



ROLAND ERNST STIFTUNG FÜR GESUNDHEITSWESEN

– Endogene Einflussfaktoren der postnatalen Alveolarfunktion –

Abschlussbericht

1. Allgemeine Informationen

1.1. Antragsteller

Antragsteller 1/Projektleiter:

Prof. Dr. Ulrich Thome

Leiter der Selbstständigen Abteilung Neonatologie, Universität Leipzig

Universitätsklinikum für Kinder- und Jugendmedizin,

Liebigstr. 20, 04103 Leipzig

Email: ulrich.thome@medizin.uni-leipzig.de

Tel.: (0341) 9726020

Antragsteller 2/Projektbearbeiter:

Dr. Mandy Laube

Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Leiterin des Forschungslabors der Neonatologie am Pädiatrischen Forschungszentrum der Universität Leipzig

Liebigstr. 19, 04103 Leipzig

Email: mandy.laube@medizin.uni-leipzig.de

Tel.: (0341) 9726502

1.2. Förderzeitraum

01.05.2017 bis 31.12.2018

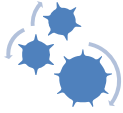


2. Zusammenfassung

Dieses Projekt sollte dazu beitragen, verantwortliche Faktoren und Mechanismen des lange bekannten Geschlechtsunterschieds bei der Ausprägung pulmonaler Komplikationen unter Frühgeborenen zu identifizieren. Durch eine unzureichende Flüssigkeitsabsorption in der Lunge männlicher Frühgeborenen, leiden diese fast doppelt so häufig am Atemnotsyndrom. Maßgeblich beteiligt an der pulmonalen Flüssigkeitsabsorption ist der Amilorid-sensitive Epitheliale Natriumkanal (ENaC). Dieser befindet sich in Pneumozyten des Typs II, auch ATII-Zellen genannt, am apikalen Zellpol, also der dem Lungenlumen zugewandten Seite. Über den ENaC werden Natriumionen aus dem Lungenlumen in die Alveolarzellen aufgenommen und basolateral durch die Na,K-ATPase ins Interstitium abgegeben. Es kommt zu einem osmotischen Gefälle, welches durch die Absorption von Flüssigkeit aus dem Lumen ins Gewebe ausgeglichen wird. Dieser Schritt ist essentiell für die Anpassung Neugeborener an die Luftatmung, die bei Frühgeborenen aufgrund fehlender Lungenreife häufig gestört ist. In vorhergehenden Projekten konnte bereits gezeigt werden, dass männliche fetale ATII-Zellen sowohl bei direkter RNA-Isolation, als auch nach Kultivierung, weniger ENaC-Kanäle exprimieren als weibliche. Als Ursache wurde die Wirkung verschiedener Serumfaktoren untersucht, da geschlechtsspezifische Unterschiede nur nach Zellkultivierung mit fetalem Serum bzw. direkter Isolation aus dem Fötus auftraten. Da die ENaC-vermittelten Ionenströme bei serumfreier Kultivierung höher sind und der Geschlechtsunterschied negiert wurde, lautete unsere Arbeitshypothese, dass bestimmte Wachstumsfaktoren im fetalem Serum die ENaC-Aktivität geschlechtsspezifisch reduzieren.

Zunächst wurde das fetale Serum einer Hitzeinaktivierung unterzogen. Da die Hitzesensitivität von Enzymen variiert, sollte so der Kandidatenkreis potentieller Faktoren eingegrenzt werden. Eine Inaktivierung bei 56°C zeigte keine Wirkung und eine weitere Erhöhung der Temperatur erbrachte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Dies geht möglicherweise darauf zurück, dass ein Großteil der infrage kommenden Faktoren sehr hitzestabil ist. Auch die nachfolgende Größenseparation zeigte keinen geschlechtsspezifischen Unterschied. Bereits bekannte, mit der Flüssigkeitsabsorption assoziierte Serumfaktoren wurden daraufhin systematisch untersucht. Dabei lag der Fokus auf den Liganden des TGF- β -Rezeptors und der ERBB-Rezeptoren. So wurde der Einfluss von TGF- β , NRG1, HB-EGF, TGF- α und EGF auf den ENaC-vermittelten Natriumtransport untersucht. HB-EGF zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den Natriumtransport, während TGF- β zwar die ENaC-Aktivität reduzierte, jedoch für beide Geschlechter in gleichem Maße. Geschlechtsspezifische Unterschiede konnten für die Liganden NRG1 und EGF gezeigt werden. Von den genannten Serumfaktoren zeigte jedoch nur EGF einen stärker hemmenden Einfluss auf den Natriumtransport in männlichen ATII-Zellen, NRG1 wirkte hingegen stärker hemmend auf weibliche Lungenepithelzellen. Dem entgegen induzierte EGF die Zellproliferation ausschließlich in männlichen ATII-Zellen. Des Weiteren zeigten sich Geschlechtsunterschiede bei den durch EGF induzierten Signalwegen. In weiblichen ATII-Zellen wurde der PI3K-Signalweg induziert, während der MAPK-Signalweg bei beiden Geschlechtern induziert wurde, bei männlichen jedoch deutlich stärker.

Zusammenfassend wurden verschiedene Serumfaktoren und deren Einfluss auf die ENaC-Aktivität und mRNA-Expression untersucht. Dabei zeigte vor allem EGF in verschiedenen Analysen deutliche Geschlechtsunterschiede. Ob die EGF-Wirkung jedoch ausreicht, die geschlechtsspezifischen Unterschiede zwischen serumfreier und serumhaltiger Zellkultivierung zu erklären, konnte im Zeitrahmen der Arbeiten nicht abschließend geklärt werden. Die in diesem Projekt gewonnenen Ergebnisse bilden eine wichtige Grundlage für ein Anschlussprojekt, was ohne die finanzielle Förderung durch die Roland Ernst Stiftung nicht möglich gewesen wäre. Eine Publikation der gewonnenen Ergebnisse in einer referierten, internationalen Fachzeitschrift ist noch für 2019 geplant.



3. Zielsetzung des Projektes / Ausgangssituation

Seit Ende der 70'er Jahre ist bekannt, dass geschlechtsspezifische Unterschiede im Erkrankungsrisiko und der Überlebensrate von Frühgeborenen existieren. Demnach entwickeln männliche Frühgeborene wesentlich häufiger pulmonale Komplikationen wie das Atemnotsyndrom (RDS; *respiratory distress syndrome*). Ursache des RDS ist eine unzureichende postnatale Alveolarfunktion, die u. a. eine verminderte Flüssigkeitsabsorption zur Folge hat. Da weltweit jedes 10. Kind als Frühgeborenes zur Welt kommt, ist die Forschung auf diesem Gebiet klinisch höchst relevant. Denn Frühgeborene stellen die größte Kinderpatientengruppe, auch in Deutschland, dar.

In vorangegangenen Projekten konnte unsere Arbeitsgruppe anhand von primären fetalen distalen Lungenepithelzellen (FDLE; *fetal distal lung epithelia*) der Ratte bereits Ursachen für die gestörte Flüssigkeitsabsorption in männlichen Lungen demonstrieren [1]. Diese gehen auf eine geringere Expression des epithelialen Natriumkanals (ENaC) in männlichen Feten zurück. Durch Kultivierung der FDLE-Zellen mit fetalem Serum, welches eine hohe Anzahl an Wachstumsfaktoren und Antikörpern beinhaltet, wurde diese Wirkung bestätigt. Eine serumfreie Kultivierung hingegen zeigte in beiden Geschlechtern eine massive Erhöhung der ENaC-Aktivität sowie eine Negierung des Geschlechtsunterschieds. Diese Ergebnisse führten uns zu der Hypothese, dass im fetalen Serum Faktoren enthalten sind, die zum einen den ENaC-vermittelten Natriumtransport reduzieren und zum anderen, stärker auf männliche Lungenepithelzellen wirken.

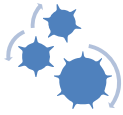
Zielsetzung

Ziel des Projekts war es, die zugrunde liegenden endogenen Faktoren im fetalen Serum (FKS; fetales Kälberserum) zu bestimmen, die einen Einfluss auf den ENaC-vermittelten Natriumtransport und damit auf die postnatale Alveolarfunktion nehmen. Dabei lag der Fokus auf geschlechtsspezifisch wirkenden Wachstumsfaktoren, die mithilfe von geschlechtsgetrennten FDLE-Zellkulturen untersucht werden sollten. Für die Analyse der ENaC-Aktivität wurden elektro-physiologische Messungen in der Ussing Kammer durchgeführt, die es ermöglicht, die Ionenkanalaktivität auf Epithelebene zu bestimmen. Der gemessene Kurzschlussstrom (I_{sc}) lässt direkte Schlüsse auf den Amilorid-sensitiven ENaC-vermittelten Natriumstrom (ΔI_{amil}) zu. Daneben sollte die Wirkung bestimmter Wachstumsfaktoren (Kandidatenfaktoren), wie TGF- β (*transforming growth factor*), NRG1 (Neuregulin 1) oder EGF (*epidermal growth factor*), auf die Genexpression der drei ENaC-Untereinheiten mittels quantitativer Real-Time PCR (RT-qPCR) untersucht und beteiligte Signalwege bestimmt werden.

4. Ergebnisse

4.1. Eingrenzung potentieller Wachstumsfaktoren im Serum

Zunächst sollte die Vielzahl der infrage kommenden Wachstumsfaktoren aus dem fetalen Serum durch verschiedene Methoden eingegrenzt werden. Für diese Analysen wurde eine FDLE-Zellkultur gemischten Geschlechts verwendet, da auf diese Weise mehr Zellen für die Analysen zur Verfügung standen und in den Vorversuchen gezeigt wurde, dass die Serumwirkung für beide Geschlechter zu beobachten war. Da sich Wachstumsfaktoren unter anderem hinsichtlich ihrer Hitzesensitivität unterscheiden, wurde das fetale Serum für 30 min auf 56°C bzw. für je 10 min auf 70°C oder 80°C erhitzt. Nach Abkühlung des hitzeinaktivierten Serums wurde es dem Wachstumsmedium der FDLE-Zellen zugesetzt und diese für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die FDLE-Zellen hinsichtlich des ΔI_{amil} untersucht. Der ΔI_{amil} gibt Aufschluss über die ENaC-Aktivität des epithelialen Monolayers. Eine Hitzeinaktivierung des Serums auf 56°C hatte keinen Einfluss auf die ENaC-Aktivität, da sich der ΔI_{amil} nicht von unbehandeltem Serum unterschied (Abb. 1). Eine serumfreie Kultivierung (SF) zeigte analog zu den Vorversuchen eine signifikant höhere ENaC-Aktivität verglichen mit der serumhaltigen sowie der hitzeinaktivierten serumhaltigen Kontrolle (ΔI_{amil} : ctrl/HI-ctrl vs. SF $p < 0,01$). Eine Erhöhung der Inaktivierungstemperatur auf 70°C



bzw. 80°C hingegen wirkte sich negativ auf die Integrität des Epithels aus. Ein Großteil der elektrophysiologischen Messungen konnte aufgrund eines zu niedrigen transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) nicht ausgewertet werden. Es ist unklar, ob Temperaturen $\geq 70^\circ\text{C}$ zur Bildung toxischer Abbauprodukte im Serum führen oder Faktoren inaktiviert werden, die für die FDLE-Zellkultivierung notwendig sind. Aus diesen Ergebnissen können daher keine Rückschlüsse auf die gesuchten Kandidatenfaktoren abgeleitet werden.

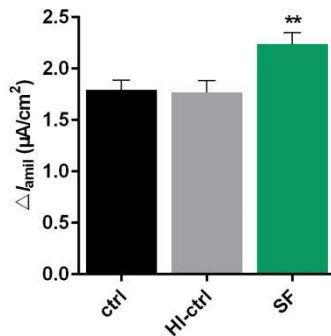


Abb. 1: Einfluss von hitzeinaktiviertem Serum auf den ΔI_{amil} von FDLE-Zellen. Dazu wurde serumhaltiges Kulturmedium (FKS) als Kontrolle (ctrl) bzw. für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert (HI-ctrl) eingesetzt. Die Hitzeinaktivierung hat keinen Einfluss auf den ΔI_{amil} . Im Gegensatz dazu kommt es bei serumfreier (SF) Kultivierung zu einer signifikanten Erhöhung des ΔI_{amil} . Mittelwert + SEM, $n = 26-30$, T-Test: ** $p \leq 0,01$.

Neben der Hitzesensitivität kann man Wachstumsfaktoren auch anhand ihres Molekulargewichts in Gruppen unterteilen. Dazu wurde eine Größenfraktionierung des serumhaltigen Mediums mithilfe einer Ultrafiltration durchgeführt und molekulare Filter der Größen 10 kDa und 50 kDa verwendet. Es entstanden zwei Fraktionen: Medium mit Serumproteinen <10 kDa und Medium mit Serumproteinen >50 kDa. Eine dritte Fraktion (10-50 kDa) bestand nur aus Totvolumen und wurde daher nicht weiter untersucht. Im Anschluss wurde der ΔI_{amil} in der Ussing Kammer gemessen und die Fraktionen mit der Kontrolle, nicht-fraktionierten serumhaltigen Medium, verglichen (Abb. 2). In beiden Geschlechtern konnte kein signifikanter Unterschied im ΔI_{amil} zwischen der Kontrolle und den Fraktionen festgestellt werden. In Anlehnung an die Hypothese konnte mit der durchgeführten Größenfraktionierung keine hemmende Fraktion identifiziert werden. Die erhoffte Eingrenzung potentieller Kandidatenfaktoren konnte mit den durchgeführten Versuchen nicht erreicht werden.

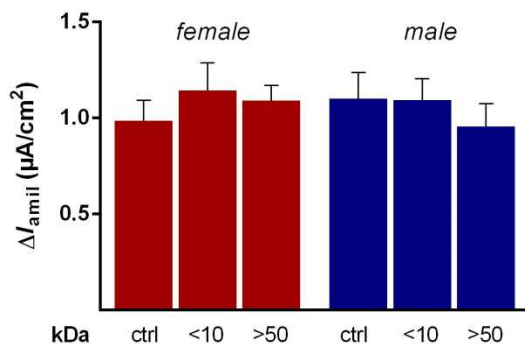
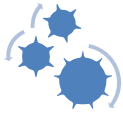


Abb. 2: ΔI_{amil} von FDLE-Zellen kultiviert mit serumhaltigen fraktionierten Medien. Dazu wurde serumhaltiges Kulturmedium als Kontrolle (ctrl) eingesetzt. Im Weiteren wurde dieses Medium mithilfe von Ultrafiltration in zwei Fraktionen unterteilt, abhängig vom Molekulargewicht der enthaltenen Serumproteingrößen, unterteilt: <10 kDa und >50 kDa. Mittelwert + SEM, $n = 9 - 19$.



4.2. Analyse von Kandidatenfaktoren: TGF- β

Im Weiteren wurde ein anderer Ansatz verfolgt und gezielt der Einfluss von Kandidatenfaktoren auf den Natriumtransport in FDLE-Zellen untersucht. Der erste untersuchte Wachstumsfaktor war TGF- β , der bereits als hemmend auf den Natriumtransport beschrieben wurde [2]. Dafür wurden die FDLE-Zellen nach dem Geschlecht getrennt ausgesät und für 24 h in serumfreiem bzw. serumhaltigem Medium mit oder ohne Zugabe eines TGF- β -Rezeptor-Inhibitors (SB431542; 1 μ M) kultiviert. Zunächst wurde der Einfluss auf die Genexpression der ENaC-Untereinheiten (α , β , γ) mittels RT-PCR untersucht (Abb. 3).

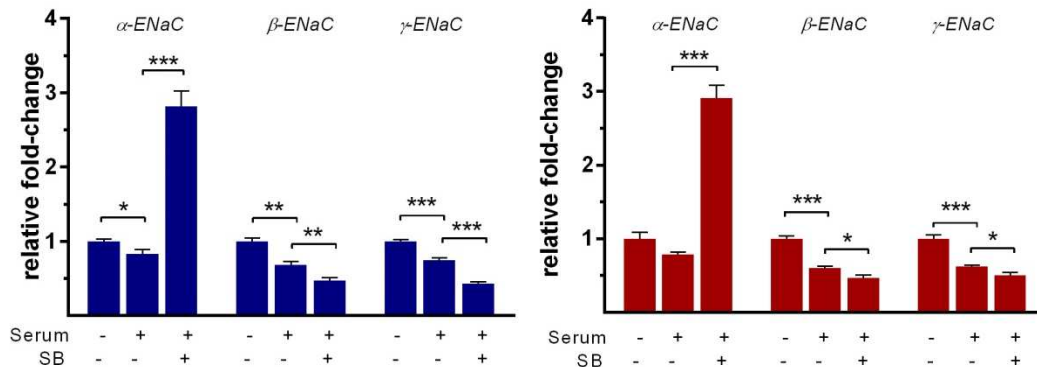


Abb. 3: Genexpression der ENaC-Untereinheiten nach Inhibition des TGF- β -Rezeptors. Dafür wurden FDLE-Zellen für 24 h serumfrei bzw. mit Serum kultiviert. In einer weiteren serumhaltigen Gruppe wurde ein TGF- β -Rezeptor-Inhibitor (SB, 1 μ M) eingesetzt. Mittelwert + SEM, n = 8, T-Test: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Blau = male; Rot = female.

Analog zu den bereits beschriebenen Ergebnissen führte eine Inkubation der Zellen mit serumhaltigem Medium im Vergleich zur serumfreien Kultivierung zu einer signifikant reduzierten mRNA-Expression der ENaC-Untereinheiten, sowohl bei männlichen wie auch bei weiblichen FDLE-Zellen. Eine Hemmung des TGF- β -Rezeptors in serumhaltigem Medium durch SB431542 führte bei der α -ENaC mRNA zu einer massiver Steigerung der mRNA-Expression, sowohl in weiblichen wie auch in männlichen Zellen. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Gegensatz zu der mRNA-Expression der anderen ENaC-Untereinheiten (β und γ), die bei einer Inhibition des TGF- β -Rezeptors eine signifikant reduzierte Expression aufwiesen. Daher beeinflusst eine Inhibition des TGF- β -Rezeptors die ENaC-Untereinheiten unterschiedlich, wohingegen kein geschlechts-spezifischer Einfluss zu erkennen war.

Da die Ergebnisse der Expression offen lassen in welche Richtung TGF- β den Natriumtransport beeinflusst, wurden elektrophysiologische Messungen unter Zugabe von TGF- β_1 (1 nM) und/oder dem TGF- β -Rezeptor-Inhibitor durchgeführt. Die Kultivierung wurde in serumfreiem Medium durchgeführt, um den isolierten Einfluss des Kandidatenfaktors auf den ΔI_{amil} zu bestimmen.

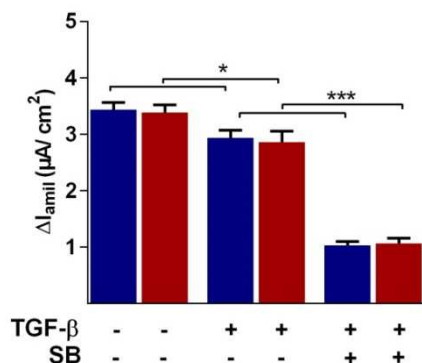


Abb. 4: ΔI_{amil} von FDLE-Zellen unter Einfluss von TGF- β . Dafür wurden FDLE-Zellen für 24 h serumfrei mit und ohne TGF- β_1 (1 nM) kultiviert. In einer weiteren Gruppe wurde zusätzlich ein TGF- β -Rezeptor-Inhibitor (SB, 1 μ M) eingesetzt. Mittelwert + SEM, n = 13 – 16, T-Test: * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$. Blau = male; Rot = female.



Unter serumfreien Bedingungen konnte eine signifikante Reduktion des ΔI_{amil} durch TGF- β bei beiden Geschlechtern ermittelt werden (Abb. 4). Dieses Ergebnis zeigt, dass TGF- β den ENaC-vermittelten Natriumtransport verringert, jedoch diese reduzierende Wirkung für beide Geschlechter in etwa gleich ist. Eine geschlechtsspezifische Reduktion des ΔI_{amil} durch TGF- β findet demnach nicht statt. Die massive Erhöhung der α -ENaC mRNA Expression spiegelt sich nicht im gemessenen ΔI_{amil} wieder, vermutlich da die beiden anderen ENaC-Untereinheiten durch TGF- β reduziert wurden und ein funktioneller ENaC-Kanal aus allen drei Untereinheiten aufgebaut ist.

Überraschenderweise konnte die ENaC-Aktivität durch Zugabe des TGF- β -Rezeptor-Inhibitors SB431542 weiter signifikant reduziert werden. Die starke Hemmung des Ionentransports könnte darin begründet sein, dass der Inhibitor neben dem TGF- β -Rezeptor ALK5 auch die verwandten Rezeptoren ALK4 und ALK7 hemmt (SMAD2-Phosphorylierung), wodurch sowohl die Activin-, als auch die Nodal-Signalkaskade blockiert werden. Auch hier zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Da die, wenngleich irritierende, Reduktion des ΔI_{amil} durch TGF- β -Rezeptor-Inhibition nicht zur Überprüfung der Arbeitshypothese beiträgt, wurde das Ergebnis nicht weiter adressiert. Zusammengefasst kann TGF- β als Ursache der geschlechtsspezifischen ENaC-Aktivität ausgeschlossen werden.

4.3. Analyse von Kandidatenfaktoren: Aktivatoren des ERK1/2-Signalweges

In der Literatur wurde beschrieben, dass sich die Aktivierung des ERK1/2- (*extracellular-signal regulated kinases*) Signalweges negativ auf die mRNA-Expression der ENaC-Untereinheiten auswirkt [3,4]. Man kann also davon ausgehen, dass Faktoren, die zur Aktivierung von ERK1/2 führen, eine hemmende Wirkung auf die ENaC-Expression ausüben. Dies betrifft u.a. die Liganden der ERBB1 und ERBB2 (*erythroblastic oncogene B, epidermal growth factor receptor*) Rezeptoren und deren nachfolgende Signalwege.

I: ERBB2 - Neuregulin 1 Interaktion

Als Ligand des ERBB2-Rezeptors wurde der Einfluss von Neuregulin 1 (NRG1) auf FDLE-Zellen analysiert. Dazu wurden geschlechtsspezifisch isolierte FDLE-Zellen für 24 h serumfrei unter Zugabe von NRG1 (50 μ g/ml) kultiviert.

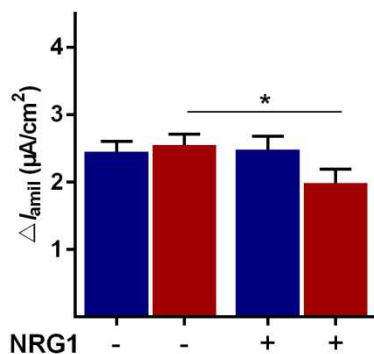
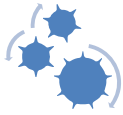


Abb. 5: ΔI_{amil} von FDLE-Zellen unter Einfluss von NRG1. Dafür wurden FDLE-Zellen für 24 h serumfrei mit und ohne NRG1 (50 μ g/ml) kultiviert. Mittelwert + SEM, n = 10 - 26; T-Test: * $p \leq 0,05$. Blau = male; Rot = female.

Durch Zugabe von NRG1 in serumfreiem Medium konnte ein geschlechtsspezifischer Unterschied ermittelt werden. So ist nur in weiblichen FDLE-Zellen eine signifikante Reduktion der ENaC-Aktivität messbar (Abb. 5). NRG1 zeigt demnach einen geschlechtsspezifischen Einfluss in fetalen ATII-Zellen, wobei es jedoch zu einer Reduktion des Natriumtransports in weiblichen FDLE-Zellen und nicht in männlichen kommt. NRG1 kann demnach als verantwortlicher Serumfaktor ausgeschlossen ebenfalls werden.



II: ERBB1

Als Liganden des ERBB1, auch bekannt als EGF-Rezeptor, kommen verschiedene Faktoren infrage. Sowohl HB-EGF (*Heparin-binding EGF-like growth factor*), TGF- α (*transforming growth factor alpha*), als auch EGF stellen Liganden des ERBB1-Rezeptors dar. Allen drei ERBB1-Liganden wurde bereits eine Rolle in der Lungenentwicklung zugeschrieben [5–7].

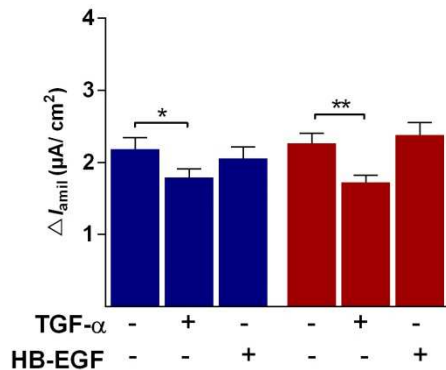


Abb. 6: Einfluss der ERBB1-Liganden, TGF- α und HB-EGF auf den ΔI_{amil} in FDLE-Zellen. FDLE-Zellen wurden für 24 h serumfrei mit und ohne TGF- α (10 ng/ml) bzw. HB-EGF (50 ng/ml) kultiviert. Mittelwert + SEM. n = 25-28; T-Test: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Blau = male; Rot = female.

Die Messung des ΔI_{amil} unter HB-EGF-Einfluss ergab weder in männlichen Zellen, noch in weiblichen signifikante Unterschiede (Abb.6). Im Gegensatz dazu wurde nach TGF- α -Applikation eine Hemmung des ΔI_{amil} gemessen. Diese Reduktion durch TGF- α ist, analog zu NRG1, in weiblichen Alveolarzellen stärker ausgeprägt und kann daher nicht den gesuchten, auf männliche Zellen stärker wirkenden, reduzierenden Faktor darstellen.

Als weiteren Liganden des ERBB1-Rezeptors wurde EGF adressiert, ein Faktor der in der fetalen Lungenentwicklung eine wichtige Rolle einnimmt [7]. Dazu wurde der Effekt von EGF auf die Genexpression der ENaC-Untereinheiten nach 24-stündiger Exposition in serumfreiem Medium untersucht. Während sich die mRNA-Expression der α -Untereinheit nicht signifikant änderte, konnten sowohl bei der β -Untereinheit, als auch der γ -Untereinheit eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression durch EGF gezeigt werden (Abb. 7). Dies lässt vermuten, dass die Proteinexpression bzw. die Aktivität funktioneller ENaC-Ionenkanäle ebenfalls stark vermindert ist.

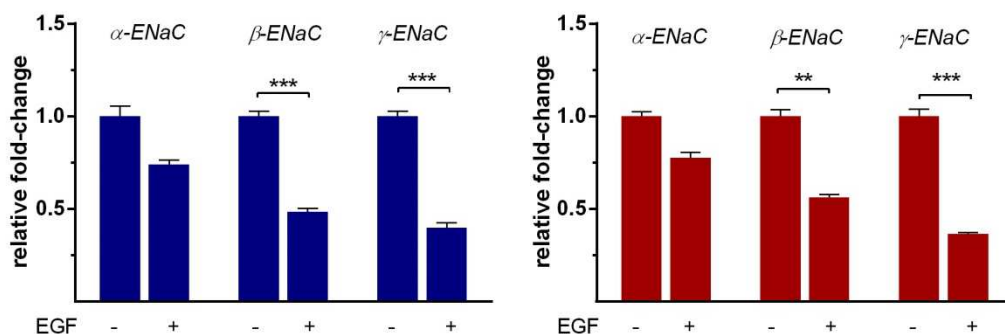
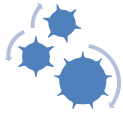


Abb. 7: EGF hemmt Genexpression der ENaC-Untereinheiten in beiden Geschlechtern. Dafür wurden FDLE-Zellen für 24 h serumfrei mit bzw. ohne EGF (10 ng/ml) kultiviert. Mittelwert + SEM, n = 8, T-Test: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Blau = male; Rot = female.

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen zeigen deutlich die reduzierende Wirkung von EGF auf den ENaC bei männlichen wie auch weiblichen Zellen. Um mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede zu ermitteln wurde als nächstes die Wirkung von EGF auf den Natriumtransport elektrophysiologisch untersucht. Dazu wurden die FDLE-Zellen analog serumfrei mit bzw. ohne EGF inkubiert und zusätzlich in serumhaltigem Medium mit und ohne Inhibition des ERBB1-Rezeptors durch AG1478. Dabei zeigte EGF bei serumfreien Bedingungen ebenfalls eine



reduzierende Wirkung auf den ΔI_{amil} in beiden Geschlechtern (Abb. 8). Die ENaC-Aktivität wurde in männlichen Zellen um etwa 31% vermindert, in weiblichen um 20%, was in einem signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern resultierte ($p < 0.05$). EGF zeigte daher eine signifikant reduzierende Wirkung auf den Natriumtransport bei männlichen und weiblichen FDLE-Zellen, wie es auch der gesuchte Serumfaktor demonstriert hatte, die bei männlichen Zellen stärker ausgeprägt ist. EGF stellt daher möglicherweise den bzw. einen der gesuchten Serumfaktor(en) dar. Aufgrund der dargestellten Ergebnisse wäre zu erwarten, dass eine Inhibition des ERBB1-Rezeptors durch AG1478 zu einem Anstieg des Natriumtransports führt, da sowohl TGF- α als auch EGF ihre reduzierenden Signale über ERBB1 vermitteln. Überraschenderweise, führte eine ERBB1-Inhibition jedoch nicht zu einer Erhöhung des ΔI_{amil} , sondern reduzierte ΔI_{amil} in serumhaltigem Medium in weiblichem (-30%) und männlichem (-23%) FDLE-Zellen. Die Differenz beruht möglicherweise auf dem allgemein höheren ΔI_{amil} in weiblichen Zellen bei serumhaltiger Kultivierung.

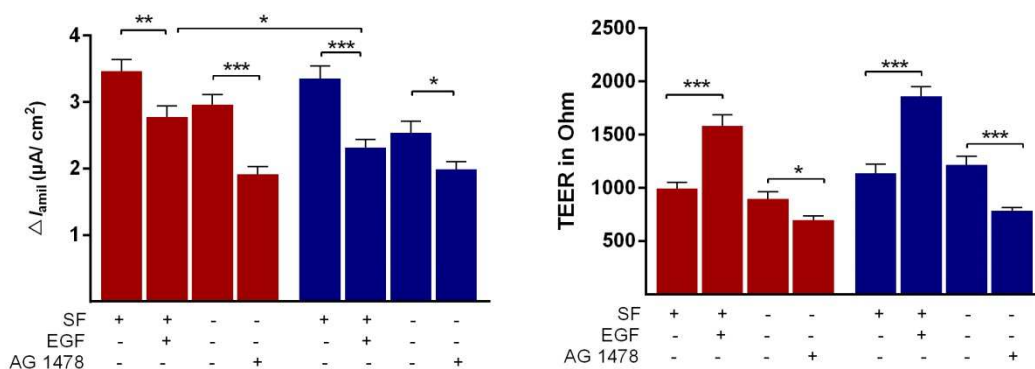


Abb. 8 EGF hemmt den ΔI_{amil} in FDLE-Zellen. FDLE-Zellen wurden für 24 h serumfrei (SF) mit und ohne EGF (10 ng/ml) kultiviert. In einer weiteren Gruppe wurden die FDLE-Zellen mit serumhaltigen Medium sowie mit und ohne den ERBB1-Inhibitor (AG1478, 2 μM) kultiviert. Mittelwert + SEM, n = 19-23; T-Test: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Blau = male; Rot = female.

Als Nebenbefund induzierte EGF eine signifikante Erhöhung des TEER bei beiden Geschlechtern, was eine Erhöhung der Epithelintegrität darstellt. In Darmzellen wurde die Zunahme des Widerstands unter EGF-Einfluss bereits beschrieben [8]. Die beschriebene Wirkung beruhte auf einer erhöhten Expression verschiedener Tight Junction Proteine wie Claudin oder Occludin [8], was zu einer verbesserten Barrierefunktion des Epithels führte. Entsprechend der Erwartungen kam es zu einer Reduktion des TEER durch ERBB1-Inhibition, da das Signal zur vermehrten Expression der Tight Junctions Proteine nicht mehr vermittelt werden kann. Eine Zunahme der Zellproliferation durch EGF könnte eine weitere Ursache für die Zunahme des TEERs darstellen. Da EGF neben der Wirkung auf die Tight Junctions auch eine Reihe von Wachstumsimpulsen vermittelt, ist zudem davon auszugehen, dass die Zellen bei ERBB1-Inhibition vermehrt Apoptose einleiten, was sich ebenfalls im TEER widerspiegelt.

Um eine Induktion der Zellproliferation durch EGF zu überprüfen, wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Mit einem MTT-Assay kann die metabolische Aktivität und Proliferation von Zellen bestimmt werden. Die Analyse zeigte eine Zunahme der Zellproliferation durch EGF, allerdings nur in männlichen FDLE-Zellen (Abb. 9). Dem entgegen wiesen weibliche FDLE-Zellen keine Änderung der metabolischen Aktivität auf. Daher zeigt EGF einen geschlechtsspezifischen Einfluss auf die Zellproliferation und wirkt verstärkt auf männliche ATII-Zellen.

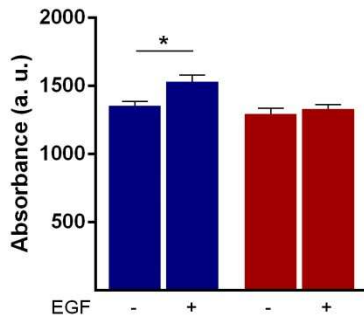


Abb. 9 EGF steigert die Proliferation in männlichen FDLE-Zellen. Mittels MTT-Test wurde die metabolische Aktivität der Zellen mit und ohne Zugabe von EGF (10 ng/ml) bestimmt. In männlichen Zellen wurde, im Gegensatz zu weiblichen, eine erhöhte Stoffwechselaktivität durch EGF induziert. Mittelwert + SEM, n = 6; T-Test: * $p \leq 0,05$. Blau = male; Rot = female.

Im nächsten Versuch sollte geklärt werden, über welche Signalkaskade EGF wirkt. Dafür wurde die Phosphorylierung zweier prominenter Kinasen – der Proteinkinase B (AKT) und ERK – gemessen. AKT steht dabei für den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Signalweg, der unter anderem Proliferation, Migration oder Differenzierung vermittelt. ERK ist ein wichtiger Bestandteil des MAP-Kinase Signalwegs (*mitogen-activated protein*), der ebenfalls an der Proliferation und Differenzierung sowie der Apoptose beteiligt ist. Western Blot Messungen zeigten, dass EGF vor allem den ERK-vermittelten MAP-Kinase Signalweg induziert. In weiblichen FDLE-Zellen konnte außerdem eine signifikante Aktivierung des PI3K Signalwegs gezeigt werden. In vorangegangenen Studien zeigte sich bei einem aktivierten PI3K-Signalweg auch eine erhöhte ENaC-Aktivität [9]. Schlussfolgernd könnte die Aktivierung des Signalwegs in weiblichen ATII-Zellen die auf den ENaC hemmende Wirkung des MAPK-Wegs möglicherweise wenigstens zum Teil aufheben.

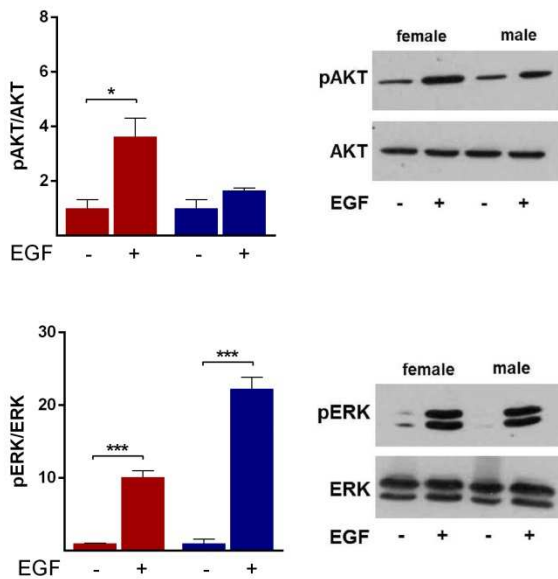


Abb. 10: EGF vermittelt seine Wirkung vor allem über den MAPK-Weg. Für Western Blot Analysen wurden weibliche und männliche FDLE-Zellen für 24 h serumfrei kultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von EGF (10 ng/ml) für 15 min, gefolgt von der Zellyse mit RIPA-Puffer und Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE. Detektiert wurde phosphoryliertes AKT (pAKT) bzw. pERK sowie jeweils AKT bzw. ERK als Totalprotein. In der statistischen Auswertung wurde pAKT auf AKT normiert und pERK auf ERK. Mittelwert + SEM, n = 3; T-Test: * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$. Blau = male; Rot = female.

Insgesamt konnten bei zwei Faktoren geschlechtsspezifische Unterschiede gemessen werden: NRG1 und EGF. Jedoch ist unklar, ob diese Unterschiede allein für die geschlechtsspezifischen Unterschiede zwischen serumfreier und serumhaltiger Zellkultivierung verantwortlich sind.



5. Schwierigkeiten im Verlauf des Projekts

Im Verlauf des Projekts wurden wir mit verschiedenen Schwierigkeiten konfrontiert. Bereits im ersten Abschnitt des Projekts, nämlich der Konzentrationsbestimmung der Wachstumsfaktoren im Serum durch Multiplex ELISA bzw. durchflusszytometrische Methoden, konnte die geplante Durchführung aufgrund fehlender geeigneter Antikörper für Faktoren bovinen Ursprungs nicht durchgeführt werden. Hinzu kamen Schwierigkeiten beim Nachweis von Membranproteinen, wie dem EGF-Rezeptor, mittels Western Blot. Zwar sind EGF-Rezeptor-spezifische Antikörper gegen Ratte kommerziell erhältlich, diese konnten jedoch kein Signal erbringen, möglicherweise da es sich um die erste Antikörpercharge (Lot 1) handelte und wenig Erfahrung auch firmenseitig vorlag. Ähnliche Probleme zeigten sich beim Nachweis der membranständigen ENaC-Untereinheiten auf Proteinebene, wofür inzwischen spezielle Aufreinigungsmethoden etabliert werden konnten, die in künftigen Projekten zuverlässig quantifizierbare Daten liefern.

Die größten Schwierigkeiten stellen jedoch die Versuche mit Inhibitoren dar, die sich negativ auf die ENaC-Aktivität auswirken, obwohl das Gegenteil erwartet wurde. Gründe hierfür sind vielfältig, so wirken einige verwendete Inhibitoren, beispielsweise AG1478, nicht spezifisch auf eine Untereinheit des Rezeptors (ERBB1), sondern auf verschiedene (ERBB1, ERBB2), die durch Dimerisierung mit anderen ERBB-Proteinen verschiedene Rezeptoren bilden können, deren Signalkaskaden dann ebenfalls blockiert werden. So kann nicht eindeutig bestimmt werden, welche Hemmung die ENaC-Aktivität mindert. Ebenfalls ist es möglich, dass essentielle Überlebenssignale, vermittelt durch andere Liganden der Rezeptoren, blockiert werden und der reduzierte ΔI_{amil} aus beginnender Apoptose resultiert. Da die Membranintegrität nach Zugabe der Inhibitoren ebenfalls sinkt, ist dieser Fall als sehr wahrscheinlich anzusehen. So konnte in dem Projekt zwar die Wirkung der einzelnen Faktoren nachgewiesen werden, die Kontrollexperimente mit Inhibition der spezifischen Rezeptoren waren jedoch nicht schlüssig.

6. Ausblick

EGF stellt einen vielversprechenden geschlechtsspezifisch wirkenden Wachstumsfaktor dar, dessen Wirkung weiter quantifiziert werden soll. Um die Inhibitor-Versuche zu wiederholen, sollte ein spezifisch auf den ERBB1 wirkender Inhibitor wie bspw. Erlotinib verwendet werden. Dabei ist zu erwarten, dass die ENaC-Aktivität nach Zugabe des Inhibitors zunimmt verglichen mit der Kontrolle ohne Inhibitor. Ein Aspekt, der ebenfalls beleuchtet werden muss, ist die generelle Protein- und mRNA-Expression des EGF-Rezeptors in männlichen und weiblichen Alveolarzellen ohne vorherige Kultivierung sowie unter serumhaltigen und -freien Bedingungen. Weiterhin muss eine Lösung für die Konzentrationsbestimmung von EGF im fetalen Serum gefunden und die Wirkung auf die Membranintegrität, bzw. die Proliferation weiter untersucht werden, auch dahingehend, welchen Einfluss dies auf die ENaC-Aktivität hat.



References

1. Kaltofen T, Haase M, Thome UH, Laube M (2015) Male Sex is Associated with a Reduced Alveolar Epithelial Sodium Transport. *PLoS one* 10 (8): e0136178.
2. Frank J, Roux J, Kawakatsu H, Su G, Dagenais A et al. (2003) 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. *JBC* 278 (45): 43939–43950.
3. Lazrak A, Chen L, Jurkuvenaite A, Doran SF, Liu G et al. (2012) Regulation of alveolar epithelial Na⁺ channels by ERK1/2 in chlorine-breathing mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46 (3): 342–354.
4. Borok Z, Hami A, Danto SI, Lubman RL, Kim KJ et al. (1996) Effects of EGF on alveolar epithelial junctional permeability and active sodium transport. *Am J Physiol* 270 (4 Pt 1): L559-65.
5. Strandjord TP, Clark JG, Madtes DK (1994) Expression of TGF-alpha, EGF, and EGF receptor in fetal rat lung. *Am J Physiol* 267 (4 Pt 1): L384-9.
6. Minami S, Iwamoto R, Mekada E (2008) HB-EGF decelerates cell proliferation synergistically with TGFalpha in perinatal distal lung development. *Dev Dyn* 237 (1): 247–258.
7. Fraslon C, Bourbon JR (1992) Comparison of effects of epidermal and insulin-like growth factors, gastrin releasing peptide and retinoic acid on fetal lung cell growth and maturation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1123 (1): 65–75.
8. Tang X, Liu H, Yang S, Li Z, Zhong J et al. (2016) Epidermal Growth Factor and Intestinal Barrier Function. *Mediators Inflamm* 2016: 1927348.
9. Mattes C, Laube M, Thome UH (2014) Rapid elevation of sodium transport through insulin is mediated by AKT in alveolar cells. *Physiol Rep* 2 (3): e00269.

Leipzig, den 29. Januar 2019

Dr. Mandy Laube

Prof. Dr. Ulrich Thome