

Förderpreis der GPA 2025 – Hintergrund

Expressionsanalyse von Aquaporinen im nasalen Atemwegsepithel bei Kindern und Jugendlichen mit allergischer Rhinitis

Hintergrund und eigene Vorarbeiten

Allergische Atemwegserkrankungen haben in Deutschland unter Kindern und Jugendlichen eine hohe Prävalenz, circa 10% sind von einer allergischen Rhinitis (AR), ca. 4% von einem allergischen Asthma bronchiale betroffen (Tamm et al., 2018). Die kontinuierliche Verbesserung der Therapie allergischer Atemwegserkrankungen und die Entwicklung zielgerichteter Therapieansätze erfordert das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen, um neue therapeutische Targets identifizieren zu können.

In einem translationalen Forschungsansatz in Kooperation mit dem Institut für Allgemeine Physiologie der Universität Ulm soll die Rolle transepithelialer Wasserkanäle, sogenannter Aquaporine, bei inflammatorischen Atemwegserkrankungen – in dem vorgestellten Teilprojekt speziell bei allergischer Inflammation, untersucht werden.

Die Oberfläche der Atemwege ist mit dem respiratorischen Epithel ausgekleidet, dem eine dünne Flüssigkeitsschicht, das sogenannte airway-surface-liquid (ASL) aufliegt. Die exakte Volumeneinstellung des ASL ist essentiell für respiratorische Funktionen wie die Filterung und Anfeuchtung der Atemluft, effektiven mukoziliären Transport und Gasaustausch. Die Regulation des ASL-Volumens erfolgt durch aktiven Ionentransport über das Epithel, dem Wasser osmotisch nachfolgt. Lange Zeit ging man davon aus, dass die ASL-Einstellung ausschließlich durch die Regulation des Ionentransportes gesteuert wird (Chambers et al., 2007; Kunzelmann et al., 2012). In eigenen Vorarbeiten konnten wir jedoch zeigen, dass für die ASL-Einstellung auch Aquaporine (AQP), die als Wasserkanäle den transepithelialen Wassertransport erleichtern, entscheidend sind (Schmidt et al., 2017). Im humanen respiratorischen Epithel sind vor allem AQP3, 4, und 5 exprimiert (Kreda et al., 2001). In Vorarbeiten zeigte sich, dass AQP3 für kompensatorische Volumenresorption notwendig ist (Schmidt et al., 2017). Veränderte AQP-Expression bei allergischer Inflammation wurde im Tiermodell für Asthma bronchiale (Sharif et al., 2022; Ikezoe et al., 2016) sowie in humanem nasalen Gewebe von Erwachsenen mit allergischer Rhinitis beschrieben (Seno et al., 2012).

In weiteren Vorarbeiten haben wir die Auswirkungen des Th2-Zytokins Interleukin-13 (IL-13) auf humanes Trachealepithel in-vitro umfassend untersucht. Hierbei zeigte sich neben einer Störung der Barrierefunktion durch die Internalisierung von tight junction Proteinen (Schmidt et al., 2019) und Modulation der Mukussekretion (Winkelmann et al., 2019) interessanterweise auch eine verminderte Expression von AQP3 und 5 sowie eine Depletion des ASL Volumens (unpublizierte Daten).

Die funktionelle Rolle von AQP für die Pathophysiologie allergischen Atemwegserkrankungen ist jedoch weitgehend unklar. Neben dem transepithelialen Flüssigkeitstransport gibt es Hinweise, dass AQP auch durch Modulation der Mucussekretion pathophysiologisch relevant sind (Wang et al., 2007).

Wir untersuchen in diesem Projekt den Zusammenhang zwischen Inflammation und der AQP-Expression am nasalen respiratorischen Epithel in einem pädiatrischen Kollektiv. Hierbei sollen in einem Teilprojekt Kinder- und Jugendliche mit allergischer Rhinitis untersucht werden. Da inflammatorische Atemwegserkrankungen zu einem Epithelremodelling führen und die AQP-Expression möglicherweise von der zellulären Zusammensetzung des Epithels abhängt, soll dies mitberücksichtigt werden.

Projektziel

Übergeordnetes Ziel unserer Forschungsarbeit ist es, die epithelialen Pathomechanismen allergischer und anderer inflammatorischer Atemwegserkrankungen besser zu verstehen und dadurch neue Forschungsansätze für zielgerichtete Therapien zu entwickeln. Wir gehen davon aus, dass AQP pathophysiologisch hierbei eine relevante Rolle spielen und perspektivisch interessante therapeutische Targets darstellen könnten.

Das vorgestellte konkrete Teilprojekt hat zum Ziel, Veränderungen der AQP-Expression im nasalen respiratorischen Epithel von Kindern- und Jugendlichen mit AR zu identifizieren.

Hypothesen

Hypothesen des Projektes sind:

1. AR führt zu einem veränderten Inflammationsprofil in einer nasalen Lavage
2. AR führt zu veränderter Expression der AQP3, 4 und/oder 5 im nasalen respiratorischen Epithel
3. AR führt zu einem epithelialen remodelling mit veränderter Zusammensetzung der Zelltypen des nasalen Epithels

Studienkonzept

Die Fragestellung wird an einem pädiatrischen Kollektiv mit 10-12 Kindern- und Jugendlichen zwischen 4 und 16 Jahren mit ärztlich diagnostizierter, symptomatischer allergischer Rhinitis untersucht. Als Kontrollgruppe dienen 10-12 altersgematchte gesunde Probanden (HC=healthy controls). Zur Teilnahme

eingeladen werden Patienten, die sich im Rekrutierungszeitraum von 6-12 Monaten aus medizinischer Indikation in der Ambulanz für Kinderpneumologie, -allergologie & Mukoviszidose des Universitätsklinikums Ulm vorstellen und definierte Einschlusskriterien erfüllen. Vor Beginn der Studie wird ein Ethikvotum der lokalen Ethikkommission eingeholt.

Die Studienteilnehmer werden einmalig untersucht. Bei Probanden mit saisonaler AR wird ein Zeitpunkt, zudem typische Symptome der AR bestehen, gewählt.

Zur Probengewinnung wird zunächst eine nasale Spülung mit isotoner Kochsalzlösung durchgeführt, danach erfolgt eine nasale Bürstenbiopsie im Bereich der unteren Nasenmuscheln. Die Proben werden nach der Gewinnung in geeigneter Weise gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt für experimentelle Arbeiten verwendet.

Experimentelles Arbeitsprogramm:

Hypothese 1:

Bei den Studienteilnehmern aller Gruppen wird eine nasale Lavage mit NaCl 0,9% durchgeführt und die Lavageflüssigkeit aufgefangen. In diese wird mittels ELISA-Essays die Konzentration inflammatorischer Mediatoren bestimmt, um das jeweilige Inflammationsprofil zu charakterisieren.

Folgende Mediatoren werden voraussichtlich untersucht: TNF alpha, IFN γ , Interleukin (IL)-1 β , IL2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, HE4, G-CSF, GM-CSF

Hypothese 2:

Es wird eine nasale Bürstung an der unteren Nasenmuschel durchgeführt, um respiratorisches Epithel zu gewinnen. Das gewonnene Zellmaterial wird zum Teil auf Objektträger ausgestrichen. Mittels Immunzytochemie für AQP3, 4 und 5 und Gegenfärbung der basolateralen Zellmembran mit der Na⁺/K⁺-ATPase wird der Anteil der AQP-positiven Zellen und deren Lokalisation in der Zelle bestimmt.

Der Rest des gewonnenen Zellmaterials wird lysiert und bei -80°C asserviert. Hieraus wird die Expression der AQP mittels RT-PCR quantitativ bestimmt.

Hypothese 3:

Das gewonnene Zellmaterial aus der nasalen Bürstung (siehe Hypothese 2) wird zum Teils für zusätzliche Färbungen auf Objektträger ausgestrichen. Mittels Immunzytochemie werden Marker verschiedener epithelialer Zelltypen angefärbt, um zilierte Zellen (Marker: Tubulin, FOXJ1), Mucus-produzierende Zellen (MUC5AC), Ionocytes (FOXI1) und Basalzellen (p63) zu differenzieren. Der Anteil nicht-epithelialer Zellen wird durch

Der Rest des gewonnenen Zellmaterials wird wie bei Hypothese 2 beschrieben für RT-PCR Experimente verwendet. Hier wird die Expression der Zelltypmarker quantitativ bestimmt (voraussichtlich verwendete Marker: Tubulin, FOXI1, FOXJ1, MUC5AC, MUC5B, p63)

Finanzierungsplan

Von dem Förderpreis sollen anteilig Sachmittel wie folgt finanziert werden:

RT-PCR-Reagenzien ca. 800 Euro

ELISA-Kits ca. 2500 Euro

Antikörper ca. 1700 Euro

Gesamt: 5.000 Euro

Die übrigen Kosten für Personal- und Sachmittel zur Projektfinanzierung sind durch anderweitige Drittmittel abgedeckt.

Literatur

Schlaud M, Atzpodien K, Thierfelder W. Allergische Erkrankungen. Ergebnisse aus dem Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS) [Allergic diseases. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS)]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2007;50(5-6):701-710.

Chambers LA, Rollins BM, Tarran R. Liquid movement across the surface epithelium of large airways. Respir Physiol Neurobiol. 2007;159(3):256-270.

Chen L, A Hoefel G, Pathinayake PS, et al. Inflammation-induced loss of CFTR-expressing airway ionocytes in non-eosinophilic asthma. Respirology. 2025;30(1):25-40

Kreda SM, Gynn MC, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE. Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001;24(3):224-234.

Kunzelmann K, Schreiber R. Airway epithelial cells--hyperabsorption in CF?. Int J Biochem Cell Biol. 2012;44(8):1232-1235.

Ikezoe K, Oga T, Honda T, et al. Aquaporin-3 potentiates allergic airway inflammation in ovalbumin-induced murine asthma. Sci Rep. 2016;6:25781. Published 2016 May 11.

Schmidt H, Michel C, Braubach P, et al. Water Permeability Adjusts Resorption in Lung Epithelia to Increased Apical Surface Liquid Volumes. Am J Respir Cell Mol Biol. 2017;56(3):372-382.

Schmidt H, Braubach P, Schilpp C, et al. IL-13 Impairs Tight Junctions in Airway Epithelia. Int J Mol Sci. 2019;20(13):3222

Sharif M, Anjum I, Shabbir A, et al. Amelioration of Ovalbumin-Induced Allergic Asthma by Juglans regia via Downregulation of Inflammatory Cytokines and Upregulation of Aquaporin-1 and Aquaporin-5 in Mice. J Trop Med. 2022;2022:6530095. Published 2022 Mar 30.

Seno S, Ogawa T, Shibayama M, Kouzaki H, Shimizu T. Expression and localization of aquaporin 1, 2, 3, 4, and 5 in human nasal mucosa. *Am J Rhinol Allergy*. 2012;26(3):167-171.

Thamm R, Poethko-Müller C, Hüther A, Thamm M. Allergic diseases in children and adolescents in Germany. Results of the cross-sectional KiGGS Wave 2 study and trends. *J Health Monit*. 2018;3(3):3-16. Published 2018 Sep 19.

Wang K, Feng YL, Wen FQ, et al. Decreased expression of human aquaporin-5 correlated with mucus overproduction in airways of chronic obstructive pulmonary disease. *Acta Pharmacol Sin*. 2007;28(8):1166-1174.

Winkelmann VE, Thompson KE, Neuland K, et al. Inflammation-induced upregulation of P2X4 expression augments mucin secretion in airway epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019;316(1):L58-L70.7.