;26(4):199-206.
190. Zhao H, Nepomuceno R, Gao X, Foley LM, Wang S, Begum G, Zhu W, Pigott VM, Falgoust LM, Kahle KT, Yang SS, Lin SH, Alper SL, Hitchens TK, Hu S, Zhang Z, Sun D. Deletion of the WNK3-SPAK kinase complex in mice improves radiographic and clinical outcomes in malignant cerebral edema after ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(2):550-63.

191. Vitzthum C, Clauss WG, Fronius M. Mechanosensitive activation of CFTR by increased cell volume and hydrostatic pressure but not shear stress. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1848(11 Pt A):2942-51.
192. Zhang WK, Wang D, Duan Y, Loy MMT, Chan HC, Huang P. Mechanosensitive gating of CFTR. *Nature Cell Biology*. 2010;12(5):507-12.
193. Hannemann A, Flatman PW. Phosphorylation and transport in the Na-K-2Cl cotransporters, NKCC1 and NKCC2A, compared in HEK-293 cells. *PLoS One*. 2011;6(3):e17992.
194. Klein JD, O'Neill WC. Volume-sensitive myosin phosphorylation in vascular endothelial cells: correlation with Na-K-2Cl cotransport. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 1):C1524-31.
195. Hartmann AM, Nothwang HG. NKCC1 and KCC2: Structural insights into phospho-regulation. *Front Mol Neurosci*. 2022;15:964488.
196. Sartori C, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights. *Eur Respir J*. 2002;20(5):1299-313.
197. 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. *Crit Care Med*. 1999;27(2):304-12.
198. Frank J, Roux J, Kawakatsu H, Su G, Dagenais A, Berthiaume Y, Howard M, Canessa CM, Fang X, Sheppard D, Matthay MA, Pittet JF. Transforming growth factor-beta1 decreases expression of the epithelial sodium channel alphaENaC and alveolar epithelial vectorial sodium and fluid transport via an ERK1/2-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2003;278(45):43939-50.
199. Roux J, Kawakatsu H, Gartland B, Pespeni M, Sheppard D, Matthay MA, Canessa CM, Pittet JF. Interleukin-1beta decreases expression of the epithelial sodium channel alpha-subunit in alveolar epithelial cells via a p38 MAPK-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(19):18579-89.
200. Koto H, Salmon M, Haddad el-B, Huang TJ, Zagorski J, Chung KF. Role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in ozone-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(1):234-9.
201. Geiser T, Dewald B, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M. The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO alpha, GRO beta, and GRO gamma activate human neutrophil and basophil leukocytes. *J Biol Chem*. 1993;268(21):15419-24.
202. Roux J, McNicholas CM, Carles M, Goolaerts A, Houseman BT, Dickinson DA, Iles KE, Ware LB, Matthay MA, Pittet JF. IL-8 inhibits cAMP-stimulated alveolar epithelial fluid transport via a GRK2/PI3K-dependent mechanism. *FASEB J*. 2013;27(3):1095-106.
203. Rezaiguia S, Garat C, Delclaux C, Meignan M, Fleury J, Legrand P, Matthay MA, Jayr C. Acute bacterial pneumonia in rats increases alveolar epithelial fluid clearance by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *J Clin Invest*. 1997;99(2):325-35.

204. Dagenais A, Fréchette R, Yamagata Y, Yamagata T, Carmel JF, Clermont ME, Brochiero E, Massé C, Berthiaume Y. Downregulation of ENaC activity and expression by TNF- α in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286(2):L301-11.
205. Bertani B, Ruiz N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*. 2018;8(1).
206. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000;342(18):1334-49.
207. Brand JD, Lazrak A, Trombley JE, Shei RJ, Adewale AT, Tipper JL, Yu Z, Ashtekar AR, Rowe SM, Matalon S, Harrod KS. Influenza-mediated reduction of lung epithelial ion channel activity leads to dysregulated pulmonary fluid homeostasis. *JCI Insight*. 2018;3(20).
208. Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron*. 2009;61(6):820-38.
209. Price TJ, Cervero F, Gold MS, Hammond DL, Prescott SA. Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):149-70.
210. Pieraut S, Laurent-Matha V, Sar C, Hubert T, Méchaly I, Hilaire C, Mersel M, Delpire E, Valmier J, Scamps F. NKCC1 phosphorylation stimulates neurite growth of injured adult sensory neurons. *J Neurosci*. 2007;27(25):6751-9.
211. Pieraut S, Lucas O, Sangari S, Sar C, Boudes M, Bouffi C, Noel D, Scamps F. An autocrine neuronal interleukin-6 loop mediates chloride accumulation and NKCC1 phosphorylation in axotomized sensory neurons. *J Neurosci*. 2011;31(38):13516-26.
212. O'Neill WC. Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am J Physiol*. 1999;276(5):C995-c1011.
213. Karimy JK, Zhang J, Kurland DB, Theriault BC, Duran D, Stokum JA, Furey CG, Zhou X, Mansuri MS, Montejo J, Vera A, DiLuna ML, Delpire E, Alper SL, Gunel M, Gerzanich V, Medzhitov R, Simard JM, Kahle KT. Inflammation-dependent cerebrospinal fluid hypersecretion by the choroid plexus epithelium in posthemorrhagic hydrocephalus. *Nat Med*. 2017;23(8):997-1003.
214. Lan CC, Peng CK, Tang SE, Lin HJ, Yang SS, Wu CP, Huang KL. Inhibition of Na-K-Cl cotransporter isoform 1 reduces lung injury induced by ischemia-reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2017;153(1):206-15.
215. Yuan SY, Shen Q, Rigor RR, Wu MH. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvasc Res*. 2012;83(1):82-8.
216. Rittirsch D, Flierl MA, Day DE, Nadeau BA, McGuire SR, Hoesel LM, Ipaktchi K, Zetoune FS, Sarma JV, Leng L, Huber-Lang MS, Neff TA, Bucala R, Ward PA. Acute lung injury induced by lipopolysaccharide is independent of complement activation. *J Immunol*. 2008;180(11):7664-72.

217. Hung CM, Peng CK, Wu CP, Huang KL. Bumetanide attenuates acute lung injury by suppressing macrophage activation. *Biochem Pharmacol.* 2018;156:60-7.
218. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, Lovell-Badge R, Masters JR, Meredith J, Stacey GN, Thraves P, Vias M, UK CR. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer.* 2014;111(6):1021-46.
219. Cooper JR, Abdullatif MB, Burnett EC, Kempell KE, Conforti F, Tolley H, Collins JE, Davies DE. Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164438.
220. Kuehn A, Kletting S, de Souza Carvalho-Wodarz C, Repnik U, Griffiths G, Fischer U, Meese E, Huwer H, Wirth D, May T, Schneider-Daum N, Lehr CM. Human alveolar epithelial cells expressing tight junctions to model the air-blood barrier. *Altex.* 2016;33(3):251-60.
221. Corbière V, Dirix V, Norrenberg S, Cappello M, Rimmelink M, Mascart F. Phenotypic characteristics of human type II alveolar epithelial cells suitable for antigen presentation to T lymphocytes. *Respir Res.* 2011;12(1):15.
222. Sakamoto A, Matsumaru T, Yamamura N, Suzuki S, Uchida Y, Tachikawa M, Terasaki T. Drug Transporter Protein Quantification of Immortalized Human Lung Cell Lines Derived from Tracheobronchial Epithelial Cells (Calu-3 and BEAS2-B), Bronchiolar-Alveolar Cells (NCI-H292 and NCI-H441), and Alveolar Type II-like Cells (A549) by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Pharm Sci.* 2015;104(9):3029-38.
223. Hermanns MI, Unger RE, Kehe K, Peters K, Kirkpatrick CJ. Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. *Lab Invest.* 2004;84(6):736-52.
224. Zhu W, Begum G, Pointer K, Clark PA, Yang SS, Lin SH, Kahle KT, Kuo JS, Sun D. WNK1-OSR1 kinase-mediated phospho-activation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter facilitates glioma migration. *Mol Cancer.* 2014;13:31.

Der letzte Zugriff auf alle Internetquellen erfolgte am 30.12.2022.

7 Anhang

Im Folgenden sind die von 2.3.3 abweichenden Punkte für die Genotypisierung für WNK1-Mäuse unter freundlicher Bereitstellung von Dr. Lasti Erfinanda Fuaadi aufgelistet.

Tabelle 7-1: Kommerzielles Kit zur DNA-Extraktion und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von WNK1

Name	Katalognummer	Hersteller
REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit	XNAT 100	Sigma-Aldrich

Es wurden 0,4 µM der folgenden Primer eingesetzt:

Tabelle 7-2: WNK1-Primer zur Genotypisierung

Wnk1 WT	for 5'- AACGTTAACTCAGCATGTGGAAGCA -3' rev 5'- GACTGCCCAGTAGGAGGAGAGGC -3' Proteingröße: 772 bp
Wnk1 KO	for 5'- TGAAACTTCCCAAGAGTCCGAGGGA -3' rev 5'- CCCGGCGCTCTTACCAAAGG -3' Proteingröße: 1498 bp

Wnk1^{+/-} zeigt beide Banden (772 und 1498 bp) auf dem Agarosegel nach Elektrophorese.

Tabelle 7-3: Amplifikationsprogramm der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für *Wnk1* WT

Initiale Denaturierung	94°C	3 min
30 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	61°C	30 s
Elongation	72°C	1 min
Finale Elongation	72°C	2 min

Tabelle 7-4: Amplifikationsprogramm der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für *Wnk1* KO

Initiale Denaturierung	94°C	3 min
<hr/>		
30 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 s
Annealing	55,5°C	2 min
Elongation	72°C	1 min 30 s
<hr/>		
Finale Elongation	72°C	2 min

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Delia Isabel Langner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Funktion des Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporters NKCC1 in der alveolären Flüssigkeitsresorption und der Entwicklung des kardiogenen Lungenödems - *Functional relevance of the sodium-potassium-chloride cotransporter NKCC1 in alveolar fluid clearance and the development of cardiogenic pulmonary edema*“ 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, Datum_____Unterschrift_____

(Delia Isabel Langner)

Curriculum vitae

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

Publikationsliste

S. Weidenfeld, C. Chupin, D.I. Langner, T. Zetoun, S. Rozowsky, W.M. Kuebler
„Sodium-coupled neutral amino acid transporter SNAT2 counteracts cardiogenic
pulmonary edema by driving alveolar fluid clearance“, Am. J. Physiol. Lung Cell.
Mol Physiol., 2021; doi:10.1152/ajplung.00461.2020

Danksagung

Mein tiefer Dank gilt zuallererst Herrn Professor Dr. med. Wolfgang M. Kübler, der mich in seine Forschungsgruppe aufnahm und mir dieses spannende Thema für meine Promotion überließ. Seine Tür stand einem immer offen und bei den regelmäßigen Gesprächen über die Fortschritte oder Probleme der Arbeit, hatte er stets bereichernde Ideen und gute Ratschläge, um die Experimente voranzutreiben. Die Kommunikation mit ihm ist offen und ehrlich. Auch dafür möchte ich mich bedanken, denn so wurden Missverständnisse schnell aus dem Weg geräumt.

Weiterhin gilt meiner Betreuerin Dr. Sarah Weidenfeld großer Dank. Sie hat mich in das wissenschaftliche Arbeiten im Labor eingeführt und stand mir fachlich stets mit Rat und Tat beiseite. Ihre freundliche und engagierte Betreuung motivierte mich auch in den Phasen, wenn einfach nichts gelingen wollte. Doch ihre vielen guten Tipps trugen dazu bei, dass diese Arbeit nun fertig ist.

Außerdem danke ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der AG Kübler für die Hilfe bei wissenschaftlichen sowie administrativen Fragen und Problemen, aber auch für die lustigen Pausen und den angenehmen Arbeitsalltag im Labor.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung bedanken, die mir half, diese intensive Zeit zu meistern. Viel mehr noch danke ich ihnen dafür, dass sie immer an mich glauben.

Unter meinen Freunden möchte ich hier insbesondere Laura und Jill nennen, die nicht müde wurden mich zu motivieren und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Vor allem danke ich Charlie an dieser Stelle, der in allen Phasen an meiner Seite war. Seine Unterstützung während des Schreibens und Formatierens, als auch beim freizeithlichen Ausgleich gilt ein riesengroßer Dank.

Bescheinigung Statistisches Gutachten



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBike)

Direktorin: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Name, Vorname: Langner, Delia Isabel

Emailadresse: delia-isabel.langner@charite.de

Matrikelnummer: 223123

PromotionsbetreuerIn: Professor Wolfgang Kübler

Promotionsinstitution/Klinik: Institut für Physiologie

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau *Delia Isabel Langner* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- *Termin 1: 12.01.2021*

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- *Deskriptive Methoden*
- ANOVA-basierte Verfahren zur Datenauswertung

Diese Bescheinigung garantiert weder die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren noch die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum:

Name des Beraters: Frank Konietschke



Unterschrift Berater, Institutsstempel