UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Direktor: Prof. Dr. Christian Zöllner

Analyse von *S. pneumoniae*-abhängigen Phänomenen an Purinrezeptor $P2Y_2$ in Alveolarepithelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Bastian Koch
aus Bad Oldesloe

Hamburg 2019

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.09.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Rainer Kiefmann

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **7**
1.1 Purinrezeptoren . . . 9
1.2 *S. pneumoniae* . . . 11
1.3 Fragestellung dieser Dissertation . . . 12

2 Material und Methoden **14**
2.1 Material . . . 14
2.1.1 Zellkultur . . . 14
2.1.2 Anzucht von *E. coli* (DH5α) . . . 16
2.1.3 Anzucht von *S. pneumoniae* . . . 16
2.1.4 Verwendete Bakterien . . . 16
2.1.5 Verwendete Kits . . . 17
2.1.6 Enzyme . . . 17
2.1.7 Plasmide . . . 17
2.1.8 Western-Blot . . . 18
2.1.9 Substanzen Calciumimaging . . . 19
2.1.10 Geräte . . . 20
2.1.11 Software . . . 21
2.2 Methoden . . . 22
2.2.1 Vorbereitung der Agarplatten . . . 22
2.2.2 Transformation von kompetenten *E. coli* . . . 22
2.2.3 Anzucht von *S. pneumoniae* . . . 23
2.2.4 Anzucht von *Pseudomonas aeruginosa* . . . 23
2.2.5 Zellkultur . . . 24
2.2.5.1 Zellen einfrieren . . . 24
2.2.5.2 Zellen auftauen . . . 24
2.2.5.3 Polylysinierung von 2-well Zellkulturkammern und T-75 Zellkulturflaschen . . . 24
2.2.5.4 Trypsinierung von T-75 Zellkulturflaschen . . . 25
2.2.5.5 Zellzählung . . . 25
2.2.5.6 Transfektion . . . 25
2.2.6 De novo Vektor-Klonierung . . . 27
2.2.6.1 RNA-Isolierung aus A549-Zellen . . . 27
2.2.6.2 Copy-DNA-Synthese . . . 28
2.2.6.3 PCR zur Amplifizierung von $P2Y_2$-dsDNA mit Restriktionsstellen . . . 28
2.2.6.4 Isolierung von $P2Y_2$-DNA aus PCR-Reaktionsansatz . . . 30
2.2.6.5 DNA-Isolierung aus Agarosegel . . . 30
2.2.6.6 Klonieren des neuen Vektors . . . 31
2.2.6.7 Doppelter Restriktionsverdau . . . 31

2.2.6.8 Isolierung der DNA . . . 31
2.2.6.9 Ligierung von Insert und Vektor . . . 31
2.2.6.10 Transformation und Isolierung der DNA . . . 32
2.2.6.11 Erfolgskontrolle der Ligation . . . 32
2.2.6.12 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA in wässriger Lösung 33
2.2.7 Herstellung einer $P2Y_2$-Mutante zur Untersuchung von vermuteten Phosphorylierungsstellen . . . 34
2.2.8 Klonierung von $P2Y_2$-GFP-Rezeptoren für eine stabile lentivirale Transduktion . . . 36
2.2.8.1 Primerdesign . . . 36
2.2.8.2 PCR-Ansatz . . . 37
2.2.8.3 Isolierung und Aufreinigung des PCR-Produktes . . . 38
2.2.8.4 Doppelter Restriktionsverdau für Klonierung . . . 38
2.2.8.5 Ligierung von $P2Y_2$-R-LeGO-iPuro2 . . . 38
2.2.9 Punktmutationen am $P2Y_2$-Rezeptor im LeGO-iPuro2 Vektor . . . 39
2.2.10 Herstellung von Zelllinien, welche die $P2Y_2$-GFP-Rezeptoren stabil exprimieren . . . 39
2.2.11 Calcium-Ratio-Imaging . . . 40
2.2.11.1 Calcium-Versuche mit $P2Y_2$-3A Rezeptormutante . . . 43
2.2.11.2 Calcium-Versuche mit verschiedenen $P2Y_2$-Mutanten . . . 43
2.2.11.3 Calciumversuche mit Inhibitoren . . . 43
2.2.11.4 Kontrollen . . . 46
2.2.11.5 Calciumversuche mit *Pseudomonas aeruginosa* . . . 47
2.2.11.6 Versuche mit Live/Dead Cell staining-Kit II . . . 47
2.2.12 Versuche mit LysoTracker Green (LTG) . . . 47
2.2.13 Spinning-Disk Mikroskopie . . . 48
2.2.13.1 Spinning-Disk-Mikroskopie mit $P2Y_2$-GFP-Rezeptoren und *S. pneumoniae* . . . 50
2.2.13.2 Spinning Disk-Mikroskopie mit LifeAct . . . 50
2.2.14 Phos-tag Western-Blot . . . 52
2.2.14.1 Stimulation von A549-Zellen . . . 53
2.2.14.2 Proteinisolation . . . 54
2.2.14.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen . . . 54
2.2.14.4 Herstellung eines Acrylamid-Phos-tag-Gels . . . 55
2.2.14.5 Elektrophorese . . . 55
2.2.14.6 Gel waschen . . . 55
2.2.14.7 Blotten . . . 56
2.2.14.8 Blocken und Antikörper . . . 56
2.2.14.9 Entwicklung . . . 56
2.2.15 Ko-Kultur von A549- und HUVE-Zellen /Permeabilitätsassay . . . 57
2.2.15.1 Permeabilitätsassay . . . 57

3 Ergebnisse **59**
3.1 Calcium-Imaging . . . 59
3.1.1 Calcium-Versuche mit $P2Y_2$-Rezeptorvarianten und HPAEpi-Zellen . . . 59
3.1.2 Calciumversuche mit $P2Y_2$-Varianten und D39(Δcps) . . . 62

3.1.3 Calciumversuche mit Inhibitoren . . . 64
3.1.3.1 Kinaseinhibitoren . . . 64
3.1.3.2 PKA-Inhibitor H-89 . . . 65
3.1.3.3 PKC-Inhibitor-*Myristoylated* . . . 67
3.1.3.4 Plättchenaktivierender Faktor – Inhibitor WEB2086 . . . 68
3.1.4 Kontrollen Calciumversuche . . . 69
3.1.5 Versuche mit Live/Dead-Kit . . . 70
3.2 Phos-tag Western Blot . . . 72
3.3 Spinning-Disk-Mikroskopie . . . 75
3.3.1 Spinning-Disk-Mikroskopie von GFP-P2Y$_2$-R nach D39 . . . 75
3.3.2 Spinning-Disk-Mikroskopie von GFP-P2Y$_2$-R nach ATP . . . 78
3.3.3 Spinning-Disk-Mikroskopie von GFP-P2Y$_2$-R unter Kontrollbedingungen 80
3.3.4 Spinning-Disk-Mikroskopie von A549-Zellen und markierten D39 . . . 81
3.4 LifeAct-Versuche . . . 82
3.4.1 LifeAct Red . . . 82
3.4.2 LifeAct Green . . . 84
3.5 Surfactantversuche mit Lyso-Tracker Green . . . 86
3.6 Permeabilitätsassay . . . 88
3.6.1 Calciumversuche mit *Pseudomonas aeruginosa* . . . 89
3.7 Stabile Transduktion von A549-Zellen mit GFP-P2Y$_2$-WT . . . 90
3.7.1 FACS-Analyse . . . 90
3.7.2 Spinning-Disk-Mikroskopie . . . 91
3.7.3 Calcium-Ratio-Mikroskopie . . . 92

4 Diskussion **93**
4.1 Diskussion der Methodik . . . 93
4.1.1 Klonierung von GFP-P2Y$_2$-Rezeptorvarianten . . . 93
4.1.2 Herstellung einer Zelllinie, welche GFP-P2Y$_2$ stabil exprimiert . . . 93
4.1.3 Fura2-Ratio-Mikroskopie . . . 93
4.1.4 Spinning-Disk-Mikroskopie . . . 94
4.1.5 Western-Blot mit Phos-tag . . . 94
4.1.6 Ko-Kultur und Permeabilitätsassay . . . 95
4.2 Diskussion der Ergebnisse . . . 95
4.2.1 Fura2-Ratio-Mikroskopie mit HPAEpi-Zellen und P2Y$_2$-Rezeptoren . . . 95
4.2.2 Fura2-Ratio-Mikroskopie mit Inhibitoren . . . 96
4.2.2.1 Kinaseinhibitoren . . . 96
4.2.2.2 Weitere Substanzen . . . 99
4.2.3 Fura2-Ratio-Mikroskopie mit P2Y$_2$-Rezeptoren, Deletion von Phosphorylierungsstellen . . . 99
4.2.4 Phos-tag Western-Blot . . . 100
4.2.5 P2Y$_2$-Rezeptor-Internalisierung . . . 101
4.2.6 LifeAct . . . 102
4.2.7 Surfactant-Versuche . . . 103
4.2.8 Ko-Kultur und Permeabilitätsassay . . . 104
4.2.9 Fura2-Ratio-Mikroskopie mit *Pseudomonas aeruginosa* . . . 104

5 Zusammenfassung und Ausblick **106**
5.1 Ausblick 107
5.2 Summary 109

6 Abkürzungsverzeichnis **110**

7 Literaturverzeichnis **112**

8 Danksagung **116**

9 Lebenslauf **117**

10 Eidesstattliche Versicherung **118**

1 Einleitung

Unsere Lunge ist ein lebenswichtiges Organ, welches im Wesentlichen für den äußeren Gasaustausch zuständig ist. Dabei wird Sauerstoff (O_2) an Hämoglobin (Hb) gebunden, während Kohlendioxid (CO_2) aus dem Blut abgegeben wird. Dieser Gasaustausch findet in den Alveolen statt, die von Alveozyten Typ I und II ausgekleidet sind, wobei die Typ II-Zellen als Progenitorzellen für die Typ I-Zellen betrachtet werden dürfen und die Typ I-Zellen deutlich in der Mehrzahl sind [48].

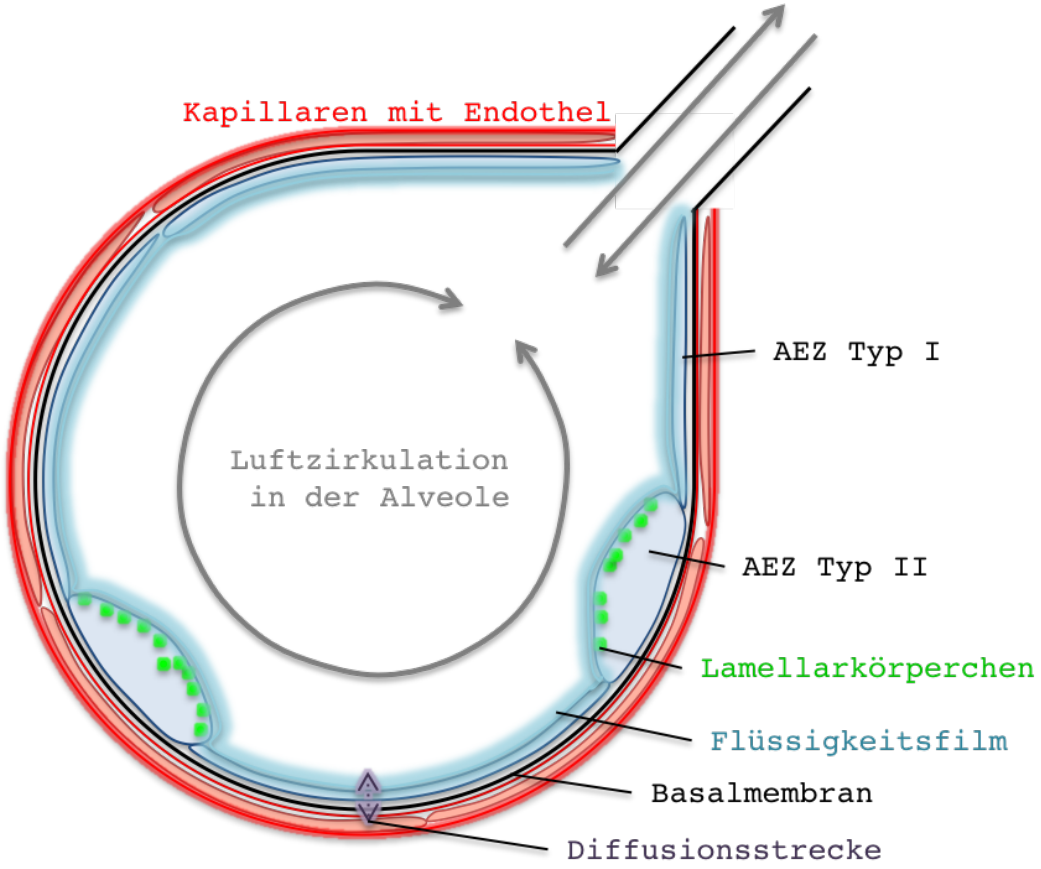

Abb. 1.1. *Schematische Darstellung eines Querschnittes durch eine Alveole. Darstellung von Alveozyten und Andeutung des umgebenden Kapillarbettes mit Diffusionsstrecke.*

Von entscheidender Bedeutung ist die unmittelbare Nähe zwischen Kapillare und Alveolarlumen, um einen guten Gasaustausch zu ermöglichen, da mit zunehemender Distanz die Diffusionsgeschwindigkeit exponentiell abnimmt (zweites Diffusionsgesetz). Die physiologische Diffusionsstrecke beträgt 0,2-1 μm. Pathologien wie z.B. ein Lungenödem, das während einer Lungenentzündung auftreten kann, aber auch Prozesse, die mit einem fibrotischen Umbau der Lunge einhergehen, wie eine COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung), vergrößern den Abstand zwischen Alveolarlumen und Kapillare. Dabei wird oftmals zunächst nur der Sauerstoffaustausch gestört, da Kohlendioxid leichter wasserlöslich ist und besser diffundieren kann. Erst wenn die Pathologien ausgeprägter werden, kommt es zu einer respiratorischen Globalinsuffizienz, die sich durch einen niedrigen O_2-Partialdruck und einen erhöhten CO_2-Partialdruck im arteriellen Blut zeigt. Akut geht dies mit einer potentiell lebensbedrohlichen Azidose einher, da CO_2 zu Kohlensäure umgewandelt wird [9], [26].
Damit die epitheliale Barriere ungestört funktionieren kann, unterhalten die Alveozyten (Typ II) wichtige Mechanismen, die unter anderem über den Purinrezeptor $P2Y_2$ gesteuert werden: Hierzu gehört die Flüssigkeitsreabsorption in der Alveole, die über apikale Natrium-Kanäle (ENaC) und die Na^+/K^+-ATPase ermöglicht wird. Natriumionen aus dem Alveolarlumen werden über die ENaC ins Zellinnere transportiert und über die Na^+/K^+-ATPase wieder nach extrazellulär, um das Membranpotential stabil zu halten. Zusammen mit den Natriumionen strömt osmotisch Wasser mit [17].
Ein weiterer Vorgang, der über den Purinrezeptor $P2Y_2$ vermittelt wird, ist die Surfactantsekretion. Surfactant ist ein Lipoproteingemisch, das von Alveozyten Typ II in Lamellarkörperchen gespeichert wird und bei einem zytosolischen Calciumsignal per Exozytose ins Alveolarlumen transportiert wird. Es setzt die Oberflächenspannung in der Alveole herab, die ansonsten durch den in der Lunge herrschenden Gewebedruck kollabieren würde. Surfactantmangel oder -dysfunktion führen zu Atelektasen, die die Ventilation innerhalb der Lunge behindern und so den Gasaustasch empfindlich stören können. Weiterhin spielt $P2Y_2$-R eine wichtige Rolle bei der Schleimproduktion und der Zilienmotilität und beeinflusst so die Effektivität der mukoziliären clearance [22], [24].

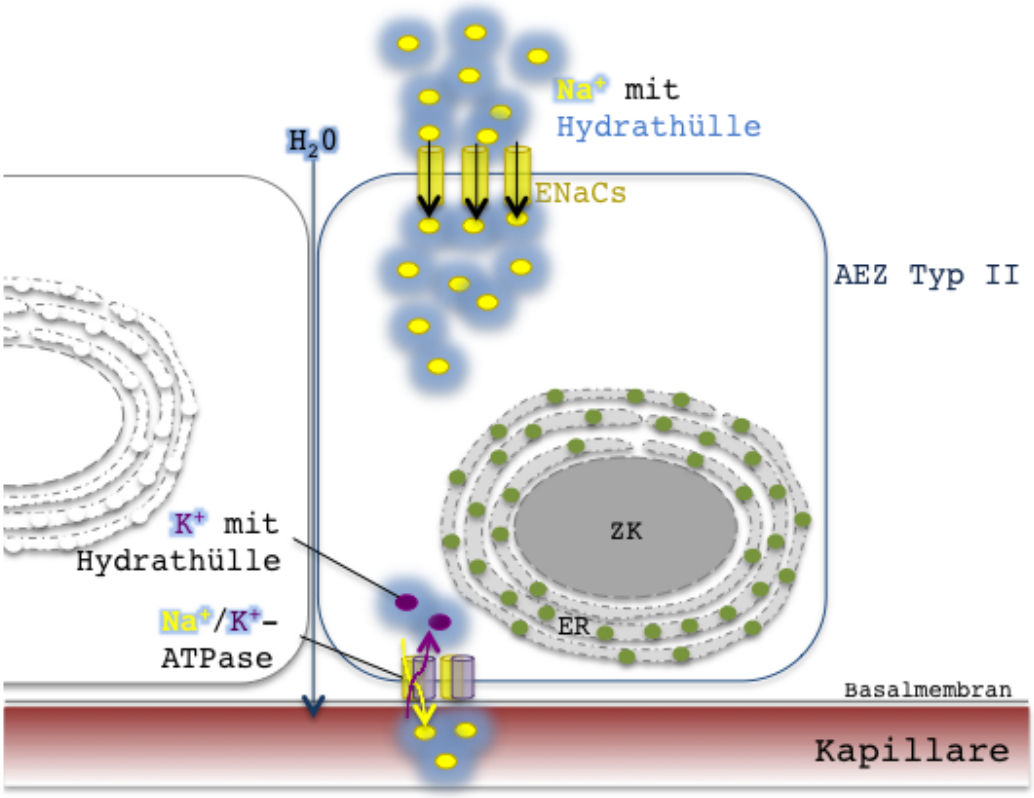

Abb. 1.2. *Schematische Darstellung eines Alveozyten Typ II mit ENaC und Na^+/K^+-ATPase. Darstellung von Natrium- und Wassertransport*

1.1 Purinrezeptoren

Purinrezeptoren sind eine heterogene Gruppe von membranständigen Rezeptoren. Sie spielen in fast allen eukaryotischen Zellen eine große Rolle und sind Ziel vieler Forschungsarbeiten auf diversen Gebieten.

Purinrezeptoren teilen sich in zwei Gruppen auf: die ionotropen P2X-Rezeptoren, die bei Ligandenbindung (hier im Beispiel Adenosintriphosphat (ATP)) einen offenen Ionenkanal bilden und Calcium per Diffusion von extra- nach intrazellulär strömen lassen, sowie die metabotropen P2Y-Rezeptoren, die G-Protein gekoppelt, einen zytosolischen Calciumeinstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) bewirken. Hierbei wird die membranständige Phospholipase C (PLC) aktiviert, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) aus der Zellmembran in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP_3) spaltet. Das IP_3 dient als Ligand an membranständigen Calciumkanälen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und bewirkt dort eine Öffnung, sodass Calcium dem Diffusionsgradienten folgend ins Zytosol einströmen kann. Außerdem aktiviert IP_3 die Proteinkinase C, welche eine wichtige Rückkoppelung darstellt, indem diese den metabotropen Purinrezeptor durch Phosphorylierungen inaktiviert und

das Signal beendet. In beiden Fällen - bei P2X- oder P2Y-Rezeptoren - führt der Ligandenkontakt zur zytosolischen Calcium-Erhöhung, die eine Reihe weiterer Signaltransduktionen nach sich zieht.

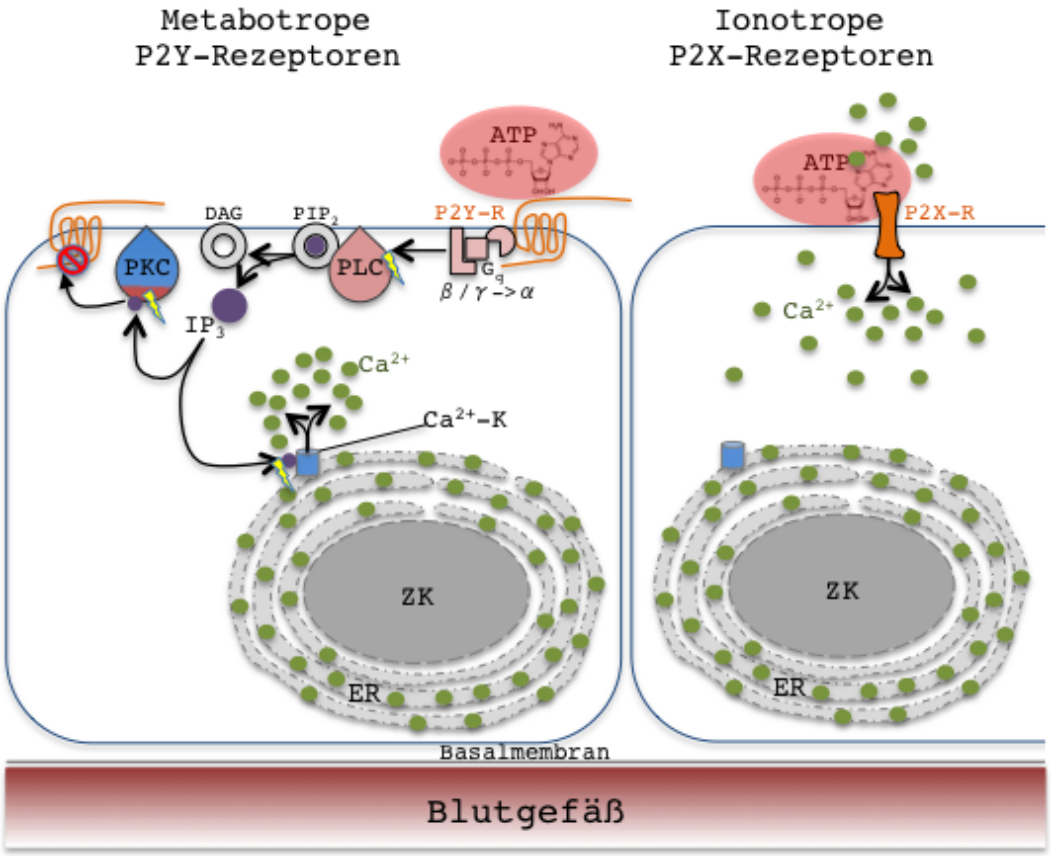

Abb. 1.3. *Schematisch vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion von metabotropen P2Y-Rezeptoren auf der linken und ionotropen P2X-Rezeptoren auf der rechten Seite am Beispiel von Alveozyten Typ II, modifiziert nach [18].*

In dieser Dissertationsschrift sind Alveolarepithelzellen Typ II von besonderem Interesse. Der $P2Y_2$-Rezeptor spielt am Alveolarepithel eine wichtige Rolle bei der Surfactantsekretion und bei der Flüssigkeitsreabsoption.

1.2 *S. pneumoniae*

Streptokokkus pneumoniae zählt zu den häufigsten Erregern einer Pneumonie weltweit. Insbesondere Kinder unter fünf Jahren sowie ältere Menschen und solche mit chronischen Leiden sind gefährdet. Dabei tragen viele Menschen den Erreger asymptomatisch im Nasopharynx. Erst wenn das Immunsystem geschwächt ist oder die natürlichen Barrieren, wie eine intakte Schleimhaut, lädiert sind, kommt es zur Infektion. Besonders gefürchtet sind die durch *S. pneumoniae* ausgelöste Meningitis, sowie die Sepsis. Gerade im Säuglings- und Kleinkindesalter zählt *S. pneumoniae* zu den häufigsten Erregern einer Meningitis mit nicht selten schweren, bleibenden Folgen wie Krampfleiden, Schwerhörigkeit, Sehstörungen und Lernbehinderungen. In Entwicklungsländern ist *S. pneumoniae* sogar der häufigste Erreger der sogenannten Late-Onset-Meningitis, die ab einer Woche post partum auftritt [30], [16].
Ebenso ist eine Pneumokokkenimpfung verfügbar, wobei es einen konjugierten Impfstoff für Säuglings- und Kleinkinder und einen Polysaccharid-Impfstoff für Erwachsene gibt, der v.a. Personen über 60 Jahren, sowie bei chronischen Leiden oder geschwächter Immunabwehr empfohlen wird. Beide Impfstoffe haben eine entsprechende Empfehlung durch das Robert-Koch-Institut (RKI) [39].
Kommt es dennoch zu einer Infektion mit *S. pneumoniae*, sind Penicilline oder Erythromycin in der Regel gut wirksam, wobei in letzter Zeit vermehrt Resistenzen beobachtet werden [43]. Die Klassifizierung der bislang bekannten 91 Serotypen richtet sich nach den verschiedenen Oberflächenantigenen, bestehend aus Polysacchariden, die sich bei *S. pneumoniae* in der Kapsel befinden. Dadurch werden die Antigene auf der Oberfläche larviert, was einen Schutz vor Phagozytose durch Makrophagen zur Folge hat. Für diese Fälle von bekapselten Erregern, wie *S. pneumoniae*, *N. meningitidae* oder *H. influenzae*, gibt es milzständige Makrophagen, die auf die Abwehr dieser Erreger spezialisiert sind. Die Kapsel der Bakterien ist also ein Virulenzfaktor, der bei der Pathogenität eine wichtige Rolle spielt.
Kommt es zu einer Infektion mit S. pneumoniae, ist zu beobachten, dass die Kapsel zunächst abgebaut wird, bevor es zu einer bakteriellen Adhärenz an die Wirtszelle kommen kann. In dieser Arbeit wurde vorwiegend ein kapseldefizienter *S. pneumoniae*-D39–Stamm verwendet (D39(Δcps)), da die physiologische Degradation der Kapsel unter den in vitro-Bedingungen des hier verwendeten Infektionsmodells nicht ausreichend erfolgen konnte. Dadurch wäre die zelluläre Adhärenz deutlich vermindert gewesen und damit die durch *S. pneumoniae*-induzierten Effekte entsprechend abgeschwächt und nur schwer zu untersuchen.

1.3 Fragestellung dieser Dissertation

Es ist bekannt, dass in Alveolarepithelzellen (AEZ) der metabotrope Purinrezeptor $P2Y_2$ bei Überstimulation mit seinem natürlichen Agonisten ATP inaktiviert wird.
Dies wird durch die Proteinkinase-C vermittelt, welche den Rezeptor an drei Stellen phosphoryliert: Serin an Position 243, Tyrosin an Position 344 und Serin an Position 356. Dadurch wird der Rezeptor inaktiviert und im Folgenden von der Zellmembran ins Zytosol transloziert.
Der Purinrezeptor $P2Y_2$ ist ein zellmembranständiger 7TM-Rezeptor und der Beginn einer Signaltransduktion, welche in AEZ u.a. die Surfactantsekretion, die Flüssigkeitsbarriere in der Alveole und den Aktinaufbau moduliert.

In Vorversuchen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Präinkubation von AEZ mit *S. pneumoniae* zu einer Unterdrückung des ATP-induzierten Calciumsignals führt. *S. pneumoniae* ist von besonderem Interesse, da dieses Bakterium der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie ist.

Noch ist unklar, wie diese Unterdrückung zustande kommt. Denkbar ist, dass die Inkubation mit *S. pneumoniae* dazu führt, dass die AEZ so geschädigt werden, dass sie nicht mehr in der Lage sind, ein Calciumsignal zu generieren. Dies könnte beispielsweise durch Freisetzung freier Radikale der Fall sein.
Es könnte auch sein, dass die Inkubation der AEZ mit *S. pneumoniae* zu einer vergleichbaren Phosphorylierung am $P2Y_2$-Rezeptor führt, wie der natürliche Agonist ATP dies über die PKC bewirkt.
Möglicherweise gibt es auch alternative Signalwege über weitere Proteinkinasen, die ähnliche Motive phosphorylieren, wie bspw. die PKA.
Ob Phosphorylierungen am $P2Y_2$-Rezeptor ursächlich für die oben beschriebene Unterdrückung des Calciumsignals sind, bisher ebenfalls ungeklärt. Möglich wäre, dass *S. pneumoniae* umfassend in den Zellstoffwechsel eingreift und so intrazelluläre Signalwege modifiziert werden.
Weiterhin ist unklar, ob es während der Inkubation zu einer parakrinen Stimulation am $P2Y_2$-Rezeptor durch ATP kommt und dieser so inaktiviert wird.
Zudem ist eine funktionelle Inaktivierung des Rezeptors durch Translokation ins Zytosol möglich.
Um diese Möglichkeiten zu untersuchen, soll der $P2Y_2$-Rezeptor für die geplanten Versuche möglichst isoliert betrachtet werden. Hierzu soll dessen Gensequenz in einen Vektor kloniert und mit einem Fluoreszenz-tag versehen werden. Zudem sollen Varianten dieses rekombinanten Proteins hergestellt werden, bei dem die Phosphorylierungsstellen der PKC teilweise oder vollständig deletiert sind. Durch Transfektion von AEZ mit dem Vektor soll das rekombinante Protein hergestellt werden.
Mittels Calcium-Ratio-Mikrosokopie sollen die Rezeptorvarianten anhand ihres zytosolischen

Calciumsignals vergleichend untersucht werden, wobei diese mit ATP stimuliert werden und teilweise mit *S. pneumoniae* vorbehandelt sein sollen. Weiterhin soll getestet werden, ob verschiedene Kinaseinhibitoren einen Einfluss auf den durch *S. pneumoniae* bedingten Ausfall des zytosolischen Calciumsignals haben. In Kontrollversuchen sollen freie Radikale und ATP im Überstand der Zellen, die während der Inkubation mit *S. pneumoniae* auftreten könnten, möglichst eliminiert werden. Eine möglicherweise auftretende Translokation des $P2Y_2$-Rezeptors soll durch eine rekombinante Variante des Rezeptors in Verbindung mit dem GFP-tag fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. Ob die Inkubation von Alveolarepithelzellen mit *S. pneumoniae* eine Phosphorylierung am $P2Y_2$-Rezeptor bewirkt, soll mit einer Variante eines Western-Blots untersucht werden, die speziell zur Detektion von Phosphorylierungen an Proteinen entwickelt wurde.

Weiterhin soll untersucht werden, ob die Inaktivierung des $P2Y_2$-Rezeptors durch *S. pneumoniae* auch funktionelle Veränderungen zeigt, sodass die über den Rezeptor normalerweise mitbedingten Aufgaben, wie bspw. die Surfactantsekretion, Aufbau von Aktinstrukturen, oder die Flüssigkeitsreabsorption, inhibiert werden.
Für Aktinstrukturen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, diese darzustellen. Hier sollen Versuche durchgeführt werden, bei denen AEZ mit ATP oder *S. pneumoniae* stimuliert werden, welche mit LifeAct transient transfiziert wurden. LifeAct ist ein Protein, welches sich an Aktinstrukturen anlagert und mit einem verbundenen Fluoreszenzprotein mikroskopisch sichtbar macht, wobei der Auf- und Abbau von Aktinfilamenten nicht beeinflusst wird.
Eine mögliche Veränderung der Surfactantsekretion soll durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen an Zellen untersucht werden, bei denen die Lysosomen markiert wurden. Eine Stimulation der Zellen mit ATP soll mit einer Versuchsgruppe anhand der Floureszenzintensität im Verlauf verglichen werden, in der die Zellen vorab mit *S. pneumoniae* inkubiert wurden.
Für Versuche zur Untersuchung der Flüssigkeitsbarriere von AEZ soll ein Modell einer Alveole entwickelt werden, bei dem ein Zell-Bilayer, bestehend aus AEZ einerseits und Endothelzellen andererseits, gebildet wird. Die Durchlässigkeit soll durch eine Substanz gemessen werden, welche auf beiden Seiten des Zell-Bilayers unabhängig voneinander quantitativ gemessen werden kann. Mögliche Veränderungen sollen durch Stimulation mit ATP oder *S. pneumoniae* herbeigeführt und anschließend verglichen werden.

Ob die Unterdrückung des zytosolischen Calciumsignals ein spezifischer Effekt von *S. pneumoniae* ist, ist ebenfalls ungeklärt. Um dies weiter zu untersuchen, soll *Pseudomonas aeruginosa*, ein weiteres bekapseltes Bakterium, welches den Respirationstrakt befallen kann, vergleichend untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

Material	Substanz(en)	Hersteller
Medium A549-Zellen	F-12K mit L-Glutamin	ATCC, USA
	+ 10% fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
	+ 100 U/ml Penicillin	Biochrom, Berlin
	+ 100 μg/ml Streptomycin	Biochrom, Berlin
	+ 10% DMSO zum Einfrieren bei -196°C	Sigma, Steinheim
Medium HPAEpi-Zellen	D-MEM	Biochrom, Berlin
	+ 10 % fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
	+ 100 U/ml Penicillin	Biochrom, Berlin
	+ 100 μg/ml Streptomycin	Biochrom, Berlin
Medium für HUVE-Zellen	Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell, Heidelberg
	+ Endothelial Cell Growth Medium SupplementMix	PromoCell, Heidelberg
Medium Transfektion	Opti-MEM	Invitrogen, Darmstadt
PBS	- NaCl: 800 mg/l - KCl: 200 mg/l - Na_2HPO_4: 1150 mg/l - KH_2PO_4: 200 mg/l	Biochrom, Berlin
Trypsin	- 0,05% Trypsin - 0,02% EDTA	Biochrom, Berlin
HEPES-Puffer (HBS) (1 Liter)	20 mM HEPES	Sigma, Steinheim
	- 1 mM $CaCl_2$	Sigma, Steinheim
	- 1 mM $MgCl_2$	Sigma, Steinheim
	- 5 mM KCl	Sigma, Steinheim
	- 135 mM NaCl	Sigma, Steinheim

	- 10 mM D-(+)Glucose	Sigma, Steinheim
	ad 1 l ddH_2O	Braun, Melsungen
	Abschließende sterile Filtration des Puffers durch PES-Filtermembran	Sarstedt, Nümbrecht
A549-Zellen	Humane Alveolarepithel Typ II ähnliche Lungenkarzinom-Linie	ATCC, USA
HPAEpi-Zellen	Humane, primär isolierte Alveolar-Epithelzell-Linie Typ II	ScienCell, USA
Primär isolierte AEZ	Isoliert aus der Ratte, Alveolar-Epithelzellen Typ II	eigene Arbeitsgruppe
HUVE-Zellen	Humane Endothelzellen aus der Nabelschnur	PromoCell, Heidelberg

Material	**Hersteller**
T75-Zellkulturflaschen	Corning, USA
Glass Bottom Culture Dishes	MatTek, USA
2-well Zellkulturkammern	Sarstedt, Nümbrecht
15 μ-Slide 4 well	Ibidi, Martinsried
Center-Well Organ Culture Dish	Corning, USA
Poly-L-lysine solution (0,1%)	Sigma, Steinheim
Fibronektin 0,1% (humanes Plasma)	Sigma, Steinheim
Kollagen (Rattenschwanz)	Roche, Mannheim
Cryo Tube Vials (1 ml)	Thermo, Berlin
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo, Berlin
X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent	Roche, Mannheim
ThinCerts-TC Einsätze, 6-well, 0,4 μm, transparent	Greiner Bio-One, Frickenhausen
FITC-BSA	Sigma, Steinheim

2.1.2 Anzucht von *E. coli* (DH5α)

Material	Substanz	Hersteller
Selektions-LB-Nährmedium:	SELECT Peptone 140: 10g/l	Invitrogen, Darmstadt
(1 Liter)	- Hefeextrakt: 5g/l	
	- NaCl: 5g/l	
Mit Kanamycin:	+ 50 μg/ml Kanamycin	Sigma, Steinheim
Mit Ampicillin:	+ 100 μg/ml Ampicillin	Sigma, Steinheim
Selektions-Agarplatte (Lennox)	- Trypton: 10g/l	Carl Roth GmbH
	- Hefeextrakt: 5g/l	
	- NaCl: 5g/l	
	- Agar-Agar	
	- pH-Wert: 7,0±0,2	
Mit Kanamycin:	+ 50 μg/ml Kanamycin	Sigma, Steinheim
Mit Ampicillin:	+ 100 μg/ml Ampicillin	Sigma, Steinheim

2.1.3 Anzucht von *S. pneumoniae*

Material	Substanz	Hersteller
THY-Medium	- 36,4 g Bacto™ Todd Hewitt Broth	BD, USA
(1 Liter)	- 5 g Hefeextrakt	Sigma, Steinheim
Zum Einfrieren bei -80°C	+ 200g Glycerin	Sigma, Steinheim
Agarplatte für Streptokokken:	- Columbia-Agar mit Schafblut	Oxoid, Wesel

2.1.4 Verwendete Bakterien

Besonderheit	Bezeichnung	Resistenz
S. pneumoniae:		
Wildtyp	D39	Keine Resistenzen
Kapseldefizient	D39(Δcps)	Kanamycin
Wildtyp mit GFP	D39+GFP	Ampicillin
Kapseldefizienz mit GFP	D39(Δcps)+GFP	Kanamycin + Ampicillin
Pseudomonas aeruginosa		keine Resistenzen

2.1.5 Verwendete Kits

Kitbezeichnung	Hersteller
Plasmid Mini/Maxipräp Kit	Qiagen, Hilden
Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
PCR Purificatio Kit	Qiagen, Hilden
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
QuickCange II XL Mutagenesis Kit	Agilent, USA
Live/Dead Cell Staining Kit II	PromoKine, Heidelberg

2.1.6 Enzyme

Enzymbezeichnung	Hersteller
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo, Berlin
EcoRI	NEB, Frankfurt/Main
XhoI	NEB, Frankfurt/Main
NotI-HF	Thermo, Berlin
SbfI-HF	Thermo, Berlin
DpnI	Agilent, USA
T4-DNA Ligase	NEB, Frankfurt/Main
Apyrase	Sigma, Steinheim
PEG-SOD	Sigma, Steinheim

2.1.7 Plasmide

Plasmidbezeichnung	Hersteller
pTagGFP2-N	Evrogen, Russland
LeGO-iPuro2	Kristoffer Riecken, Hamburg (Universitätsklinikum Eppendorf - Onkologisches Zetrum)
LifeAct-RFP	Ibidi, Martinsried
LifeAct-GFP	Ibidi, Martinsried

2.1.8 Western-Blot

Material	Substanz(en)	Hersteller
RIPA-Puffer:	- 50 mM Tris-HCl, pH 8,0	Sigma, Steinheim
	- 150 mM NaCl	
	- 1,0% Igepal CA-630 (NP-40)	
	- 0,5% Natriumdeoxycholat	
	- 0,1% Natriumdodecylsulfat	
Vor Gebrauch nach Herstellerprotokoll hinzugefügt:		
Proteinase-Inhibitor:	Complete Mini EDTA-free	Roche, Mannheim
Phosphatase-Inhibitor:	Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail 100x	Thermo, Berlin
10x Western Blot Puffer:	- 30,3 g Tris	Sigma, Steinheim
(1 Liter)	- 144 g Glycin	Sigma, Steinheim
	ad 1 l ddH_2O	Braun, Melsungen
Laufpuffer:	- 100 ml 10x Western Blot Puffer	
(1 Liter)	- 10 ml 10% Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Steinheim
	- 890 ml Aqua Dest.	Braun, Melsungen
Blotpuffer:	- 100 ml 10x Western Blot Puffer	
(1 Liter)	- 150 ml Methanol	Sigma, Steinheim
	- 750 ml Aqua Dest.	Braun, Melsungen
10x TBS:	- 24,2 g Trizma base	Sigma, Steinheim
(1 Liter)	- 80,0 g NaCl	Sigma, Steinheim
	- pH 7,6 mit HCl einstellen	Sigma, Steinheim
	ad 1 l ddH_2O	Braun, Melsungen
TBS-T:	- 100 ml 10x TBS	
(1 Liter)	- 1 ml Tween20	Sigma, Steinheim
	- 899 ml Aqua Dest.	Braun, Melsungen
4x Ladepuffer:	- 0,25M Tris pH 6,8	Sigma, Steinheim
(10 ml)	- 8% SDS	Sigma, Steinheim
	- 40% Glycerol	Sigma, Steinheim
	- 10% β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
	- 20 μl Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
	- ad 10ml Aqua Dest.	Braun, Melsungen
Pierce BCA Protein Assay Kit		Thermo, Berlin

TRIS		Sigma, Steinheim
30% Acrylamid		Sigma, Steinheim
SDS		Sigma, Steinheim
APS		Sigma, Steinheim
TEMED		Sigma, Steinheim
Phos-tag		Wako, Japan
$MnCl_2$		Sigma, Steinheim
Elektrophorese- und Blotkammer		BioRad, USA
BenchMark Pre-Stained Proteinleiter		Invitrogen, USA
MagicMark XP Protein Standard Proteinleiter		Thermo, Berlin
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate		Thermo, Berlin
Foto-Papier		GE, Solingen
Milchpulver		Sigma, Steinheim
Primärer Antikörper	Anti-Tag(CGY)FP-AK	Evrogen, Russland
Sekundärer Antikörper	Anti-Rabbit-AK, HRP-linked	CellSignal, USA

2.1.9 Substanzen Calciumimaging

Substanz	Hersteller
Färbungen:	
Fura-2AM	PromoKine, Heidelberg
LysoTracker Green	Invitrogen, Darmstadt
Agonisten:	
Trypsin (24kDa)	Sigma Aldrich, Steinheim
Adenosin 5‘-triphosphosphat disodium Salz	Sigma Aldrich, Steinheim
Kinaseinhibitoren:	
H-89	Sigma Aldrich, Steinheim

KT5720	Sigma Aldrich, Steinheim
PKC Inhibitor, Myristoylated	Sigma Aldrich, Steinheim
Roscovitine	Sigma Aldrich, Steinheim
CID 755673	Sigma Aldrich, Steinheim
GSK690693	Sigma Aldrich, Steinheim
KN-93	Sigma Aldrich, Steinheim
Rezeptorinhibitor:	
WEB2086	Sigma Aldrich, Steinheim
Weitere:	
Apyrase (from potatoe)	Sigma Aldrich, Steinheim
PEG-SOD	Sigma Aldrich, Steinheim

2.1.10 Geräte

Gerät	Hersteller
Zentrifugen:	
- Tischzentrifuge: Heraeus Pico 17	Thermo, Berlin
- Tischzentrifuge: Heraeus Biofuge Stratos	Thermo, Berlin
- Tischzentrifuge: Universal 32	Hettich, CH
- Tischzentrifuge: 5417 R	Eppendorf, Hamburg
- High-Performance Zentrifuge: Avanti J-E	Beckmann, USA
Zellkultur-Inkubatoren:	Thermo, Berlin; Sanyo, Japan
Blockheizer: SBH130DC	Stuart, UK
Sterile Werkbank: Herasafe	Thermo, Berlin
Mikroskope:	
- Fluoreszenz-Auflichtmikroskop: BX40	Olympus, Hamburg
- Spinning-Disk-Mikroskop	Perkin Elmer, USA; Nikon, Japan
- Lichtmikroskop: CK30	Olympus, Hamburg

Thermocycler: Px2	Thermo, Berlin
Gel-Dokumentationssystem	Syngene, UK
Transluminator: Fluo.Link	Bioblock Scientific, Frenkendorf
Bakterien-Schüttler/Inkubator	New Brunswick Scientific, USA
pH-Meter: ϕ72	Beckmann, USA
Spectrophotometer: Multiskan Spectrum	Thermo, Berlin
Elektrophorese Netzgerät: EV231	Consort, BE
PowerPac™ Basic Power Supply	Biorad, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Schüttelwasserbad: SW22	Julabo, Seelbach
Zelldichtemessgerät: CO8000	Biochrom, UK
Magnetrührer: IKAMAG REO	IKA, Staufen
Mikrovolumen Spectralphotometer: NanoDrop 2000	Peqlab, Erlangen
Microplate-Reader Infinite 200 Pro	Tecan, Schweiz
Foto-Entwickler	AGFA, Belgien
OD600-Zelldichtemessgerät: WPA CO8000	Biochrom, UK

2.1.11 Software

Name	**Hersteller**
MetaFluor	Molecular Devices, USA
Volocity	PerkinElmer, USA
Imaris	Bitplane, CH
pDRAW32	Open Source
SigmaPlot/Stat	Systat Software, Erkrath
ImageJ	Open Source

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung der Agarplatten

Zum Gießen von Agarplatten wurden nach Herstellerangaben 35 g des Pulvers in einem Liter H_2O gelöst und im Autoklaven zusammen mit einem Magnetrührstab sterilisiert. Unter kontinuierlichem Rühren auf einem Magnetrührer wurde das noch flüssige LB-Agar auf ca. 50°C abgekühlt. Unter sterilen Kautelen erfolgte nun zügig die Zugabe eines Selektionsantibiotikums, entweder 50 μg/ml Kanamycin oder 100 μg/ml Ampicillin, je nach Verwendungszweck. Direkt im Anschluss wurden 20 ml des LB-Agars unter einem sterilen Abzug in jeweils eine Platte gegossen und für eine Stunde mit geöffnetem Deckel ruhen gelassen. Die anschließende Lagerung erfolgte bei 4°C für maximal zwei Wochen.

2.2.2 Transformation von kompetenten *E. coli*

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA kommen verschiedene Methoden infrage. Eine einfache und schnelle Methode ist es, die Plasmide in kompetente Bakterien zu transformieren, welche im Anschluss unter Selektionsdruck gezwungen werden, das Plasmid zu vervielfältigen und an die Nachkommen weiterzugeben. Dazu muss das Plasmid ein entsprechendes Resistenzgen für z.B. Kanamycin, Ampicillin o.ä. enthalten, das von den Bakterien translatiert werden kann. Werden die Bakterien dann unter Selektionsdruck des entsprechenden Antibiotikums angezüchtet, können sich nur diejenigen vermehren, die vorher das Plasmid aufgenommen haben. Die bei -80°C gelagerten kompetenten Bakterien (DH5α) wurden nach Herstellerangaben als 25 μl Aliquot auf Eis aufgetaut und für 30 min zusammen mit ca. 50-100 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA inkubiert, wodurch es zu einer guten Verteilung und Adhäsion der DNA an den Bakterien kam. Anschließend wurden die Bakterien für genau 45 s einem Hitzeschock von 42°C im Heizblock ausgesetzt. Dies führte zu einer transienten Porenbildung in der Zellmembran der Bakterien und zur Aufnahme der DNA ins Zytosol. Um die Poren schnell wieder zu verschließen und ein zügiges Absterben der Bakterien zu verhindern, wurde die Suspension gleich im Anschluss für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 225 μl SOC-Medium, das die Transformationseffizienz maximieren soll [15], wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C und 225 rpm im Schüttler inkubiert, um sie in die Log-Phase des Wachstums zu überführen, da hier die Teilungsrate der Bakterien am schnellsten und die Menge an Plasmid pro Bakterium am höchsten ist; zudem hatten die Bakterien mit Plasmid die Möglichkeit, das Resistenzgen in ein Protein zu translatieren, das sie vor dem Einfluss des Antibiotikums schützt. Nun wurden 230 μl der Bakteriensuspension auf eine Agarplatte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum pipettiert und mit 5-6 Glasperlen gleichmäßig auf der Platte verteilt. Die Anzucht erfolgte für maximal 16 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Am

Folgetag wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze vorsichtig aufgenommen und jeweils in ein Reaktionsgefäß mit 5 ml LB-Medium inklusive ensprechendem Selektionsantibiotikum überführt. Die Anzucht erfolgte abermals für maximal 16 Stunden bei 37°C und 225 rpm.
Abschließend wurden 600 μl der Bakteriensuspension abgenommen und mit 400 μl 50%igem Glycerol vermischt und bei -80°C zügig eingefroren, um Frostschäden an den Bakterien zu verhindern. Diese können nach erneutem Auftauen wieder in Nährmedium anwachsen, falls noch mehr DNA benötigt wird.
Die abschließende Isolation der Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte mittels Plasmid Mini/Maxipräp Kit von Qiagen nach Herstellerangaben [15].

2.2.3 Anzucht von *S. pneumoniae*

Die Anzucht der verschiedenen D39-Stämme erfolgte nach jeweils gleichem Prozedere. Hierzu wurden 50 μl einer Stammlösung (ca. 10^9 Bakterien/ml) mit einem sterilen Watteträger auf Schafblut-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die Bakterien auf einer Platte unter sterilen Kautelen mit einem befeuchteten Watteträger geerntet und in 20 ml THY-Medium (s.o.) überführt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für drei Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert, wobei auf ausreichende Belüftung geachtet wurde. Die Bakterienkultur wurde nun für 10 min bei 3750 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 2 ml THY-Medium mit 20% Glycerin vorsichtig resuspendiert. Ab jetzt erfolgten alle weiteren Schritte auf Eis.
Von den resuspendierten D39 wurde nun eine Verdünnung hergestellt. Hierzu wurden zu 40 ml THY-Medium (20% Glycerin) in kleinen Schritten à 50 μl D39 zugegeben bis eine Konzentration von 10^7/ml erreicht wurde. Die Einstellung erfolgte photometrisch bei 600 nm (OD600), wobei eine optische Dichte von 0,7 einer Bakterienkonzentration von 10^7/ml entspricht. Die optische Dichte von 0,7 wurde anhand einer Eichkurve mit verschiedenen Verdünnungen von Bakteriensuspensionen bestimmt, indem die Bakterienanzahl in einer Zählkammer bestimmt wurde. Abschließend erfolgte die gebrauchsfertige Aliquotierung und Lagerung bei -80°C.

2.2.4 Anzucht von *Pseudomonas aeruginosa*

Ein Aliquot der Stammkultur wurde in einem Cryoröhrchen über Nacht in 100 ml LB-Medium bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 10 min bei 4500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 90 ml PBS resuspendiert. Dies wurde noch zwei Mal wiederholt, um den Überstand von Bakterienexsudat zu befreien. Nach dem letzten Zentrifugieren wurde das Pellet mit 4 ml HBS-Puffer resuspendiert. Abschließend wurde eine Verdünnung in HBS-Puffer angesetzt, die einer Bakterienkonzentration von 10^8/ml entspricht. Dazu wurde die OD600 photometrisch auf einen Wert von 0,5 eingestellt.

2.2.5 Zellkultur

Zur Untersuchung des $P2Y_2$-Rezeptors dienten vorwiegend Versuche an lebenden Zellen. Hierfür wurden primär isolierte humane Alveolarepithelzellen (HPAEpiC), primär isolierte Alveolarepithelzellen aus der Ratte (Typ II) und immortalisierte, aus einem pulmonalen Adenokarzinom gewonnene A549-Zellen (Typ II) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die primären humanen HPAEpi-Zellen wurden in den Passagen 1-6 und die A549-Zellen wurden in den Passagen 1-15 kultiviert. Die primär isolierten AEZ aus der Ratte wurden unmittelbar nach der Isolierung verwendet und wurden nicht weiter passagiert. Mediumwechsel wurden nach 48 Stunden oder spätestens nach 72 Stunden durchgeführt und die Kultur bei ca. 70-90% Konfluenz geteilt. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter einer sterilen Werkbank, um Kontaminationen zu vermeiden.

2.2.5.1 Zellen einfrieren

Zur späteren Verwendung von A549-Zellen wurden diese in einer frühen Passage in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren. Hierzu wurden die Zellen wie üblich aus einer T75-Zellkulturflasche trypsiniert (siehe Kapitel 2.2.5.4), jedoch in 3 ml Zellkulturmedium mit 10% DMSO resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden à 1 ml in Cryoröhrchen aliquotiert und zügig bei -80°C eingefroren. Am Folgetag erfolgte die Überführung in den Stickstofftank zur Langzeitlagerung der Zellen.

2.2.5.2 Zellen auftauen

Zum Auftauen von Zellen wurden diese aus dem Stickstofftank entnommen und drei Minuten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Im Anschluss wurden die aufgetauten Zellen zügig, aber möglichst schonend in eine neue T-75 Flasche mit 30 ml F-12K Medium mit 10% FBS und 1% Antibiotikum (s.o.) pipettiert, um das toxische, im Kryomedium enthaltene, DMSO zu verdünnen. Am Folgetag, wenn die Zellen angewachsen waren, konnte das Medium gegen 12 ml frisches Standardmedium ausgetauscht werden. Nach 72 Stunden wurden die Zellen T-75 bei Konfluenz trypsiniert und auf drei neue T-75 mit 12 ml Medium verteilt.

2.2.5.3 Polylysinierung von 2-well Zellkulturkammern und T-75 Zellkulturflaschen

Die Polylysin-Stocklösung (1 mg/ml) wurde auf 15 μg/ml in H_2O verdünnt und ein Milliliter je Well pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht.
Am Folgetag wurde die Polylysinlösung einmal mit H_2O und ein zweites Mal mit Dulbeco's MEM ohne Zusätze abgewaschen, um Polylysinreste zu entfernen und die Dishes für die auszusäenden Zellen optimal vorzubereiten. Die Polylysinierung von T-75 Zellkulturflaschen erfolgte mit zehn Millilitern der o.g Polylysinkonzentration, ebenfalls mit Inkubation über Nacht. Am

Folgetag wurden die Flaschen zweimalig mit 10 ml H_2O gewaschen und im Brutschrank gelagert.

2.2.5.4 Trypsinierung von T-75 Zellkulturflaschen

Bei ca. 90% Konfluenz wurden die Zellen passagiert, indem sie drei Mal mit jeweils 10 ml PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung für vier Minuten im Brutschrank inkubiert wurden. Anschließend wurden noch nicht abgelöste Zellen vorsichtig vom Boden abgeklopft und die Trypsinreaktion mit 7 ml Medium inklusive 10 % FBS gestoppt. Um die Verunreinigung durch Trypsin/EDTA wieder zu entfernen, wurde das Gesamtvolumen von 10 ml in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 5 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und drei neue T-75 Flaschen mit jeweils 200-, 400- und 600-tausend Zellen und 12 ml Medium mit 10% FBS angelegt, wobei für die A549-Zellen zusätzlich Pen/Strept, (s.o.) enthalten war.

2.2.5.5 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension nach Trypsinierung wurde wie folgt vorgegangen: Die Zellsuspension wurde 1:5 in einer mit PBS 1:10 verdünnten Trypanblaulösung verdünnt. Anschließend wurden 10 μl der Verdünnung in eine Zählkammer nach Neubauer pipettiert und die Zellen in den vier großen Eckquadraten zusammengezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter wurde das Zählergebnis in folgende Formel eingesetzt:

$$\frac{Z*10^4*V}{Q} = K$$

Z	Gezählte Zellen in vier Großquadraten
V	Verdünnungfaktor der Zellsuspension
Q	Anzahl der gezählten Großquadrate
K	Zellzahl pro Milliliter

2.2.5.6 Transfektion

Durch Transfektion werden eukaryotische Zellen dazu veranlasst, rekombinante Proteine zu exprimieren, die dann näher untersucht werden können. Hierbei wird rekombinante, plasmidförmige DNA über die Zellmembran hinweg und Richtung Zellkern translozíert. Dort bewirken vorgeschaltete virale Promotorregionen in der Sequenz, dass die DNA des rekombinanten Proteins konsekutiv in mRNA transkribiert wird. Diese wird anschließend von Ribosomen in Proteine translatiert. In einigen Fällen enthält die rekombinante DNA vor oder hinter dem zu untersuchenden Protein in der Sequenz den Code für ein fluoreszierendes Protein, das in einem Schritt mit translatiert wird und kovalent verbunden ist (Fusionsprotein). In diesem Fall lieferte Evrogenes pTagEGFP2-N-Vektor die Sequenz für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP)

hinter dem $P2Y_2$-Rezeptor, der untersucht werden sollte. Zur Herstellung von rekombinanter DNA siehe auch Abschnitt 2.2.6.

Transfektion von A549-Zellen

Die A549-Zellen wurden für die Spinning-Disk-Mikroskopie und weitere Versuche mit verschiedenen Fusionsproteinen, wie dem klonierten $P2Y_2$-Rezeptor oder den LifeAct-Vektoren transfiziert.
Transfiziert wurde entweder auf Glass Bottom Culture Dishes oder auf 15 μ-Slide 4 well Dishes, je nach Anzahl der Messungen am Messtag.

Transfektion auf Glass Bottom Culture Dishes

Hierfür wurden 72 Stunden vor Versuchsbeginn $7*10^4$ A549-Zellen in zwei Milliliter Standardmedium ausgesät. Am Folgetag wurde eine Stunde vor der Transfektion das Medium durch einen Milliliter neues, vorgewärmtes Standardmedium ersetzt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz wie folgt pipettiert:

- 100 μl Opti-MEM
- 3 μl X-tremeGene HP
- 1 μg Vektor-DNA

und 30 Minuten inkubiert. Nach Hinzugabe des Transfektionsansatzes zu den Zellen erfolgte kein weiterer Mediumwechsel bis zum Messtag, 48 Stunden später.

Transfektion auf 15 μ-Slide 4 well Dishes

Im Vergleich zu den Glass Bottom Culture Dishes wurden $3{,}5*10^4$ Zellen pro well mit einem Milliliter Standardmedium ausgesät, welches am Folgetag durch 500 μl neues Medium ersetzt wurde. Der Transfektionsansatz wurde ebenfalls 30 Minuten inkubiert und setzte sich wie folgt zusammen:

- 50 μl Opti-MEM
- 1,5 μl X-tremeGENE HP
- 0,5 μg Vektor-DNA

Bis zum Messtag, 48 Stunden später, erfolgte kein weiter Mediumwechsel.

Transfektion von primär isolierten humanen Alveozyten (HPAEpiC)

Die HPAEpi-Zellen wurden einen Tag vor Transfektion à 10^5 mit zwei Milliliter Medium ohne Antibiotikum auf polylysinierte 2-well Zellkulturkammern ausgesät. Eine Stunde vor

Transfektion wurde das Medium durch vorgewärmtes Medium ohne Antibiotikum ersetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 100 μl Opti-MEM
- 3 μl X-tremeGENE HP
- 1 μl Vektor-DNA

Bis zur Messung der Zellen, 48 Stunden später, wurde noch zweimalig, jeweils nach 24 Stunden, das Medium im Überstand durch einen Milliliter neues, vorgewärmtes Standardmedium ohne Antibiotikum ersetzt.

2.2.6 De novo Vektor-Klonierung

Um den $P2Y_2$-Rezeptor fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen, wurde eine de novo Klonierung durchgeführt. Dabei wurde die DNA des humanen $P2Y_2$-Rezeptor (Accession Code: NM 176072) aus A549-Zellen isoliert und in den pTagGFP-N-Vektor ligiert, sodass ein Fusionsprotein aus Rezeptor und Fluoreszenz-tag entstand. Dieser Vektor sollte danach in Alveolarepithelzellen transfiziert werden.

2.2.6.1 RNA-Isolierung aus A549-Zellen

Zur Gewinnung von $P2Y_2$- mRNA wurde die Zelllinie A549 gewählt, da diese den $P2Y_2$-Rezeptor sicher exprimiert (eigene Vorarbeiten).
Hierzu wurden $2{,}5*10^5$ Zellen pro well auf einer 6-well Platte ausgesät und am nächsten Tag geerntet. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Alle angegeben Arbeitsschritte wurden auf Eis, bzw. bei 4°C durchgeführt.
Zuerst wurden je well 350 μl RLT Plus Puffer zur Zelllyse zugegeben, welcher nach kurzer Inkubation mit einer Pipette aufgenommen und durch eine „gDNA Eliminator spin column“ zentrifugiert wurde. Die so filtrierte Flüssigkeit wurde mit 525 μl 100% Ethanol versetzt und vermischt. Von dem Gemisch wurden 700 μl in eine „RNeasy Mini spin column“ pipettiert und zentrifugiert. Nun wurde der Durchfluss verworfen und die spin column zweimalig mit jeweilig 500 μl RPE-Waschpuffer zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen und die spin column aufbewahrt. Abschließend erfolgte die Zugabe von 50 μl RNase freiem Wasser in die spin column. Nach einminütiger Inkubation erfolgte die Zentrifugation, der Durchfluss enthielt die RNA der A549-Zellen. Abschließend erfolgte die photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung bei 260 nm mittels NanoDrop.

2.2.6.2 Copy-DNA-Synthese

Die gewonnene mRNA wurde nun in in Copy-DNA (cDNA) umgeschrieben, um eine Matrize für die anschließende PCR herzustellen. Dies wurde mit dem Omniscript RT Kit von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde folgender Ansatz pipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert:

Substanz	Menge	Endkonzentration
10X Reaktionspuffer	3 μl	1X
dNTP's	2 μl	333 nM
Primer	1 μl	1,0 μM
RNase Inhibitor	1 μl	1,33 U/μl
Omniscript RT	1 μl	0,13 U/μl
RNA	2 μl	66,6 ng/μl
H_2O	20 μl	
Gesamtvolumen	**30 μl**	

Tabelle 2.7. *Reaktionsansatz zur Herstellung einer Copy-DNA*

2.2.6.3 PCR zur Amplifizierung von P2Y$_2$-dsDNA mit Restriktionsstellen

Bei der oben genannten Herstellung von DNA ist ein ungeordnetes Gemisch ganz verschiedener DNA entstanden. Zur selektiven Vermehrung von P2Y$_2$-dsDNA wurde eine PCR durchgeführt. Hierzu wurden Primer erstellt, die die Restriktionsstellen für XhoI und EcoRI enthielten, um die P2Y$_2$-DNA in den vorher ausgewählten Vektor klonieren zu können. Dem Design kam hier eine besondere Bedeutung zu, da anders als bei vielen anderen PCRs, die Bindungsstellen für die Primer vorgegeben sind. Es konnte also nicht auf eine andere Stelle mit besseren Bedingungen für eine Primerbindung ausgewichen werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass derjenige Teil des Primers, der an die Matrize bindet, ausreichend lang ist um eine ausreichende Spezifität zu gewährleisten. Jedoch sollte der Primer nicht zu lang sein, um die Annealingtemperatur nicht zu hoch werden zu lassen:

P2Y2-FWD: TA CTCGAG CG ATG GCA GCA GAC CTG

P2Y2-REV: TA GAATTC C CTC C AGC CGA ATG TCC TTA G

CTCGAG	Restriktionsstelle XhoI
GAATTC	Restriktionsstelle EcoRI
ATG	Startcodon
CTC	mutiertes Stoppcodon

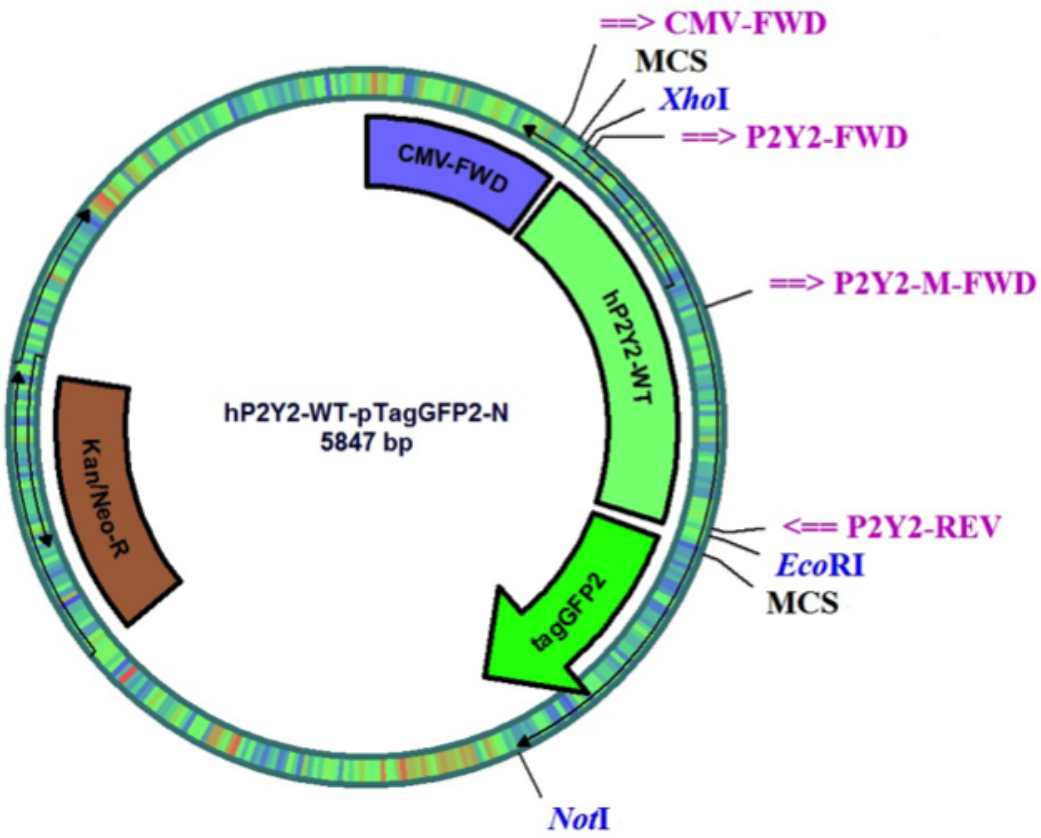

Abb. 2.1. *Schematische Darstellung des fertig klonierten Vektors mit dem $P2Y_2$-Rezeptor Insert vor dem GFP-tag im Vektor von Evrogene.*

Die PCR wurde nach Tabelle 2.8 pipettiert und nach Tabelle 2.9 in Cycler durchgeführt:

Substanz	**Menge**	**Endkonzentration**
5x Phusion HF-Buffer	10 μl	1X
dNTP's	1 μl	200 μM jeweils
Forward Primer	2,5 μl	500 nM
Reverse Primer	2,5 μl	500 nM
cDNA	5 μl	
DMSO	1,5 μl	3%
Phusion DNA Polymerase	0,5 μl	0,02 U/μl
H_2O	27 μl	
Gesamtvolumen	**50 μl**	

Tabelle 2.8. *Reaktionsansatz für eine PCR zur Amplifikation vom $P2Y_2$-Rezeptor*

Zyklus	Stufe	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl Zyklen
1	Initiale Denaturierung	98	30	1
2	1: Denaturierung	98	10	35
	2: Annealing	62	30	
	3: Elongation	72	45	
3	Finale Elongation	72	600	1

Tabelle 2.9. *PCR-Programm zur Amplifikation der P2Y$_2$-Rezeptor-DNA.*

2.2.6.4 Isolierung von P2Y$_2$-DNA aus PCR-Reaktionsansatz

Um die DNA aus dem PCR-Reaktionsansatz zu isolieren, wurden die gesamten 50 μl mit 9 μl eines 6x Ladepuffers vermischt und in ein einprozentiges Agarosegel geladen, um es per Elektrophorese aufzutrennen. Diese wurde ein Stunde lang bei 120 V, 75 mA und 150 W durchgeführt:

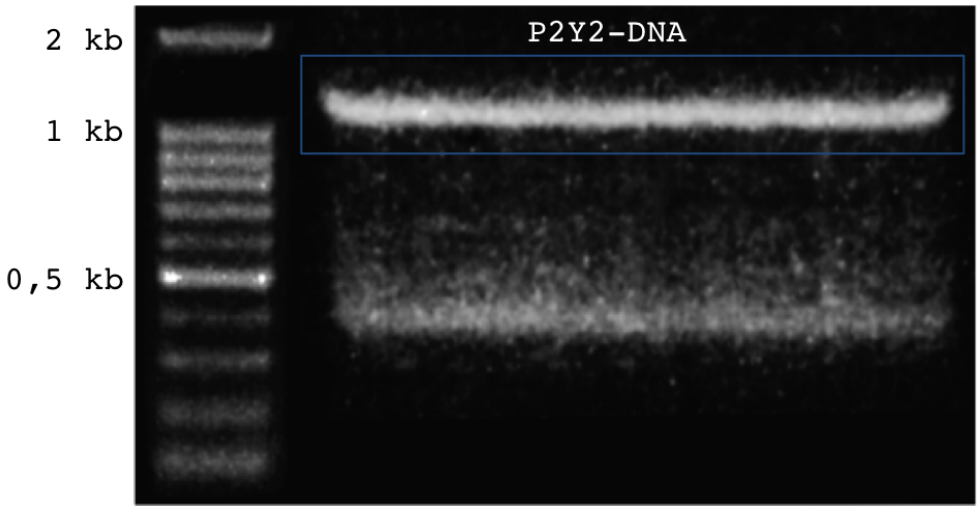

Abb. 2.2. *Aufgetrenntes PCR-Produkt nach Elektrophorese.*

2.2.6.5 DNA-Isolierung aus Agarosegel

Die in Abb. 2.2 markierte Bande wurde zügig, unter abgeschwächtem UV-Licht, identifiziert und mit einem Skalpell auf dem Gel herausgeschnitten, um Schäden an der DNA durch das UV-Licht zu minimieren. Danach wurde sie mit dem Gel Extraction Kit von Qiagen nach Herstellerprotokoll aufgereinigt, indem das Gelfragment bei 50°C im mitgelieferten Puffer geschmolzen wurde. Anschließend wurden die Gelbestandteile in verschiedenen Waschschritten entfernt, bis die DNA mit 50 μl Puffer eluiert wurde. Abschließend wurde die Konzentration der DNA mittels NanoDrop bestimmt.

2.2.6.6 Klonieren des neuen Vektors

Der eingesetzte Vektor von Evrogen (pTagGFP2-N) enthält bereits die Sequenz für GFP mit einer vorangehenden Multi Cloning Site (MCS) sowie Resistenzgene für Kanamycin und Neomycin für die Transformation von kompetenten Bakterien, bzw. die stabile Transfektion von Zellen.

2.2.6.7 Doppelter Restriktionsverdau

Um die $P2Y_2$-DNA (Insert) in den Vektor ligieren zu können, mussten sowohl der Vektor, als auch das Insert mit Restriktionsenzymen geschnitten werden, um jeweils komplementäre Sequenzen auf beiden DNA-Strängen zu erhalten (sticky ends). So konnten diese von einer Ligase in einem späteren Schritt wieder zusammengefügt werden.

Substanz	Insert	Vektor	Endkonzentration
H_2O	12,5 μl	37,5	
EcoRI	1 μl	1 μl	10 U/μg DNA
XhoI	0,5 μl	0,5 μl	10 U/μg DNA
DNA	26 μl	1 μl	ca. 10 ng/μl
10X BSA	5 μl	5 μl	1X
10X EcoRI-Puffer	5 μl	5 μl	1X
Gesamtvolumen	**50 μl**	**50 μl**	

Tabelle 2.10. *Reaktionsansatz für einen doppelten Restriktionsverdau des $P2Y_2$-Rezeptors, sowie des Vektors in den kloniert werden soll.*

2.2.6.8 Isolierung der DNA

Um den Restriktionsansatz aufzureinigen, wurde das QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen nach Herstellerprotokoll angewandt. Bei diesem Kit wurden die Enzyme und die Bestandteile des o.g. Reaktionsansatzes entfernt, sodass am Ende gereinigte DNA eluiert werden konnte. Die Konzentrationsbestimmung der gereinigten DNA erfolgte mit NanoDrop.

2.2.6.9 Ligierung von Insert und Vektor

Für den Ligationsansatz war das Mischungsverhältnis von Insert (1153 Basenpaare) zu Vektor (ca. 4700 Basenpaare) von großer Bedeutung; bei der verwendeten T4 Ligase betrug es 3 : 1 Insert zu Vektor. Die Berechnung erfolgte wie folgt:

$$\mu g[DNA] = fmol[DNA] * \frac{1\mu g}{3000 fmol} * \frac{BP[DNA]}{1000 BP}$$

$$BP = Basenpaare$$

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen und wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert:

Substanz	Menge	Endkonzentration
Insert	3,85 μl	90 fmol
Vector	1,58 μl	30 fmol
10X Ligase-Puffer	2 μl	1X
H_2O	11,57 μl	
Ligase	1 μl	1 U/μl
Gesamtvolumen	**20 μl**	

Tabelle 2.11. *Reaktionsansatz für eine Ligation zwischen Insert und Vektor.*

2.2.6.10 Transformation und Isolierung der DNA

Die Transformation erfolgte wie oben beschrieben.
Am Folgetag erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien mittels QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen nach Herstellerangaben. Dabei wurden die abzentrifugierten Bakterien mittels alkalischer Detergenzien lysiert und die RNA über eine RNase degradiert, sowie die Proteine ausgefällt. Die so entstandenen Zellreste wurden per Zentrifugation entfernt und der Überstand gereinigt, sodass gereinigte DNA eluiert werden konnte.

2.2.6.11 Erfolgskontrolle der Ligation

Um den Erfolg der Ligation zu überprüfen, wurde ein doppelter Restriktionsverdau des Plasmids durchgeführt. Dafür wurde folgender Ansatz bereitet und für eine Stunde bei 37°C inkubiert:

Substanz	Menge	Endkonzentration
XhoI	0,5 μl	10 U/μg DNA
NotI	0,5 μl	10 U/μg DNA
DNA	2 μl	800 ng/30 μl
10X BSA	3 μl	1X
10X NEB-4-Puffer	3 μl	1X
H_2O	21 μl	
Gesamtvolumen	**30 μl**	

Tabelle 2.12. *Reaktionansatz für einen doppelten Restriktionsverdau des fertig klonierten Vektors zur Funktionskontrolle der Ligation.*

Die Analyse erfolgte mittels Elektrophorese in einem 1%igen Agarosegel bei 120 V, 70 mA und 150 W für eine Stunde. Die erwarteten Banden bei ca. 2 und 4 Kilobasen waren sichtbar, daher erfolgte die Sequenzierung mit folgenden Primern:

CMV-FWD: `CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG`

P2Y2-M-FWD: `TGC TCT ACT TTG TCA CCA CCA`

Im Anschluss wurde eine MaxiPrep mit dem Kit von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt (QIAfilter Plasmid Maxi Kit), welche analog zum MiniPrep Kit funktioniert.

2.2.6.12 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA in wässriger Lösung

Mittels Nanodrop kann die Konzentration von DNA und RNA in einer wässrigen Lösung photometrisch bestimmt werden. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass nur eine geringe Menge der Probe (2 μl) eingesetzt werden muss, um ein sehr genaues Ergebnis zu erhalten. Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm gegenüber H_2O bidest. Außerdem wurde die Reinheit der Probe bestimmt, wobei der Quotient der OD bei 260/280 nm gebildet wurde. Ein Quotient von 1,8 entspricht einer reinen DNA-Probe, während ein Quotient von 2,0 einer reinen RNA-Probe entspricht. Bei einer OD260 = 1 entspricht dies einer DNA-Konzentration 50 μg/ml oder einer RNA-Konzentration von 40 μg/ml.

Zur Bestimmung der Konzentration von doppelsträngigen Nukleinsäuregemischen in μg/ml wurde folgende Formel angewandt:

$$c[\mu g/ml] = OD_{260} * F$$

OD260	Optische Dichte bei 260 nm
F	Multiplikationsfaktor: 40 für RNA, 50 für DNA

Zur Bestimmung der Molarität von doppelsträngigen Nukleinsäuregemischen wurde folgende Formel angewandt:

$$c[\mu mol/ml] = \frac{OD_{260} * V * F}{M_W * L}$$

OD260	Optische Dichte bei 260 nm
V	Verdünnungsfaktor (in der Regel = 1)
F	Multiplikationsfaktor: 50
$\mathbf{M_W}$	Molekulargewicht je Basenpaar (660g/mol)
L	Länge der DNA in kb

2.2.7 Herstellung einer P2Y$_2$-Mutante zur Untersuchung von vermuteten Phosphorylierungsstellen

In vivo erfolgt die agonisten-induzierte Inaktivierung und Internalisierung des P2Y$_2$-Rezeptors PKC-abhängig, nach Phosphorylierung, an drei Phosphorylierungsstellen (siehe Einleitung):

1. Serin an Position 243 (S243)
2. Thyrosin an Position 344 (T344)
3. Serin an Position 356 (T356)

Zur Deletion dieser Phosphorylierungsstellen, wurde das QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit per PCR nach Herstellerangaben von Agilent Technologies verwendet. Das Primer-Design erfolgte mit dem unter http://www.agilent.com/genomics/qcpd angebotenen Online-Programm, unter Angabe der zu mutierenden Basen, hier in Rot. Die Mutationen bewirken jeweils einen Wechsel zu Alanin als codierende Aminosäure, somit kann an dieser Stelle nicht mehr durch entsprechende Kinasen phosphoryliert werden. Folgende Primer wurden verwendet:

1. S243:
   a. GCC AAG CGC AAG GCC GTG CGC ACC A
   b. TGG TGC GCA CGG CCT TGC GCT TGG C
2. T344:
   a. CGC AGA TCC GAC AGA GCT GAC ATG CAG AGG A
   b. TCC TCT GCA TGT CAG CTC TGT CGG ATC TGC G
3. S356:
   a. GAT GTG TTG GGC AGC GCT GAG GAC TCT AGG CG
   b. CGC CTA GAG TCC TCA GCG CTG CCC AAC ACA TC

Der verwendete Ansatz für die PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Substanz	Menge	Endkonzentration
10X Reaktionspuffer	5 μl	1X
Vektor-DNA	2 μl	0,5 ng/μl
dNTP mix	1 μl	
Primer a	1,2-1,5 μl	125 ng/50 μl
Primer b	1,2-1,5 μl	125 ng/50 μl
QuickSolution	3 μl	
H_2O	35,6 μl	
Pfu Ultra HF DNA Polymerase	1 μl	0,05 U/μl
Gesamtvolumen	**50 μl**	

Tabelle 2.13. *Reaktionsansatz für eine PCR zur Mutagenese des P2Y$_2$-Rezeptors.*

Das PCR-Programm gestaltete sich wie folgt:

Zyklus	Stufe	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl Zyklen
1	Initiale Denaturierung	95	60	1
2	1: Denaturierung	95	50	18
	2: Annealing	60	50	
	3: Elongation	68	360	
3	Finale Elongation	68	420	1

Tabelle 2.14. *Programm für eine PCR zur Mutagenese des P2Y$_2$-Rezeptors.*

Die Mutationen wurden nacheinander eingebracht, das heißt, nach jeder PCR wurde der neue Vektor in kompetente Bakterien (XL10 Gold Ultrakompetent Cells) transformiert, wobei der Hitzeschock abweichend zu den DH5α lediglich 30 s dauerte. Anschließend wurden die transformierten Bakterien auf einer Agarplatte mit 50 μg/ml Kanamycin ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden am Folgetag mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in einer Schüttelkultur mit 50 μg/ml Kanamycin über Nacht inkubiert. Die DNA-Isolation erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen nach Herstellerangaben und die Erfolgskontrolle erfolgte per Sequenzierung. Hierfür wurde abermals folgender Primer verwendet:

P2Y2-M-FWD: `TGC TCT ACT TTG TCA CCA CCA`

Dieser Primer bindet in der Mitte der P2Y$_2$-Rezeptor-Sequenz und ist in der Lage, alle Mutationsstellen abzubilden, siehe Abb. 2.3. Bei Erfolg wurde der neue Vektor als Matrize für die nächste Mutation verwendet.

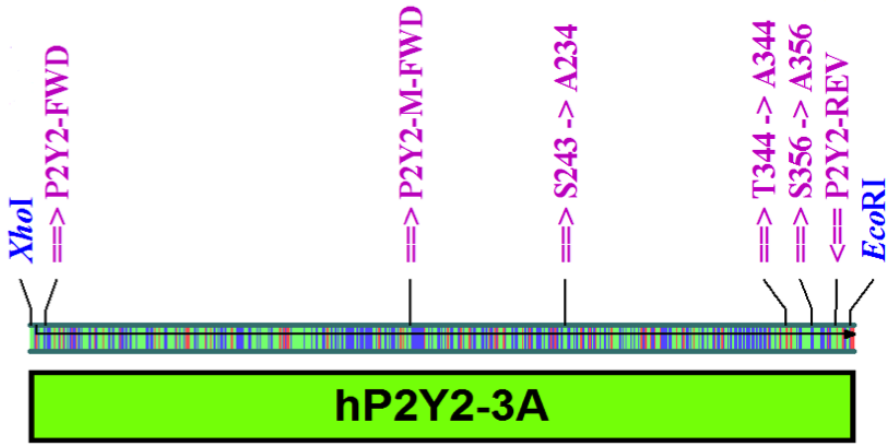

Abb. 2.3. *Lineare Darstellung des humanen $P2Y_2$-Rezeptors. Hervorgehoben sind die Mutationsstellen der mutierten Variante, sowie die Bindungsstellen der verwendeten Primer (s.o.). Des Weiteren sind die Restriktionsstellen für die Klonierung markiert.*

2.2.8 Klonierung von $P2Y_2$-GFP-Rezeptoren für eine stabile lentivirale Transduktion

Das Herstellen von Zelllinien, die einen mit GFP gekoppelten $P2Y_2$-Rezeptor stabil exprimieren, hat verschiedene Vorteile. In dieser Arbeit wurden A549-Zellen stabil mit der Wildtyp-Variante des $P2Y_2$-Rezepors transduziert. Hierzu wurde die DNA des kompletten Fusionsproteins aus dem Vektor von Evrogene per PCR amplifiziert und in einen lentiviralen Vektor ligiert. Der lentivirale Vektor wurde freundlicherweise von Kristoffer Riecken (Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation aus dem Onkologisches Zentrum am UK Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Er enthält ein Resistenzgen (Reportergen) für Puromycin, das über ein IRES-Element hinter der Multi-Cloning-Site liegt und somit stabil mit translatiert wird. Zur Vervielfältigung mittels Transformation in kompetente *E. coli* ist ein Resistenzgen für Ampicillin enthalten.

2.2.8.1 Primerdesign

Da der lentivirale Zielvektor andere Restriktionsstellen als der Ursprungsvektor enthält, mussten neue Primer konstruiert werden, um eine korrekte Ligation zu ermöglichen. Die Restriktionsstellen Sbf und NotI und folgende Primersequenzen wurden verwendet:

P2Y2-FWD-SBF: `ATC CTG CAG GGC CAC CAT GGG CAG CAG ACC T`

P2Y2-REV-REV: `CCA AGT TAA CAA CAA CAA TTG C`

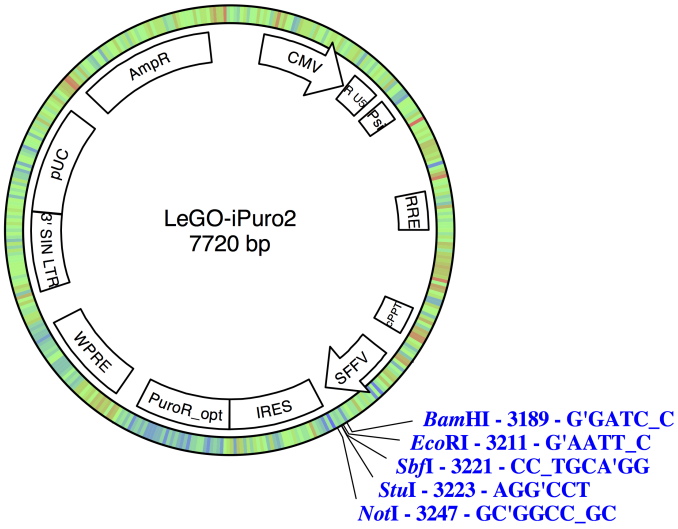

Abb. 2.4. *Schemazeichnung des LeGO-iPuro2-Vektors. Hervorgehoben im Vektor sind wichtige Bereiche wie die Resistenzgene und Promotor. Außerhalb in blau sind die Restriktionsstellen der MCS markiert.*

Als Matrize diente der bereits in den pTagGFP2-N ligierte $P2Y_2$-Rezeptor. Im Gegensatz zur PCR in Abschnitt 2.2.6.3 wurde nicht nur die Sequenz des Rezeptors, sondern die Rezeptorsequenz mit der des GFP zusammen amplifiziert, um sicher zu stellen, dass auch aus dem lentiviralen Vektor heraus das gleiche Produkt hergestellt wird, wie aus dem pTagGFP2-N-Vektor. Zumal der zur Verfügung gestellte Vektor noch keine Sequenz für ein Fluoreszenzprotein bot. Der Reaktionsansatz der PCR setzte sich wie folgt zusammen:

2.2.8.2 PCR-Ansatz

Substanz	**Menge**	**Endkonzentration**
H_2O	27 μl	
5x Phusion HF-Buffer	10 μl	1X
dNTP's	1 μl	200 μM jeweils
Forward Primer	2,5 μl	500 nM
Reverse Primer	2,5 μl	500 nM
Matrizen-DNA	5 μl	1ng/μl
DMSO	1,5 μl	3%
Phusion DNA Polymerase	0,5 μl	0,02 U/μl
Gesamtvolumen	**50 μl**	

Tabelle 2.15. *Reaktionsansatz für eine PCR zur Amplifikation der DNA des $P2Y_2$-Rezeptors mit den Schnittstellen für SbfI und NotI.*

Das PCR-Programm gestaltete sich wie folgt:

Zyklus	Stufe	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl Zyklen
1	Initiale Denaturierung	98	30	1
2	1: Denaturierung	98	10	35
	2: Annealing	62	30	
	3: Elongation	72	75	
3	Finale Elongation	72	600	1

Tabelle 2.16. *Programm für eine PCR zur Amplifikation der DNA des P2Y$_2$-Rezeptors mit den Schnittstellen für SbfI und NotI*

2.2.8.3 Isolierung und Aufreinigung des PCR-Produktes

Die Isolation des PCR-Produktes erfolgte durch Elektrophorese durch ein Agarosegel, wie in Abschnitt 2.2.6.4 beschrieben.

2.2.8.4 Doppelter Restriktionsverdau für Klonierung

Um die P2Y$_2$-DNA (Insert) in den Vektor ligieren zu können, mussten sowohl der Vektor als auch das Insert mit Restriktionsenzymen geschnitten werden, um jeweils komplementäre Sequenzen auf beiden DNA-Strängen zu erhalten (sticky ends). So konnten diese von einer Ligase in einem späteren Schritt wieder zusammengefügt werden. Von der Insert-DNA wurde der gesamte Ansatz verwendet, vom Vektor 1 μg.

Substanz	Insert	Vektor	Endkonzentration
H_2O	17,5 μl	42,5	
SbfI	1 μl	1 μl	10 U/μg DNA
NotI	0,5 μl	0,5 μl	10 U/μg DNA
DNA	26 μl	1 μl	
10X Reaktionspuffer	5 μl	5 μl	1X
Gesamtvolumen	**50 μl**	**50 μl**	

Tabelle 2.17. *Reaktionsansatz für einen doppelten Restriktionsverdau für die DNA des P2Y$_2$-Rezeptors, sowie des LeGO-iPuro-2 Vektors, in den kloniert werden sollte.*

Die Aufreinigung der DNA erfolgte jeweils mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen nach Herstellerangaben, siehe Abschnitt 2.2.6.8.

2.2.8.5 Ligierung von P2Y$_2$-R-LeGO-iPuro2

Die Ligasereaktion setzte sich wie folgt zusammen und wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Substanz	Menge	Endkonzentration
Insert	3,85 μl	90 fmol
Vector	1,58 μl	30 fmol
10X Ligase-Puffer	2 μl	1X
H_2O	11,57 μl	500 nM
Ligase	1 μl	1 U/μl
Gesamtvolumen	**20 μl**	

Tabelle 2.18. *Reaktionsansatz für eine Ligation zwischen Rezeptor-GFP Insert und dem LeGO-iPuro2 Vektor.*

Der ligierte Vektor wurde, wie oben beschrieben, durch das Maxipräp-Kit von Qiagen in kompetente *E. coli* (DH5α) transformiert und so vervielfältigt.

2.2.9 Punktmutationen am $P2Y_2$-Rezeptor im LeGO-iPuro2 Vektor

Wie in Abschnitt 2.2.7 bereits beschrieben, erfolgte nun das Einbringen von Punktmutationen in den Purinrezeptor, wobei dieses Mal alle möglichen Kombinationen der drei Punktmutationen erstellt wurden:

- S243 ($P2Y_2$-1A)
- T344
- S356
- S243 + T344 ($P2Y_2$-2A)
- S243 + S356
- T344 + S356
- S243 + T344 + S356 ($P2Y_2$-3A)

Hierfür wurden dieselben Primer, Protokolle und Kits verwendet, wie in Abschnitt 2.2.6, daher erfolgt hier keine detailierte Erläuterung der Arbeitsschritte

2.2.10 Herstellung von Zelllinien, welche die $P2Y_2$-GFP-Rezeptoren stabil exprimieren

Die weiteren Schritte zur Herstellung von lentiviralen Viruspartikeln aus dem von mir klonierten Vektoren und die Beimpfung von A549-Zellen, sowie die einwöchige Kultur der Zellen nach Beimpfung unter Selektionsdruck von Puromycin, wurden im Labor des onkologischen Zentrums / Klinik für Stammzelltransplantationen am Universitätsklinikum Eppendorf durch

Kristoffer Riecken durchgeführt. Die Kontrolle erfolgte im Anschluss mittels FACS-Analyse, welche die Effizienz der Methode zeigte, wobei das GFP als Marker diente, siehe Ergebnisteil. Außerdem wurde von Kristoffer Riecken, wie oben beschrieben, eine A549-Zelllinie hergestellt, die stabil GFP exprimiert, welche für die Versuche als Kontrolle dienen sollte.

2.2.11 Calcium-Ratio-Imaging

Calcium-Ratio-Imaging ist eine Methode, bei der an vielen lebenden Zellen gleichzeitig die zytosolische Calciumkonzentration mit einem Fluorezenzmikroskop quantifiziert werden kann (Live-Cell-Imaging).
Calcium ist ein wichtiger Botenstoff in der, unter anderem von metabotropen Purinrezeptoren aktivierten, IP_3-Signaltransduktion. Es spielt aber auch eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, der Depolarisierung von Neuronen oder Muskelzellen und anderen Zellen wie z.B. Alveozyten Typ II (AEZ) [35].
In dieser Dissertation werden mit $P2Y_2$-Rezeptor-Varianten transfizierte AEZ im Brutschrank zwei Stunden mit einer kapseldefizienten Variante von *S. pneumoniae*, den D39(Δcps), inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung der zytosolischen Calciumkonzentration. Hier sollen zwei Agonisten, die in der Lage sind ein zytosolisches Calciumsignal auszulösen, getestet werden. Zum einen ATP als natürlicher Agonist des $P2Y_2$-Rezeptors, zum anderen Trypsin. Trypsin aktiviert über PAR-Rezeptoren, ebenso wie ATP bei $P2Y_2$-Rezeptoren, über die PLC die IP_3-Kaskade. Nach der Aktivierung erfolgte, genau wie bei den Purinrezeptoren, ein zytosolisches Calciumsignal [4]. Sollte Trypsin ein Calciumsignal auslösen, müsste überprüft werden, ob D39(Δcps) eine Modifikation weiter oberhalb der Signalkaskade, bspw. am Rezeptor direkt bewirkt.
Hierzu werden AEZ untersucht, die eine Wildtypvariante ($P2Y_2$-WT) des Rezeptors exprimieren, im Vergleich zu einer dreifach mutierte Variante des Rezeptors ($P2Y_2$-3A). Es soll überprüft werden, ob die AEZ mit mutiertem Purinrezeptor noch ein zytosolisches Calciumsignal zeigen, auch wenn diese mit D39(Δcps) vorinkubiert wurden. Dies würde die Überlegung stützen, dass *S. pneumoniae* über eine Modifikation am Purinrezeptor dessen Inaktivierung bewirkt.
Bei positivem Ergebnis sollen die Mutationsstellen auch einzeln untersucht werden, um zu überprüfen, welche der Phosphorylierungsstellen den Effekt bewirkt, oder ob die Kombination den Ausschlag gibt.
Zur Messung der zytosolischen Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_{zyt}$ wurde Fura-2AM verwendet, welches ein Calcium-Chelator ist, der, anhängig von der Bindung an Calcium, Licht bei 510 nm in unterschiedlicher Intesität emittiert. Während einer Messung wird das Fluorophor alternierend mit 340 und 380 nm angeregt. Ist Calcium gebunden, ist die Emission nach 340 nm Exzitation gering und nach 380 nm Exzitation hoch. Wenn jedoch gerade viel Calcium im Zytosol

vorliegt, steigt auch der Anteil am Fura-2, der an Calcium gebunden ist. Dann ist die Emission erhöht, wenn mit 340 nm angeregt wird und erniedrigt, wenn mit 380 nm angeregt wird. Aus der Ratio der Fluoreszenzintensitäten kann so anhand einer Eichkurve auf die zytosolische Calciumkonzentration geschlossen werden.

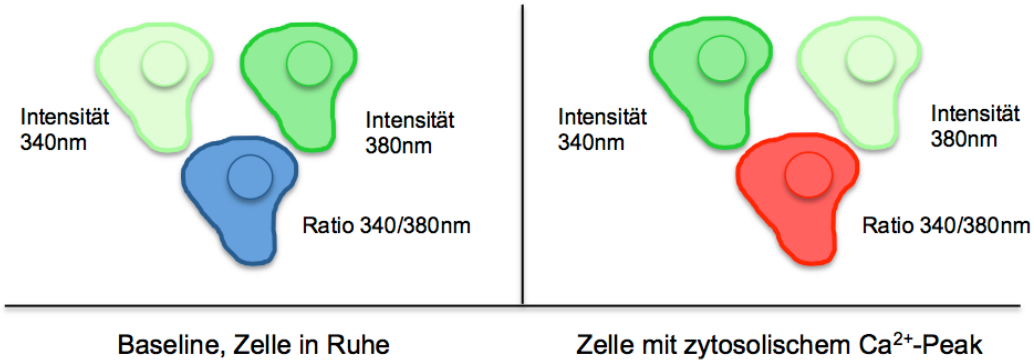

Abb. 2.5. *Schematische Darstellung von mit Fura-2 beladenen Zellen. Links ist das Fluoreszenzverhalten von Fura unter Ausgangsbedingungen zu sehen, wenn wenig zytosolisches Calcium vorhanden ist. Rechts mit viel zytosolischem Calcium, z.B. nach Stimulation mit ATP*

Die Eichkurve musste für jeden Zelltyp individuell erstellt werden. Hierzu wurden die Zellen analog zu den Versuchen mit 10 μM Fura-2AM gefärbt, gewaschen und der Versuch gestartet. Nach ca. 10 min wurden 80 μM Ionomycin in den Überstand pipettiert. Ionomycin ist ein Salz, das vom Bakterium *Streptomyces conglobatus* gebildet wird. Es zählt zu den Ionophoren und setzt sich in Zellmembranen fest. Dadurch werden diese durchlässig für Calciumionen, welche dann aus dem Überstand anhand des chemischen Gradienten ins Zytosol einströmen können. Die intrazelluläre Calciumkonzentration entspricht dann näherungsweise derjenigen Konzentration, die im Überstand vorliegt: ca. 2 mM. Nach ca. 10 min lag liegt ein stabiles Gleichgewicht zwischen einströmendem und ausströmendem Calcium vor. Nun wurden 4 mM EGTA hinzugegeben. EGTA ist ein Chelator für zweiwertige Kationen, besonders für freie Calciumionen und bildet mit diesen stabile Komplexe im Verhältnis 1:1. Da EGTA im Überschuss vorlag, darf näherungsweise angenommen werden, dass die Konzentration freier Calciumionen im Überstand sowie im Zytosol nahe Null lag. Die Messwerte der Fluoreszenzintensitäten bei 2 mM und 0 mM Calcium wurden zusammen mit weiteren Parametern in die Formel nach Grynkiewicz [12] eingesetzt, um die zytosolische Calciumkonzentration zu bestimmen:

$$[Ca^{2+}]_{zyt} = KD * B\frac{(R-R_{MIN})}{(R_{MAX}-R)}$$

$\mathbf{[Ca^{2+}]_{zyt}}$	Zytosolische Calciumkonzentration
KD	Dissozationskonstante für Fura-2AM: 224 nM
R	Gemessener Fluoreszenzintensitätsquotient von Fura-2AM (bei 340 und 380 nm)
RMIN	Fluoreszenzintensitätsquotient bei 0 mM Ca^{2+}-Konzentration (Fura-2 entsättigt)
RMAX	Fluoreszenzintensitätsquotient bei 2 mM Ca^{2+}-Konzentration (Fura-2 gesättigt)
B	Fluoreszenzintensitätsquotient von der Ca^{2+}-freien und Ca^{2+}-gesättigten Form von Fura-2AM bei 380 nm.

Die intrazelluläre Konzentration an Fura-2 kann zwischen zwei Versuchen sehr unterschiedlich ausfallen und zu verschiedenen Fluoreszenzintensitäten führen. Die Bildung der Ratio aus den Fluoreszenzintensitäten bei 340 und 380 nm Anregung hat den Vorteil, dass die Errechnung des Calciumwertes unabhängig von der Konzentration des intrazellulären Fluoreszenzfarbstoffes erfolgen kann.
Die Hintergrundfluoreszenz muss von den gemessenen Werten abgezogen werden, da es sonst zu verfälschten Messungen kommt. Dies wurde jeweils unmittelbar vor Versuchsbeginn durchgeführt.
Auf 2-well Zellkulturkammern befindliche Zellen wurden jeweils einmal mit 2 ml HEPES-Puffer abgewaschen und anschließend 30 min mit 10 μM Fura-2AM in 500 μl Nährmedium im Brutschrank inkubiert. Während der Inkubationszeit diffundierte Fura-2AM als apolare Esterverbindung durch die Zellmembran ins Zytosol. Hier hydrolysierten unspezifische Esterasen die Esterverbindung und überführten das Fura in eine apolare Form, welches die Zelle nicht mehr verlassen kann. Im Anschluss wurde das überschüssige Fura-2AM im Überstand dreimalig mit jeweils 2 ml HEPES-Puffer abgespült, um die Hintergrundfluoreszenz zu verringern und nicht vollständig aufgelöstes Fura-2AM zu entfernen, welches die Aufnahmen stören könnte.
Anschließend wurden die Objektschalen unter dem Fluoreszenz-Auflichtmikroskop BX40 betrachtet, wobei die Messung mit 340/380 nm Exzitation alle 5 Sekunden erfolgte. Nach einer Baseline von ca. 5 Minuten erfolgte die Zugabe von 100 μM ATP als Agonist des $P2Y_2$-Rezeptors. Wenn die Zellen auf Agonistenzugabe kein zytosolisches Calciumsignal zeigten, wurde 50 nm Trypsin als Positivkontrolle zugegeben um die Vitalität der Zellen zu gewährleisten.
Teilweise wurden die Zellen mit kapseldefizienten *S. pneumoniae* (D39Δcps) unter Brutschrankbedingungen über zwei Stunden vorinkubiert. Hierzu wurde das Medium über den Zellen zunächst zweimalig mit HEPES-Puffer abgewaschen. Anschließend wurden zu 1 ml Medium ohne Antibiotikum 100 μl (D39Δcps) in THY-Medium mit einer Konzentration von 10^7/ml (CFU ca. 100:1) hinzugefügt. Anschließend erfolgten die Färbung mit Fura-2AM und alle weiteren Schritte wie oben beschrieben.

2.2.11.1 Calcium-Versuche mit P2Y$_2$-3A Rezeptormutante

Um zu zeigen, ob die P2Y$_2$-Rezeptormutante im Vergleich zum Wildtyp ein anderes Verhalten nach Inkubation von Zellen mit D39(Δcps) hat, wurde zum einen die Wildtyp-Variante des Rezeptors, zum anderen die Mutante mit drei deletierten Phosphorylierungsstellen in primär isolierte Alveolarepithelzellen transient transfiziert, die von sich aus auf ATP kein Calciumsignal zeigten (s.o.). In einer Versuchsgruppe wurde mit D39(Δcps) vorinkubiert und anschließend mit 100 μM ATP stimuliert, in der anderen wurde nur ATP zugegeben.
Die Messung erfolgte wie oben beschrieben, jedoch wurde vor Versuchsbeginn eine Aufnahme bei 488 nm angefertigt, um die GFP-Markierung am P2Y$_2$ sichtbar zu machen. Nun konnten die transfizierten Zellen ausgewählt werden, um diese gesondert auszuwerten. Kontrollversuche wurden mit Zellen durchgeführt, die mit dem Wildtyp-Rezeptor oder nur mit GFP transfiziert waren.

2.2.11.2 Calcium-Versuche mit verschiedenen P2Y$_2$-Mutanten

Um den Effekt der jeweiligen Punktmutationen näher zu untersuchen, wurden die mutierten und klonierten P2Y$_2$-Mutanten in A549-Zellen transfiziert.

- S243A = **1A**
- S243A + T344A = **2A**
- S243A + T344A + S356A = **3A**

Auch hier wurden über die GFP-Makrierung am P2Y$_2$-Rezeptor gezielt transfizierte Zellen ausgesucht und isoliert von nicht transfizierten Zellen ausgewertet.

2.2.11.3 Calciumversuche mit Inhibitoren

1) Kinaseinhibitoren

Um den Effekt, den *S. pneumoiae* auf die Zellen hat, näher zu untersuchen, wurden diese zeitgleich mit verschiedenen Kinaseinhibitoren koinkubiert.
Die Auswahl der möglichen Phosphorylierungsstellen erfolgte anhand des Onlineprogramms Scansite vom Massachusetts Institute of Technology (http://scansite3.mit.edu). Dieses ist in der Lage, aus Protein-Sequenzen wahrscheinliche Phosphorylierungsmotive für verschiedene Kinasen zu erkennen. Unter Angabe der Aminosäurensequenz des P2Y$_2$-Rezeptors schienen hier verschiedene Proteinkinasen infrage zu kommen. Verschiedene Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen wurden daher ausgetestet, um zu untersuchen, ob eine Substanz die Calciumantwort auf Zugabe von 100 μM ATP trotz Vorinkubation mit *S. pneumoiae* erhalten kann.

Dazu wurde zunächst das Medium über A549-Zellen zweimalig mit 2 ml HBS-Puffer abgewaschen und durch 1 ml Medium ohne Antibiotikum mit gelöstem Inhibitor in entsprechender Konzentration ersetzt. Nach 30 min Inkubation im Brutschrank wurden, analog zu den Versuchen ohne Inhibitoren, 10^6 D39(Δcps) hinzugefügt (CFU ca. 100:1) und für 120 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank für 30 min mit Fura-2AM gefärbt. Ca. fünf Minuten nach Versuchsbeginn wurden 100 μM ATP zugegeben. Falls die Zellen keine Calciumantwort zeigten, wurden 50 nM Trypsin als Positivkontrolle zugegeben, um die Vitalität der Zellen zu überprüfen.

- **PKA-Inhibitoren:**

  H-89 ist ein reversibler, potenter, selektiver Inhibitor der PKA und kompetiert mit zytosolischem ATP, weswegen die optimale Inhibitor-Konzentration für jeden Zelltyp einzeln bestimmt werden muss. Die Wirkung auf andere Kinasen, wie die PKC, PKG, Calcium/Calmuodulin abhängige Kinase und andere, wurde als schwach getestet [2]. H-89 wurde in Konzentrationen von 10-100 μM eingesetzt, die Vorinkubationszeit betrug von 30 Minuten bis 12 Stunden.

  KT5720 ist ebenfalls ein reversibler, potenter, selektiver Inhibitor der PKA und kompetiert ebenfalls mit zytosolischem ATP. Bei den meisten anderen getesteten Kinasen wurde nur ein sehr geringer Effekt festgestellt. Jedoch wurden für Phosphorylase Kinase PHK und die Pyruvat-Dehydrogenase-Lipoamid-Kinase Isoenzym 1 (PDK1) sogar noch stärkere inhibitorische Effekte als für die PKA gezeigt [5]. Hier wurde eine Konzentration von 10 μM eingesetzt.

- **PKC-Inhibitoren:**

  Protein Kinase C Inhibitor, *Myristoylated* ist ein Peptid aus 13 Aminosäuren das mit einem Myristoylat-Rest kovalent verbunden ist, wodurch es lipophiler wird und Zellmembranen überwinden kann. Das Peptid ist ein Pseudosubstrat der PKC. Eine 75%-ige, jedoch hochspezifische Inhibition der PKC zeigte die Substanz schon bei 50 nM [8]. Hier wurden 75 nM verwendet.

  KN-93 ist ein reversibler, selektiver und kompetitiver Inhibitor der Ca^{2+}/Calmodulin abhängigen Kinase II, zeigt jedoch auch Effekte auf die Durchlässigkeit von L-Typ Calciumkanälen in glatter Muskulatur. [11] Die Substanz wurde in DMSO gelöst und in einer Konzentration von 2 μM eingesetzt

- **PKD-Inhibitor:**

  CID755673 ist ein nicht ATP-kompetitiver, selektiver und reversibler Inhibitor aller PKD Isoformen (I, II und III). Die PKD ist in der Signaltransduktion der PKC unmittelbar nachgeschaltet und wird durch diese aktiviert. AKT, polo-like kinase 1 (PLK1),

CDK aktivierende Kinase (CAK), CAMKIIα und alle drei PKC-Isoformen werden hingegen nur sehr schwach gehemmt [41]. CID755673 wurde in einer Konzentration von 500 nM eingesetzt.

- **CDK-Inhibitor**

  Roscovitine ist ein Purinanalogon und selektiver, kompetitiver Inhibitor der Cyklin-abhängigen Kinasen und kompetiert mit zytosolischem ATP [28]. Getestet wurde eine Inhibitorkonzentration von 10 μM.

- **PKB-Inhibitor:**

  GSK690693 ist ein ATP-kompetitiver, selektiver Inhibitor aller drei Isoformen der Proteinkinase B (α, β und γ). Die PKB gehört zu den Serin/Threoninkinasen und ist in Tumorgewebe oft überexprimiert, da sie an Wachstums- und Proliferationssignalen beteiligt ist [19]. Der Inhibitor wurde in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt.

2) Rezeptorinhibitor

- **WEB2086** ist ein potenter, selektiver Antagonist am plättchenaktivierten Rezeptor [31]. Getestet wurden die Konzentrationen 10, 50 und 100 μM des Inhibitors, jeweils analog zu den Versuchen mit den Kinaseinhibitoren: 30 min Vorinkubation der Substanz, gelöst in Medium im Brutschrank, anschließend Koinkubation mit 10^6 D39(Δcps) ebenfalls im Brutschrank.

2.2.11.4 Kontrollen

PEG-SOD ist eine Superoxyddismutase, welche von fast allen aeroben Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen gebildet wird und die Reaktion von Sauerstoffradikalen mit Wasser in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid katalysiert [46]. Dies dient dem Schutz der Zellen vor Schäden durch die Radikale.
Um zu prüfen, ob eine Inkubation mit *S. pneumoniae* über das vermehrte Auftreten von Sauerstoffradikalen Veränderungen an der Calciumantwort auf ATP-Stimulation bewirken kann, wurden A549-Zellen mit 20 U/ml PEG-SOD und D39(Δcps) im Überstand inkubiert. Nach zwei Stunden erfolgte die Färbung mit Fura2-AM und eine Calcium-Ratio Mikroskopie mit Zugabe von 100 μM ATP in den Überstand.

Apyrase ist eine ATP und ADP Diphosphohydrolase, welche als Produkt ADP + 2 P bildet [38]. Bei diesen Versuchen sollte geprüft werden, ob eine Inkubation von AEZ mit *S. pneumoniae* über ein vermehrtes Auftreten von ATP im Überstand zur Inaktivierung des $P2Y_2$-Rezeptors führen könnte. A549-Zellen wurden mit 5,4 U/ml Apyrase und D39(Δcps) im Überstand inkubiert. Nach zwei Stunden erfolgte die Färbung mit Fura2-AM und eine Calcium-Ratio Mikroskopie mit Zugabe von 100 μM ATP in den Überstand.

2.2.11.5 Calciumversuche mit *Pseudomonas aeruginosa*

Analog zu den Versuchen mit *S. pneumoniae* wurden A549-Zellen verwendet, die jedoch abweichend mit ca. 10^7, *Pseudomonas aeruginosa* (CFU 1000:1) zwei Stunden im Brutschrank vorinkubiert wurden. Anschließend erfolgten die Färbung mit Fura-2AM und alle weiteren Schritte wie oben beschrieben.

2.2.11.6 Versuche mit Live/Dead Cell staining-Kit II

Um zu überprüfen, ob eine zweistündige Inkubation mit D39(Δcps) (CFU 100:1) dazu führt, dass vermehrt HPAEpi-Zellen zugrunde gehen, wurden diese nach einer zweistündigen Inkubation mit *S. pneumoniae* im Brutschrank mit den Fluoreszenzfarbstoffen aus dem o.g. Live/Dead-Kit, anstatt mit Fura-2AM gefärbt. Das im Kit enthaltene Calcein-AM kann ähnlich wie Fura-2AM die Zellmembranen überwinden, wobei durch Hydrolyse der Esterverbindung im Zytosol eine Diffusion zurück in den Überstand nicht mehr möglich ist. Der grüne Farbstoff hat eine maximale Exzitation bei 495 nm und eine maximale Emission bei 515 nm. Das enthaltene Ethidium homodimer III kann intakte Zellmembran nicht überwinden. Bei geschädigter Zellmembran werden vor allem im Zellkern Nukleinsäuren rot gefärbt, wobei die maximale Exzitation bei 530 nm und die maximale Emission bei 635 nm liegt. Das Calcein wurde in einer Konzentration von 2 μM, das Ethidium homodimer in einer Konzentration von 4 μM eingesetzt.

2.2.12 Versuche mit LysoTracker Green (LTG)

Um zu überprüfen, ob die Inaktivierung des $P2Y_2$-Rezeptors durch *S. pneumoniae* auch tatsächlich funktionelle Konsequenzen hat, sollten Versuche zur Surfactant-Sekretion durchgeführt werden. Wenn AEZ in Kultur gehalten werden, verlieren sie schnell die Fähigkeit zur Surfactant-Sekretion; daher sollten hier primär isolierte AEZ aus der Rattenlunge möglichst rasch nach der Ernte zur Messung verwendet werden. Die Isolation erfolgte im Wesentlichen nach Haller et. al. 1998 [13]. Um die Lamellarkörperchen untersuchen zu können, wurden die AEZ mit LysoTracker Green (LTG) angefärbt. In niedrigen Konzentrationen werden selektiv saure sphärische Zellorganellen, wie bspw. Peroxisomen, angefärbt, also nicht nur Lamellarkörperchen, wobei sich gezeigt hat, dass das LTG als Marker zur Selektion von AEZ Typ II dienen kann [6].
Hier wurden zwei Gruppen verglichen: Zum einen die alleinige Zugabe von ATP in den Überstand, zum anderen mit D39(Δcps) vorinkubierte AEZ und Zugabe von ATP. Die Zugabe fand während der Messung unter einem Fluoreszenzmikroskop statt. Die Fluoreszenzintensität der Lamellarkörperchen wurde über 45 min gemessen. Ein Abfall der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von ATP würde dann als Surfactant-Sekretion gewertet werden, im Vergleich zu einer Kontrolle in der nur Messpuffer zugegeben wird.

LysoTracker Green (LTG) besteht aus einer schwachen Base mit einem Fluorophor, das eine maximale Anregung bei 504 nm und Emission bei 511 nm hat. Es kann Zellmembranen überwinden und wird in saurem Milieu der Lysosomen protoniert, wodurch es diese nicht mehr verlassen kann. Auf diese Weise ließen sich auch die Lamellarkörperchen der primär isolierten Pneumozyten Typ II aus der Ratte färben.
Somit werden ebenfalls die Surfactant speichernden Lamellarkörperchen angefärbt. Es sollte untersucht werden, ob die Zugabe von 100 μM ATP zu einem gesteigerten Verlust der Fluoreszenzintensität führt, welche als Sekretion des Inhaltes der Lamellarkörperchen interpretiert werden könnte. Ebenfalls sollte überprüft werden, ob dies bei Zellen, die mit D39(Δcps) vorinkubiert waren, ausbleibt.
Hierzu wurden die AEZ zwei Stunden mit 10^6 D39(Δcps) im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die zeitgleiche Färbung mit 10 μM Fura-2AM und 50 nm LTG für 30 min im Brutschrank, ähnlich zu den Versuchen von Haller 1998 [13], wobei die Fura-2AM-Konzentration an die verwendeten Zellen angepasst wurde. Minütlich wurden mit 340, 380 nm für die Calcium-Ratio Messung und 485 nm Anregung für die Messung des LTG, Bilder aufgenommen. Nach 15 min erfolgte die Zugabe von 100 μM ATP, bzw. HBS in der Kontrollgruppe.
Zur Auswertung wurden die einzelnen LTG-gefärbten Strukturen je mit einer Region of interest (ROI) eingeschlossen und die Fluoreszenz über die Zeit gemessen. Das Ergebnis wurde in einem Graph aufgetragen, wobei die relativen Fluoreszenzintensitäten der Strukturen einer Zelle wieder zu einem Mittelwert mit Standardfehler zusammengefasst wurden.

2.2.13 Spinning-Disk Mikroskopie

Der GFP-Marker am klonierten $P2Y_2$-Rezeptor kann Fluoreszenzmikroskopisch dazu genutzt werden, dessen Bewegung und Verhalten zu beobachten.
In dieser Dissertation sollte gezeigt werden, ob ATP als natürlicher Agonist am $P2Y_2$-Rezeptor, genau wie D39(Δcps) zu einer Sequestrierung des Rezeptors von der Membran ins Zytosol bewirken kann, und ob sich dies durch Verwendung der dreifachen Mutante ($P2Y_2$-3A) verhindern lässt. Dies wurde mit ATP als Agonist bereits beschrieben [10], neu ist hier die Verwendung von D39.
Spinning-Disk-Mikroskopie bedeutet, dass von den Zellen hochaufgelöste Schichtaufnahmen angefertigt werden können, die anschließend mit einer Auswertungssoftware, in diesem Fall Imaris® von Bitplane, zu einem 3D-Modell wieder zusammengesetzt werden können. Dies erlaubt, im Vergleich zur Mikroskopie mit einem Epifluoreszenzmikroskop, eine erheblich detailliertere Darstellung der intrazellulären Strukturen.
Im Gegensatz zu den Versuchen der zytosolischen Calciummessung, wurden hier ATP bzw. D39(Δcps) während der Messung zugegeben. Über einen Zeitraum von zwei Stunden wurden in zehnminütigen Abständen Aufnahmen von den transfizierten AEZ erstellt, um Bewegungen des Rezeptors zu verfolgen. Auch hier sollte die Wildtyp-Variante des $P2Y_2$-Rezeptors im

Vergleich zur dreifachen Mutante untersucht werden.

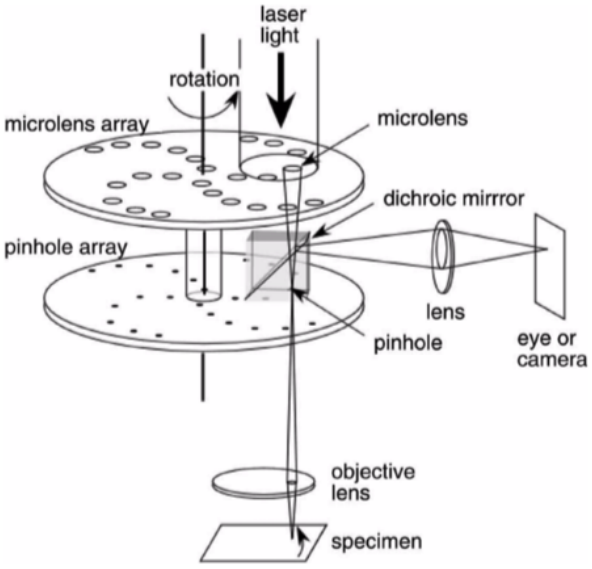

Abb. 2.6. *Schematische Darstellung eines Spinning-Disk Mikroskopes mit den wichtigsten Bauteilen und Lichtwegen. Aus Nakano 2002 [32].*

Der Vorteil von Spinning-Disk-Mikroskopie gegenüber der konfokalen Mikroskopie liegt in der Geschwindigkeit der Aufnahmen, die hier deutlich übertroffen wird. Somit können in kürzerer Zeit mehrere Aufnahmen gemacht werden. Ein weiterer Vorteil ist die geringere Phototoxizität: Der Laserstrahl für die Exzitation wird durch schnell rotierende Linsen über den gesamten zu mikroskopierenden Bereich aufgefächert, wodurch jeder einzelne neue Laserpunkt viel weniger Energie hat, als der einzelne Laserstrahl der Konfokalmikroskopie. Dadurch kommt es zu weniger Zellschäden durch den Laser und die Fluorophore bleichen nicht so schnell aus. Die Messung erfolgt so schnell, dass für das Auge am Okular ein reales Bild sichtbar wird.

In Abb. 2.6 ist eine schematische Darstellung des Lichtweges bei der Spinning Disk Mikroskopie zu sehen. Zu beachten ist, wie das Laser-Licht durch eine Vielzahl von Linsen durch sog. *pinholes* gelenkt wird. Die pinholes sind so angeordnet, dass Licht von außerhalb der Fokusebene ausgeblendet wird. Die beiden Scheiben mit den Linsen und den bis zu 2000 pinholes drehen sich immer gleichsinnig und sind so übereinander angeordnet, dass weniger als eine Umdrehung ausreicht um ein Bild aufzunehmen, wobei die Umlaufsgeschwindigkeit 10 Umdrehungen/min beträgt.

Zu den Nachteilen der Spinning-Disk-Mikroskopie gehört die geringere Lichtausbeute im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie. Ein erheblicher Anteil des zurückkommenden Lichts

bleibt an der Lochblende zurück. Ebenso ist das Auflösungsvermögen vergleichsweise etwas geringer.

2.2.13.1 Spinning-Disk-Mikroskopie mit $P2Y_2$-GFP-Rezeptoren und *S. pneumoniae*

In dieser Arbeit ging es auch darum, das $P2Y_2$-Rezeptorverhalten, im Sinne einer Translokation, auf Zugabe von ATP als natürlichem Agonisten im Vergleich zu *S. pneumoniae*, zu untersuchen. Dazu wurden hier A549-Zellen entweder mit der Wildtypvariante oder der dreifach mutierten Variante des $P2Y_2$-Rezeptors, jeweils mit GFP-Tag, transient transfiziert und nach Agonisten-/D39-Zugabe für zwei Stunden alle 10 min mikroskopiert. Dabei wurde ein Wildtyp-D39 Stamm, sowie eine kapseldefiziente D39-Variante eingesetzt. Kontrollen mit HBS-Puffer und THY-Medium mit 20% Glycerin wurden durchgeführt.
Mit einer XYZ-Stage, welche die zellentragenden Objekträger mikrometergenau dreidimensional bewegen kann, konnten Software-gesteuert mehrere Messpunkte auf einem Objektträger nacheinander angefahren werden und somit bis ca. 10 Zellen pro Versuch mikroskopiert werden. Es wurde ein 60x Ölimmersions-Objektiv von Zeiss verwendet. Die Versuche fanden unter Brutschrankbedingungen bei 37°C, 5% CO_2 und Gasbefeuchtung statt.
Um das Ausbleichen der Fluophore so gering wie möglich zu halten, wurde ein 488 nm Laser mit zehn Prozent der maximalen Leistung für jeweils 500 ms/Schicht eingesetzt. Die Anzahl der Schichten war von Versuch zu Versuch unterschiedlich und orientierte sich an der Größe der Zellen; meist waren es 12 Schichten. Die Schichtdicke betrug jeweils 1 μm, sodass in der Höhe 11 μm gemessen wurden. Zudem wurde ein Long-Pass eingesetzt, um die gesamte Emission des GFP detektieren zu können.
Als Software kam Volocity 3D Image Analysis Software von Perkin Elmer zum Einsatz, um das Mikroskop zu steuern und die Aufnahmen in das OME-TIFF-Format zu exportieren. Die so gewonnenen Daten wurden anschließend von Imaris (Bitplane) bearbeitet und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte halb-standardisiert, indem Imaris unter Angabe von Parametern wie Strukturgröße und Form Oberflächen detektierte. Die Parameter, wieviel Hintergrundrauschen abgezogen werden muss, welche Größe und Form die interessierenden Strukturen haben und andere Einstellungen, unterschieden sich von Zelle zu Zelle. Im rekonstruierten 3D-Modell wurden regelhaft fälschlicherweise erkannte Strukturen manuell entfernt, die beispielsweise noch in der Zellmembran waren und nicht im Zytosol. Beobachtet, gezählt und ausgewertet wurde die Anzahl zytosolischer Vesikel vor und nach Intervention. Die Ergebnisse der einzelnen Messpunkte wurden über die Versuchsgruppen gemittelt und über die Zeit graphisch aufgetragen.

2.2.13.2 Spinning Disk-Mikroskopie mit LifeAct

Ein weiterer beschriebener Effekt von $P2Y_2$ ist ein Remodelling am Aktinskelett durch ATP-Stimulation [20]. Durch eine transiente Transfektion mit LifeAct (Red oder Green) sollen

A549-Zellen, die ein kräftiges Aktinskelett mit vielen Stressfibers ausbilden [47], eine kurze Proteinsequenz, die mit einem Fluophor verbunden ist, herstellen. Die kurze Proteinsequenz ist in der Lage, selektiv an intrazelluläre Aktinfilamente zu binden und sich wieder zu lösen, wenn es zu einem Umbau am Aktinskelett kommt. Die physiologischen Auf- und Abbauprozesse des Aktins werden nicht gestört und können so auch in einem Live-Imaging sichtbar gemacht werden [37].
In einem Spinning-Disk-Mikroskop sollen die transfizierten Zellen untersucht werden. Dann soll in verschiedenen Versuchsgruppen untersucht werden, ob die Zugabe von ATP oder D39(Δcps) und ATP reproduzierbare Veränderungen am Aktinskelett bewirkt.
LifeAct ist ein kurzes Fusionsprotein, bestehend aus einem kurzen Peptid, welches mit tagGFP2 (Exzitation/Emission: 483 / 506 nm) oder tagRFP (Exzitation/Emission: 555 / 584 nm) verbunden ist. Das Peptid bindet an zytosolische Aktinstrukturen und macht diese über das angeregte Fluophor sichtbar. Dabei wird der natürliche Auf- und Abbau von Aktin nicht beeinträchtigt [37].
A549-Zellen wurden in 4-well Platten transient mit LifeAct-RFP transfiziert, um zu untersuchen, ob durch die Zugabe von ATP oder D39 das Aktinskelett der A549-Zellen verändert wird.
Das Protokoll gestaltete sich wie folgt, wobei zunächst zwei verschiedene Gruppen gleichzeitig untersucht wurden:

Gruppe	**Schritt 1**	**Schritt 2**	**Schritt 3**
1	Ausgangsbedingungen	THY-Medium (20% Glycerol)	HBS
2	Ausgangsbedingungen	10^6 D39(Δcps)	100 μM ATP

Tabelle 2.19. *Versuchsablauf bei Spinning-Disk Versuchen mit LifeAct-Red*

In 15-min-Intervallen wurden pro Gruppe je drei verschiedene Zellen mikroskopiert, wobei ein Laser mit 560 nm zur Exzitation verwendet wurde. Es wurden je Zelle 31 Schichten bei einer Schichtdicke von 0,5 μm aufgenommen.

In einem weiteren Versuchsaufbau wurden A549-Zellen mit LifeAct-Green transfiziert, da das hier exprimierte GFP eine höhere Photostabilität hat.
Zuvor wurde ATP erst nach der D39(Δcps) zugegeben, was jedoch keine sichtbaren Veränderungen gezeigt hat. Hier sollten direkt die Auswirkungen von D39(Δcps)- und ATP-Zugabe verglichen werden:

Gruppe	Schritt 1	Schritt 2
1	Ausgangsbedingungen	100 μM ATP
2	Ausgangsbedingungen	10^6 D39(Δcps)

Tabelle 2.20. *Versuchsablauf bei Spinning-Disk Versuchen mit LifeAct-Green*

Für die Auswertung wurden die aufgenommenen Schichten in beiden Versuchsansätzen wieder zu einem Bild zusammengefügt. Innerhalb einer Freihand-Region of Interest (ROI), die möglichst eng um die untersuchten Zellen gesetzt wurde, wurde über die Zeitpunkte die mittlere Fluoreszenzintensität mit ImageJ gemessen und graphisch aufgetragen.

2.2.14 Phos-tag Western-Blot

Um eine mögliche Phosphorylierung von $P2Y_2$ nachzuweisen steht eine besondere Form eines Western-Blots zur Verfügung, der zunächst wie ein konventioneller SDS-Page Western-Blot funktioniert. Das Laufgel enthält jedoch zusätzlich Phos-tag und Mn^{2+}-Ionen im Verhältnis 1:2.
Phos-tag ist in der Lage, mit phosphorylierten Aminosäuren der Proteine im Laufgel während der Elektrophorese zu interagieren und für kurze Zeit zu binden. Dadurch kommt es zu einer Verlangsamung der Laufgeschwindigkeit phosphorylierter Proteine, wobei die Trennschärfe, je nach Anwendung, so genau sein kann, dass jede einzelne Phosphorylierung eines Proteins als separate Bande dargestellt werden kann [21]. Sollten sich also vermehrte, oder ausgeprägtere Banden in den Versuchsgruppen mit D39-Inkubation oberhalb des Kontrollniveaus zeigen, wäre dies ein deutlicher Hinweis auf eine Phosphorylierung des Rezeptors durch *S. pneumoniae*.
Hier wurden A549-Zellen stabil mit GFP-markierten $P2Y_2$-Rezeptoren transfiziert. Als Kontrolle dienten A549-Zellen, die lediglich mit GFP stabil transfiziert wurden, sowie native untransfizierte A549-Zellen.
Die stabil transduzierten Zellen bieten eine hohe Proteinausbeute und es können Standard-Antikörper gegen GFP verwendet werden, die bessere Ergebnisse ohne unspezifische Banden liefern.

Abb. 2.7 soll ein mögliches Ergebnis eines Phos-tag Western-Blots zeigen, bei dem ein bestimmtes Protein über die Zeit einer immer längeren Phosphorylierung ausgesetzt wurde. Dieses wird durch das Phos-tag im Laufgel verlangsamt, wodurch sich oberhalb der Kontrollhöhe neue Banden zeigen. Eine dickere Bande entspricht mehr Protein.
Das Phos-tag wurde nach Herstellerangaben aufgelöst, die 5 mM Stocklösung wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Das $MnCL_2$ wurde in Wasser gelöst, die 10 mM Stocklösung wurde bei -20°C gelagert.

Abb. 2.7. *Schematische Darstellung. Mögliches Ergebnis eines Blots von einem über die Zeit durch Kinasen phosphorylierten Proteins. Links ohne Phos-tag, rechts mit Phos-tag*

2.2.14.1 Stimulation von A549-Zellen

Stabil mit $P2Y_2$-WT-GFP transduzierte A549-Zellen wurden auf eine 6-well Platte ausgesät und bei Konfluenz für 120 min, 60 min, 30 min, 15 min und 5 min mit 2 x 10^6 D39(Δcps) im Brutschrank inkubiert.

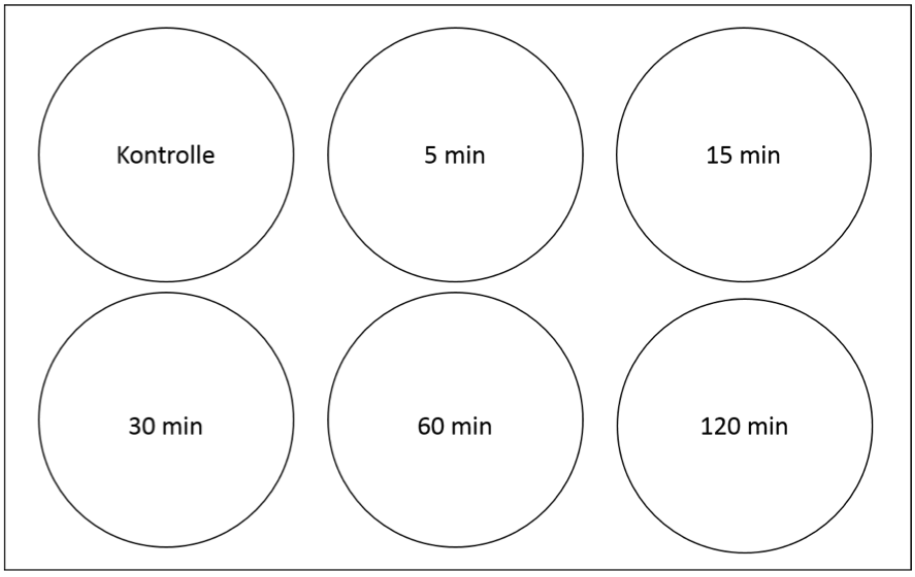

Abb. 2.8. *Schematische Darstellung der Stimulation von A549-Zellen auf einer 6-well Platte*

Außerdem wurden als Kontrollen native A549-Zellen und A549-Zellen, die stabil GFP exprimieren, kultiviert.

2.2.14.2 Proteinisolation

Nach erfolgter Stimulation wurden die wells jeweils zwei Mal mit jeweils 2 ml kaltem PBS abgespült, alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.
Anschließend erfolgte die Zugabe von je 100 μl RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitor und Phosphatase-Inhibitor, um die Zellen zu lysieren. Um die Zellen abzulösen wurden diese mit sterilen Zellschabern abgelöst und in ein Epi überführt. Die Inkubation erfolgte für 45 min auf Eis. Abschließend wurden die Zelllysate für 20 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert, um DNA oder Zellmembranbestandteile, zu entfernen. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues Epi überführt.

2.2.14.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo. Hierfür wurden 25 μl einer 1:10 Verdünnung des Proteingemisches zur Doppelbestimmung auf eine 96well-Platte pipettiert. Zusätzlich wurden 25 μl des im Kit enthaltenen Standard von 0 bis 2000 μg/ml Protein in einer Reihe pipettiert, um eine Eichkurve erstellen zu können. Anschließend wurden zu jedem well 200 μl Working Reagenz aus dem Kit pipettiert. Die Working Reagenz enthält Bicinchoninsäure (BCA), welche zusammen mit einwertigen Kupferionen, die beim Kontakt von zweiwertigen Kupferionen mit Proteinen entstehen, einen bläulichen Komplex bildet. Dieser kann photometrisch bei 562 nm quantifiziert werden und zusammen mit der Eichkurve in eine Proteinkonzentration umgerechnet werden. Das Gemisch aus Protein und Working-Reagenz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 5 min zum Abkühlen stehen gelassen. Dann erfolgte umgehend die Messung bei 562 nm im Spectro-photometer. Die zugehörige Software erstellt automatisch die Mittelwerte der Doppelbestimmungen und berechnet die Proteinkonzentrationen.

Nach der Messung wurden die einzelnen Proben mit RIPA-Puffer (mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor) auf 20 μg/ml verdünnt und im Verhältnis 4:1 mit 4-fachem Lade-Puffer vermischt. Abschließend erfolgte die Hitzedenaturierung der Proteine bei 95°C für 5 min im Heizblock. Die gebrauchsfertigen Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.14.4 Herstellung eines Acrylamid-Phos-tag-Gels

Die Ansätze für die Herstellung von Acrylamid-Phos-tag Gelen wurde wie folgt hergestellt:

Substanz	Laufgel	Sammelgel
H_2O	4012,5 μl	3629 μl
1 M TRIS-Puffer	3750 μl (pH 8,8)	625 μl (pH 6,8)
30% Acrylamid	2000 μl	666 μl
10% SDS	100 μl	50 μl
10% APS	50 μl	25 μl
TEMED	7,5 μl	5 μl
5 mM Phos-tag	40 μl	20μM
10 mM $MnCl_2$	40 μl	20μM
Gesamtvolumen	**10 ml**	**5 ml**

Tabelle 2.21. *Zusammensetzung für ein Phos-tag Westernblot Acrylamid-Gel.*

Das Laufgel enthält somit 8% Acrylamid, das Sammelgel hingegen 4%.
Nach Zugabe jeder weiteren Substanz wurde das Gemisch gründlich im Vortexter durchmischt. Die Glasplatten zum Gießen eines 1 mm dicken Gels wurden zuvor gründlich mit Isopropanol gereinigt und in einem Glasstand befestigt. Nun wurden 5 ml des Laufgels zwischen die Platten pipettiert und für ca. 30 min, in denen das Gel aushärten konnte, mit ca. 2 ml Isopropanol überschichtet, um das Gel zu beschweren und eine gleichmäßige Oberkante nach dem auspolymerisieren zu erhalten.
Das Isopropanol konnte nun wieder abgegossen werden und der freie Platz mit dem Sammelgel aufgefüllt werden. Abschließend wurde noch ein Kamm in das Sammelgel eingesetzt, um Taschen einzuformen. Das Polymerisieren dauerte wiederum 30 min. Eine Lagerung der gebrauchsfertigen Gele war für bis zu 24 Stunden bei 4°C möglich.

2.2.14.5 Elektrophorese

Die auspolymerisierten Gele wurden ohne Kamm in eine Elektrophorese-Kammer eingesetzt, welche nach Herstellerangaben mit Laufpuffer befüllt wurde. Anschließend wurden jeweils 15μg der Proteinproben in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 15 min mit 50 V / Gel, um eine einheitliche Lauffront zu erhalten. Anschließend erfolgten weitere 110 min bei 75 mA / Gel.

2.2.14.6 Gel waschen

Nach der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus den Glasplatten gelöst und das Sammelgel abgetrennt. Da die im Gel enthaltenen Mangan-Ionen das Blotten stören würden, wurde

das Gel zwei Mal für 10 min in Blot-Puffer eingelegt, welches 1 mM EDTA enthielt, um die Manganionen wieder aus dem Gel zu lösen. Da auch EDTA das Blot-Ergebnis beeinträchtigen kann, wurden die Gele noch zwei Mal für 5 min in Blot-Puffer ohne EDTA gewaschen.

2.2.14.7 Blotten

Für das Blotten der Proteine wurde eine PVDF-Membran (Porengröße 02,μm) verwendet. Diese wurde zunächst für 30 sek. in Methanol aktiviert und anschließend für ca. 5 min in Aqua dest. eingelegt bis die Membran abgesunken war. Nun wurde sie noch für 15 min in Blot-Puffer eingelegt, um sie mit diesem zu äquilibrieren. Anschließend wurde der Blot-Stapel wie folgt erstellt:

1. Schwamm
2. 2 x Filter
3. Gel
4. PVDF-Membran
5. 2 x Filter
6. Schwamm

Dabei wurde darauf geachtet, dass zwischen den Schichten keine Luftblasen entstehen. Der gesamte Stapel wurde in eine Elektrophorese-Kammer eingesetzt und die Kammer mit kaltem Blot-Puffer aufgefüllt. Das Blotten erfolgte mit 150 mA über Nacht bei 4°C Umgebungstemperatur und zusätzlich auf Eis.

2.2.14.8 Blocken und Antikörper

Um unspezifische Bindungen des ersten und zweiten Antikörpers zu vermeiden, wurde die PVDF-Membran für zwei Stunden in 5%igem Milchpulver inkubiert.
Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper gegen GFP (Anti-Tag(CGY)FP-AK) in einer Verdünnung von 1:5.000 in 5%igem Milchpulver über Nacht bei 4°C.
Am nächsten Tag wurde der erste Antikörper abgegossen und die Membran vier Mal für 10 min in TBS-T gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des zweiten Antikörpers (Anti-Rabbit) mit Peroxidase-Tätigkeit in einer Verdünnung von 1:10.000 in 5%igem Milchpulver für zwei Stunden. Die Membran wurde dann erneut vier Mal in TBS-T gewaschen.

2.2.14.9 Entwicklung

Um die Proteinbande mit GFP sichtbar zu machen, wurde Pierce ECL Western Blotting Substrate von Thermo verwendet. Die Substanzen A und B des Kits wurden bei abgedunkeltem

Licht nach Herstellerangaben im Verhältnis 1:40 gemischt. Jede Membran wurde gleichmäßig mit 1,5 ml des Gemisches benetzt und für 5 min inkubiert.
Nach der Inkubation wurde die Membran zügig, aber vorsichtig abgetupft und luftblasenfrei zwischen zwei Lagen Frischhaltefolie gelegt. Nun erfolgte nacheinander das Auflegen von Fotopapier im Dunkelraum, jeweils für 1 und 5 min. Die Entwicklung der Fotopapiere erfolgte in einem AGFA-Western-Blot Filmentwickler.

2.2.15 Ko-Kultur von A549- und HUVE-Zellen /Permeabilitätsassay

Da für den $P2Y_2$-Rezeptor beschrieben ist, dass dieser über ENaCs die Flüssigkeitsbarriere in der Alveole moduliert (s.o.), sollte in dieser Dissertation untersucht werden, wie sich die Barriere aus Epithel- und Endothelzellen, sowie der Basalmembran verändert, wenn epithelseitig eine Inkubation mit *S. pneumoniae* durchgeführt wird.
Um ein Modell für die Bedingungen in der Alveole in vitro zu schaffen, wurden A549-Zellen als Epithel und HUVE-Zellen als Endothel verwendet, die Basalmembran wurde durch ThinCerts-TC-Einsätze für eine 6-well-Platte mit einer Porengröße von 0,4 μm verwendet.
Um beide Zelllinien in Ko-Kultur halten zu können, wurden im Vorfeld die bestmöglichen Nährbedingungen, zunächst in Monokultur, bestimmt. Hierzu wurden die Zellen nach dem Aussäen mit verschiedenen Mischungsverhältnissen der Nährmedien für A549- und HUVE-Zellen im Brutschrank kultiviert. Als eine für beide günstig erscheinende Mischung erschien F-12K + 5% FBS mit dem Standardmedium der HUVE-Zellen im Verhältnis 1:1. Für eine optimale Anhaftung und Kulturbedingungen der Zellen wurde die Oberseite der Einsätze unter sterilen Bedingungen für die A549-Zellen mit 150 μl einer Kollagenlösung (1 mg/ml in 0,2% Essigsäure) und die Unterseite für die HUVE-zellen mit 150 μl einer 1:100 verdünnten Fibronektinlösung (0,1%) beschichtet und trocknen gelassen.
Die so vorbereiteten Einsätze wurden umgedreht und auf der Unterseite mit $8*10^5$ HUVE-Zellen belegt (gelöst in 600 μl), die danach zwei Stunden im Brutschrank anwachsen konnten. Anschließend wurden die Einsätze in eine 6-well-Platte eingesetzt in der 2 ml des Nährmediums für HUVE-Zellen vorgelegt waren und über Nacht ruhen gelassen.
Am Folgetag wurden auf die Oberseite der Einsätze $12{,}5*10^5$ A549-Zellen, gelöst in 2 ml F-12K mit 5% FBS, pipettiert und für drei Tage, bzw. bis zum Erreichen eines dichten Zellrasens auf beiden Seiten des Einsatzes, im Brutschrank belassen.

2.2.15.1 Permeabilitätsassay

Um die Durchlässigkeit nach Intervention (Zugabe von ATP oder D39(Δcps) gegenüber Kontrolle) über die Zeit verfolgen zu können wurden 75 μl des grün fluoreszierneden FITC-BSA (Exzitation: 488 nm, Emission: 520 nm) in den Überstand der A549 pipettiert und im Anschluss über eine Stunde alle 10 min. eine Probe (150 μl) aus dem Medium der A549- und HUVE-Zellen entnommen und gekühlt, sowie lichtgeschützt, zur späteren Messung aufbe-

wahrt.

Für die Messung der Fluoreszenzintensitäten wurden die Proben gruppenweise nach Stimulationszeit in Doppelbestimmung à 70 μl in eine 96-well Platte pipettiert. Die Proben wurden in einem Plate-Reader mit 488 nm Exzitation und 520 nm Emission gemessen. Anschließend wurde eine Ratio aus der Fluoreszenzintensität unten gegenüber oben gebildet und das Ergebnis mit dem Faktor 1000 multipliziert um ganzzahlige Werte zu erhalten. So konnte die Zunahme des FITC-BSA nach Durchtritt durch die Zellschichten und damit die Durchlässigkeit der Zellbarriere beurteilt werden.

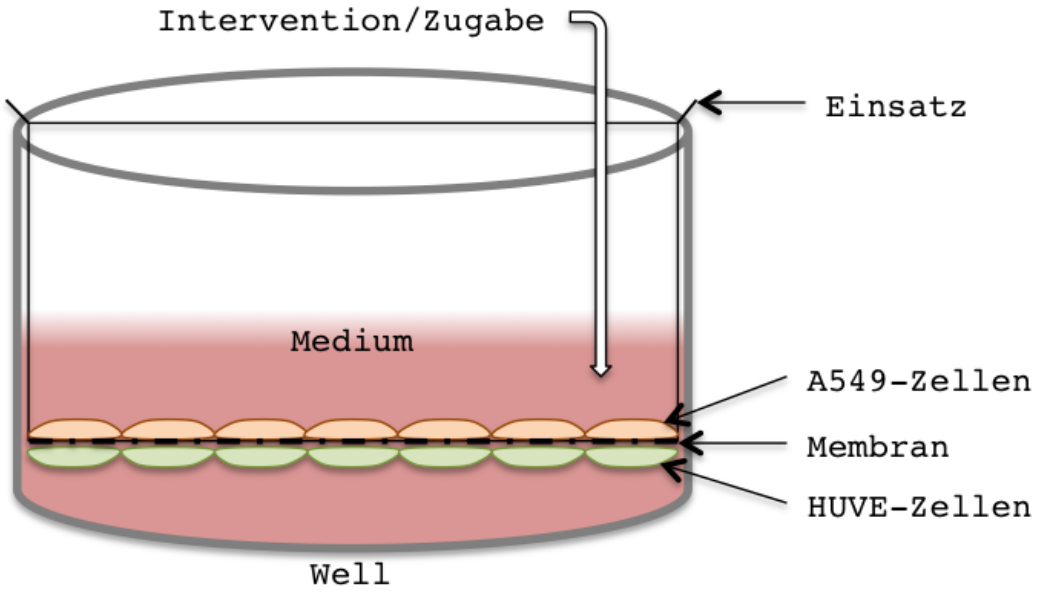

Abb. 2.9. *Schematische Darstellung eines wells einer 6-well Platte mit Zellkultureinsatz.*

3 Ergebnisse

3.1 Calcium-Imaging

3.1.1 Calcium-Versuche mit P2Y$_2$-Rezeptorvarianten und HPAEpi-Zellen

Zur Untersuchung, ob die PKC-abhängigen Phosphorylierungsstellen eine Rolle bei der durch *S. pneumoniae* induzierten Inaktivierung und Internalisierung des P2Y$_2$-Rezeptors spielen, wurde die Wildtyp- (WT) oder die dreifach mutierte (3A) Variante des Rezeptors in HPAEpi-Zellen transfiziert und mit D39(Δcps) vorinkubiert.
Native HPAEpi-Zellen zeigten zunächst keine Calciumantwort auf ATP. Wurden die Zellen jedoch mit P2Y$_2$-Rezeptor transfiziert, zeigten die Zellen ein Calciumsignal auf ATP.
Für die Versuche wurden die Zellen sowohl mit dem transfizierten Wildtyp-, als auch mit dem mutierten P2Y$_2$-Rezeptor mit D39(Δcps) vorinkubiert. In der Versuchsgruppe mit dem Wildtyp-Rezeptor + D39 zeigte sich keine Calciumantwort mehr auf Stimulation mit ATP. In der Gruppe mit dem mutierten Rezeptor + D39 war hingegen eine deutliche Calciumantwort auf ATP-Stimulation zu sehen (Abb. 3.1).

Zum Nachweis, dass das ausbleibende Calciumsignal nicht Ausdruck einer zytotoxischen Wirkung von *S. pneumoniae* auf AEZ ist, erfolgte nach Zugabe von ATP vor Ende des Versuches eine weitere Zugabe von Trypsin. Trypsin aktiviert über PAR-Rezeptoren, ähnlich wie ATP über Purinrezeptoren, die IP$_3$-Kaskade und induziert somit ein zytosolisches Calciumsignal (Abb. 3.2).

Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu P2Y$_2$-WT-Rezeptor transfizierten Zellen, P2Y$_2$-3A transfizierte HPAEpi-Zellen trotz Vorinkubation mit D39(Δcps) ein deutliches zytosolisches Calciumsignal auf ATP zeigen (Abb. 3.3).

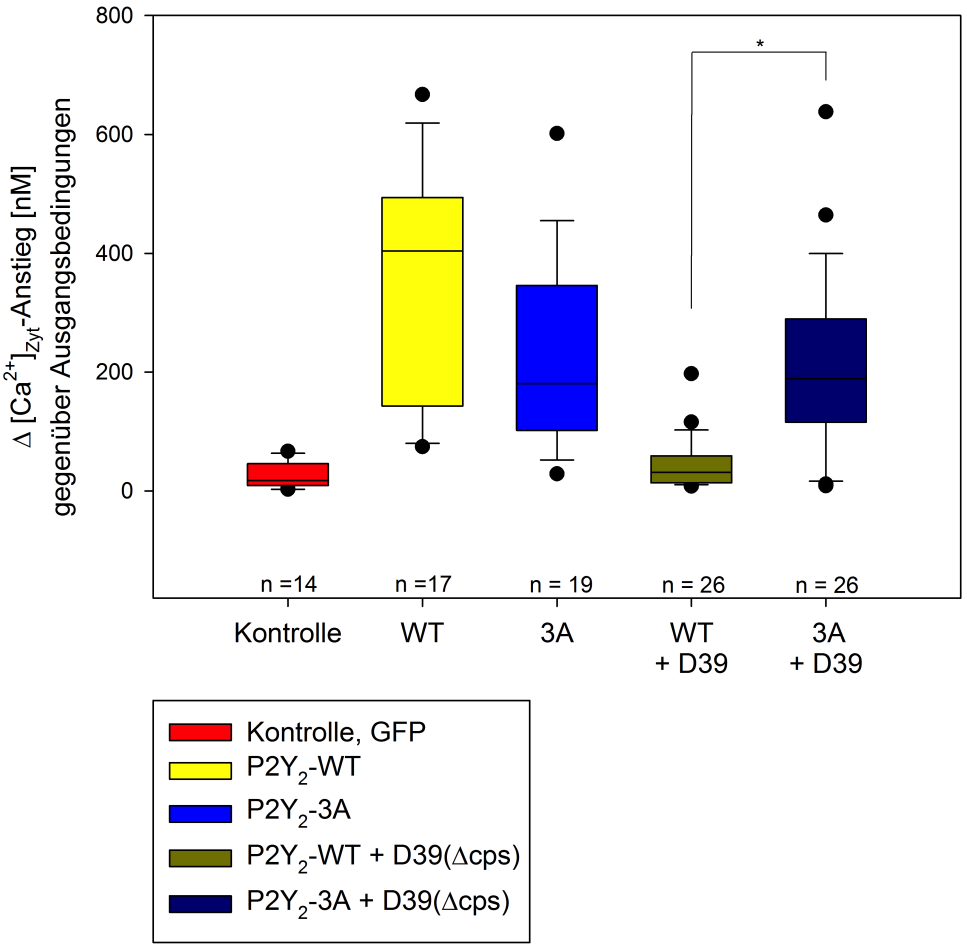

Abb. 3.1. *Messung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in mit $P2Y_2$-Rezeptorvarianten transfizierten HPAEpi-Zellen. Dargestellt ist das Delta Δ des Anstieges von zytosolischem Calcium zu Ausgangsbedingungen nach Zugabe von 100 μM ATP in den Überstand (Mittelwerte). * = $p < 0{,}001$; U-Test.*

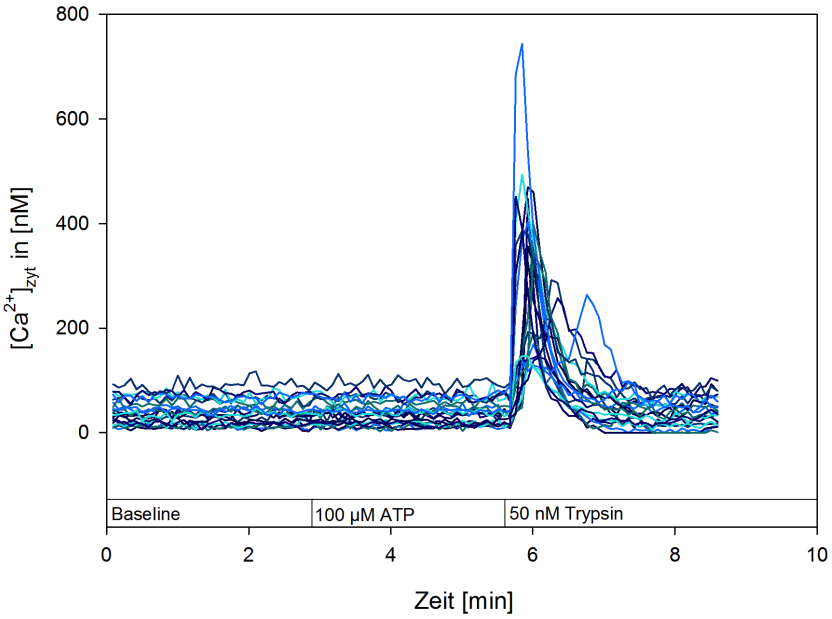

Abb. 3.2. *Zeitlicher Verlauf der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ von mit $P2Y_2$-WT-Rezeptor transfizierten HPAEpi-Zellen. Hier ist an einem repräsentativen Versuch zu sehen, wie nach Vorinkubation mit D39(Δcps) das Calciumsignal auf ATP ausbleibt, auf Trypsin jedoch bestehen bleibt.*

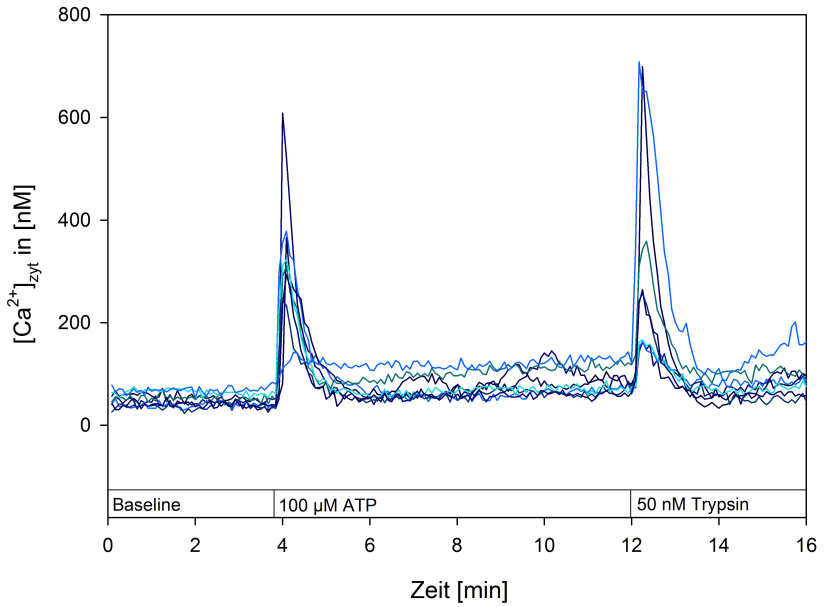

Abb. 3.3. *Zeitlicher Verlauf der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ von mit $P2Y_2$-3A-Rezeptor transfizierten HPAEpi-Zellen. Hier ist an einem repräsentativen Versuch zu sehen, wie nach Vorinkubation mit D39(Δcps) sowohl die Stimulation mit ATP als auch mit Trypsin zu einer Calciumantwort führen.*

Abb. 3.4 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Versuches aus Abb. 3.2 zu Versuchsbeginn, wobei die Fura-2AM Falschfarben-Ratioaufnahme mit dem GFP-Kanal übereinander gelegt wurden. Grün markierte Zellen entsprechen $P2Y_2$-WT-Transfektion.

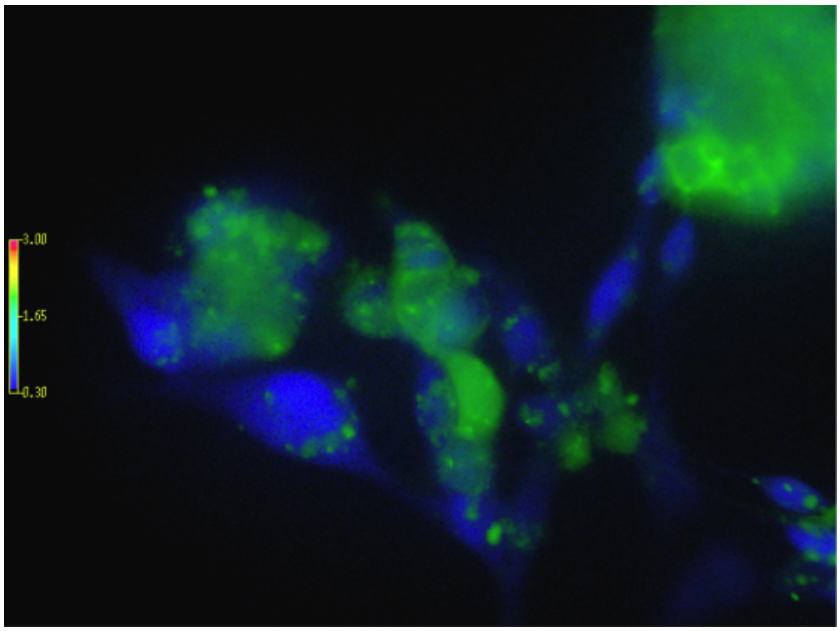

Abb. 3.4. *Repräsentativer Versuch, Fura-2-Ratio Aufnahme in Falschfarben. HPAEpi-Zellen transfiziert mit $P2Y_2$-GFP-Rezeptor*

Abb. 3.4 zeigt vor allem im mittleren Bereich einige Zellen, an denen der $P2Y_2$-Rezeptor über einen GFP-Marker gut in der Peripherie der Zellen an der Membran sichtbar wird. Weiterhin ist die uneinheitlich stark ausgeprägte Expression des Rezeptors zu erkennen.

3.1.2 Calciumversuche mit $P2Y_2$-Varianten und D39(Δcps)

Um näher zu untersuchen, ob und wie Phosphorylierungen eine Rolle für das Ausbleiben eines Calciumsignals nach einer Inkubation mit D39(Δcps) spielen, wurden weitere mutierte Varianten des $P2Y_2$-Rezeptors hergestellt, bei denen nur eine oder zwei der drei Phosphorylierungsstellen der PKC deletiert wurden. Ob eine der drei Mutationsstellen - oder eventuell erst deren Kombination - für den Erhalt des zytosolischen Calciumsignals nach Inkubation mit *S. pneumoniae* verantwortlich ist, sollte hier untersucht werden. A549 wurden mit $P2Y_2$-WT oder $P2Y_2$ mit ein, zwei oder drei mutierten Phosphorylierungsstellen transfiziert. Anschließend erfolgte die Fura-2-Ratio-Calciummessung mit Zugabe von ATP in den Überstand.

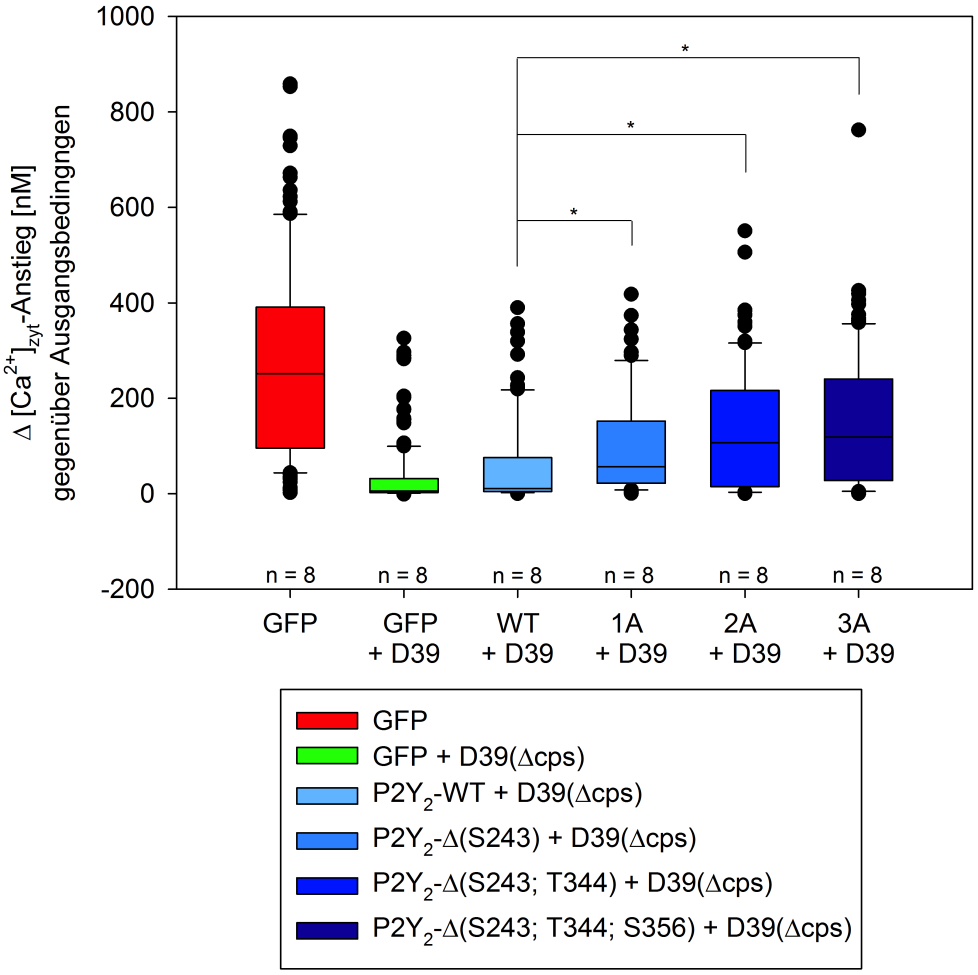

Abb. 3.5. *Darstellung des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ von A549-Zellen nach Zugabe von 100 µM ATP in den Überstand. * = $p < 0{,}001$; U-Test.*

Die Abb. 3.5 zeigt bei den nur mit GFP-transfizierten A549-Zellen (Kontrolle) ein deutlich messbares Calciumsignal auf ATP, während bei gleichzeitiger Inkubation mit D39 (Δcps) dieses erwartungsgemäß unterdrückt wird. Bei Transfektion mit $P2Y_2$-WT kommt es zu einem leichten Anstieg des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$. Es konnte gezeigt werden, das die eingebrachten Mutationen im Rezeptor zu einem signifikant erhöhten zytosolischen Calciumsignal auf Stimulation mit ATP führen. Ähnlich zu den Versuchen mit HPAEpi zeigen auch die $P2Y_2$-3A-A549-Zellen ein $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$, welches unter dem Niveau von *S. pneumoniae*-unbehandelten $P2Y_2$-WT liegt.

3.1.3 Calciumversuche mit Inhibitoren

3.1.3.1 Kinaseinhibitoren

Eine These dieser Dissertation ist, dass intrazelluläre Proteinkinasen für den D39(Δcps)-induzierten Ausfall des Purinrezeptor $P2Y_2$ gesteuerten zytosolischen Calciumsignals verantwortlich sein könnten. Mögliche Kinasen wurden über das Programm *Scansite* identifiziert, welches vom MIT entwickelt wurde. Verschiedene Kinaseinhibitoren wurden zusammen mit *S. pneumoniae* in den Zellüberstand pipettiert und für 2 Stunden belassen. Anschließend erfolgte die Fura-2-Ratio-Calciummessung im Zytosol nach Zugabe von 100 μM ATP. Sollte ein Inhibitor dazu führen, dass die Zellen trotz der Pneumokockeninkubation ein zytosolisches Calciumsignal auf ATP zeigen, wäre das ein Hinweis auf die Bestätigung dieser Hypothese.

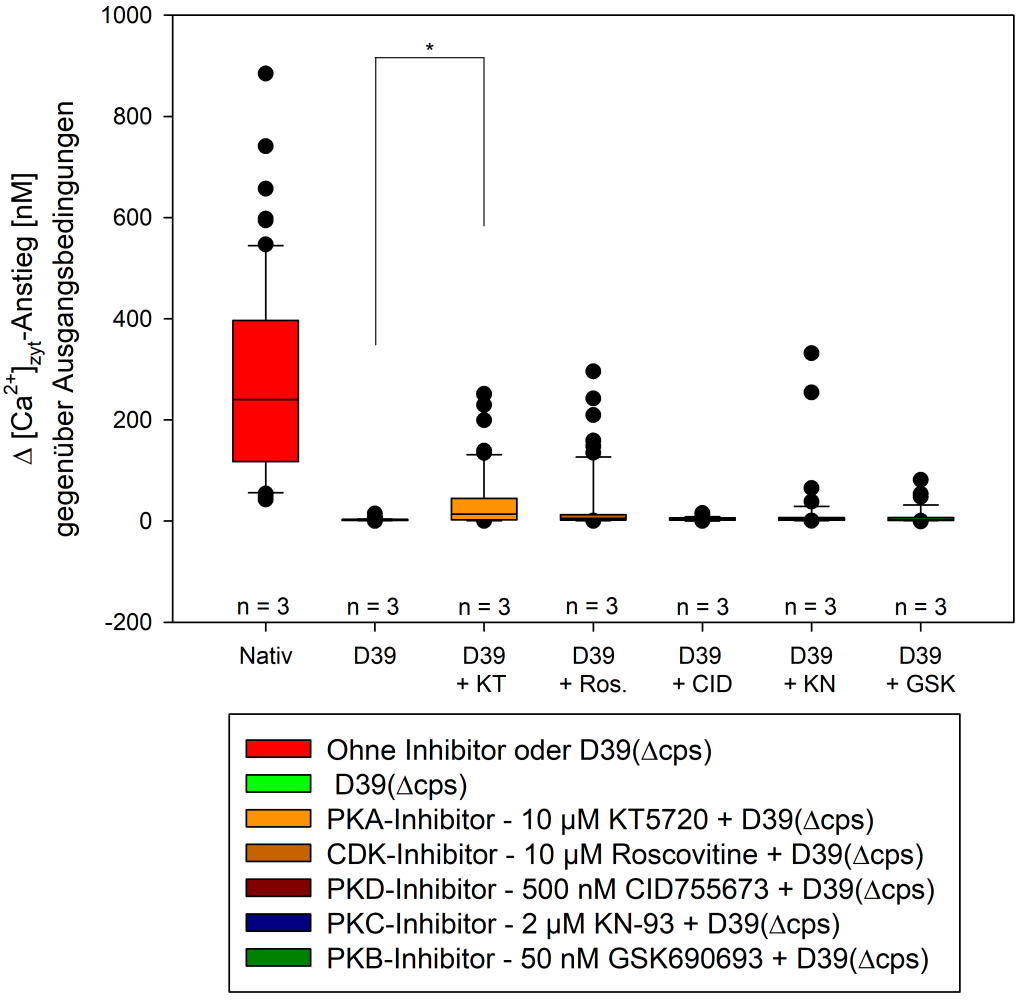

Abb. 3.6. *Darstellung des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ von A549-Zellen nach Zugabe von 100 µM ATP in den Überstand. Darstellung der Versuchsgruppen nativ gegen D39 mit Inhibitor vs. Kontrollen ohne Inhibitor. * = $p < 0{,}001$; U-Test.*

Abb. 3.6 zeigt, dass der PKA-Inhibitor KT5720 an A549-Zellen als einziger der hier getesteten Inhibitoren im Zusammenhang mit einer D39(Δcps)-Inkubation zu einem signifikant erhöhtem $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ im Vergleich zur Kontrolle mit nur D39(Δcps) führt.

3.1.3.2 PKA-Inhibitor H-89

Nach Analyse der Ergebnisse des *Scansite*-Programms war die PKA eine besonders wahrscheinliche Kinase am $P2Y_2$-Rezptor, weshalb der spezifische PKA-Inhibitor H-89 ausführlicher und in unterschiedlichen Konzentartionen untersucht wurde. H89 wurde in Konzentrationen von 10, 20 und 40 μM eingesetzt (Abb. 3.7).

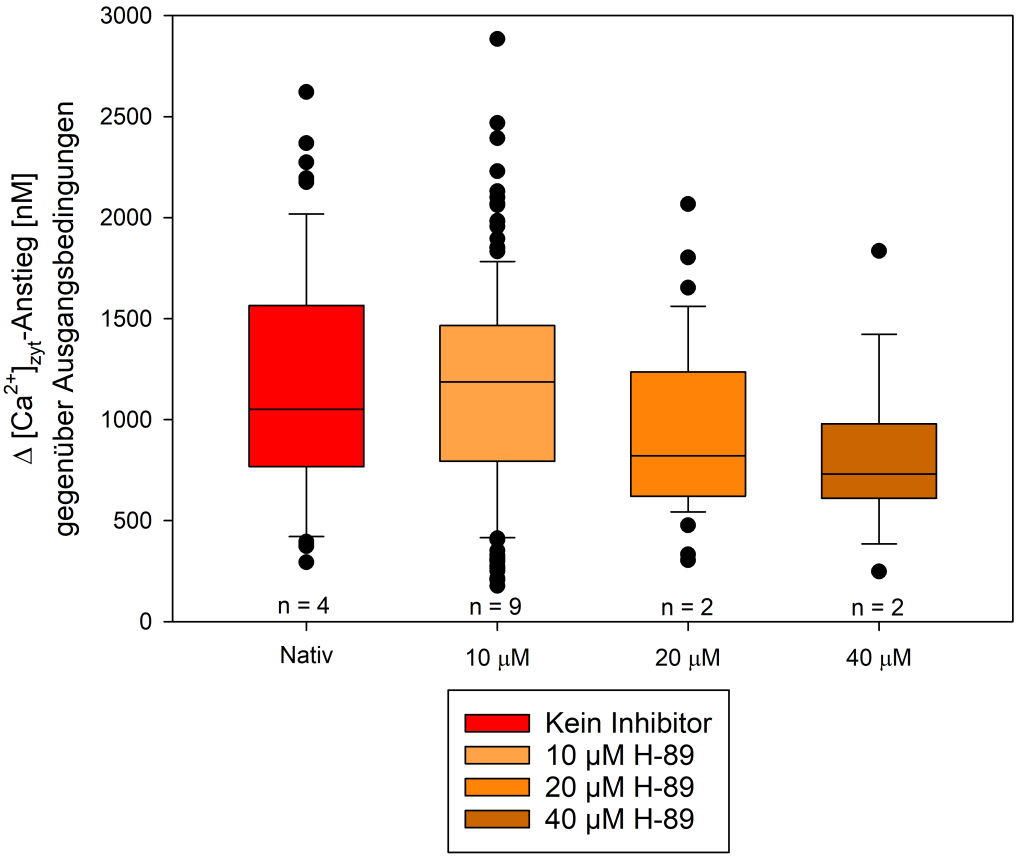

Abb. 3.7. *Darstellung des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ von A549-Zellen nach Zugabe von 100 µM ATP in den Überstand. Versuchsgruppen mit PKA-Inhibitor H-89-Vorinkubation sowie einer Kontrollgruppe ohne Inhibitor. * = p 0,011; U-Test.*

Abb. 3.7 zeigt einen geringen Abfall des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf 100 μM ATP bei Konzentrationen von 20 und 40 μM H-89, wobei statistische Signifikanz erst bei einer Konzentration von 40 μM erreicht wurde.

Neben den Kontrollversuchen wurde H-89 auch zeitgleich mit D39(Δcps) eingesetzt (Abb. 3.8).

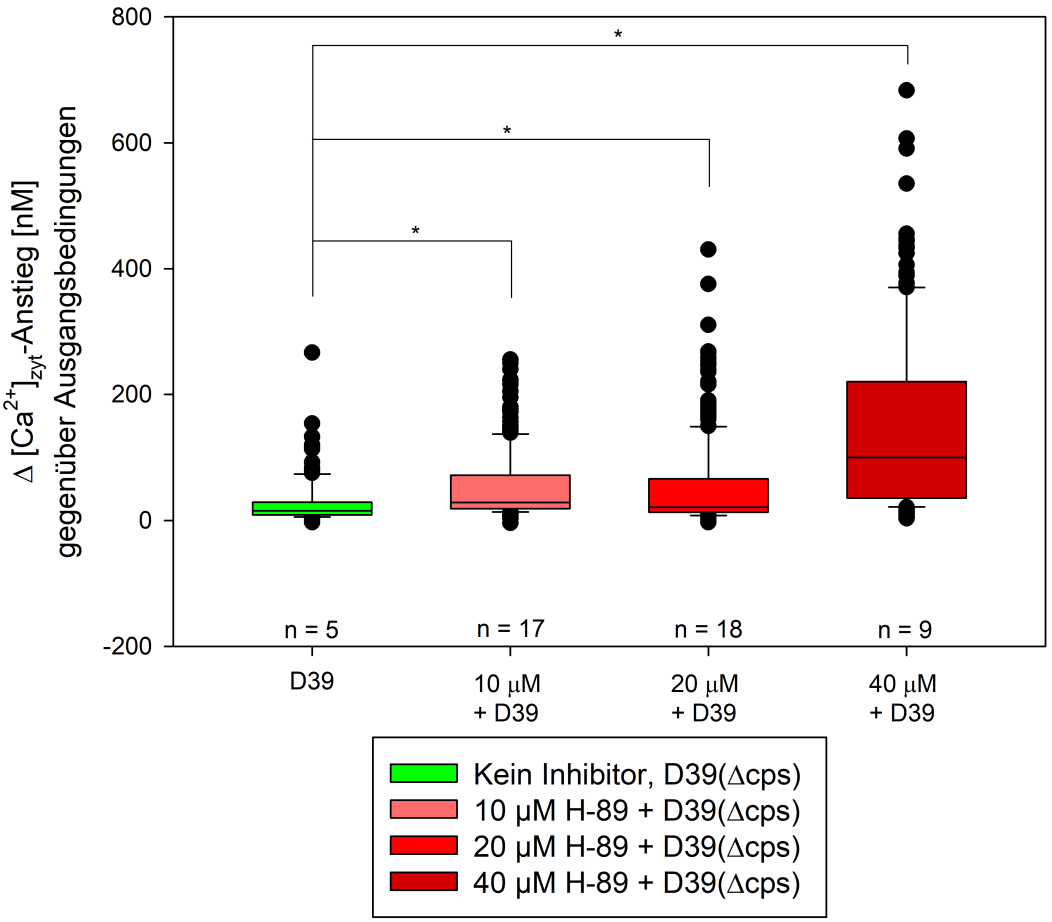

Abb. 3.8. *Darstellung des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ von A549-Zellen nach Zugabe von 100 µM ATP in den Überstand. Versuchsgruppen mit D39, sowie Vorinkubation mit PKA-Inhibitor H-89. * = $p < 0{,}001$; U-Test.*

Abb. 3.8 zeigt einen signifikanten Anstieg des zytosolischen Calciums bei Ko-Inkubation der Zellen mit H-89 und D39(Δcps) gegenüber der alleinigen Inkubation mit D39(Δcps), der nach Zugabe von ATP bei steigender H-89-Konzentration zunehmend ist.

3.1.3.3 PKC-Inhibitor-*Myristoylated*

Die Proteinkinase C (PKC) ist Teil der $P2Y_2$ Signalkaskade (siehe Abb. 1.3). Sie wird durch IP_3 aktiviert, welches auch am endoplasmatischen Retikulum Calciumkanäle öffnet. Die PKC sorgt wiederum für eine Phosphorylierung am $P2Y_2$-Rezeptor, die zur Inaktivierung und Internalisierung desselben Rezeptors führt. Somit ist die Inhibition einer zentralen Kinase in der Signalkaskade ein wesentlicher Bestandteil an der Untersuchung, auf welchem Wege eine Inkubation mit *S. pneumoniae* zum Ausbleiben einer zytosolischen Calciumantwort führt.

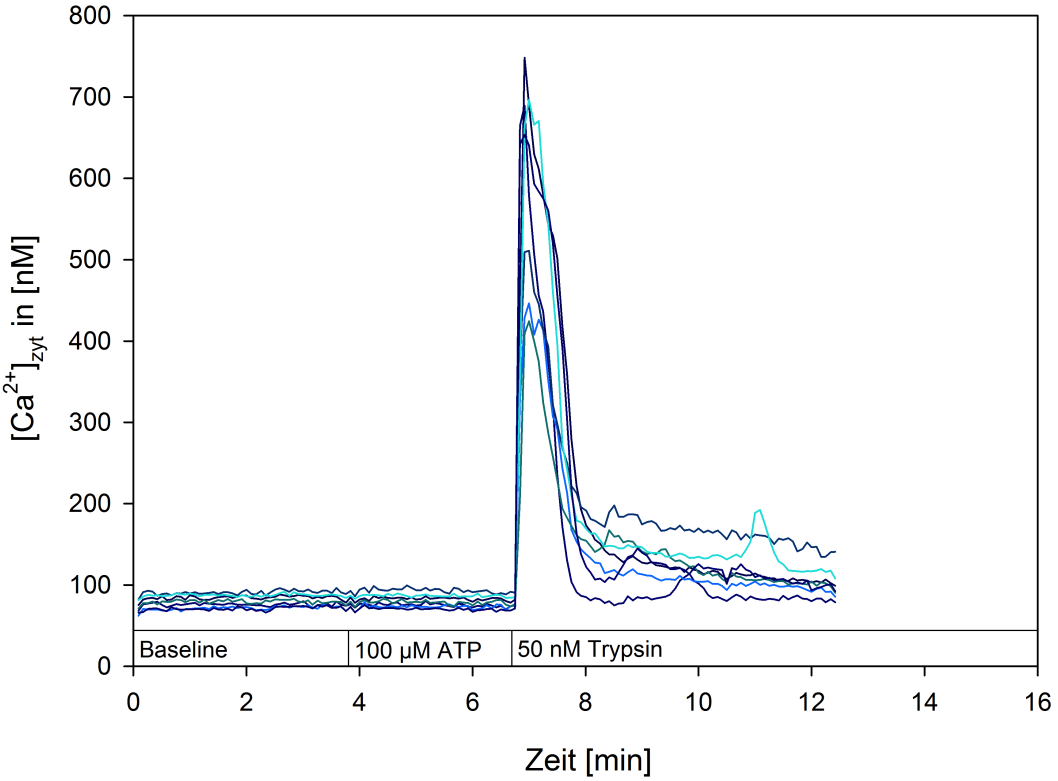

Abb. 3.9. *Repräsentativer Versuch mit A549-Zellen. 30 min. Vorinkubation mit PKC-Inhibitor-Myristoylated [75 nM]. Fura-Ratio-Mikroskopie mit Zugabe von ATP und Trypsin in den Überstand.*

Abb. 3.9 zeigt, dass die mit PKC-Inhibitor-*Myristoylated* vorbehandelten Zellen keine zytosolische Calciumantwort mehr auf ATP zeigen, jedoch noch auf Trypsin reagieren. (Vergleiche auch Abb. 3.2).

3.1.3.4 Plättchenaktivierender Faktor – Inhibitor WEB2086

Der plättchenaktivierende Faktor-Rezeptor (PAF-R) ist auf vielen humanen Zellen exprimiert. Besonders gut wurde er auf Thrombozyten untersucht, spielt aber auch auf vielen Epithelzellen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. So wurde bereits an A549-Zellen gezeigt, dass der PAF-R an der Transzytose von D39 beteiligt ist [31]. Um zu untersuchen, ob der PAF-R bei den hier gesehenen Phänomenen ebenfalls eine Rolle spielt, wurden folgende Versuche in Co-Inkubation mit dem PAF-Inhibitor WEB2086 in verschiedenen Konzentrationen wiederholt.

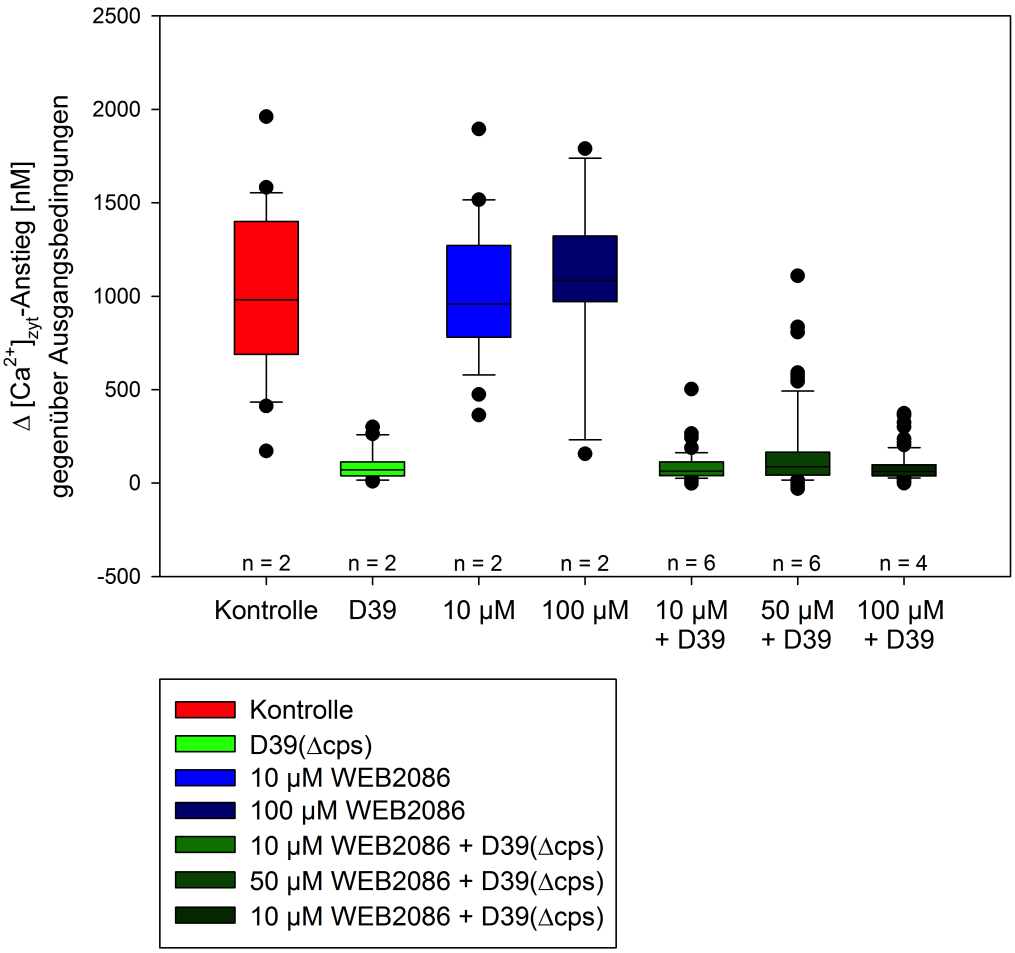

Abb. 3.10. *Darstellung des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ von A549-Zellen nach Zugabe von 100 µM ATP in den Überstand. Versuchsgruppen mit und ohne D39(Δcps), sowie PAF-Inhibitor WEB2086-Vorinkubation*

Das ATP-induzierte Calciumsignal der A549-Zellen mit WEB2086-Vorinkubation verändert sich nicht im Vergleich zur ATP-Stimulation ohne WEB2086-Vorinkubation. WEB2086 führt bei (Δcps)-Vorinkubation zu keinem Unterschied im Bezug auf das ATP-induzierte Calciumsignal im Vergleich zu WEB2086-unbehandelten Zellen.

3.1.4 Kontrollen Calciumversuche

Zur Kontrolle von Effekten, die durch freie Radikale oder ATP im Überstand im Zusammenhang mit einer D39-Inkubation auftreten könnten, wurden A549-Zellen mit den Enzymen Apyrase oder PEG-SOD vorinkubiert. Apyrase hydrolysiert ATP zu ADP + P und sollte verhindern, dass der $P2Y_2$-Rezeptor bereits vor Versuchsbeginn durch ATP im Überstand inaktiviert wurde.
PEG-SOG ist eine Superoxiddismutase, die freie Sauerstoffradikale in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umwandelt. So sollte untersucht werden, ob oxidativer Stress zum Ausbleiben einer Calciumantwort auf ATP bei D39-Vorinkubation führt.
Anschließend erfolgte die zweistündige Inkubation von D39(Δ cps). Vor Versuchsbeginn wurde der Überstand mehrfach gewaschen und die Zellen mit Fura-2AM gefärbt. Während der anschließenden Messung des zytosolischen Calciums erfolgte die Zugabe von 100 μM ATP in den Überstand.

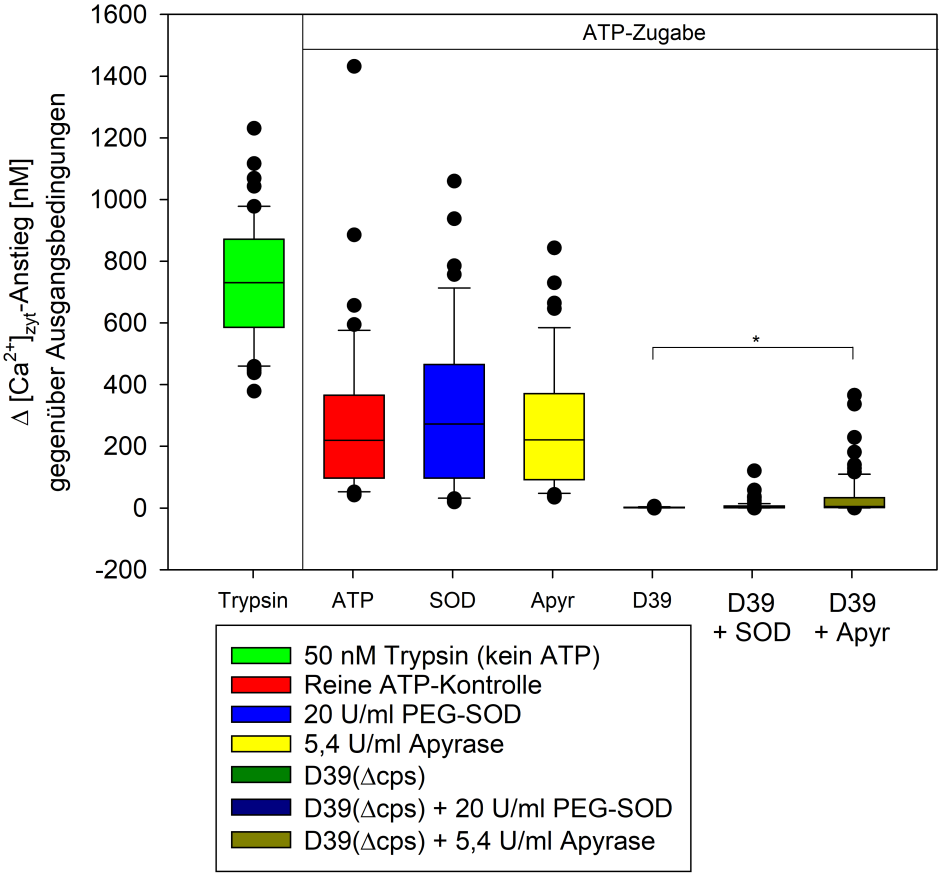

Abb. 3.11. *Darstellung des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ in A549-Zellen nach Zugabe von 100 μM ATP in den Überstand. Jeweils $n = 3$. * = $p < 0{,}001$; U-Test.*

Obige Abb. 3.11 stellt graphisch dar, wie die A549-Zellen ein deutliches zytosolisches Calci-

umsignal auf 100 μM ATP zeigen, auch wenn diese mit Apyrase oder PEG-SOD vorinkubiert wurden. Die gleichzeitige Inkubation von D39(Δcps) mit PEG-SOD führte zu keiner Modulation der bisher bekannten Ergebnisse, während das $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ bei D39(Δcps) mit Apyrase signifikant anstieg.

3.1.5 Versuche mit Live/Dead-Kit

Um sicher ausschließen zu können, dass die HPAEpi-Zellen aufgrund einer *S. pneumoniae*-induzierten Zellschädingung keine Calciumantwort mehr generieren können, wurde der zytotoxische Effekt von D39(Δcps) getestet. Dazu wurden die Zellen zwei Stunden mit *S. pneumoniae* inkubiert und danach mit einer Calcein/Ethidium-Homodimer-Lösung gefärbt (Live/Dead-Kit). Zunächst wurde eine Totkontrolle durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Triton-X permeabilisiert und anschließend gefärbt (Abb. 3.12).

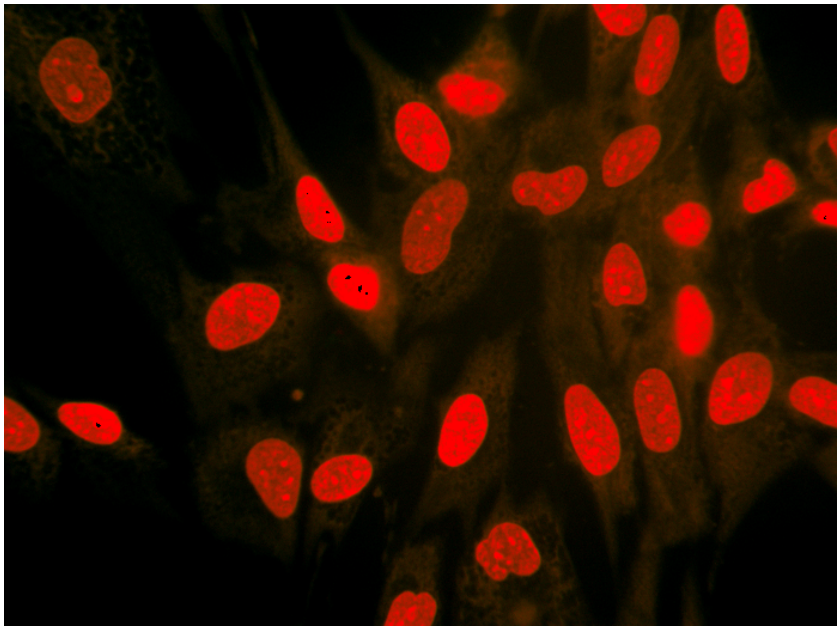

Abb. 3.12. *HPAEpi-Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop: Vorbehandelt mit Triton-X und mit Färbung mit Live/Dead-Kit.*

In Abb. 3.12 ist zu erkennen, dass die Zellkerne der HPAEpi-Zellen rot fluoreszieren. Durch den permeabilisierenden Effekt des Triton-X kann der Ethidium-Homodimer die Zellmembran passieren und an DNA im Nucleus binden. Grün fluoreszierendes Calcein ist nicht zu sehen, da Triton-X die Zellen permeabilisiert hat und intrazelluläre Esterasen somit nicht für ein Verbleiben des Fluophors innerhalb der Zellen sorgen konnten.

Zum Vergleich ist in Abb. 3.13 eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit L/D-Kit Färbung von HPAEpi-Zellen zu sehen, die zuvor zwei Stunden mit D39(Δcps) im Brutschrank inkubiert wurden.

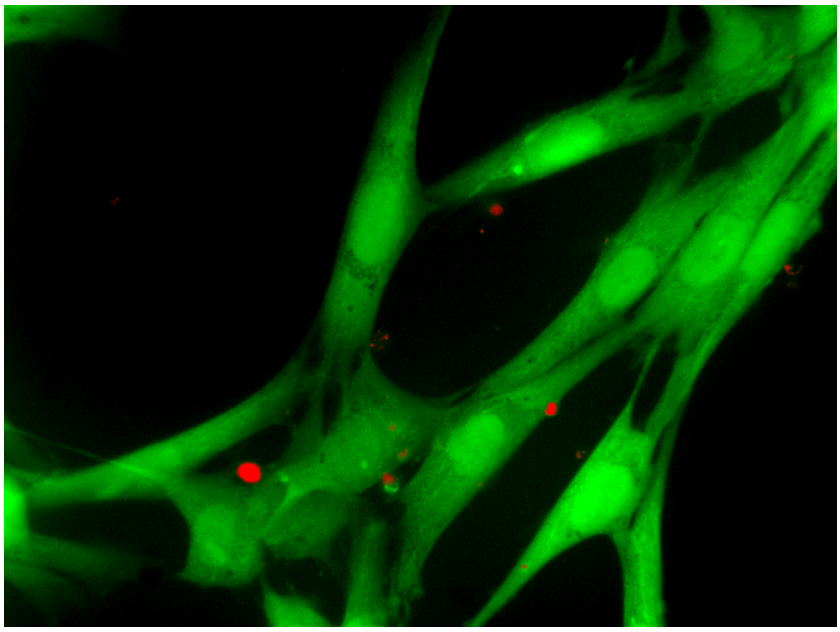

Abb. 3.13. *HPAEpi-Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop: Zweistündige Vorinkubation mit D39(Δcps). Anschließende Färbung mit Live/Dead-Kit.*

Abb. 3.13 zeigt ausschließlich vitale, grün fluoreszierende Zellen.

3.2 Phos-tag Western Blot

Der Western-Blot mit Phos-tag diente der Überprüfung, ob eine Inkubation von AEZ Typ II mit *S. pneumoniae* zu einer verstärkten Phosphorylierung am $P2Y_2$-Rezeptor führt. Das entwickelte Foto des fertigen Blots (Abb. 3.14) wurde eingescannt und digital aufgehellt sowie kontrastverstärkt.

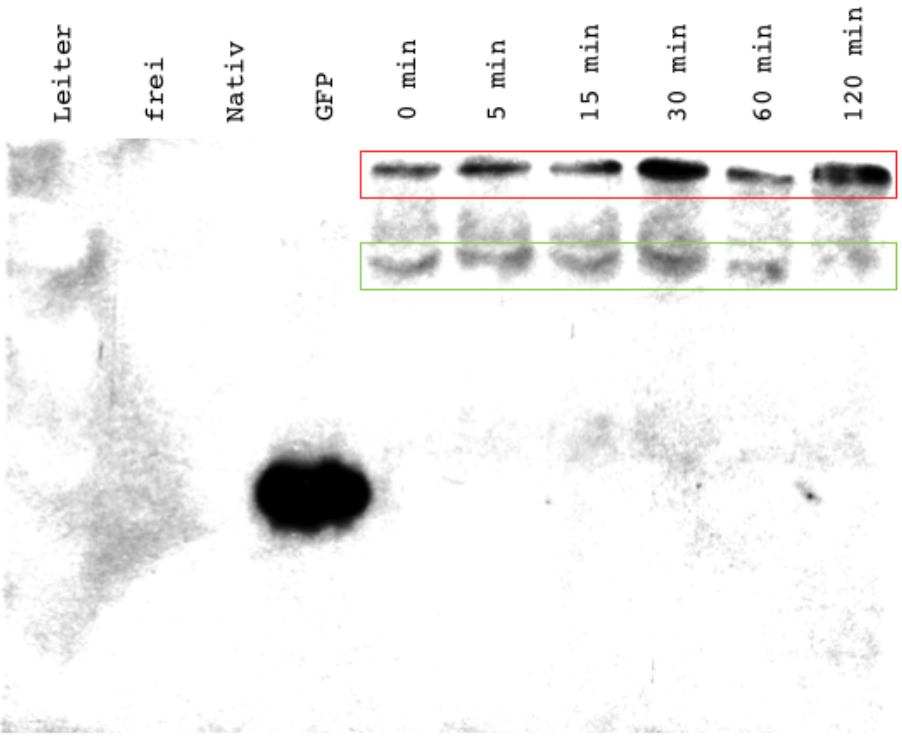

Abb. 3.14. *Foto des Phot-tag Western Blot mit A549-Zellen.*

Abb. 3.14 zeigt von links nach rechts:

1. Proteinleiter
2. freie Tasche
3. Native Zellen ohne Transduktion, unstimuliert
4. Transduktion mit GFP, unstimuliert
5. Transduktion mit $P2Y_2$-WT-GFP, unstimuliert
6. Transduktion mit $P2Y_2$-WT-GFP, 5 min D39(Δcps)
7. Transduktion mit $P2Y_2$-WT-GFP, 15 min D39(Δcps)
8. Transduktion mit $P2Y_2$-WT-GFP, 30 min D39(Δcps)
9. Transduktion mit $P2Y_2$-WT-GFP, 60 min D39(Δcps)
10. Transduktion mit $P2Y_2$-WT-GFP, 120 min D39(Δcps)

Die Proteinleiter wurde nur unzureichend dargestellt, da diese EDTA enthält, was das Blotten bei einem Phos-tag Western Blot durch die ionische Ladung stark einschränkt (s. dazu auch Produkthinweise des Herstellers). Die GFP-Kontrolle zeigt eine positive Bande. Die oberen Banden entsprechen phosphoryliertem mit GFP verbundenem $P2Y_2$-Rezeptor, während die unteren Banden nicht oder weniger phosphoryliertem Rezeptor entsprechen.
Von links nach rechts gesehen zeigen die oberen Banden eine Zunahme, während die unteren Banden deutlich abnehmen und ganz rechts (120 min) kaum noch zu erkennen sind.

Mithilfe von *ImageJ* wurden die Fluoreszenzintensitäten der oberen Banden und der unteren Banden gemessen. Aus den so ermittelten Werten wurde eine Ratio gebildet (obere Bande / untere Bande zum jeweiligen Messzeitpunkt) und in Abb. 3.15 aufgetragen. So war es möglich, Unterschiede in der Beladung des Gels mit Protein auszugleichen.

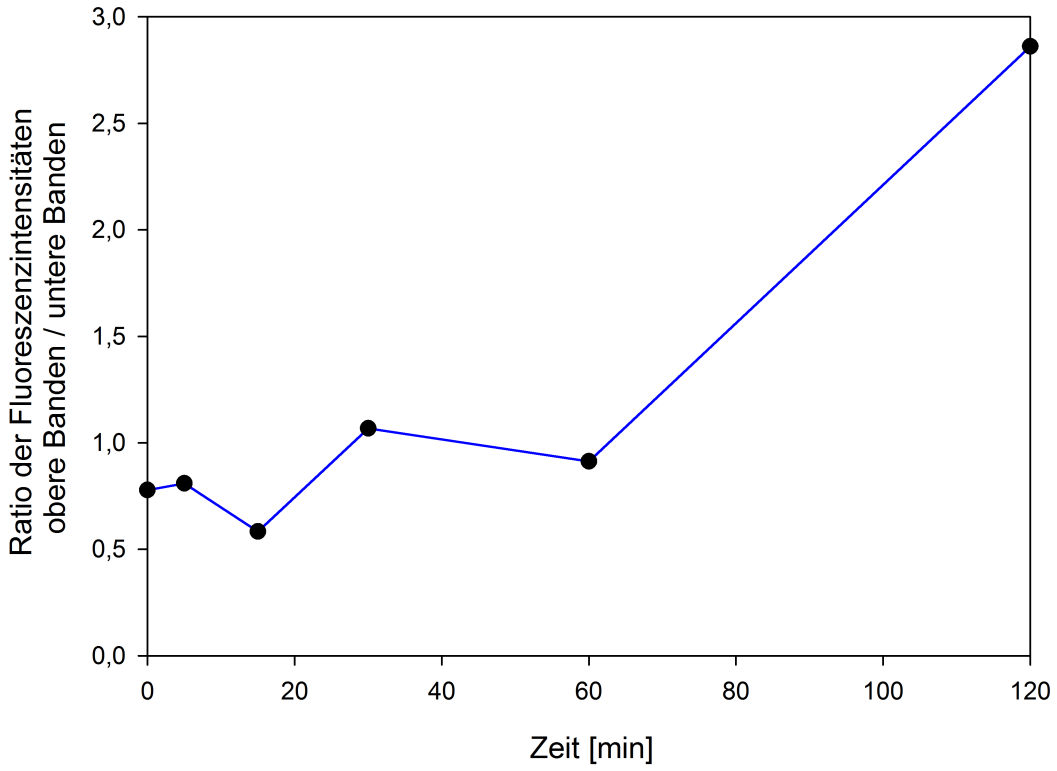

Abb. 3.15. *Ratio der Flureszenzintensitäten obere / untere Banden zum jeweiligen Messzeitpunkt.*

In Abb. 3.15 ist zu erkennen, wie die obere Bande im Verhältnis zur unteren über die Zeit immer stärker ausgeprägt ist, nach 120 min ist der Unterschied maximal ausgeprägt. Somit ist anzunehmen, dass der GFP-$P2Y_2$ im Verlauf der Inkubation mit D39(Δcps) immer stärker phosphoryliert wurde.

Um zu überprüfen, inwieweit das Blotten unter den gewählten Parametern erfolgreich war,

und um einen Anhalt für eine einheitliche Ladekontrolle zu erhalten, wurde das Acrylamid-Gel mit Phos-tag nach dem Blotten auf die PVDF-Membran mit Coomassie gefärbt:

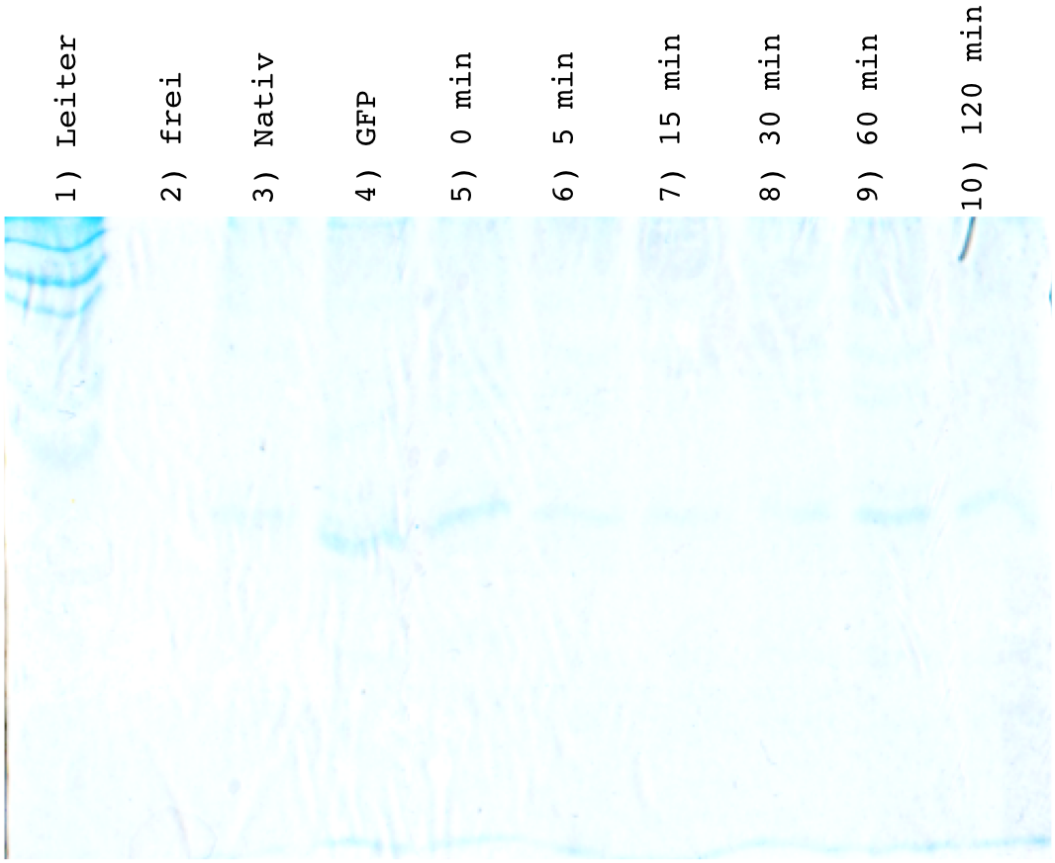

Abb. 3.16. *Scan des Acrylamid-Gels nach dem Blotten, Färbung mit Coomassie*

Abb. 3.16 zeigt das Coomassie gefärbte Laufgel des Blots aus Abb. 3.14. Eine absolut gleiche Proteinbeladung scheint nicht gelungen zu sein, da in Tasche 4, 5 und 9 noch etwas mehr gefärbtes Protein sichtbar ist. Diese Ungleichheit scheint jedoch so geringfügig ausgeprägt zu sein, dass die Auswertung des Blots dennoch möglich ist, zumal die unterschiedliche Beladung durch Ratiobildung ausgeglichen wurde.

3.3 Spinning-Disk-Mikroskopie

3.3.1 Spinning-Disk-Mikroskopie von GFP-P2Y$_2$-R nach D39

A549-Zellen wurden mit P2Y$_2$-WT-GFP oder P2Y$_2$-3A-GFP transient transfiziert. Im Spinning-Disk-Mikroskop sollte die Anzahl von intrazellulären Vesikeln als Zeichen der Rezeptorinternalisierung gemessen werden. Unter Versuchsbedingungen wurden ca. 20 min nach Messbeginn 10^7 D39(Δcps) in den Überstand der Zellen gegeben. Über einen Zeitraum von zwei Stunden wurde der Verlauf von intrazellulären Vesikeln beobachtet. Als Marker für internalisierte Rezeptoren wurde die Bewegung von grün fluoreszierenden vesikulären Strukturen innerhalb der Zellen beobachtet und gezählt:

Abb. 3.17 zeigt, dass es kurz nach der Zugabe von kapseldefizienten *S. pneumoniae* zu einer Zunahme von intrazellulären Vesikeln sowohl bei P2Y$_2$-WT als auch bei P2Y$_2$-3A kommt.

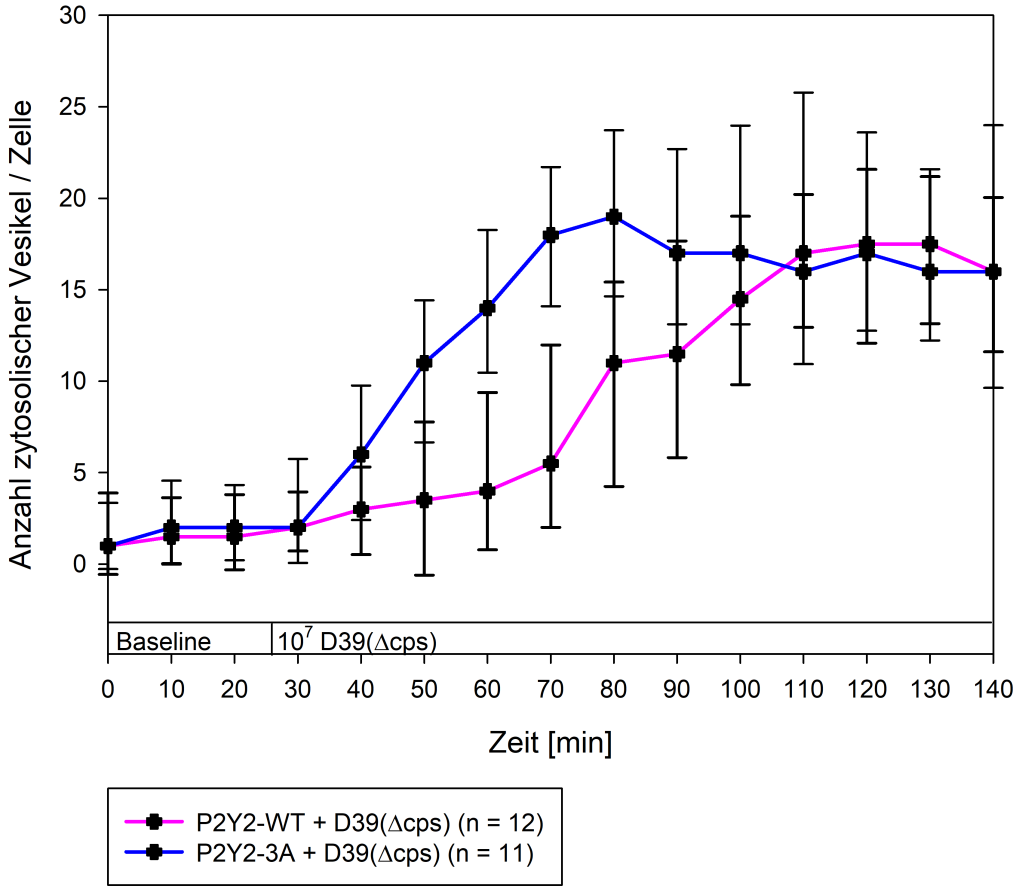

Abb. 3.17. *Zytosolischer Anstieg von intrazellulären GFP-markierten Vesikeln nach Zugabe von 10^7 D39(Δcps) in den Überstand. Darstellung von Mittelwerten ± Standardabweichung.*

Abb. 3.18 zeigt, dass es nach der Zugabe von bekapselten *S. pneumoniae* (Wildtyp) ebenso zu einer Zunahme von intrazellulären Vesikeln, sowohl bei $P2Y_2$-WT, als auch bei $P2Y_2$-3A kommt. Der Anstieg in beiden Gruppen verläuft auf ähnlichem Niveau. Sowohl im Falle von D39(Δcps), als auch D39(WT) erscheinen bei der dreifach mutierten Variante die intrazellulären Vesikel vergleichsweise etwas früher im Vergleich zur Wildtypvariante des Rezeptors.

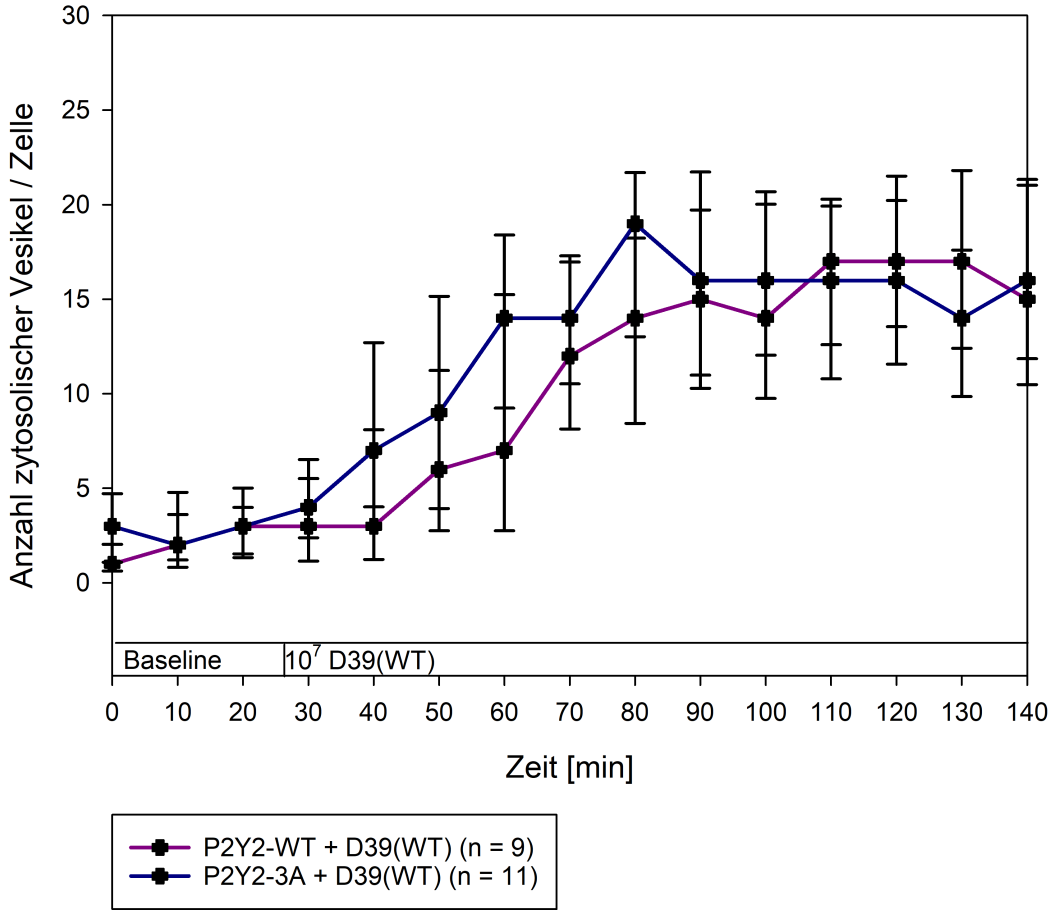

Abb. 3.18. *Zytosolischer Anstieg von intrazellulären, GFP-markierten Vesikeln nach Zugabe von 10^7 bekapselten Wildtyp-D39 in den Überstand. Darstellung von Mittelwerten ± Standardabweichung.*

Folgend sind in Abb. 3.19 und 3.20 mit beiden Rezeptorvarianten transfizierte A549-Zellen zu den jeweils angegebenen Versuchszeiten zu sehen, die den durch *S. pneumoniae* bedingten Effekt abbilden:

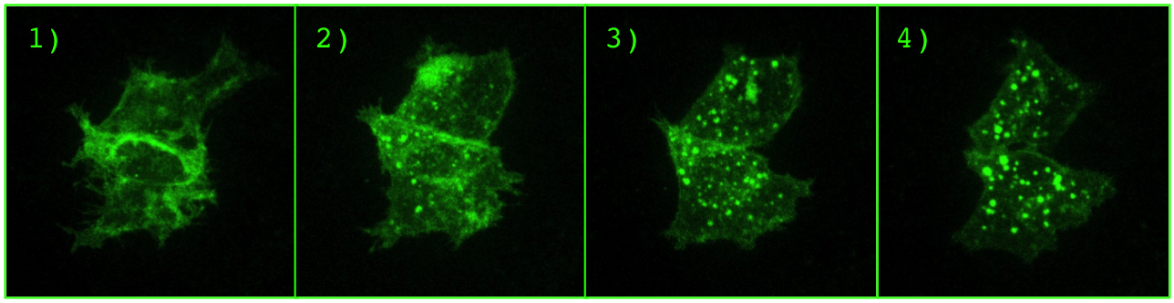

Abb. 3.19. *Repräsentativer Versuch. Dreidimensionale Rekonstruktion von A549-Zellen (Sicht von oben), die mit $P2Y_2$-3A transfiziert wurden. Von links nach rechts: 1) Vor Zugabe von S. pneumoniae, 2) 30 min. nach Zugabe von 10^7 S. pneumoniae, 3) 60 min. nach Zugabe von 10^7 S. pneumoniae, 4) 120 min. nach Zugabe von 10^7 S. pneumoniae.*

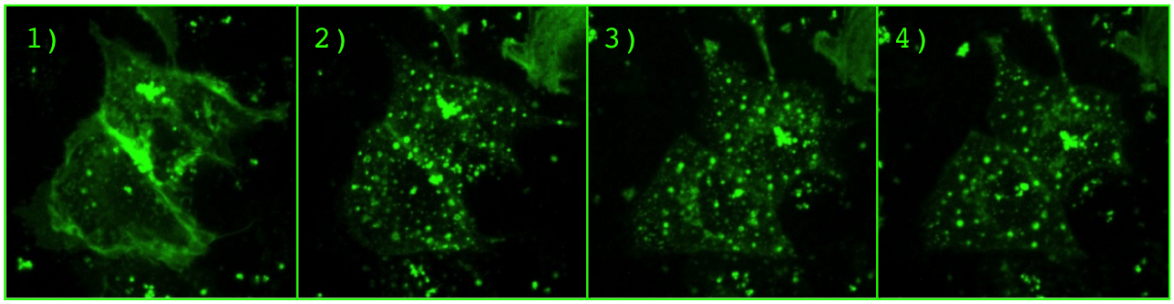

Abb. 3.20. *Repräsentativer Versuch. Dreidimensionale Rekonstruktion von A549-Zellen (Sicht von oben), die mit $P2Y_2$-WT transfiziert wurden. Von links nach rechts: 1) Vor Zugabe von S. pneumoniae, 2) 30 min. nach Zugabe von 10^7 S. pneumoniae, 3) 60 min. nach Zugabe von 10^7 S. pneumoniae, 4) 120 min. nach Zugabe von 10^7 S. pneumoniae.*

3.3.2 Spinning-Disk-Mikroskopie von GFP-P2Y$_2$-R nach ATP

ATP ist der natürliche Agonist für den P2Y$_2$-Rezeptor. Eine Stimulation sollte nach bisherigen Erkenntnissen zur Inaktivierung und Internalisierung von P2Y$_2$-WT führen. Ob eine Internalisierung ebenfalls bei GFP-P2Y$_2$-3A-A549-Zellen zu beobachten ist, sollte hier untersucht werden.

Unter Versuchsbedingungen wurden ca. 20 min nach Messbeginn 100 μM ATP in den Überstand der Zellen gegeben. Anschließend wurden über einen Zeitraum von 2 Stunden intrazelluläre Vesikel beobachtet und gezählt.

Abb. 3.21 zeigt, dass die Zugabe von 100 μM ATP zu einer schnellen und ausgeprägten Zunahme von intrazellulären Vesikeln in P2Y$_2$-WT transfizierten Zellen führt. Im Gegensatz dazu ist bei GFP-P2Y$_2$-3A-A549-Zellen kein signifikanter Anstieg der Anzahl der Vesikel über das Ausgangsniveau zu erkennen.

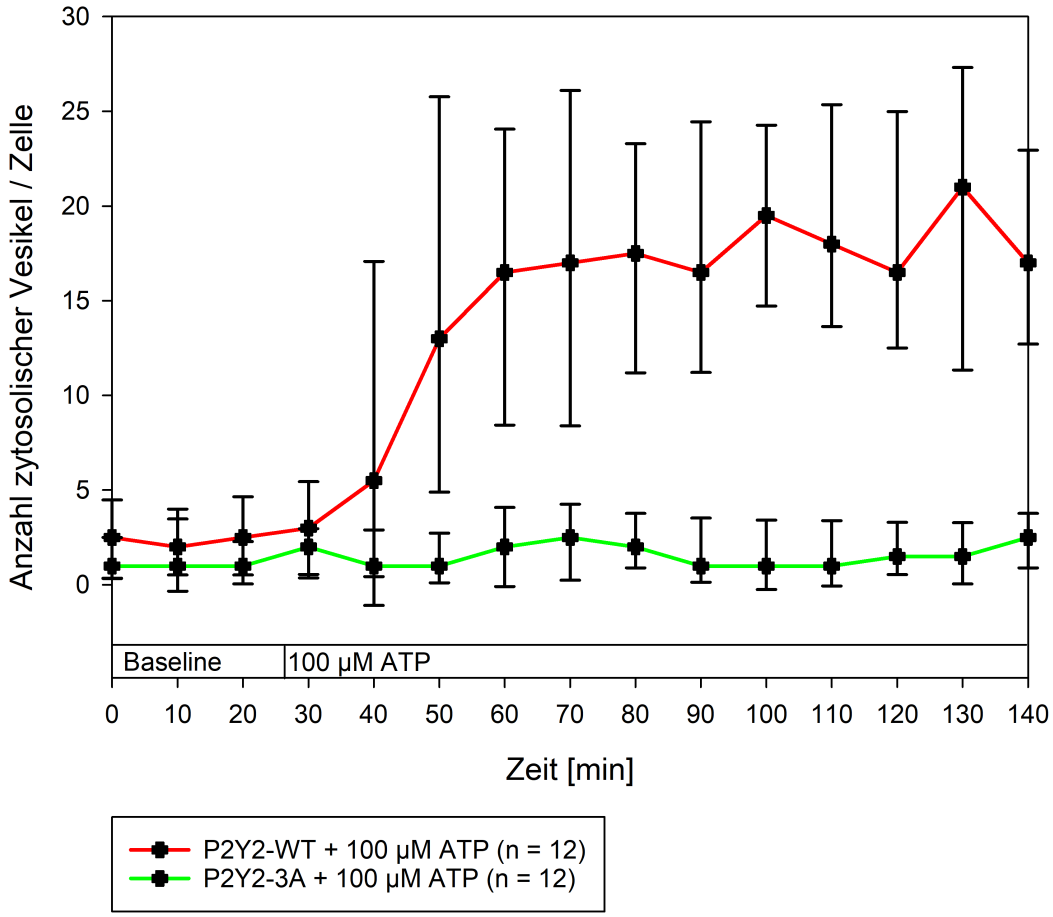

Abb. 3.21. *Zytosolischer Anstieg von intrazellulären, GFP-markierten Vesikeln nach Zugabe von 100 µM ATP in den Überstand. Darstellung von Mittelwerten ± Standardabweichung.*

In Abb. 3.22 und 3.23 ist ein deutlicher Unterschied im Verhalten der Rezeptorinternalisierung in den beiden Versuchsgruppen zu erkennen. Während bei $P2Y_2$-WT eine starke intrazelluläre Vesikelbildung zu erkennen ist, bleibt dies bei der mutierten Variante gänzlich aus:

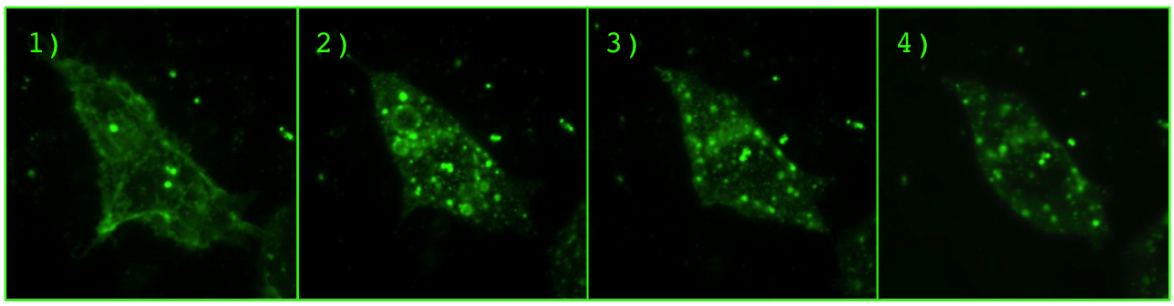

Abb. 3.22. *Zeitlicher Verlauf einer repräsentativen GFP-$P2Y_2$-WT-transfizierten A549-Zelle, dreidimensionale Rekonstruktion.Von links nach rechts: 1) Vor Zugabe von ATP, 2) 30 min. nach Zugabe von 100 µM ATP, 3) 60 min. nach Zugabe von 100 µM ATP, 4) 120 min. nach Zugabe von 100 µM ATP.*

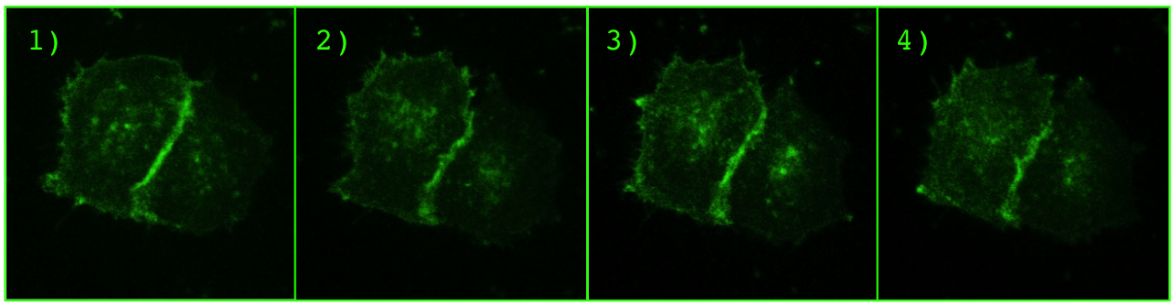

Abb. 3.23. *Zeitlicher Verlauf einer repräsentativen GFP-$P2Y_2$-3A-transfizierten A549-Zelle, dreidimensionale Rekonstruktion. Von links nach rechts: 1) Vor Zugabe von ATP, 2) 30 min. nach Zugabe von 100 µM ATP, 3) 60 min. nach Zugabe von 100 µM ATP, 4) 120 min. nach Zugabe von 100 µM ATP.*

3.3.3 Spinning-Disk-Mikroskopie von GFP-P2Y$_2$-R unter Kontrollbedingungen

Um auszuschließen, dass der alleinige Vorgang der Zugabe einer Substanz oder aber die Trägerlösungen (HBS-Puffer für ATP, THY-Medium für *S. pneumoniae*) im Überstand der Zellen eine Reaktion mit Vesikelabschnürung hervorrufen, wurden diese gesondert untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass weder HBS-Puffer noch THY-Medium *per se* zu einer vermehrten zytosolischen Vesikelbildung in A549-Zellen führen (Abb. 3.24).

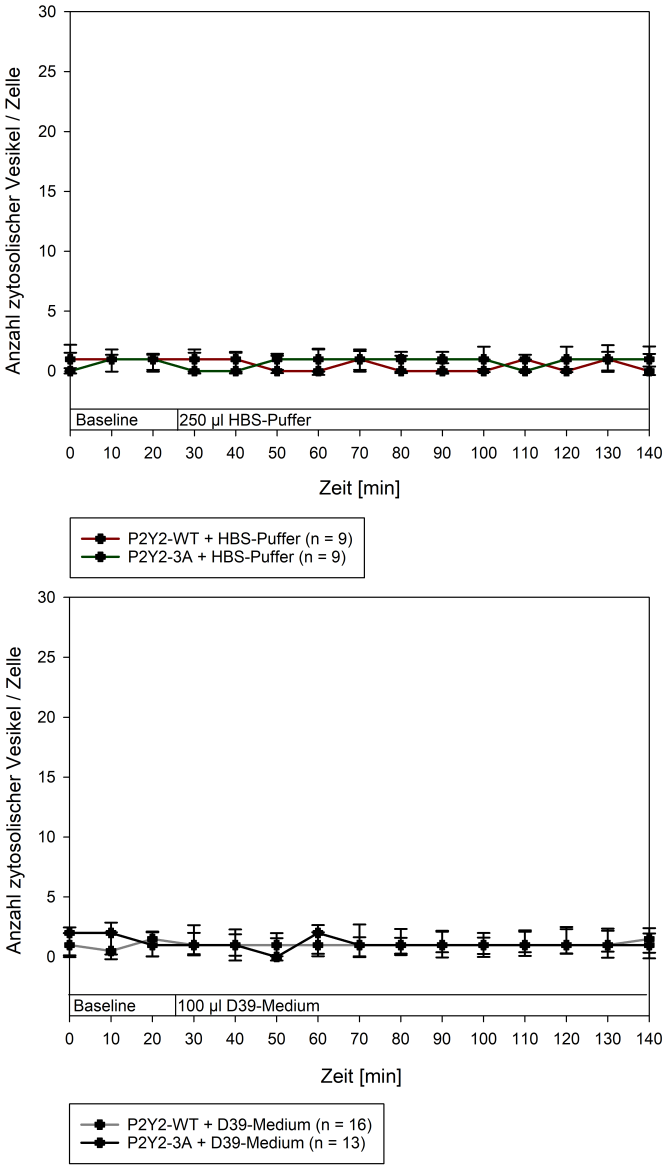

Abb. 3.24. *Zytosolischer Verlauf von intrazellulären GFP-markierten Vesikeln nach Zugabe von 100 µl HBS-Puffer (oben) oder 100 µl THY-Medium (unten) in den Überstand. Darstellung von Mittelwerten ± Standardabweichung.*

3.3.4 Spinning-Disk-Mikroskopie von A549-Zellen und markierten D39

Aus der Literatur ist bekannt, dass Zellen Erreger, wie *S. pneumoniae*, teilweise durch Transzytose ins Zytosol aufnehmen [36]. Die beschriebenen Effekte aus den Spinning-Disk-Mikroskopie-Versuchen von GFP-$P2Y_2$-Rezeptor und D39 könnten somit auch durch mit Zellmembran umhüllten D39 nach Transzytose entstanden sein. Zur Kontrolle einer möglichen Transzytose wurde das Zytosol von A549-Zellen mit Calcein Red-Orange gefärbt. Unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, erfolgte die Zugabe von mit GFP markierten D39(Δcps).

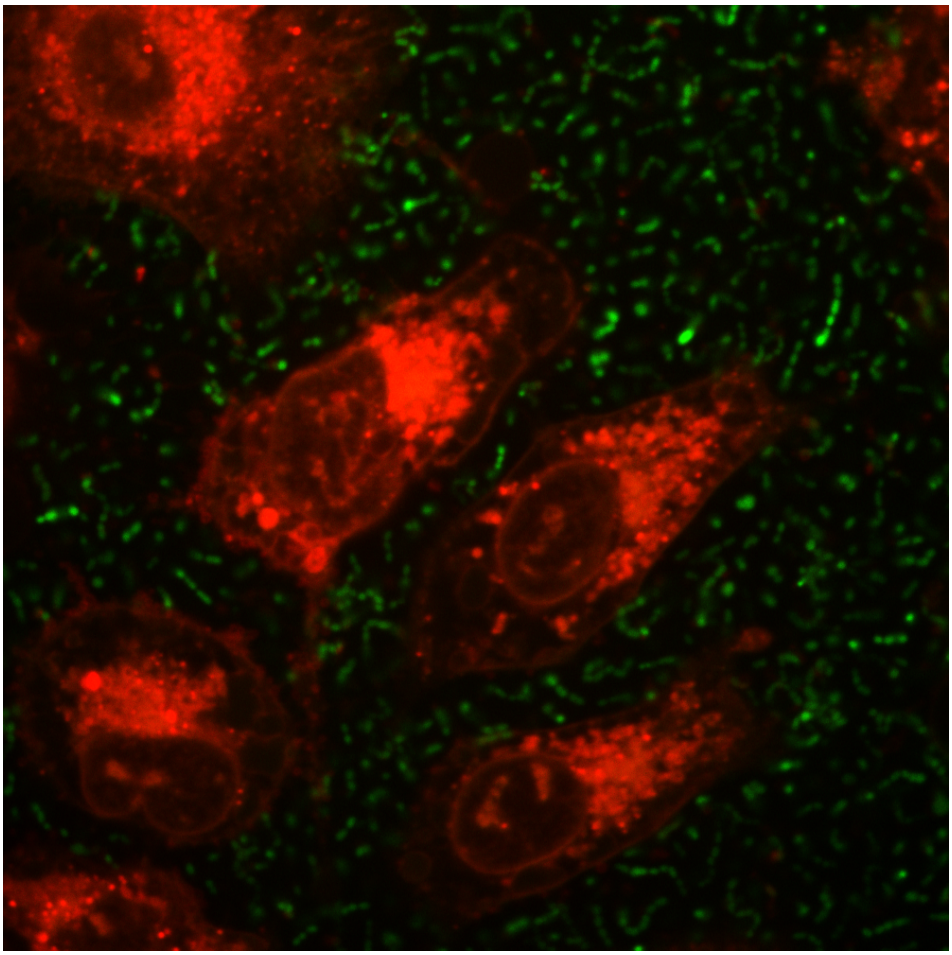

Abb. 3.25. *Mit Calcein Orange-Red gefärbte A549-Zellen (rot) nach 2-stündiger Inkubation mit GFP-D39(Δcps) (grün) Spinning-Disk-Mikroskopie.*

Abb. 3.25 zeigt, wie grün markierte D39(Δcps) reichlich im Überstand der Zellen vorhanden sind. Im Zytosol der mit behandelten Calcein Red-Orange Zellen ist keine grüne Fluoreszenz zu erkennen. Dies gilt ebenso für alle weiteren aufgenommenen Schichten sowie weitere Bildausschnitte und Versuche unter gleichen Bedingungen.
Somit ergibt sich kein Anhalt für eine Internalisierung oder Transzytose von D39(Δcps).

3.4 LifeAct-Versuche

Für dieser Versuche standen zwei verschiedene Fluophore zur Verfügung, welche mit LifeAct verbunden sind und intrazelluläre Aktinstrukturen durch Anlagerung an diese sichtbar machen können.

3.4.1 LifeAct Red

Es wurde gezeigt, wie eine Inkubation von A549-Zellen mit *S. pneumoniae* oder ATP zu Rezeptorinternalisierung und Inaktivierung am $P2Y_2$-Rezeptor führt. Ob dies auch funktionelle Auswirkungen hat, wurde bisher nicht untersucht.
Ein $P2Y_2$-modulierter Effekt ist, nach dessen Aktivierung, der Aufbau von Aktinstrukturen. Bei diesen Versuchen sollte an lebenden A549-Zellen untersucht werden, ob die Inkubation mit ATP oder D39(Δcps) zu sichtbaren Veränderungen am Aktinskelett führen. Hierfür wurde das bereits oben beschriebene Spinning-Disk Mikroskop verwendet. Mit Life-Act transient transfizierte Zellen wurden zu den unten angegebenen Zeitpunkten aufgenommen.

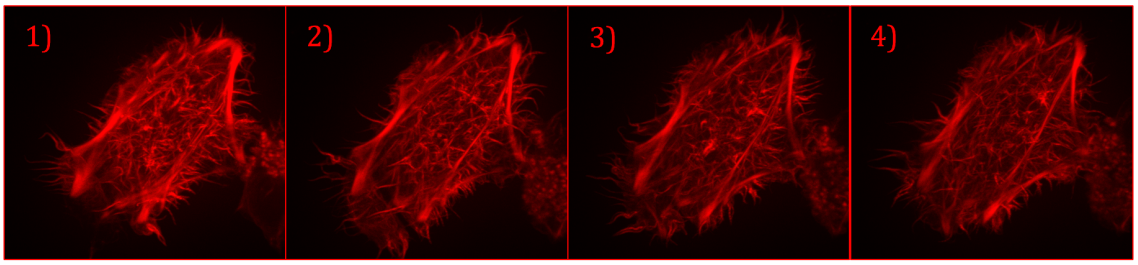

Abb. 3.26. *LifeAct-Red-transfizierte A549-Zelle. Keine Intervention. Rekonstruiertes dreidimensionales Bild. 1) Ausgangsbedingungen, 2) 30 min, 3) 60 min, 4) 90 min.*

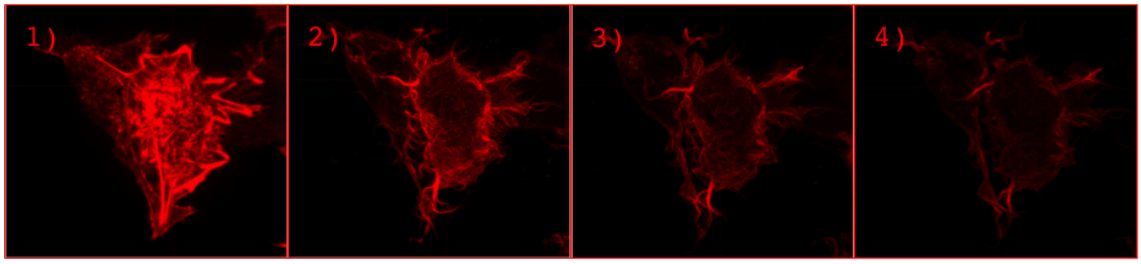

Abb. 3.27. *LifeAct-Red-transfizierte A549-Zelle. Rekonstruiertes dreidimensionales Bild. 1) Ausgangsbedingungen, 2) 30 min nach Hinzugabe von D39(Δcps), 3) 60 min nach Hinzugabe von D39(Δcps), 4) 90 min nach Hinzugabe von D39(Δcps) und 20 min nach Zugabe von 100 µM ATP.*

In Abb. 3.26 ist eine nur langsame Abnahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit zu erkennen, während in der Zelle in Abb. 3.27 bereits zum ersten Messzeitpunkt nach Zugabe von *S. pneumoniae*, insbesondere intrazellulär, ein ausgeprägter Verlust von Fluoreszenz zu erkennen ist. Zum Versuchsende ist kaum noch Fluoreszenz auszumachen.

Um die Auswirkungen der D39(Δcps)-Zugabe objektiv quantifizieren zu können, wurden die Fluoreszenzintensitäten der aufgenommenen Zellen zu den jeweiligen Messpunkten gemessen. Das Ergebnis ist in Abb. 3.28 aufgetragen.

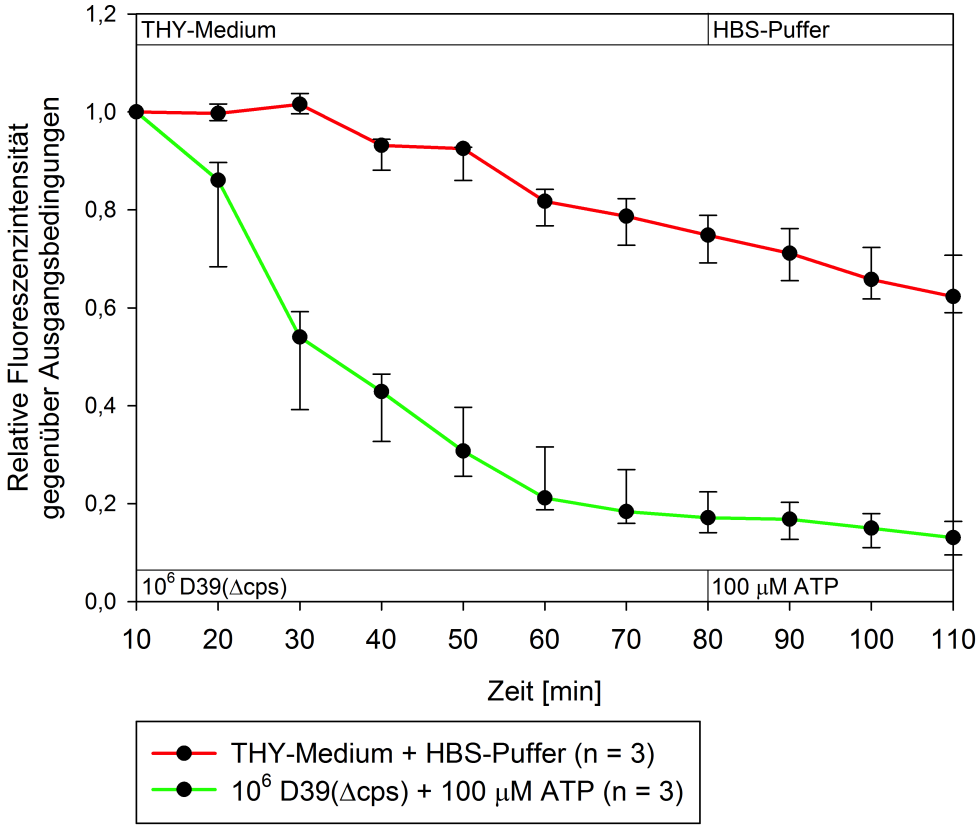

Abb. 3.28. *Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität gegenüber Ausgangsbedingungen. In rot: Kontrollgruppe mit Zugabe von THY-Medium mit 10% Glycerol und HBS-Puffer. In grün: Interventionsgruppe mit Zugabe von D39(Δcps) und 100µM ATP. Darstellung von Mittelwerten ± Standardabweichung.*

Abb. 3.28 zeigt, dass die relative Fluoreszenzintensität der Kontrollgruppe nur langsam, am ehesten im Rahmen des Photobleachings abfällt, während die realtive Fluoreszenzintensität der Interventionsgruppe mit *S. pneumoniae* unmittelbar nach der Zugabe einen signifikanten Abfall zeigt.

3.4.2 LifeAct Green

In folgendem Versuch wurde die Intervention ATP-Zugabe mit der Zugabe von D39(Δcps) in den Überstand verglichen. Hierfür wurde LifeAct-Green verwendet, welches ein GFP als Fluophor an der Aktin bindenden Proteinsequenz trägt. Dieses ist im Vergleich zur RFP photostabiler und bleicht nicht so schnell aus.

In Abb. 3.29 ist zu erkennen, wie es nach Zugabe von ATP (2) über die Zeit zu einem Umbau am Aktinskelett kommt und neue und kräftigere Aktinstrukturen vor allem im mittleren Bereich der Zelle entstehen:

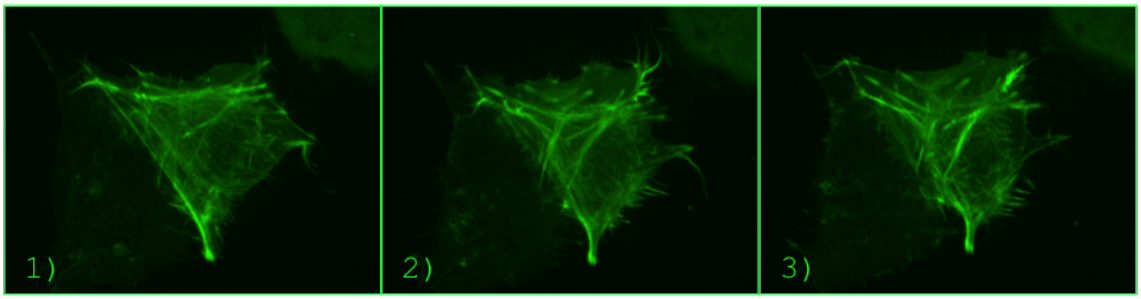

Abb. 3.29. *LifeAct-Green-transfizierte A549-Zelle. Rekonstruiertes dreidimensionales Bild, zeitlicher Verlauf einer Zelle: 1) Ausgangsbedingungen, 2) 30 min nach 100µM ATP, 3) 60 min nach 100µM ATP.*

Abb. 3.30 zeigt ausschnittsweise die Aufnahmen der Intervention D39(Δcps)-Zugabe. Hier ist zu erkennen, wie es über die Zeit zu einem zügigen Abbau von Aktinfasern vor allem im mittleren Bereich der Zelle kommt:

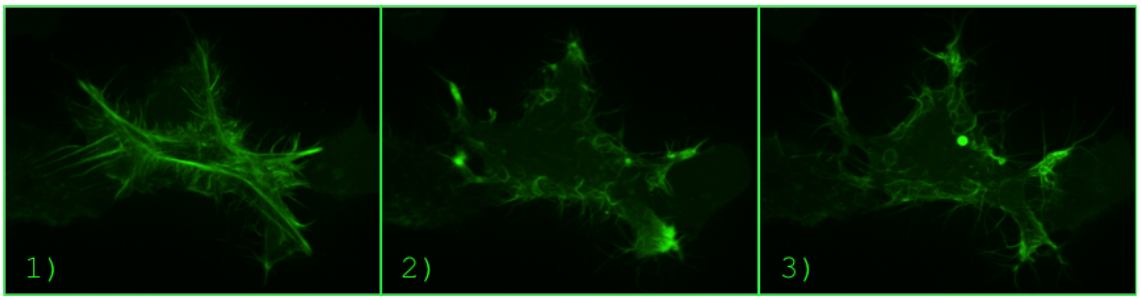

Abb. 3.30. *LifeAct-Green-transfizierte A549-Zelle. Rekonstruiertes dreidimensionales Bild, zeitlicher Verlauf einer Zelle: 1) Ausgangsbedingungen, 2) 30 min nach D39(Δcps), 3) 60 min nach D39(Δcps).*

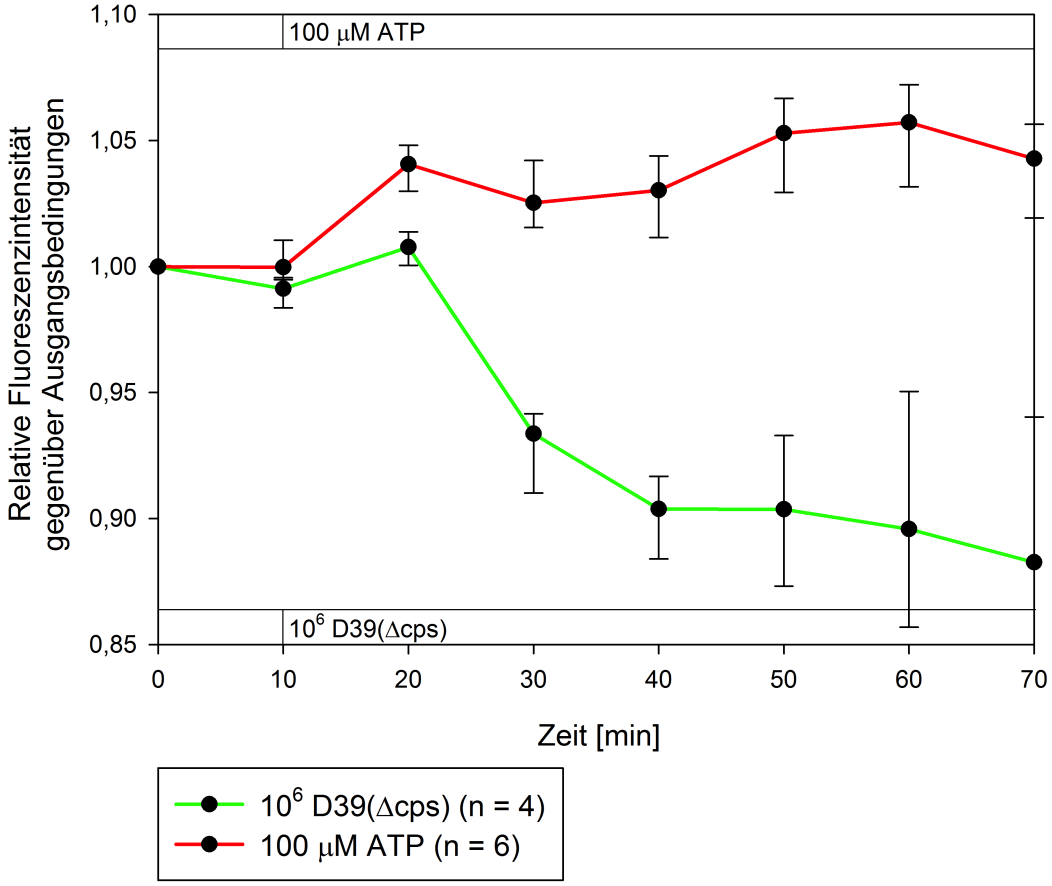

Abb. 3.31. *Verlauf der relativen Fluoreszenzintensitäten gegenüber Ausgangsbedingungen. In rot: Zugabe von ATP. In grün: Zugabe von D39(Δcps). Darstellung von Mittelwerten ± Standardabweichung.*

Sowohl in den Versuchen mit LifeAct Green als auch LifeAct Red kam es zu einem ausgeprägten Verlust der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von D39(Δcps), was einem Verlust von Aktin entspricht.
Hingegen zeigte die Zugabe von ATP eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität, was einem Aufbau von Aktinstrukturen entspricht. Vergleiche hierzu Abb. 3.28 und 3.31.

3.5 Surfactantversuche mit Lyso-Tracker Green

Alveozyten Typ II wurden aus einer Rattenlunge isoliert und dann mit Lyso-Tracker Green (LTG) sowie Fura-2AM gefärbt. Mittels Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie erfolgte die Messung von intrazellulärem Calcium, sowie der Fluoreszenzintensität von den mit LTG angefärbten Lamellarkörperchen. Als Agonist wurde ATP verwendet. Dies wurde an nativen sowie an D39(Δcps)-vorinkubierten Zellen vorgenommen. Eine Gruppe mit alleiniger HBS-Zugabe diente als Kontrolle.

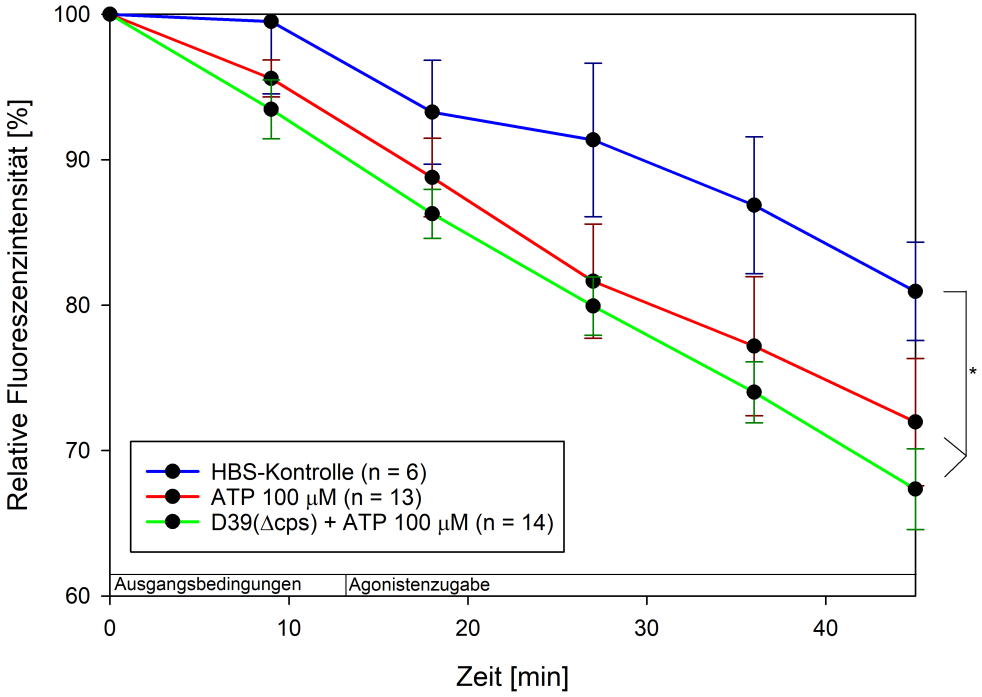

Abb. 3.32. *Relative Fluoreszenzintensität von mit LysoTracker Green gefärbten Lamellarkörperchen in primär isolierten AEZ aus der Rattenlunge nach Zugabe von 100 µM ATP in den Überstand. Darstellung von Mittelwerten ± Standardabweichung. * = $p < 0{,}001$; U-Test*

Abb. 3.32 zeigt, wie die Fluoreszenzintensität in der mit *S. pneumoniae* vorinkubierten Versuchsgruppe auch unabhängig von der ATP-Zugabe am stärksten abnimmt, wobei die Fluoreszenzintensität in der HBS-Kontrollgruppe am stabilsten bleibt.

Die Abb. 3.33 zeigt den maximalen zytosolischen Calciumanstieg der selben Zellen aus Abb. 3.32 nach ATP- oder HBS-Zugabe. Hier ist zu sehen, dass die Zellen wie erwartet eine Calciumantwort zeigen, welche jedoch bei den mit D39(Δcps)-vorinkubierten Zellen ausbleibt.

Abb. 3.34 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme primär isolierter AEZ aus einer Rattenlunge, welche mit Fura-2AM und LTG gefärbt wurden.

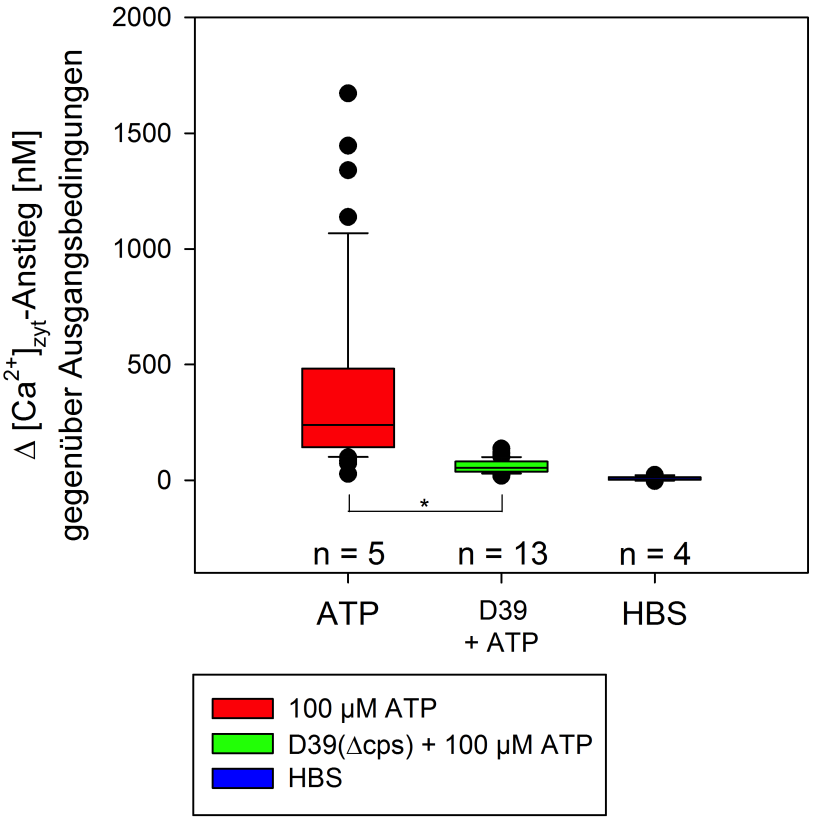

Abb. 3.33. *Zytosolischer Calciumanstieg zu Ausgangsbedingungen in A549-Zellen nach Zugabe von 100 µM ATP in den Überstand. * = $p < 0{,}001$; U-Test*

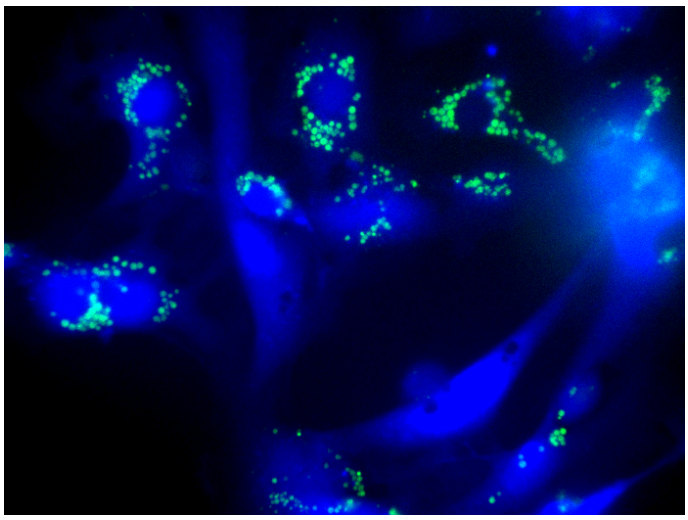

Abb. 3.34. *Repräsentativer Versuch, Fura-2-Ratio Aufnahme in Falschfarben (Zellen blau dargestellt). Grüne Fluoreszenz entspricht LTG gefärbten Lysosomen.*

3.6 Permeabilitätsassay

Das Ziel der Etablierung einer Ko-Kultur von A549- und HUVE-Zellen war die Schaffung eines alveolen ähnlichen in vitro-Modells.
Nach Etablierung der Ko-Kultur wurden zunächst kapseldefiziente *S. pneumoniae* oder ATP in den Überstand der A549-Zellen pipettiert und gegen eine Kontrolle mit HBS-Puffer verglichen. Die Durchlässigkeit sowie deren Veränderung wurde mittels Fluoreszenzintensitätsmessung von FITC-BSA durchgeführt, welches in den Überstand der A549-Zellen pipettiert wurde. Das Ergebnis zeigt Abb. 3.35, wobei die erste Messung nach 10 min erfolgt ist:

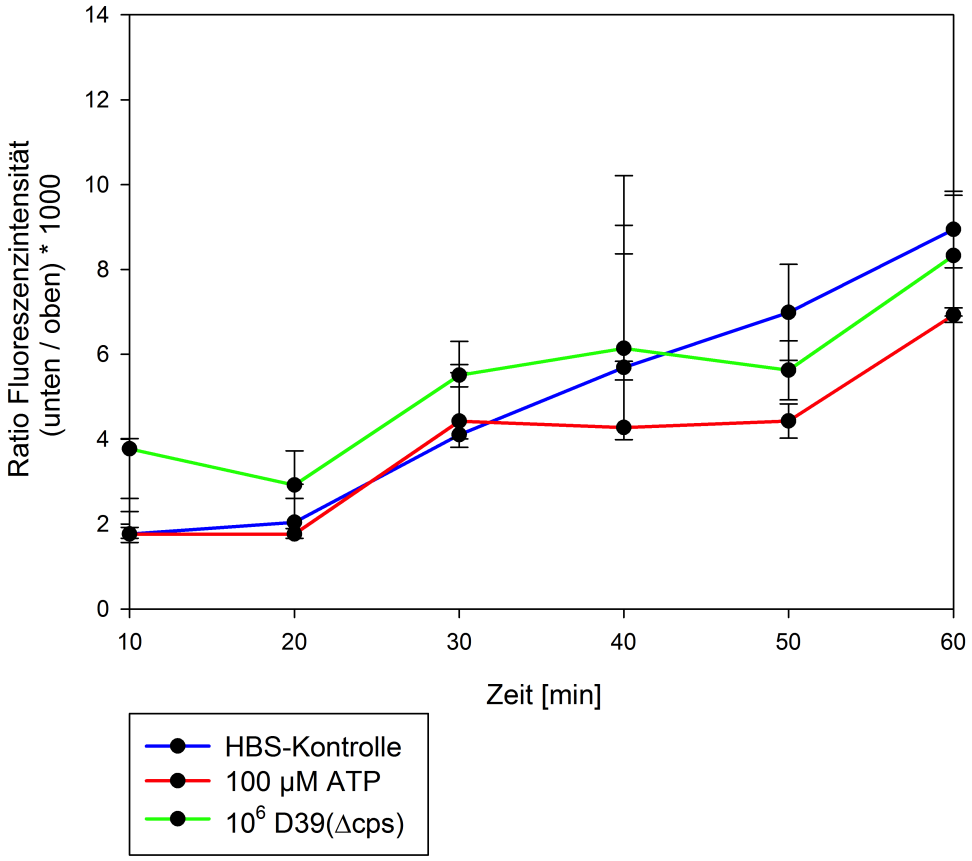

Abb. 3.35. *Verlauf der Fluoreszenzintensitäten von FITC-BSA als Ratio unterhalb / oberhalb des Zellrasens. n = jeweils 3. Darstellung von Mittelwerten ± Standardabweichung.*

Es kommt sowohl in der ATP- als auch in der D39-Versuchsgruppe nach 30 min zu einer Abflachung der Kurven. Dies ist in der Kontrollgruppe (nur HBS-Zugabe) nicht zu sehen. Das könnte bedeuten, dass über die Zeit vergleichsweise weniger des FITC-BSA durch den Zell-Bilayer gedrungen ist. Aufgrund geringer Versuchsanzahl konnte keine statistische Signifikanz erzielt werden.

3.6.1 Calciumversuche mit *Pseudomonas aeruginosa*

Dass die Inkubation mit *S. pneumoniae* zur Unterdrückung des P2Y-vermittelten zytosolischen Calciumsignals führt, wurde in dieser Dissertation an HPAEpi-Zellen (Abb. 3.1), A549-Zellen (bspw. Abb. 3.11) und primär isolierten AEZ der Rattenlunge (Abb. 3.33) gezeigt. Ob es sich dabei um einen streptokokkenspezifischen Effekt handelt, oder dieser generell nach bakterieller Exposition auftritt, wurde bisher nicht untersucht.

Um sich der Antwort auf diese Frage zu nähern, wurden A549-Zellen zum einen nur mit ATP stimuliert (Kontrolle), zum anderen zwei Stunden mit *Pseudomonas aeruginosa* oder *S. pneumoniae* vorinkubiert und anschließend mit ATP 100 μM stimuliert.

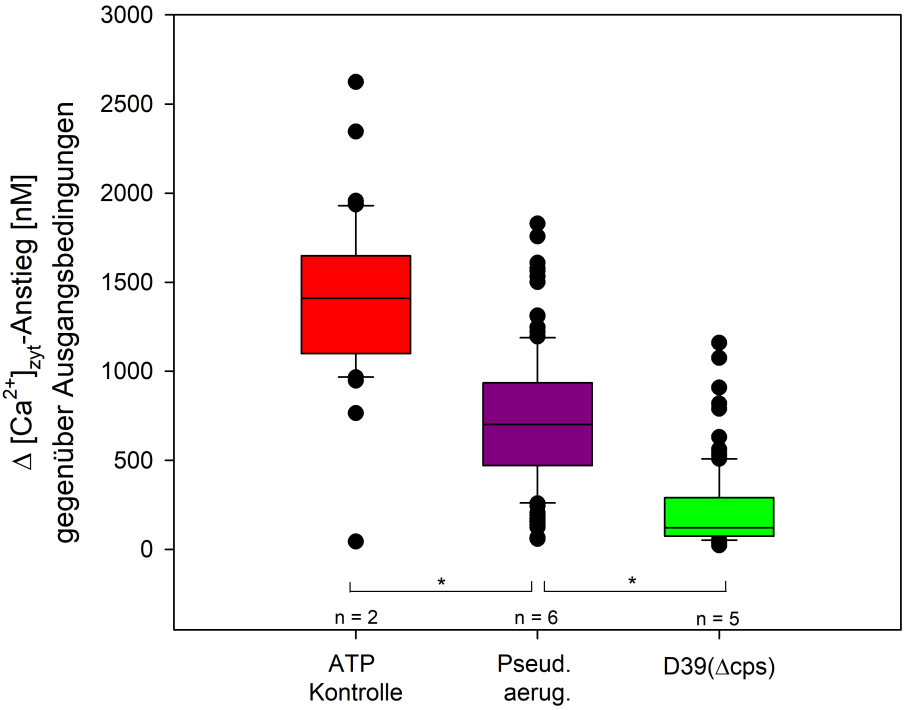

Abb. 3.36. *Darstellung des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ von A549-Zellen nach Zugabe von 100 μM ATP in den Überstand. * = $p < 0{,}001$; U-Test.*

Abb. 3.36 zeigt, wie die Inkubation mit *Pseudomonas aeruginosa* zwar zu einer statistisch signifikanten Reduktion des zytosolischen Calciumsignals führt, dieses jedoch nicht in gleichem Ausmaß unterdrückt wie D39(Δcps).

3.7 Stabile Transduktion von A549-Zellen mit GFP-P2Y$_2$-WT

Zur Herstellung einer Zelllinie, welche den GFP-markierten P2Y$_2$-Rezeptor stabil exprimiert, wurde ein entsprechender lentiviraler Vector cloniert. Dieser wurde in eine Lentivirus produzierende Zelllinie transfiziert. A549-Zellen wurden mit den so gewonnenen Viruspartikeln, welche das Plasmid mit GFP-P2Y$_2$-WT enthielten, beimpft.

3.7.1 FACS-Analyse

Durch eine FACS-Analyse wurde eine Woche nach Beimpfung der Erfolg der Transduktion überprüft, wobei GFP als Marker diente:

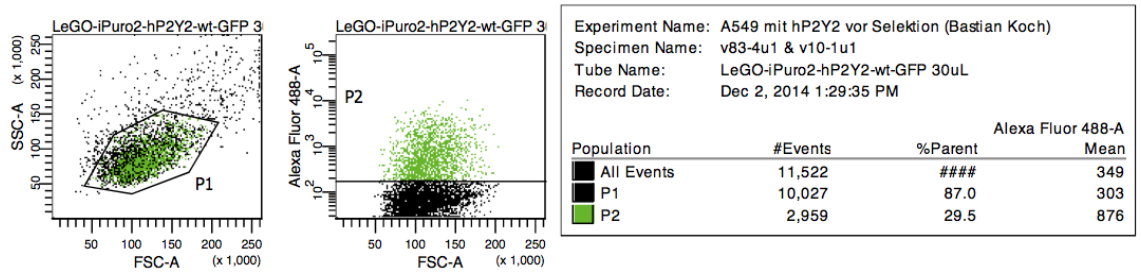

Abb. 3.37. *Ergebnis der FACS-Analyse von A549-Zellen eine Woche nach stabiler Transduktion mit LeGO-iPuro2 - GFP-P2Y$_2$-WT-Rezeptor.*

Abb. 3.37 zeigt, dass die Zellkultur zu 29,5% aus GFP-P2Y$_2$-WT-exprimierenden Zellen besteht.
Außerdem wurde unter gleichen Bedingungen eine Zelllinie hergestellt, welche stabil zytosolisches GFP exprimiert:

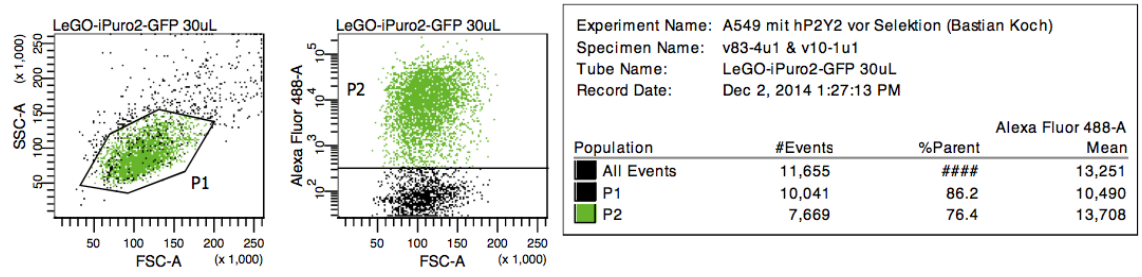

Abb. 3.38. *Ergebnis der FACS-Analyse von A549-Zellen eine Woche nach stabiler Transduktion mit LeGO-iPuro2 - GFP*

Der Abb. 3.38 ist zu entnehmen, dass 76,4% der Zellen in der Kultur nach stabiler Transduktion GFP exprimieren.

3.7.2 Spinning-Disk-Mikroskopie

Ob sich der transduzierte GFP-P2Y$_2$-Rezeptor in gleicher Weise wie der transient transfizierte verhält, war zunächst unklar. Zur Kontrolle wurde eine Probe mit der neuen Zelllinie im Spinning-Disk-Mikroskop in gleicher Weise untersucht wie transient transfizierte mit GFP-P2Y$_2$-R A549-Zellen. Ca. 20 min nach Versuchsbeginn wurden 100μM ATP in den Überstand gegeben. Folgende Darstellung zeigt die neue Zelllinie, wobei auf der linken Seite Ausgangsbedingungen zu sehen sind. Rechtsseitig sind Aufnahmen ca. 60 min nach ATP-Zugabe zu sehen:

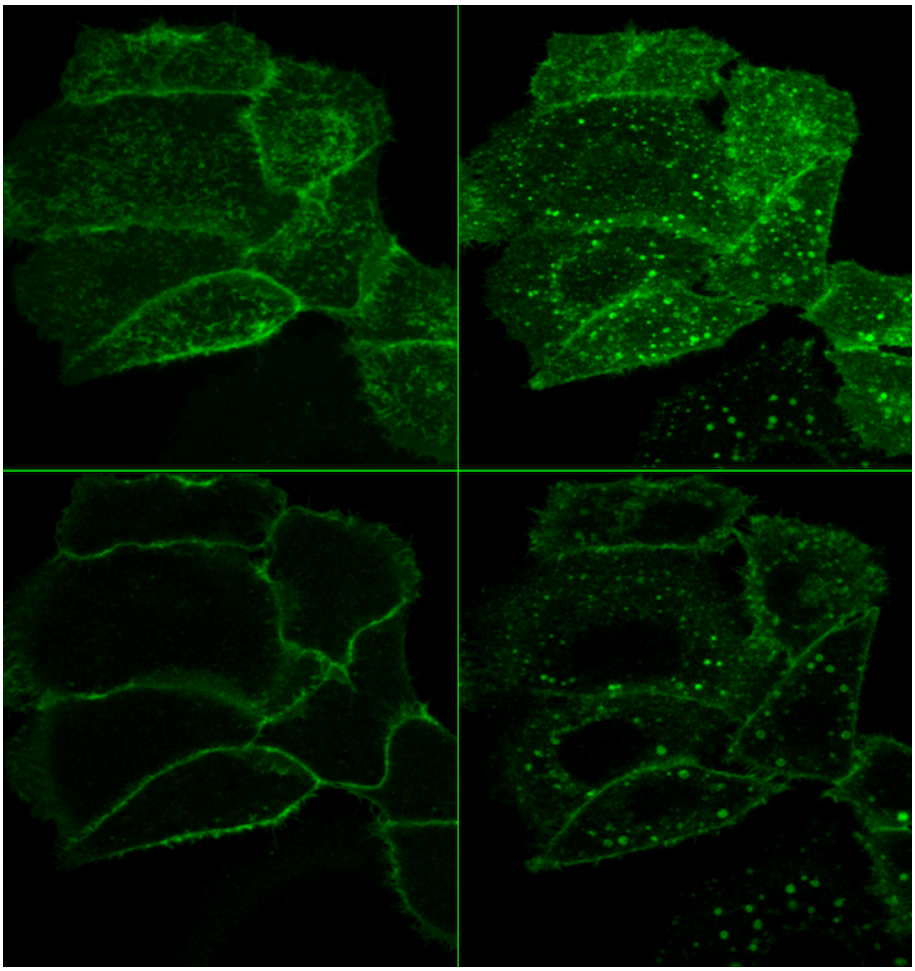

Abb. 3.39. *Spinning-Disk-Aufnahme von A549-Zellen nach stabiler Transduktion mit GFP-P2Y$_2$-Rezeptor. Links: Ausgangsbedingungen, rechts: 60 min. nach 100μM ATP. Oben: Dreidimensionale Rekonstruktion der Zellen mit Sicht von oben. Unten: Repräsentative Schichtaufnahme derselben Zellen der oberen Reihe, jeweils bei Ausgangsbedingungen (links) und 60 min nach 100 μM ATP (rechts).*

Abb. 3.39 zeigt eine kräftige Expression des GFP-P2Y$_2$-Rezeptors in den Zellen, wobei der

rekombinante Rezeptor bei Ausgangsbedingungen erwartungsgemäß an der Zellmembran zu liegen scheint. Nach Zugabe von 100μM ATP ist 60 min später eine deutliche Zunahme von zytosolisch gelegenen GFP-markierten Vesikeln zu erkennen, welche internalisiertem GFP-$P2Y_2$-Rezeptor entsprechen. Hervorzuheben ist eine Zelle unten im Bild, welche nur teilweise abgebildet ist. Zu Ausgangsbedingungen ist diese bei schwachen Expression den rekombinanten Proteins kaum zu erkennen. Nach ATP-Stimulation sind jedoch kräftig fluoreszierende Vesikel zu sehen, welche ein Hinweis darauf sein könnten, dass der Rezeptor an der Zellmembran zunächst an diversen Stellen akkumuliert und anschließend ins Zytosol transloziert wurde.

3.7.3 Calcium-Ratio-Mikroskopie

A549-Zellen exprimieren auch ohne Transduktion oder Transfektion den $P2Y_2$-Rezeptor an ihrer Oberfläche. Ein zytosolisches Calciumsignal auf ATP-Stimulation kann daher nicht dem endogenen oder einem rekombinanten Rezeptor zugeordnet werden.
Zur Überprüfung, ob die stabil transduzierten A549-Zellen weiterhin in der Lage sind, ein Calciumsignal auf ATP-Stimulation zu bilden, wurden diese dennoch mit Fura-2AM gefärbt und mit 100 μM ATP stimuliert. Die Fura2-Ratio-Mikroskopie ergab ein deutliches zytosolisches Calciumsignal. Auf eine Darstellung wird hier verzichtet.

4 Diskussion

In dieser Dissertation wurde untersucht, welche Auswirkungen *S. pneumoniae* auf die Inaktivierung der $P2Y_2$ -Signalkaskade von AEZ hat und über welche (intrazellulären) Mechanismen dies zustande kommen könnte. Außerdem wurden mögliche funktionelle Veränderungen an AEZ durch eine Inkubation mit *S. pneumoniae* untersucht.

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Klonierung von GFP-$P2Y_2$-Rezeptorvarianten

Für eine möglichst isolierte Betrachtung des $P2Y_2$-Rezeptors und dessen Phosphorylierungsstellen wurde dieser in verschiedene Vektoren zur transienten Transfektion und stabilen Transduktion kloniert und durch Punktmutationen am C-terminalen Ende modifiziert. Durch ein Fluoreszenz-tag im Vektor konnte der Rezeptor im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Durch Sequenzierungen konnte sichergestellt werden, dass der rekombinante $P2Y_2$-Rezeptor korrekt in die Vektoren kloniert wurde.

4.1.2 Herstellung einer Zelllinie, welche GFP-$P2Y_2$ stabil exprimiert

Die Herstellung einer Zelllinie mit stabiler Expression von GFP-$P2Y_2$ durch lentivirale Transduktion ergab die Möglichkeit, Versuche an Zellen durchzuführen, welche das rekombinante Protein kräftig und im Vergleich zur transienten Transfektion homogener exprimieren. So konnte beispielsweise eine hohe Proteinanzahl für einen Western-Blot erreicht werden. Die lentivirale Transduktion ist jedoch auch eine invasive Methode, bei der virale Promotoren zusammen mit der Information für ein Resistenzgen und das Protein, welches exprimiert werden soll, ungerichtet in das Genom der Zellen integriert wird. Hierdurch können umfangreiche Schäden an der DNA entstehen, welche bspw. zu einem veränderten Zellstoffwechsel oder unerwarteter Regulierung der Genexpression führen könnten.

4.1.3 Fura2-Ratio-Mikroskopie

Die Fura2-Ratio-Mikroskopie erlaubt nach Eichung auf eine bestimmte Zelllinie indirekt die quantitative Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration. So konnte je nach Versuchsaufbau nicht nur unterschieden werden, ob ein Calciumsignal entsteht, sondern auch die

Höhe des Calciumsignals in verschiedenen Versuchsgruppen quantifiziert und miteinander verglichen werden. Kritisch gesehen werden muss, dass Zellproben vorab mit Fura-2AM gefärbt werden mussten, welches zu unerwarteten Effekten an und in den Zellen führen könnte. Zudem ist ein erheblicher Aufwand mit mehreren Spülvorgängen des Zellüberstandes notwendig, welcher zu zellulärem Stress vor allem an der Zellmembran (Scherkräfte) führen und die Ergebnisse so beeinflussen könnte. Technisch bedingt konnten die Messungen ausschließlich bei Raumluftbedingungen durchgeführt werden, sodass ein anderes Verhalten als gegenüber den Bedingungen in der Alveole möglich ist. Weiterhin ist in Betracht zu ziehen, dass für die Anregung von Fura-2 kurzwelliges UV-Licht notwendig ist, welches Schäden bspw. an der DNA in den Zellen verursachen kann (Phototoxizität) [3].

4.1.4 Spinning-Disk-Mikroskopie

Die Vorteile der Spinning-Disk-Mikroskopie liegen in der hohen Auflösung in Verbindung mit der Möglichkeit, Zellen in einzelnen Schichten aufzunehmen, welche für eine Auswertung zu einem dreidimensionalen Modell wieder zusammengesetzt werden können. Durch den gezielten Einsatz eines Lasers zur Anregung der Fluophore, welcher auf mehrere Linsen verteilt wird, kann die Phototoxizität begrenzt werden. So konnte beispielweise der GFP-$P2Y_2$-Rezeptor ausreichend genau beobachtet werden, um eine Bewegung/Translokation von der Zellmembran zu beobachten. Im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie gibt es einen erheblichen Geschwindigkeitsvorteil, sodass mehrere Zellen gleichzeitig in kurzen Zeitabständen untersucht werden konnten. Zudem konnten durch eine spezielle Messkammer brutschrankähnliche Bedingungen hergestellt werden.

4.1.5 Western-Blot mit Phos-tag

Bei dieser Art Western-Blot können Phosphorylierungen an Proteinen nachgewiesen werden. Phosphorylierte Proteine laufen langsamer im Gel und bilden so, je nach Anzahl der Phosphorylierungen, mehrere Banden aus. In dieser Dissertation wurde zum Nachweis von Phosphorylierungen am Purinrezeptor $P2Y_2$ durch *S. pneumoniae* der rekombinante GFP-$P2Y_2$-Rezeptor eingesetzt, da die verfügbaren Antikörper gegen $P2Y_2$ oft auch unspezifische Banden produzierten, die eine Interpretation des Blots sehr erschwerten. Hochspezifische Antikörper gegen GFP hingegen sind vergleichsweise problemlos verfügbar gewesen, weshalb der Nachweis von $P2Y_2$ in diesem Western-Blot indirekt über den GFP-tag erfolgte. Durch unterschiedliche Inkubationszeiten konnte ein zeitabhängiger Effekt durch die Inkubation mit *S. pneumoniae* untersucht werden. Ein Western-Blot bedarf vieler handwerklich zu übender Einzelschritte, sodass die Qualität des entwickelten Blots von vielen Faktoren abhängig ist. Zum Ausgleichen von möglicherweise unterschiedlichen Proteinbeladungen der Geltaschen wurde ein Quotient aus den Fluoreszenzintentesitäten der Banden gebildet. Ein Western-Blot mit Phos-tag ist nicht geeignet zu zeigen, an welcher Stelle genau die Phosphorylierung(en) liegt/liegen. Diese

könnten ggf. auch am extrazytosolischen N-Terminus liegen, was eher dafür sprechen würde, dass *S. pneumoniae* den Rezeptor direkt modifiziert.

4.1.6 Ko-Kultur und Permeabilitätsassay

Sowohl A549- als auch HUVE-Zellen sind seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung. Eine Ko-Kultur der beiden Zelllinien wurde bisher nicht publiziert. Die hier gefundene Zusammensetzung des Nährmediums, welche für beide Zelllinien ein gutes Wachstum zeigte, ist somit für beide eine Annäherung an möglichst ideale Bedingungen. Es ist nicht auszuschließen, dass die Zellen gerade bei Ko-Kultur über einen längeren Zeitraum ein unerwartetes Verhalten zeigen könnten.
Da der $P2Y_2$-Rezeptor über ENaCs an der Flüssigkeitsreabsoption beteiligt ist [27], wurden Versuche zur Durchlässigkeit durchgeführt. Die Durchlässigkeit des Zellbilayers ist von vielen verschiedenen Faktoren und nicht nur von ENaCs abhängig, sondern bspw. auch von Interzellularverbindungen. Eine Veränderung an der Durchlässigkeit ist somit ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Außerdem ist zu bedenken, dass nur eine geringe Menge Medium aus den beiden Kammern zur Untersuchung entnommen werden kann, da die Flüssigkeitsstände ansonsten zu stark abnehmen würden. Es können dadurch nur wenige Zeitpunkte untersucht werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Fura2-Ratio-Mikroskopie mit HPAEpi-Zellen und $P2Y_2$-Rezeptoren

Die Kultur und Transfektion der primär isolierten humanen HPAEpi-Zellen gelang nur über wenige Passagen, da zügig eine Transdifferenzierung der Zellen in Richtung Fibroblasten beobachtet werden konnte. Dies zeigte sich in morphologischen als auch funktionellen Veränderungen der Zellen. So zeigten die Zellen im Verlauf auch ohne Transfektion ein Calciumsignal auf ATP-Stimulation. Die Transfektionseffizienz lag etwa bei 5-10%, wobei die Expression oftmals nur schwach ausgeprägt war.
Für den Versuchsaufbau waren sie dennoch gut geeignet, da es sich zwar um humane AEZ handelt, diese aber keine zytosolische Calciumantwort auf ATP zeigen. Nach Transfektion mit dem $P2Y_2$-WT oder der mutierten $P2Y_2$-3A-Variante, bei der die drei Phosphorylierungsstellen der PKC deletiert wurden, zeigten die Zellen ein deutliches zytosolisches Calciumsignal auf ATP. Dies ist im Wesentlichen im Einklang mit der Arbeit von Flores et. al. [10].
Wir konnten zeigen, dass die mit $P2Y_2$-WT-Rezeptor transfizierten Zellen ein deutliches Calciumsignal auf ATP zeigen, welches jedoch nicht mehr zu sehen war, wenn die Zellen vorab mit D39(Δcps) inkubiert wurden. Bei den Zellen mit transfiziertem $P2Y_2$-3A-Rezeptor hingegen war auch nach Inkubation mit D39(Δcps) eine deutliche Calciumantwort zu erkennen (siehe

hierzu ggf. Abb. 3.1).
Dadurch kann vermutet werden, dass die drei Phosphorylierungsstellen der PKC, die der mutierten Rezeptorvariante fehlen, eine entscheidende Rolle bei der durch *S. pneumoniae* vermittelten Rezeptor-Inkativierung spielen.
Ein Anhalt für eine direkte zytotoxische Wirkung durch D39(Δcps) an den AEZ als Ursache für das Ausbleiben einer Calciumantwort auf ATP konnte nicht gefunden werden. Wenn kein ATP-Signal zu erkennen war, wurde Trypsin in den Überstand der Zellen gegeben, welches regelhaft zu einem zytosolischen Calciumsignal führte (Abb. 3.2). Durch Färbungen mit einem Live/Dead-Kit konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit *S. pneumoniae* nicht zu einem Zelltod führt (Abb. 3.12 und 3.13).

4.2.2 Fura2-Ratio-Mikroskopie mit Inhibitoren

4.2.2.1 Kinaseinhibitoren

Wie *S. pneumoniae* das zytosolischen Calciumsignal unterdrückt, ist unklar. Eine direkte Interaktion zwischen dem $P2Y_2$-Rezeptor und den D39(Δcps), welche zu dessen Inaktivierung führt, erscheint möglich. In Anbetracht der großen Menge an $P2Y_2$ in der Zellmembran und der vergleichsweise geringen Menge an Bakterien im Überstand wurden weitere mögliche Ursachen untersucht.
Es wurde im Betracht gezogen, dass *S. pneumoniae* die Signaltransduktion eines anderen Rezeptors initiiert, welche zu einer Phosphorylierung und somit zur inaktivierung am Purinrezeptor führt. Über das Online-Programm *Scansite3* können anhand von Motiven in der Aminosäurensequenz mögliche Kinasen für ein Protein erkannt werden [33]. Der $P2Y_2$-Rezeptor wurde als Zielprotein eingegeben und die wahrscheinlichsten Kinasen ausgewählt. Für diese Kinasen wurden verschiedene Inhibitoren getestet, indem die AEZ zeitgleich mit D39(Δcps) und dem entsprechenden Inhibitor inkubiert wurden.

S. pneumoniae könnte dabei an einem bisher unbekannten Rezeptor X eine Signaltransduktion auslösen, die über verschiedene mögliche Proteinkinasen zu einer Phosphorylierung am $P2Y_2$-Rezeptor führen könnten. Hierüber ließe sich erklären, wie der inhibierende Effekt von S. pneumoniae auf das ATP-induzierte Calciumsignal zustannde kommt, obwohl die D39 in deutlicher Unterzahl sind, da die intrazelluläre Signaltransduktion als Verstärker wirken würde (Abb. 4.1).

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde mit Kinaseinhibitoren gearbeitet, die die Phosphorylierung am $P2Y_2$-Rezeptor hemmen könnten.
Sollte einer der Inhibitoren bewirken, dass die Zellen trotz D39(Δcps)-Vorinkubation in der Fura2-Ratio-Mikroskopie einen Anstieg des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf ATP-Zugabe zeigen, könnte dies ein Hinweis auf die Bestätigung der Hypothese sein.

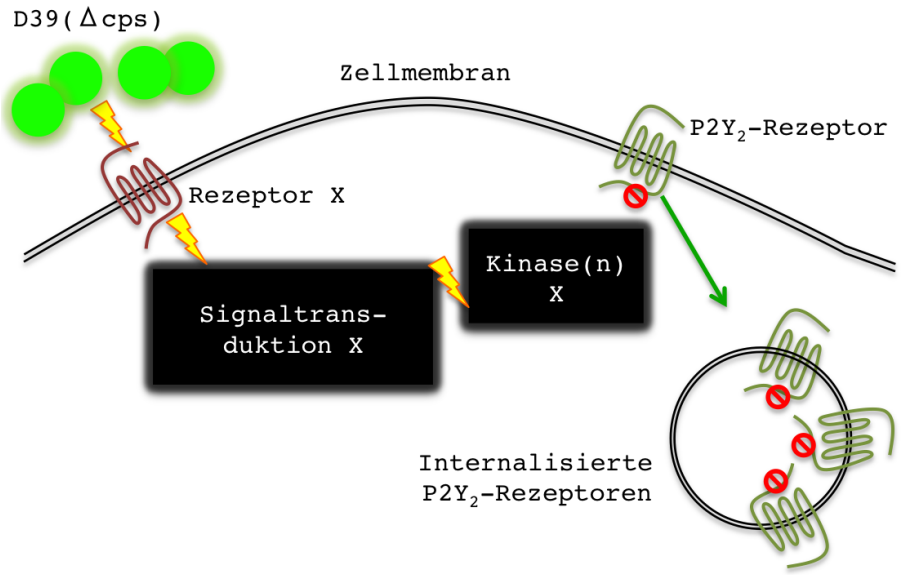

Abb. 4.1. *Schematische Darstellung einer fiktiven Signaltransduktion, ausgelöst durch D39 an einem bisher unbekannten Rezeptor X.*

PKA-Inhibitoren

Die Substanz H-89 wird als spezifischer Inhibitor der PKA beschrieben [2]. Die PKA wiederum wird in ihrer Aktivität maßgeblich durch den cAMP-Spiegel im Zytosol beeinflusst und kann durch viele verschiedene g-Protein-gekoppelte 7-Transmembranrezeptoren aktiviert werden. Außerdem kann die PKA auch weitere Proteinkinasen wie die PKC aktivieren [42].

In den Versuchen mit H-89 und D39(Δcps)-Vorinkubation zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ bei steigenden H-89-Konzentrationen, wobei schon die geringste getestete Konzentration von 10 μM einen geringen, jedoch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit alleiniger D39(Δcps)-Vorinkubation zeigte.

In den durchgeführten Kontrollversuchen konnte gezeigt werden, dass auch hohe Konzentrationen von 40 μM H-89 in Abwesenheit von D39 das $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf ATP nur wenig beeinflussen (Abb. 3.7 und 3.8).

Vorbehandlung der Zellen mit dem PKA-Inhibitor KT5720 führte zu einem vergleichbar mit dem getesteten H-89 signifikanten Anstieg des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf ATP gegenüber der alleinigen Vorinkubation mit D39(Δcps), siehe Abb. 3.6. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die PKA an der Inaktivierung und Internalisierung des $P2Y_2$-Rezeptors durch *S. pneumoniae* mitbeteiligt ist.

Das $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ dieser Versuche kommt jedoch nicht annähernd auf das Niveau der Kontrollen mit alleiniger ATP-Zugabe, wie in den Versuchen mit der Rezeptormutante gegenüber dem Wildtyp des $P2Y_2$-Rezeptors an HPAEpi-Zellen (Abb. 3.1).

Daher könnte man annehmen, dass weitere Kinasen beteiligt sind. Lee et. al. zeigten 2012,

dass eine Inkubation u.a. von Alveolarepithelzellen mit *S. pneumoniae* die Expression von PDE4B induzieren kann. Hierdurch wird die zytosolische cAMP-Konzentration gesenkt und PKA inhibiert [23]. Allein dies könnte weitreichende Auswirkungen auf weitere Aktivierungen und Inaktivierungen von Enzymen und Veränderungen in der Genexpression zur Folge haben. Es erscheint daher möglich, dass *S. pneumoniae* eine ganze Reihe von weiteren Veränderungen in den Zellen bewirkt.
Die gleichzeitige Inkubation von *S. pneumoniae* mit den Inhibitoren ist insofern kritisch zu betrachten, da eine möglicherweise auch schädigende Wirkung der Inhibitoren auf die Bakterien nicht ausgeschlossen werden kann. Außerdem ist in Betracht zu ziehen, dass die Substanzen neben der gewünschten Inhibition noch weitere unspezifische Effekte haben. Für H-89 und KT5720 wurden bereits weitere inhibitorische sowie aktivierende Effekte an weiteren Kinasen, wie bspw. der Phosphorylase Kinase, welche 300fach stärker inhibiert wird, beschrieben [5].

PKC-Inhibitor-*Myristoylated*
Der PKC-Inhibitor führte in den Calciumversuchen zunächst zu einem unerwarteten Ergebnis: Ein deutlicher Anstieg des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf ATP-Zugabe blieb aus. Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben, ist bisher bekannt, dass ATP an Purinrezeptor $P2Y_2$ durch die Aktivierung der IP_3-Kaskade eine Aktivierung der PKC bewirkt. Die PKC wiederum führt zur Phosphorylierung und Inaktivierung des $P2Y_2$-R und ist damit Teil der negativen Rückkopplung, was eine Daueraktivierung des Rezeptors verhindern soll. Strassheim zeigte 2000, dass die PKC auch zu einer Inaktivierung der PLC ($\beta 3$) führt [45]. Wurde dort die PKC mit Bisindolylmaleimid (BIM), einem weiteren spezifischen Inhibitor der PKC, gehemmt, zeigte sich ein verlängertes $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf Aktivierung des P2Y2-Rezeptors. Vor diesem Hintergrund ist es überraschend, dass nach Wegfall dieser negativen Rückkopplung hier nicht etwa eine übermäßige Stimulierbarkeit, sondern eine Unerregbarkeit des Rezeptors zu resultieren scheint. Dabei blieb die Fähigkeit, ein zytosolisches Calciumsignal auszubilden, erhalten, wenn andere Agonisten, wie hier z.B. Trypsin eingesetzt wurden.
Die PKC ist eine zentrale und an vielen Signaltransduktionen beteiligte Kinase. Dieses Phänomen könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die untersuchten Zellen an die veränderte Situation anpassen können, um eine Überstimulation zu vermeiden. Dies könnte beispielsweise durch alternative Kinasen bewirkt werden. Dabei ist nicht geklärt, ob eine Rezeptorinaktivierung am P2Y2-Rezeptor stattgefunden hat oder die Signaltransduktion an anderer Stelle verändert wurde. Dies könnte in zusätzlichen Versuchen mit Bisindolylmalimid (BIM) verifiziert werden.
Eine Hemmung von PKA, PKB, PKD und CDK ergab in den Versuchen mit D39(Δcps) vorinkubierten Zellen keinen modulierenden Effekt auf das gemessene $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$. Hier ist anzumerken, dass Konzentrationen der Inhibitoren verwendet wurden welche sich an A549-Zellen als sicher wirksam erwiesen haben, siehe hierzu die Literaturangaben der jeweiligen

Inhibitoren. Eine erneute Prüfung der Wirksamkeit wurde hier nicht durchgeführt.

4.2.2.2 Weitere Substanzen

Apyrase

Die Versuche mit Apyrase im Überstand der AEZ dienten der Prüfung, ob parakrin sezerniertes ATP während der Inkubation mit *S. pneumoniae* ursächlich für die Inaktivierung des P2Y2-Rezeptors sein könnte. Tatsächlich konnte im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit *S. pneumoniae* ein signifikanter Anstieg des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf die Stimulierung der AEZ mit ATP gezeigt werden, wenn Apyrase und *S. pneumoniae* gleichzeitig im Überstand waren. Das $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ ist jedoch im Vergleich erheblich niedriger als bei Verwendung des $P2Y_2$-3A (Abb. 3.11). Ob die Hydrolyse von parakrin sezerniertem ATP oder evtl. eine Inhibition von *S. pneumoniae* durch Apyrase zu dem Anstieg geführt haben, ist unklar.

PEG-SOD

Um zu untersuchen, ob Radikale eine Rolle bei der D39-induzierten Unterdrückung des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf Stimulierung der AEZ mit ATP spielen, wurde während der Inkubation mit *S. pneumoniae* PEG-SOD in den Überstand zugegeben. Die Ergebnisse ergaben keinen Anhalt für Effekte durch Radikale (Abb. 3.11).

PAF-Inhibitor WEB2086

Mushtaq et. al. [31] zeigten in ihrer Arbeit, dass der plättchenaktivierende Faktor-Rezeptor (PAF-R) auf AEZ eine wichtige Rolle bei der Transzytose von *S. pneumoniae* spielt. Wurden die AEZ dort mit verschiedenen Feinstaubkonzentrationen behandelt, verstärkte sich die Aufnahme von Bakterien nach intrazellulär, während diese durch Hemmung des PAF-R unterdrückt wurde. Ein weiterer Zusammenhang mit der Inaktivierung und Internalisierung des $P2Y_2$-Rezeptors sollte zumindest nicht ausgeschlossen werden; daher wurden einige Versuche auch mit sehr hohen Konzentration des Inhibitors durchgeführt.
Die Ergebnisse zeigen jedoch keinen signifikanten Anstieg des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ in den Versuchsgruppen mit *S. pneumoniae* und WEB2086-Koinkubation gegenüber der Kontrollgruppe mit alleiniger Inkubation mit *S. pneumoniae*.

4.2.3 Fura2-Ratio-Mikroskopie mit $P2Y_2$-Rezeptoren, Deletion von Phosphorylierungsstellen

Die Versuche an HPAEpi-Zellen mit den beiden Varianten des $P2Y_2$-Rezeptors (Wildtyp gegenüber Deletion von S243, T344 und S356 (3A)) zeigten einen klaren Unterschied: Während es bei $P2Y_2$-Wildtyp-transfizierten AEZ nach Inkubation mit *S. pneumoniae* erwartungsgemäß zu einem Ausbleiben des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$-Anstiegs auf ATP-Zugabe kam, blieb dieses bei

der $P2Y_2$-3A-Mutante erhalten. Die hier deletierten Mutationsstellen (S243, T344 und S356) scheinen also eine entscheidende Rolle zu spielen.
Da beim endogenen $P2Y_2$-Rezeptor sowie bei der transfizierten Wildtypvariante des Rezeptors die Inkubation mit D39(Δcps) zum Ausbleiben des Calciumsignals auf ATP führt, können die in Abb. 3.5 gezeigten $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$-Anstiege den transfizierten mutierten $P2Y_2$-Rezeptoren zugeordnet werden.
Interessanterweise ist der mittlere $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$-Anstieg umso höher, je mehr Phosphorylierungsstellen mutiert sind. Dies könnte zum einen bedeuten, dass die Anzahl der Mutationsstellen hier entscheidend ist, zum anderen ist denkbar, dass die Mutationsstelle an Postition S356 des Rezeptors einen stärkeren Einfluss als die beiden anderen hat. Dies lässt sich anhand der hier erhobenen Daten nicht sicher von einander trennen. Um dies weiter zu untersuchen, sind weitere Versuche mit weiteren Kombinationen der Mutationsstellen erforderlich. Hier könnten die klonierten LeGO-iPuro2-$P2Y_2$-R-Vektoren eingesetzt werden.
Zumindest zeigen die Versuche einen weiteren deutlichen Hinweis, dass die Phosphorylierungsstellen der PKC eine sehr wichtige Rolle bei der durch *S. pneumoniae* bedingten Rezeptorinaktivierung spielen.

4.2.4 Phos-tag Western-Blot

Eine Fragestellung, der sich im Rahmen dieser Dissertation genähert werden sollte, war der zugrundeliegende Mechanismus der *S. pneumoniae*-induziertern Inaktivierung des Purinrezeptors $P2Y_2$.
Es ist bekannt, dass es nach Aktivierung durch ATP zu einer PKC-vermittelten Phosphorylierung am C-terminalen Ende des $P2Y_2$-Rezeptors kommt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl *S. pneumoniae* als auch ATP zu einer sehr ähnlichen Internalisierung des Rezeptors führen. Die Calciummessungen an $P2Y_2$-3A-transfizierten HPAEpi-Zellen zeigten, dass dieser durch *S. pneumoniae* nicht inaktiviert wird.
Versuche mit Kinaseinhibitoren ergaben Hinweise auf eine Beteiligung der PKA sowie der PKC hinsichtlich einer möglichen $P2Y_2$-Phosphorylierung durch *S. pneumoniae*.
Wie bereits erörtert, erscheint eine intrazelluläre Signaltransduktion mit Modifikation am C-Terminus des $P2Y_2$-Rezeptors durch *S. pneumoniae* noch am ehesten wahrscheinlich, um eine Inaktivierung und Internalisierung in großer Zahl zu bewirken.
Um die Hypothese der Phosphorylierung von Purinrezeptor $P2Y_2$ durch *S. pneumoniae* weiter zu prüfen, wurden stabil mit $P2Y_2$-WT-GFP transfizierte A549-Zellen mit kapseldefizienten *S. pneumoniae* inkubiert und in einem Phos-tag Western Blot zur Detektion von Phosphorylierungen eingesetzt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Grad der $P2Y_2$-Phosphorylierung mit zunehmender Dauer der *S. pneumoniae*-Inkubation anstieg.
Interessant ist zunächst, dass schon im unstimulierten Zustand mehr phosphorylierter als unphosphorylierter Rezeptor vorzuliegen scheint. Denkbar ist ein intrazellulärer Mechanismus,

bei dem der durch die stabile Transduktion überexprimierte Rezeptor inaktiviert wird.
Mit zunehmender Stimulationsdauer wird sichtbar, dass der Anteil von (mehrfach) phosphoryliertem $P2Y_2$-Rezeptor zunimmt, während der wenig oder nicht phosphorylierte Anteil abnimmt (Abb. 3.14). Diese Ergebnisse deuten demnach darauf hin, dass *S. pneumoniae* zu einer Phosphorylierung am $P2Y_2$-Rezeptor führt.

4.2.5 $P2Y_2$-Rezeptor-Internalisierung

In dieser Arbeit konnte anhand von Versuchen mit Fura2-Ratio-Mikroskopie gezeigt werden, dass Inkubation von AEZ mit *S. pneumoniae* zur Unterdrückung des Calciumsignals auf ATP-Stimulation führt. Aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe war bekannt, dass bei wiederholten Stimulationen mit ATP ebenfalls keine zytosolischen Calciumsignale mehr feststellbar sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Stimulation von $P2Y_2$-Rezeptoren mit ATP über Phosphorylierungen zur Inaktivierung und Internalisierung des Rezeptors führt [44]. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass *S. pneumoniae* über einen ähnlichen Mechanismus zu einer Inaktivierung und Internalisierung des $P2Y_2$-Rezeptors führen könnten.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde GFP-$P2Y_2$-Rezeptor in der Wildtyp- sowie der dreifach mutierten Variante (3A) in A549-Zellen transfiziert. Durch Spinning-Disk Mikroskopie wurde das Verhalten der Zellen auf Zugabe von ATP oder *S. pneumoniae* beobachtet.
Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von ATP in den Überstand von mit dem Wildtyp transfizierten Zellen zum Erscheinen von intrazellulären GFP-haltigen Strukturen führte. Im Gegensatz hierzu blieb dies bei der dreifach mutierten Variante aus. Die GFP-haltigen Vesikel wurden unter dem Aspekt einer Rezeptorinternalisierung gedeutet. Dieses Ergebnis passt zu der Veröffentlichung von Smorek et. al. 1998 [44], in der gezeigt werden konnte, dass ein verkürztes C-terminales Ende des $P2Y_2$-Rezeptors eine Internalisierung unwahrscheinlicher macht, je kürzer dieses ist. Dies wurde mit dem Wegfall von Phosphorylierungsstellen korreliert.
In A549-Zellen kam es nach Zugabe von *S. pneumoniae* in der Wildtyp- und kapseldefizienten Variante nach kurzer Zeit zu einer deutlichen Zunahme von GFP-haltigen intrazellulären Strukturen, siehe Abb. 3.17 und 3.18. In $P2Y_2$-3A-transfizierten Zellen führt die Zugabe von *S. pneumoniae* zu einem ähnlichen Effekt, ein signifikanter Unterschied ist nicht erkennbar.
Bei den Calciumversuchen mit den Rezeptorvarianten an HPAEpi-Zellen (Abb. 3.1) war zu sehen, dass diese mit transfiziertem $P2Y_2$-3A-Rezeptor auch nach Inkubation mit *S. pneumoniae* ein Calciumsignal auf ATP-Zugabe zeigten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass diese mutierte Variante des Rezeptors nicht - oder nur geringfügig - internalisiert und nicht inkativiert wird. Da das Auftreten der GFP-haltigen Strukturen als Rezeptorinternalisierung gedeutet wurde, schien *S. pneumoniae* dies zu bedingen.
Unklar bleibt, wie Zellen, die mit der $P2Y_2$-3A-Rezeptorvariante transfiziert und anschließend

mit D39 inkubiert wurden, ein deutliches $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf ATP zeigen, obwohl der Rezeptor in großen Teilen internalisiert worden sein müsste.
Eine eindeutige Antwort kann zu diesem Zeitpunkt nicht gegeben werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Internalisierung des Rezeptors tatsächlich nicht (nur) über die Phosphorylierungsstellen der PKC initiiert wird. Wie bereits in Abschnitt 4.2.2 erwähnt, ist es durchaus möglich, dass eine Rezeptorinternalisierung durch *S. pneumoniae* an einem bisher nicht beachteten Rezeptor an der Zellmembran und dessen Signaltransduktion veranlasst wird.
Weiterhin ist zu beachten, dass die Transfektion des Rezeptors zu einer starken Überexpression führt. Auch nach zwei Stunden Inkubation der Zellen mit ATP oder D39 ist noch so viel Rezeptor in der Zellmembran, dass man diese über den GFP-tag gut sichtbar machen kann, siehe Abb. 3.19, 3.20 und 3.22. Somit könnte es sein, dass ein Großteil der Rezeptoren an der Zellmembran vorhanden bleiben, welche im Falle der mutierten Variante trotz D39-Inkubation für ATP aktivierbar bleiben.
Eine weitere zu diskutierende Möglichkeit, wie der mutierte Rezeptor durch *S. pneumoniae* scheinbar internalisiert, jedoch nicht inaktiviert wird, ist die Transmigration. Es ist bekannt, dass A549-Zellen, die mit D39 und Feinstaub oder Plasmin inkubiert wurden, die Erreger teilweise inkorporieren (Attali et al [1], Mushtaq et al [31]). Es wird postuliert, dass die Transmigration eine wesentliche Bedingung für die Ausbildung einer Pneumonie ist und einen bedeutenden Virulenzfaktor darstellt. Daher ist in Betracht zu ziehen, dass die intrazellulär detektierten Vesikel aus mit Zellmembran umhüllten D39 im Sinne einer Transmigration bestehen und keine Internalisierung des Rezeptors stattfindet. Um diese Möglichkeit näher zu betrachten, wurden Versuche mit Calcein red-orange gefärbten A549-Zellen, die mit einem kapseldefizienten grün fluoreszierendem D39-Stamm inkubiert wurden, über mehrere Stunden in einem Spinning-Disk Mikroskop untersucht. Im Überstand um die roten A549-Zellen sind reichlich grün fluoreszierende D39 zu sehen, jedoch befindet sich intrazellulär keine grüne Fluoreszenz. Somit darf angenommen werden, dass in den oben beschriebenen Versuchen keine Aufnahme von D39 stattgefunden hat, die einen solchen Anstieg von intrazellulären Vesikeln erklären kann.

4.2.6 LifeAct

Aus der Literatur ist bekannt, dass Purinrezeptoren eine wichtige Rolle im Aktinremodelling von verschiedenen Zellarten spielen. Besonders gut ist dies an Leukozyten v.a. im Zusammenhang mit Transmigrationsbewegungen gezeigt worden, wenngleich auch auf diesem Gebiet noch nicht alle Mechanismen vollständig erforscht sind [40] [7].
Ebenso ist bekannt, dass *S. pneumoniae* im Rahmen von Infektionen zu Umbauprozessen am Aktinskelett von AEZ führt, was eine Voraussetzung für das Einwandern von Makrophagen und anderen Abwehrzellen in die Alveole ist [29].
Um die Vorgänge am Aktinskelett verfolgen zu können, wurden A549-Zellen mit LifeAct trans-

fiziert, was zur Anlagerung von GFP an Aktin führte. Unter einem Spinning-Disk Mikroskop wurden ATP und Zugabe von *S. pneumoniae* getestet.
Es zeigte sich eine deutlich sichtbare Abnahme der Fluoreszenzintensität in den Zellen bei Inkubation mit *S. pneumoniae* im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Intervention. Interessanterweise nimmt die Fluoreszenzintensität jedoch bei ATP-Zugabe im Vergleich zu Ausgangsbedingungen noch zu (Abb. 3.28 und 3.31).
In der Kontrollgruppe unter Ruhebdingungen, wenn Aktinfilamente kaum umgebaut werden, kommt es wahrscheinlich durch Photobleaching während der Messung zu einem langsamen, annähernd linearen Abfall der Fluoreszenzintensität. Die Strukturen bleiben aber prinzipiell sichtbar (Abb. 3.26).
Der Anstieg der Fluoreszenzintensität auf ATP könnte somit auf einen Aufbau, während der Abfall der Fluoreszenzintensität im Gegensatz dazu auf einen Abbau von Aktinfilamenten hinweisen.
Selbstverständlich handelt es sich nur um einen indirekten Nachweis von Aktinauf- oder -abbau, da nicht Aktin an sich, sondern das mit LifeAct verbundene Fluophor am Aktin beobachtet wird.
Ein kausaler Zusammenhang zwischen einer *S. pneumoniae*-induzierten Inaktivierung am $P2Y_2$-Rezeptor und dem Abbau von Aktin kann durch diese Versuche nicht hergestellt werden. Eine indirekte Wirkung von *S. pneumoniae* auf das LifeAct, welches die Affinität zum Aktin verändert, kann nicht ausgeschlossen werden. Auch Artefakte durch Photobleaching, oder durch Aufnahmen von D39 im Überstand, können hier nicht vollständig ausgeschlossen werden, scheinen jedoch aufgrund der sehr deutlichen Tendenz und des Verlaufs eher unwahrscheinlich. Um dies weiter zu belegen, könnten in zukünftigen Versuchen Zellen unterschiedlich lange mit ATP stimuliert werden. Anschließend könnte ein Western-Blot auf Aktin erfolgen. Ein gesteigerter Aktinumbau mit erhöhter Aktinsynthese könnte dadurch sichtbar gemacht werden.
Umgekehrt könnte so ein Abbau von Aktin nach Inkubation mit *S. pneumoniae* nachgewiesen werden.

4.2.7 Surfactant-Versuche

Dem Purinrezeptor $P2Y_2$ kommt am Alveolarepithel eine wichtige Rolle bei der Surfactantsekretion zu. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass *S. pneumoniae* den $P2Y_2$-R sowohl inaktiviert als auch zu dessen Internalisierung führt. Um zu untersuchen, ob diese *S. pneumoniae*-vermittelten Effekte funktionelle Auswirkungen auf die Surfactantsekretion am Aleveolarpithel haben, wurden AEZ mit LysoTracker-Green gefärbt, welches zur Messung von Lamellarkörperchen verwendet werden kann [14]. Es färbt jedoch auch weitere saure sphärische Zellorganellen, wie Peroxisomen, und ist damit nicht spezfisch für Surfactant. Zwar lassen sich auch mit A549-Zellen solche Färbungen und Untersuchungen durchführen; hier war es je-

doch wichtig, möglichst primäre AEZ einzusetzen, um die Aussagekräftigkeit der Ergebnisse zu erhöhen.
In den Versuchen, bei denen die Zugabe von ATP und *S. pneumoniae* gegenüber Kontrollbedingungen untersucht wurde, fällt die relative Fluoreszenzintensität in allen Versuchsgruppen fast linear ab, ein eindeutiger Ausschlag nach Intervention ist in keiner Versuchsgruppen sichtbar.
Dies könnte daran liegen, dass die untersuchten Zellen aufgrund der technischen Begebenheiten unter nicht optimalen Bedingungen wie unter Brutschrankbedingungen gemessen werden konnten.
Durch die Co-Färbung mit Fura-2AM und die zeitgleiche Messung des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ (Abb. 3.33) konnte gezeigt werden, dass auch die primär isolierten AEZ wie erwartet auf ATP ein Calciumsignal zeigen, welches nach einer D39-Vorinkubation nicht mehr messbar war.
Trotz umfangreicher Bemühungen war es nicht möglich, die Ergebnisse aus der Literatur zur Surfactantsekretion nachzubilden und konnten daher nicht im Zusammenhang mit *S. pneumoniae* untersucht werden.

4.2.8 Ko-Kultur und Permeabilitätsassay

Durch das Verfahren der zellulären Ko-Kultur sollte ein Alveolen-ähnliches in vitro Modell aus epithelialen (A549) und endothelialen (HUVEC) Zellschichten etabliert werden.
Eine Vielzahl von möglichen Versuchen und Fragestellungen könnten an diesem Modell untersucht werden. Ein Anfang wurde hinsichtlich der *Permeabilität* des Bilayers gemacht. Dabei wurde untersucht, ob die Zugabe von ATP oder *S. pneumoniae* eine Veränderung in der Durchlässigkeit für FITC-BSA zur Folge hat. Aufgrund der geringen Versuchszahlen können die Ergebnisse nur sehr eingeschränkt diskutiert und als Vorversuche interpretiert werden. Die Abflachung der Kurven in der Gruppe mit ATP- und D39-Zugabe im Vergleich zur Gruppe mit alleiniger HBS-Zugabe bedeutet, dass weniger FITC-BSA übergetreten ist. Dies bedeutet eine Verminderung der Permeabilität und ist ein Hinweis auf auf eine Stärkung der Barrierefunktion.
Da die Zeit, in der Versuche im Labor durchgeführt werden konnten, begrenzt war, konnte nur eine geringe Zahl an Versuchen erreicht werden. Eine Erhöhung der Versuchszahlen sowie die Verwendung von mindestens einer weiteren Substanz (bspw. Fluorescein isothiocyanate) oder eines weiteren Farbstoffes (z.B. Brilliant Black BN) zur Testung der Permeabilität wäre in zukünftigen Versuchen wünschenswert.

4.2.9 Fura2-Ratio-Mikroskopie mit *Pseudomonas aeruginosa*

Im Rahmen der Auseinandersetzung mit *S. pneumoniae*-induzierten Prozessen am Alveolarepithel sollte untersucht werden, ob andere Erreger über ähnliche Mechanismen verfügen. Exemplarisch wurde *Pseudomonas aeruginosa* betrachtet, der zu den häufigsten Erregern der

nosokomialen Pneumonie zählt, insbesondere bei beatmeten Patienten [34].
Die Ergebnisse dieser Dissertation haben gezeigt, dass *S. pneumoniae* zu einer Inaktivierung und ggf. zu einer Internalisierung von $P2Y_2$-Rezeptoren an verschiedenen Zelllinien führt. Jedoch ist ungeklärt, ob dies ein spezifischer Effekt dieses Erregers ist oder eventuell generell im Rahmen von Infektgeschehen auftritt.
Die Ergebnisse (Abb. 3.36) zeigen nach einer Inkubation mit *Pseudomonas aeruginosa* zwar ein verringertes $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf ATP-Zugabe, jedoch keine komplette Inhibition, wie sie regelmäßig nach einer *S. Pneumoniae*-Inkubation zu sehen ist. Daher könnte das verringerte $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ beispielsweise durch die bereits seit längerem bekannten extrazellulären Toxine von *Pseudomonas aeruginosa*, wie Cyanwasserstoff oder proteolytische Enzyme, und somit durch eine Zellschädigung hervorgerufen werden [25].
Denkbar ist, dass in diesem Versuchsaufbau die Erregermenge, Inkubationsdauer oder die Wachstums- und Kultivierungsbedingungen für *Pseudomonas aeruginosa* nicht optimal waren. Daher wurde ca. 10 x mehr *Pseudomonas aeruginosa* als *S. pneumoniae* eingesetzt, um mögliche Effekte auch wirklich aufdecken zu können.
Bisher konnte die $P2Y_2$-Inaktivierung nur für *S. pneumoniae* nachgeiwsen werden. Weiterführende Experimente wären von Interesse, wie z.B. mit *Haemophilus influenzae b*, einem weiteren bekapselten Erreger, der bevorzugt den Respirationstrakt befällt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In Zeiten von wachsenden Resistenzen gegen Antbiotika, wie sie auch bei Infektionen mit *S. pneumoniae* zu beobachten sind, erscheint die Entdeckung von neuen Behandlungsansätzen erstrebenswert. Hierzu ist eine genauere Untersuchung der zugrunde liegenden Pathomechanismen erforderlich, um diese zu verstehen und um eventuell neue Ansätze zu finden.

In dieser Dissertation wurde eine bisher unbekannte *S. pneumoniae*-vermittelte Interaktion des $P2Y_2$-Rezeptors an AEZ beschrieben, die potentiell lebensbedrohende Komplikationen, wie ein Lungenödem oder schwer zu therapierende Atelektasen, während einer Pneumonie bewirken könnte, da der Purinrezeptor $P2Y_2$ unter anderem an der Surfactantsekretion oder der Regulation des Wasserhaushaltes beteiligt ist.
Hierbei konnten einige Aspekte des zugrunde liegenden Mechanismus der *S. pneumoniae*-induzierten Rezeptorinaktivierung aufgedeckt werden: So führte die Deletion von drei Phosphorylierungsstellen am zytosolischen Teil des $P2Y_2$-Rezeptors dazu, dass die so transfizierten Zellen trotz Vorinkubation mit *S. pneumoniae* eine deutliche Calciumantwort auf ATP zeigen konnten, während dies nach Transfektion von $P2Y_2$-Wildtyp nicht der Fall war. Dieses Ergebnis ließ sich auch an A549-Zellen mit weiteren Rezeptorvarianten ($P2Y_2$-1A, $P2Y_2$-2A) mit nur einer oder zwei der Mutationen reproduzieren. Somit scheint eine Phophorylierung an den drei eben genannten Stellen eine entscheidende Rolle bei der Pneumkokokken-vermittelten Inaktivierung des $P2Y_2$-Rezeptors zu spielen. Durch welchen Mechanismus diese Phosphorylierungen erfolgen, konnte bisher nicht geklärt werden, die Proteinkinasen A und C scheinen jedoch eine Rolle zu spielen.
Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Stimulation von AEZ mit ATP als auch die Zugabe von *S. pneumoniae* in den Überstand zur Internalisierung des $P2Y_2$-Rezeptors führte. Eine Wiederholung der Versuche mit Zellen, die mit $P2Y_2$-3A transfiziert wurden, ergab, dass eine Stimulation mit ATP nicht zur Translokation des Rezeptors führte, während auf Zugabe von *S. pneumoniae* eine deutliche Internalisierung des Rezeptors folgte.
Anhand der Ergebnisse ließ sich zeigen, dass *S. pneumoniae* zur Internalisierung des $P2Y_2$-Rezeptors führt. Die aus der Fura2-Ratio-Mikroskopie bekannten Phosphorylierungsstellen, welche den Rezeptor inaktivieren können, scheinen hierbei keine Rolle zu spielen.
Zum direkten Nachweis der *S. pneumoniae*-induzierten $P2Y_2$-Rezeptor-induzierten Phosphorylierung wurde ein Phos-tag Western-Blot durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Phosphorylierung am $P2Y_2$-Rezeptor zunimmt, je länger die AEZ mit *S. pneumoniae* inkubiert

wurden.
Bezüglich funktioneller Auswirkungen, welche durch die *S. pneumoniae*-induzierten Inaktivierung und Internalisierung des $P2Y_2$-Rezeptors entstehen könnten, wurde gezeigt, dass eine Stimulation mit ATP zu einem Aufbau von Aktinfilamenten führte, während die Inkubation mit *S. pneumoniae* zum Abbau von Aktin zu führen schien.
Mit der Etablierung eines Alveolen-ähnlichen in vitro Modells sind die Voraussetzungen geschaffen worden, um funktionelle Aspekte, wie beispielsweise die Flüssigkeitsbarriere, prüfen zu können. Durch erste Versuche an diesem Modell konnte gezeigt werden, dass sowohl eine epithelseitige ATP-Stimulation als auch eine Zugabe von *S. pneumoniae* Veränderungen an der Durchlässigkeit der Zellschichten bewirken könnte.

Zusammenfassend scheint es gerechtfertigt anzunehmen, dass *S. pneumoniae* über Phosphorylierungen am $P2Y_2$-Rezeptor zu dessen Inaktivierung und Internalisierung führt. Ebenso konnte ein signifikanter Abbau von Aktinstrukturen an AEZ gezeigt werden, wenn diese in Kontakt mit *S. pneumoniae* kamen. Die zugrunde liegenden Mechanismen sowie die Untersuchung der daraus folgenden Effekte sind Gegenstand weiterer Forschung.

5.1 Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation konnten nicht alle Fragestellungen abschließend behandelt werden. Zukünftige Forschungsvorhaben könnten hier weitere Erkenntnisse bringen:
Welche Rolle die einzelnen Mutationen am $P2Y_2$-Rezeptor bei der *S. pneumoniae*-induzierten Rezeptorinaktivierung spielen, könnte durch weitere Versuche untersucht werden. Bisher wurde nur die Variante $P2Y_2$-Δ(S243), nicht aber die Varianten $P2Y_2$-Δ(T344) oder $P2Y_2$-Δ(S356) einzeln analysiert. So könnte geprüft werden, ob die einzelnen Mutationen unterschiedlich starke Auswirkungen haben, oder ob vielmehr die Kombination ausschlaggebend ist.
Zur weiteren Prüfung, ob auch die *S. pneumoniae*-vermittelte *Internalisierung* des $P2Y_2$-Rezeptors durch Phosphorylierungen bewirkt wird, könnte der Phos-tag Western-Blot um eine Wiederholung mit einer Zelllinie ergänzt werden, welche die dreifach mutierte Variante des Purinrezeptors (GFP-$P2Y_2$-3A) stabil exprimiert. Sollte sich auch dann eine Zunahme der Phosphorylierung des Rezeptors durch *S. pneumoniae* zeigen, wäre dies ein Hinweis auf die Beteiligung weiterer Kinasen, welche diesen phosphorylieren. Der exakten Bestimmung der Phosphorylierungsstellen könnte eventuell die Massenspektrometrie dienen.
Die Etablierung eines alveolen ähnlichen in vitro Modells bietet Möglichkeiten für weitere Versuche. Neben der Flüssigkeitsbarriere könnten beispielsweise auch Versuche zur Zytokinsekretion oder Transmigration (mit z.B. Nachweis von Durchtritt von Bakterien auf die Endothelseite) durchgeführt werden.

Die Fura2-Ratio-Mikroskopie-Versuche mit AEZ und *Pseudomonas aeruginosa* dienten u.a. der Prüfung, ob die hier beschriebenen Effekte, wie Inaktivierung und Internalisierung vom $P2Y_2$-Rezeptor, spezifische Effekte von *S. pneumoniae* sind. Eine Rezeptorinaktivierung ließ sich anhand der Messung des $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ mit *Pseudomonas aeruginosa* nicht reproduzieren. Um zu ermitteln, ob der hier beschriebene Effekt spezifisch für *S. pneumoniae* ist, könnten neben *P. aeruginosa* weitere Erreger, wie beispielsweise die ebenfalls bekapselten Erreger *Haemophilus influenzae* oder *Neissera meningitidis*, welche den Respirationstrakt befallen, bzw. besiedeln, in künftigen Versuchen untersucht werden.

Dies ist Gegenstand weiterer Forschung.

5.2 Summary

The experiments for this doctoral thesis uncovered an interaction between *S. pneumoniae* and $P2Y_2$-receptors which leads to inactivation and internalization of said receptor. $P2Y_2$-receptors are, among others, responsible for secretion of surfactant and fluid management in the lung. This interaction might be partly responsible for potentially life threatening pulmonary edema or atelectasis which can occur during a *S. pneumoniae*-induced pneumonia.

A variant of the $P2Y_2$-receptor with three deleted PKC-phosphorylation sites was cloned. Cells were transfected with either the wildtype or mutant receptor and preincubated with *S. pneumoniae*. Stimulation of these cells with ATP, the natural agonist, showed an intact calcium signal in cells expressing the mutant $P2Y_2$-receptor, while cells expressing the wild type receptor showed no reaction, which indicates the deleted phosphorylation sites prevent the mutant receptor from being inactivated by *S. pneumoniae*.
It could be shown that incubation with *S. pneumoniae* leads to internalization of the $P2Y_2$-receptor in the wildtype as well as in the mutant variant, while stimulation with ATP did not result in internalization of the mutant receptor but led to a strong internalization of the wildtype receptor. This could imply that the phosphorylation sites of the PKC only play a marginal role concerning $P2Y_2$, but not agonist induced internalization.
For direct verification of a *S. pneumoniae*-induced phosphorylation of the $P2Y_2$-receptor a Phos-tag Western-Blot was performed. It has been shown that phosphorylation of the receptor is increasing over time, when cells are incubated with *S. pneumoniae*.
The functional importance of this phenomenon has been shown in experiments concerning actin filaments. Cells stimulated with ATP showed increased production of actin, while incubation with *S. pneumoniae* led to a significant loss of actin filaments.

Conclusion: *S. pneumoniae* leads to inactivation and internalization of $P2Y_2$-receptors via phosphorylation. Incubation with *S. pneumoniae* leads to significant loss of actin filaments in vitro.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
7TM-Rezeptor	7-Transmembranhelix-Rezeptor
AEZ	Alveolarepithelzellen
ATP	Adenosintriphosphat
BP	Basenpaar
CFU	eng.: Colony-forming unit
CO_2	Kohlendioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
D39(WT)	Pneumokokkenstamm, Wildtyp
D39+GFP	Pneumokokkenstamm mit GFP
D39(Δcps)	kapseldefizienter Pneumokokkenstamm
D39(Δcps)+GFP	kapseldefizienter Pneumokokkenstamm mit GFP
DAG	Diacylglycerol
$\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$	Veränderung der zytosolischen Calciumkonzentration
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	eng.: fluorescence-activated cell sorting
FBS	eng.: fetal bovine Serum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
H. influenzae	Haemophilus influenzae
Hb	Hämoglobin
HBS	HEPES-Puffer
IP_3	Inositoltriphosphat
LTG	Lyso-tracker green

MCS	Multi-Cloning-Site
N. meningitidae	Neisseria meningitidae
UV-Licht	Ultraviolettlicht
O_2	Sauerstoff
OD	optische Dichte
$P2Y_2$-WT	Purinrezeptor $P2Y_2$ (Wildtyp)
$P2Y_2$-3A	Purinrezeptor $P2Y_2$ (dreifach mutiert)
PAF-R	plättchen aktivierende Faktor-Rezeptor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG-SOD	Polyethylenglycol-Superoxiddismutase
PK	Proteinkinase
RFP	rot fluoreszierendes Protein
S. pneumoniae	Streptokokkus pneumoniae

7 Literaturverzeichnis

[1] C. Attali. The interaction of streptococcus pneumoniae with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. Infection and Immunity, pages 5350–5356, 2008.

[2] Chijiwa. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic amp-dependent protein kinase, n-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (h-89), of pc12d pheochromocytoma cells. Journal of Biological Chemistry, 1990.

[3] J. E. Cleaver. Repair replication and degradation of bromouracil-substituted dna in mammalian cells after irradiation with ultraviolet light. Biophys Journal, 8(7):775–791., July 1968.

[4] S. R. COUGHLIN. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 3(8):1800–1814, August 2005.

[5] S. Davies. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochem. J., (351):95–105, 2000.

[6] J. L. V. der Velden. Lysotracker is a marker of differentiated alveolar type ii cells. Respiratory Research, 2013.

[7] S. Dichmann. Adenosine triphosphate-induced oxygen radical production and cd11b upregulation: Ca2+ mobilization and actin reorganization in human neutrophils. Blood, (95):973–978, 2000.

[8] T. Eichholtz. A myristoylated pseudosubstrate peptide, a novel protein kinase c inhibitor. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 268(03):1982–1986, January 1993.

[9] M. K. Ferguson. Diffusing capacity predicts morbidity after lung resection in patients without obstructive lung disease. The Annals of Thoracic Surgery, 85(4):1158–1165, April 2007.

[10] R. V. Flores. Agonist-induced phosphorylation and desensitization of p2y2 nucleotide receptor. Molecular Cell Biochem., 2005.

[11] H. Gao. Camkii-independent effects of kn93 and its inactive analog kn92: reversible inhibition of l-type calcium channels. Biochem Biophys Res Commun, July 2006.

[12] G. Grynkiewicz. A new generation of ca2+ indicatorswith greatly improved printed in u.s.a. fluorescence properties. The Journal of Biological Chemistry, 260(6):3440–3450, March 1985.

[13] T. Haller. Dynamics of surfactant release in alveolar type ii cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998.

[14] T. Haller. Dynamics of surfactant release in alveolar type ii cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(4):1579–1584, February 1998.

[15] D. Hanahan. Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol., (166):557–580, 1983.

[16] P. T. Heath. Neonatal meningitis. Arch Dis Child Fetal Neonatal Edition, 88(3):173–178, 2003.

[17] E. L. Herzog. Knowns and unknowns of the alveolus. Proceedings of the American Thoracic Society, 5(1):778–782, June 2008.

[18] K. HUANG. The mechanism of protein kinase c activation. Trends in Neurosciences, 12(11):425–432, 1989.

[19] D. John. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of akt1 in cancer. Nature, 2007.

[20] E. Kaczmarek. Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. Thrombosis and haemostasis, 93(4):735–742, April 2005.

[21] E. Kinoshita. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. Molecular and Cellular Proteomics, 2006.

[22] E. R. Lazarowski. Udp activates a mucosal-restricted receptor on human nasal epithelial cells that is distinct from the p2y2 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, pages 2599–2603, 1994.

[23] J. Lee. Phosphodiesterase 4b mediates extracellular signal-regulated kinase-dependent up-regulation of mucin muc5ac protein by streptococcus pneumoniae by inhibiting camp-protein kinase a-dependent mkp-1 phosphatase pathway. Journal of Biological Chemistry, 287(27):22799–22811, June 29 2012.

[24] M. I. Lethem. Nucleotide regulation of goblet cells in human airway epithelial explants: normal exocytosis in cystic fibrosis. J. Respir. Cell Mol. Biol., (9):315–322, 1993.

[25] P. V. Liu. Extracellular toxins of pseudomonas aeruginosa. The Journal of Infectious Diseases, 130(1):94–99, November 1974.

[26] T. Martinu. Re-evaluation of acid-base prediction rules in patients with chronic respiratory acidosis. Canadian Respiratory Journal, 10(6):311–315, September 2003.

[27] J. Matos. Distal colonic na+ absorption inhibited by luminal p2y2 receptors. European Journal of Physiology, 454(6):977–987, September 2007.

[28] L. Meijer. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. Eur. J. Biochem., January 1997.

[29] G. A. Mueller. The role of cytoskeletal proteins in neutrophil emigration during pneumonia in rabbits. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 150(2):455–461, August 1994.

[30] D. M. Musher. Infections caused by streptococcus pneumoniae: Clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. Clinical Infectious Diseases, 12(1):801–809, 1992.

[31] N. Mushtaq. Adhesion of streptococcus pneumoniae to human airway epithelial cells exposed to urban particulate matter. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 127:1236–1242, May 2011.

[32] A. Nakano. Spinning-disk confocal microscopy - a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic. Cell Structure and Function, 27(5):349–355, 2002.

[33] J. C. Obenauer. Scansite 2.0: proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. Nucleic Acids Res., 31(13):3635–3641, July 2003.

[34] M. Pawar. Ventilator-associated pneumonia: Incidence, risk factors, outcome, and microbiology. Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, 17(1):22–28, 2003.

[35] O. H. Petersen. Calcium signalling: Past, present and future. Cell Calcium, 38(3-4):161–169, October 2005.

[36] C. Petris. Bacterial transcytosis across conjunctival m cells. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 48(5):2172–2177, May 2007.

[37] J. Riedl. Lifeact: a versatile marker to visualize f-actin. Nature Methods, July 2008.

[38] D. Riewe. The potato-specific apyrase is apoplastically localized and has influence on gene expression, growth, and development. Plant Physiology, 147:1092–1109, July 2008.

[39] RKI. Epidemiologisches bulletin 2015. Epidemiologisches Bulletin (34), 2015.

[40] H. Saito. 194. saito h, ebisawa m, reason dc, et al. extracel- lular atp stimulates interleukin-dependent cul- tured mast cell and eosinophils through calcium mobilization. Int Arch Allergy Appl Immunol., 94(68-70), 1991.

[41] E. Sharlow. Potent and selective disruption of protein kinase d functionality by a benzoxoloazepinolone. J. Biol. Chem., 2008.

[42] I. V. Shemarova. camp-dependent signal pathways in unicellular eukaryotes. Critical Reviews in Microbiology, 2009.

[43] A. M. Shibl. Antibiotic resistance and serotype distribution of invasive pneumococcal diseases before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine in the kingdom of saudi arabia. Vaccine, 30(6):G32–G36, December 2012.

[44] S. M. Smorek. Agonist-induced internalization of p2y2 receptor. Molecular Pharmacology, 1998.

[45] D. Strassheim. P2y2 purinergic and m3 muscarinic acetylcholine receptors activate different phospholipase c- isoforms that are uniquely susceptible to protein kinase c-dependent phosphorylation and inactivation. The Journal of Biological Chemistry, 275(50):39767–39772, December 2000.

[46] F. M. Veronese. Polyethylene glycol-superoxide dismutase, a conjugate in search of exploitation. Adv. Drug Deliv. Rev., 54:587–606, June 2002.

[47] F. Wang. Thapsigargin induces apoptosis by impairing cytoskeleton dynamics in human lung adenocarcinoma cells. The Scientific World Journal, 2014.

[48] J. A. Whitsett. Alveolar development and disease. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 53(1):1–7, May 2015.

8 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen die diese Dissertation möglich gemacht haben herzlich bedanken:

Zuerst bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Kiefmann, der mich über die Jahre intensiv begleitet hat. Sie haben mir durch Ihre vielen wertvollen Hinweise, kreativen Ideen und Anregungen diese Dissertation erst ermöglicht. Vielen Dank dafür!

Ein großer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Cynthia Olotu. Ohne Dich und die vielen aufmunternden Gespräche hätte ich es kaum geschafft. Vielen Dank, dass Du immer für mich da warst, vielen Dank für das große Vertrauen, dass Du mir entgegengebracht hast. Auch weil ich viel ausprobieren konnte, kam diese vielfältige Dissertation zustande, die mir sehr viel Freude bereitet hat.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich beim ganzen Laborteam. Ihr wart wie eine Familie für mich. Ganz selbstverständlich und ohne Gegenleistungen zu fordern, wurde ich unterstützt und gefördert. Viele gute Ideen und Lösungen wurden erst durch die Gespräche mit Euch ermöglicht.

Für die große Unterstützung und die Begleitung meiner Familie, und insbesondere meiner lieben Agnes, die mir in allen Bereichen stets zur Seite gestanden hat, möchte ich mich ganz besonders bedanken. Außerdem gilt mein Dank meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Schwägerin für die viele Unterstützung.

9 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

.....
Bastian Koch