

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

Zentrumsleiter: Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz  
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Christian Zöllner

## **Untersuchung der Wirkung von Luftstrom-induziertem Scherstress auf Alveolarepithelzellen**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Marie Margarete Brand  
aus Gehrden

Hamburg 2017

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 18.09.2017

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Rainer Kiefmann

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Edzard Schwedhelm

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Der beatmungsassoziierte Lungenschaden .....	1
1.1.1	Pathogenese des beatmungsassoziierten Lungenschadens .....	3
1.1.2	Protektive Beatmung.....	4
1.2	Alveolarepithel.....	5
1.3	Mechanische Beanspruchung der Atemwege und des Alveolarepithels ....	6
1.3.1	Luftstrom-induzierter Scherstress in den Atemwegen und Alveolen ....	7
1.4	Mechanotransduktion .....	8
1.4.1	Glykokalyx.....	9
1.4.2	Calcium .....	11
1.4.3	Reaktive Sauerstoffspezies.....	12
1.5	Aktinzytoskelett.....	15
1.6	Vorschädigung des Alveolarepithels durch Pneumokokken.....	16
<b>2</b>	<b>Fragestellung und Ziele .....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
3.1	Material.....	19
3.1.1	Chemikalien, Reagenzien, Kits und Proteine .....	19
3.1.2	Medien und Puffer.....	20
3.1.3	siRNA, Plasmid-DNA, kompetente Zellen und Antikörper.....	21
3.1.4	Primer .....	22
3.1.5	Geräte, Verbrauchsmaterial und Zubehör .....	22
3.1.6	Pneumokokken .....	24
3.1.7	Zelllinie L2.....	25
3.2	Methoden .....	25
3.2.1	Bakterienkultur .....	25
3.2.2	Zellkultur und Vorbereitung der Objektträger .....	26
3.2.2.1	Kryokonservation und Auftauen von L2-Zellen .....	26
3.2.2.2	Kultivierung der Zellen .....	26
3.2.2.3	Zellzahlbestimmung und Vorbereitung der Objektträger.....	27

3.2.3	Transfektion .....	28
3.2.4	Molekularbiologische Methoden .....	29
3.2.4.1	Transformation.....	29
3.2.4.2	Plasmidpräparation .....	29
3.2.4.3	Zellernte und RNA-Isolation.....	29
3.2.4.5	cDNA-Synthese .....	31
3.2.4.6	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	31
3.2.5	Das Flow Chamber-Modell.....	32
3.2.5.1	Scherstress-Berechnung .....	34
3.2.6	Fluoreszenzmikroskopie .....	36
3.2.6.1	Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie .....	36
3.2.6.2	Aufbau des Epifluoreszenzmikroskops .....	36
3.2.6.3	Messung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ mittels Fura-2-AM .....	37
3.2.6.4	Messung von mROS mittels roGFP2 .....	41
3.2.7	Immunfluoreszenz der Aktinfilamente und Zellkerne.....	42
3.2.8	Glykokalyxdegradierung.....	43
3.2.9	Angewendete Substanzen .....	43
3.2.10	Experimentelles Versuchsprotokoll .....	44
3.2.11	Auswertung .....	44
3.2.12	Statistik .....	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
4.1	Epifluoreszenzmikroskopie-Experimente.....	46
4.1.1	$[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Messungen .....	46
4.1.1.1	Das Luftstrom-induzierte $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Signal in AEC .....	46
4.1.1.3	ROS-modifizierende Substanzen.....	49
4.1.1.4	Herunterregulierung der NOX4-Genexpression.....	50
4.1.1.5	Inhibition der NO-Synthase.....	53
4.1.1.6	Inkubation mit Pneumokokken.....	55
4.1.1.7	Glykokalyx-Degradation.....	57
4.1.2	mROS-Produktion während Luftstromexposition .....	59
4.2	Immunfluoreszenz-Experimente .....	62
4.2.1	Aktinfilament-Reorganisation nach Luftstromexposition.....	62

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>64</b>
5.1	Diskussion der Methoden .....	65
5.1.1	Diskussion des Flow Chamber-Modells .....	65
5.1.2	Diskussion der Fluoreszenzmikroskopie .....	67
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	67
5.2.1	$\Delta A [Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ .....	67
5.2.2	Ca <sup>2+</sup> -Einstrom aus dem Extrazellularraum .....	68
5.2.3	Mediatoren-vermittelter Ca <sup>2+</sup> -Einstrom.....	68
5.2.3.1	Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle.....	69
5.2.4	ROS als Signaltransduktionsmolekül .....	70
5.2.4.1	NAC .....	71
5.2.4.2	PEG-SOD und PEG-Katalase.....	71
5.2.4.3	DPI.....	72
5.2.4.4	Rotenon .....	72
5.2.4.5	Herunterregulierung der NOX4-Genexpression.....	73
5.2.4.6	Inhibition der NO-Synthase.....	75
5.2.5	Inkubation mit Pneumokokken .....	75
5.2.6	Mechanotransduktion über die Glykokalyx.....	76
5.2.7	mROS als Signaltransduktionsmolekül .....	78
5.2.8	Aktinveränderungen während Luftstromexposition .....	80
5.3	Luftstrom-Scherstress am Alveolarepithel und Ausblick.....	82
5.4	Einordnung in klinische Beobachtungen und Konsequenzen.....	84
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>107</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>108</b>

## 1 Einleitung

Die Beatmung respiratorisch insuffizienter Patienten ist eine unverzichtbare, lebenserhaltende Intervention der modernen Intensivmedizin. Durch unphysiologische, mechanische Beanspruchungen können dabei trotz lungenprotektiver Beatmungsstrategien Schäden in der Lunge entstehen. Die Vermeidung beatmungsassoziierter Lungenschäden stellt eine wesentliche Herausforderung der Beatmungs-therapie dar. Trotz intensiver Forschungsbemühungen sind zentrale Pathomecha-nismen noch nicht vollständig geklärt. Im Gegensatz zu bisherigen Studien zu diesem Thema konzentriert sich die vorliegende Arbeit erstmals auf die Aus-wirkungen von Luftstrom-induziertem Scherstress auf die Mechanorezeption und –transduktion in Alveolarepithelzellen *in vitro*. Die Untersuchung dieser innovativen Fragestellung mithilfe eines experimentellen Modells könnte zur grundlegenden Erweiterung des Verständnisses zur Pathogenese des beatmungsassozierten Lungenschadens beitragen.

Im Folgenden wird zuerst der klinische Hintergrund, der beatmungsassozierte Lungenschaden, dargestellt. Anschließend wird näher auf die Mechanotransduktion am Alveolarepithel und auf Calcium und reaktive Sauerstoffspezies als Signaltrans-duktionsmoleküle eingegangen.

### 1.1 Der beatmungsassozierte Lungenschaden

Eine mechanische Beatmung wird heute als fester Bestandteil der intensivmedizi-nischen Therapie bei Patienten mit unzureichender oder fehlender Spontanatmung und Gasaustauschstörung eingesetzt, um eine adäquate Sauerstoff-Aufnahme sicherzustellen. Diese routinemäßig durchgeführte, lebenserhaltende Maßnahme kann allerdings unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen. So können gesunde Lungen geschädigt oder bestehende Lungenschäden verstärkt werden und so die Oxygenierung sogar verschlechtert werden. Ein akuter Lungenschaden, der durch die direkte Wirkung mechanischer Beatmung im Tiermodell entsteht, wird be-atmungsinduzierter Lungenschaden bzw. *Ventilator-induced lung injury* (VILI) ge-nannt. VILI ist nur im Tiermodell sicher morphologisch, radiologisch und physio-logisch von einem diffusen Alveolenschaden abgrenzbar (International Consensus Conferences in Intensive Care Medicine 1999). Da die mechanische Beatmung *in*

*vivo* nicht als ursächlich bewiesen werden kann, wird daher der Ausdruck beatmungsassoziierter Lungenschaden bzw. *Ventilator-associated lung injury* (VALI) bevorzugt (Hyzy 2017). VALI ist definiert als Lungenschaden, der in mechanisch beatmeten Patienten entsteht und dem *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) ähnelt.

ARDS ist ein rasch progredientes und lebensbedrohliches Lungenversagen, das primär entweder pulmonal oder extrapulmonal verursacht sein kann. Direkte Schädigungen des Lungengewebes entstehen vor allem bei Pneumonie, Aspiration, Lungenkontusion, Inhalationstrauma oder pulmonaler Vaskulitis. Indirekte Schäden treten häufig als Komplikation bei Sepsis, schwerem Trauma, Pankreatitis, Verbrennung, Massentransfusion oder als Reaktion auf Medikamente, wie z.B. Amiodaron, auf. ARDS kann außerdem durch eine maschinelle Beatmung verstärkt werden (Braune und Kluge 2013). 2012 wurde die ARDS-Definition von einer europäisch-amerikanischen Konsensuskonferenz (European Society of Intensive Care Medicine, American Thoracic Society, Society of Critical Care Medicine) aktualisiert (Ranieri et al. 2012). Per definitionem ist ARDS ein respiratorisches Versagen mit akutem Beginn (innerhalb von einer Woche) und bilateralen Verdichtungen in der Röntgenthoraxaufnahme oder Computertomographie, die nicht durch Ergüsse, Atelektasen oder Rundherde erklärbar sind. Außerdem muss eine kardiale Ursache des Lungenödems echokardiographisch ausgeschlossen werden (Ranieri et al. 2012). Die Berlin-Definition des akuten Lungenversagens unterscheidet drei Schweregrade, die abhängig von der Oxygenierungsstörung bei einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von  $\geq 5$  cm H<sub>2</sub>O eingeteilt werden. Schweres ARDS besteht bei einem Quotienten von arteriellem Sauerstoffpartialdruck (PaO<sub>2</sub>) und inspiratorischer Sauerstoffkonzentration (FIO<sub>2</sub>) von kleiner als 100 mmHg, moderates ARDS bei PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> = 101-200 mmHg und mildes ARDS bei PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> = 201-300 mmHg (Ranieri et al. 2012).

Ein progressives ARDS ist klinisch nicht von einer VALI zu unterscheiden, d.h. es ist unklar, welche Lungenschäden durch die Grunderkrankung und welche durch die mechanische Beatmung hervorgerufen werden (Hyzy 2017). In einer retrospektiven Kohortenstudie zeigten Gajic et al., dass 24 % der Patienten, die zu Beginn einer Beatmungstherapie noch keine Lungenschäden aufwiesen, innerhalb der ersten fünf Tage einen akuten Lungenschaden entwickelten (Gajic et al. 2004). Aufgrund der schwierigen Abgrenzung von VALI und ARDS variieren die Angaben

zur Inzidenz von VALI bei ARDS-Patienten stark zwischen den Autoren. Die Inzidenz von ARDS wird in der neueren Literatur sehr unterschiedlich zwischen 5,0 und 33,8 Fällen pro 10.000 Einwohner und Jahr (Villar et al. 2011a) angegeben. In einer aktuellen prospektiven, multizentrischen Kohortenstudie waren in 10,4 % aller Intensivstation-Aufnahmen die ARDS-Kriterien nach der Berlin Definition erfüllt (Bellani et al. 2016). Die Krankenhausmortalität für mildes ARDS betrug 35 %, für moderates ARDS 40 % und für schweres ARDS 46 % (Bellani et al. 2016). So ist ARDS mit einer Mortalität von über 40-50 % (Villar et al. 2011a) und einer Letalität von 25-50 % (Oczenski 2012) trotz protektiver Beatmungsstrategien und fortschrittlicher Therapieansätze eine intensivmedizinische Herausforderung, die weitere Forschung verlangt.

### 1.1.1 Pathogenese des beatmungsassoziierten Lungenschadens

Für die Entstehung eines beatmungsassoziierten Lungenschadens werden zwei Hauptursachen diskutiert: Die Beatmung mit zu hohen oder zu niedrigen Tidalvolumina (Slutsky und Ranieri 2013) bzw. die lokale Überdehnung von Alveolen und die zyklische Atelektasenbildung. Die relative Bedeutung dieser beiden Faktoren bei der Pathogenese von VALI ist allerdings unklar (Hyzy 2017). Beatmungsassoziierte Überdehnungstraumata entstehen abhängig von der Höhe des transpulmonalen Druckes, der das Füllvolumen der Lunge und damit die alveoläre Dehnung bestimmt (Oczenski 2012). Durch einen positiven transpulmonalen Druck werden die Alveolen offengehalten und gedehnt, ein negativer transpulmonaler Druck lässt die Alveolen kollabieren und Atelektasen entstehen.

Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, dass für die Entwicklung eines Lungenschadens nicht eine Beatmung mit erhöhtem Alveolardruck (bzw. erhöhten Beatmungsdrücken) ausschlaggebend ist, sondern mit erhöhtem Tidalvolumen (Webb und Tierney 1974; Dreyfuss et al. 1988; Dreyfuss et al. 1995). In diesem Zusammenhang wurde der Begriff Volutrauma geprägt (Slutsky und Ranieri 2013). Auch klinisch wurde eine Beatmung mit großen Tidalvolumina als Risikofaktor für VALI identifiziert (Gajic et al. 2004).

Nicht nur eine Beatmung mit zu großem Tidalvolumen kann die Lunge schädigen: Bei Beatmung mit zu geringem Tidalvolumen kommt es vermehrt zur zyklischen Atelektasenbildung, d.h. bei jedem Atemzug expandieren die Alveolen während der



Inspiration und kollabieren während der Expiration. Dadurch wird eine Scherkraft erzeugt, die auch angrenzende Alveolen beansprucht (Hyzy 2017; Chen et al. 2015). Die dabei verursachten Schädigungen der Alveolarepithelzellen, die Bildung von hyalinen Membranen und die Entstehung eines Pulmonalödems werden unter dem Begriff Atelektrauma zusammengefasst (Slutsky und Ranieri 2013).

Auch bei einer Beatmung mit protektivem Tidalvolumen (s. Abschnitt 1.1.2) kann eine alveoläre Überdehnung durch lokale Überblähung einzelner Lungenabschnitte entstehen. Die Ursache für die disproportionale Verteilung des Tidalvolumens liegt u.a. in einer Konsolidierung der Alveolen oder einer Atelektasenbildung. Der häufig im Zusammenhang mit der Pathogenese von VALI genannte Begriff Barotrauma bezieht sich nicht auf Schädigungen durch einen generell zu hohen Alveolardruck, sondern auf die regionale Überblähung von Alveolen (Slutsky und Ranieri 2013). Gattinoni und Pesenti prägten im Zusammenhang mit diesen strukturellen Veränderungen der Lungenmorphologie den Begriff der „*baby lung*“. Anhand von Computertomographie-Untersuchungen zeigten sie, dass die belüfteten Anteile von erwachsenen ARDS-Patienten Volumendimensionen wie bei 5- bis 6-jährigen Kindern aufwiesen (Gattinoni und Pesenti 2005).

Alveoläre Überdehnungen und zyklische Atelektasenbildungen führen entweder direkt durch Zellschädigung oder indirekt über eine Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden im Sinne einer Mechanotransduktion zur Freisetzung von intrazellulären proinflammatorischen Mediatoren (Villar et al. 2011b). Diese Mediatoren schädigen das Alveolarepithel entweder direkt oder wirken als Chemokin rekrutierend auf proinflammatorische Zellen. Dieser entzündungsfördernde Prozess wird als Biotrauma bezeichnet (Slutsky und Ranieri 2013). Durch eine strukturelle Zerstörung der Alveolen kann es zur Translokation von Mediatoren, Bakterien oder Lipopolysacchariden aus dem Luftraum in den systemischen Blutkreislauf und so schließlich zum Multiorganversagen und Tod kommen (Slutsky und Tremblay 1998).

### 1.1.2 Protektive Beatmung

Die Beatmungstherapieansätze zur Prävention von VALI sind aus klinischen Studien übernommen worden, in denen fast immer ARDS-Patienten untersucht worden sind (Hyzy 2017). Protektive Beatmungsstrategien sollen einen adäquaten

Gasaustausch sicherstellen und dabei den Gewebeschaden so gering wie möglich halten. Seit der randomisiert-kontrollierten klinischen Studie des *Respiratory Distress Syndrome Networks*, in der eine Beatmung mit reduziertem Tidalvolumen mit einer signifikant geringeren Mortalität und Inflammation assoziiert war, gilt die sogenannte protektive Beatmung als Goldstandard in der Therapie von ARDS (The Acute Respiratory Distress Syndrome Network 2000). Um eine alveoläre Überblähung möglichst zu verhindern und eine zyklische Atelektasenbildung zu reduzieren, wird mit geringem Tidalvolumen (6 ml/kg Standardkörpergewicht), reduziertem inspiratorischen Plateaudruck ( $\leq 30$  mbar) und einem adäquat hohen PEEP druckkontrolliert beatmet (Baum und Rathgeber 2010).

Ein spezieller Beatmungsmodus bei VALI oder ARDS ist die Hochfrequenzoszillationsbeatmung (*high frequency oscillation ventilation*, HFOV), bei der wesentlich höhere Beatmungsfrequenzen (400-2400 / Minute) als bei Spontanatmung angewendet werden (Luecke et al. 2000). HFOV ist eine seit vielen Jahren auf neonatologischen Intensivstationen etablierte Therapie in der Behandlung des Atemnotsyndroms bei Frühgeborenen. In den letzten Jahren wird HFOV zunehmend auch in der Therapie des akuten Lungenversagens angewendet (Oczenski 2012).

## 1.2 Alveolarepithel

Die Lunge eines Erwachsenen besteht aus ca. 300 Millionen Alveolen. Diese unter physiologischen Drücken im Durchmesser 100  $\mu\text{M}$  großen, dreidimensionalen Lufträume sind mit Alveolarepithelzellen (AEC) ausgekleidet (Roan und Waters 2011). Den größten Anteil bilden mit 95 % AEC Typ I, die mit ihren langen, dünnen Zellkörpern an das Kapillarendothel angrenzen. Zusammen bilden sie, nur von einer verschmolzenen Basallamina getrennt, die Blut-Luft-Schranke. Dort findet der terminale Gasaustausch des Blutes auf einer Gesamtoberfläche von ca. 140  $\text{m}^2$  statt (Lüllmann-Rauch 2009). Die oktaedrischen Alveolen teilen sich mit den jeweils benachbarten Alveolen eine Alveolarwand. In diesen nur 5-8  $\mu\text{M}$  dicken aus Kollagenfibrillen, elastischen Fasern und wenigen Myofibroblasten bestehenden Inter-alveolarsepten verlaufen die Kapillarnetze beider angrenzender Alveolen. Die kubischen AEC Typ II befinden sich in den Nischen der Alveolen (Lüllmann-Rauch 2009). Sie

sind nicht am Gasaustausch beteiligt, sondern produzieren Surfactant und dienen vermutlich als AEC Typ I Progenitorzellen (Evans et al. 1975).

In den Experimenten dieser Arbeit wurden a spontan immortalisierten AEC der Zelllinie L2 (CCL-149™, ATCC, Manassas, USA) verwendet. Die Zellen dieser Linie wurden 1974 aus Lungen weiblicher Ratten isoliert (Douglas und Kaighn 1974). Durch elektronenmikroskopischen Nachweis von typischen Vesikeln (*lamellar bodies*) erfolgte die Charakterisierung als AEC Typ II. Im Laufe der Zellkultur konnte morphologisch eine Differenzierung von AEC Typ II zu Typ I beobachtet werden.

### 1.3 Mechanische Beanspruchung der Atemwege und des Alveolarepithels

Die Lunge ist ein dynamisches Organ, auf dessen Zellen unterschiedliche physikalische Kräfte wirken (Waters et al. 2002). AEC sind während der Atembewegung Spannung und Dehnung ausgesetzt (Plataki und Hubmayr 2010). Unter mechanischer Spannung (engl. „*stress*“) wird in der Physik die Kraft pro Flächeninhalt verstanden, die auf einen Körper einwirkt. Mit Dehnung (engl. „*strain*“) wird die Deformation einer Struktur relativ zu ihrem Ruhezustand beschrieben. Mechanische Spannung und Dehnung sind Vektoren, die orthogonal oder tangential auf eine Fläche wirken können (Plataki und Hubmayr 2010). Eine Tangentialspannung durch mechanische Scherung an der Oberfläche der Lungenzellen kann z.B. durch die Luftströmung während der Atmung erzeugt werden. Scherstress entsteht z.B. auch an der Grenzfläche zwischen alveolärem Flüssigkeitsfilm und der Zelloberfläche (Wirtz und Dobbs 2000) und unter pathophysiologischen Bedingungen zwischen belüfteten und atelektatischen Alveolarkompartimenten (Oczenski 2012). AEC sind an die physiologischen, periodischen Druck- und Volumenschwankungen während des Atmens angepasst. Wird die Beatmung maschinell durchgeführt, verändern sich Drücke, Strömungsgeschwindigkeiten und Volumina und so auch die oben genannten mechanischen Beanspruchungen durch physikalische Kräfte an den Alveolen.

Es ist inzwischen gut erforscht, dass mechanischer Stress die Signaltransduktion und damit die biologische Funktion in AEC beeinflusst (Roan und Waters 2011). In zahlreichen Studien wurden AEC in unterschiedlichen experimentellen Modellen mechanischem Stress wie z.B. Dehnung, Scherstress oder lokalem Druck ausgesetzt (Liu et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass mechanische Dehnung

wichtige Prozesse in AEC Typ II reguliert. In kultivierten AEC Typ II führte eine mechanische Dehnung u.a. zur Stimulation der Surfactant-Sekretion (Wirtz und Dobbs 1990; Dietl et al. 2012) und der Differenzierung zu AEC Typ I, zur Induktion der Apoptose (Edwards 2001) und zu einer Verminderung der für Reparaturprozesse wichtigen Zellmigration (Desai et al. 2008). Eine biaxiale zyklische Dehnung der Basallamina der AEC ohne strukturelle Zellschädigung oder parakrine Stimulierung führte zu einer vermehrten Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (Vlahakis et al. 1999), einer erhöhten Superoxidbildung und einer Aktivierung der NADPH-Oxidase (Chapman et al. 2005).

Weiter konnte gezeigt werden, dass Scherstress, der an der Grenzfläche zwischen alveolärem Flüssigkeitsfilm und Luft entsteht, zelluläre Prozesse wie z.B. eine von einem transmembranösen Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Einstrom abhängige Surfactant-Sekretion triggern kann (Ravasio et al. 2011). Der an dieser sogenannten *air-liquid-interface* entstehende mechanische Stress führte zu einer veränderten Expression von Genen, deren Hochregulierung auch mit VALI assoziiert ist (Hobi et al. 2012). In einem anderen Modell wurde mechanischer Stress durch Kontakt einer Luftblase mit der Oberfläche eines Alveolarepithelzellmonolayers oder durch eine sich drehende Zellkulturkammer erzeugt (Ramsingh et al. 2011). Diese Scherstress-Stimulationen führten zu einem transienten Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ ), der unabhängig vom Einstrom extrazellulären Calciums zu einer signifikanten ATP-Freisetzung führte (Ramsingh et al. 2011). AEC, die einem Flüssigkeitsstrom induziertem Scherstress ausgesetzt wurden, zeigten einen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstieg, eine Aktinfilamentreorganisation und eine stimulierte Surfactant-Sekretion (Mahto et al. 2014).

### 1.3.1 Luftstrom-induzierter Scherstress in den Atemwegen und Alveolen

Um die wirkenden mechanischen Kräfte in den Atemwegen und Alveolen einschätzen zu können, entwickelten Nucci et al. ein mathematisch-anatomisches Modell des respiratorischen Trakts und simulierten eine mechanische Beatmung mit konstantem *flow* und passiver Expiration unter Kontrollbedingungen und heterogener Konstriktion. Eine heterogene Konstriktion der Atemwege führte im Modell zu einer extrem ungleichen Verteilung des *flows* bis auf Alveolarebene. Es konnte gezeigt werden, dass sich der maximale Scherstress unter diesen Bedingungen bis

zu 50-fach ( $> 2 \text{ cmH}_2\text{O}$ ) verstärkte (Nucci et al. 2003). Der Luftstrom-induzierte Scherstress in den Atemwegen distal der neunten Generation des Bronchialbaumes wurde in diesem Modell auf ca. 0,0042 bis 0,46  $\text{cmH}_2\text{O}$  bzw. 412 bis 450  $\text{mPa}$  berechnet (Nucci et al. 2003).

Tarran et. al entwickelten ein rotierendes Zellkammersystem, das eine Luftströmung durch Be- und Entschleunigung einer Zellkultur erzeugte. In dem Modell wurden Scherstress-Werte von  $\sim 0,4$  bis  $2,0 \text{ dynes/cm}^2$  bzw. 40 bis 200  $\text{mPa}$  gemessen. Weiter stellten sie fest, dass im Verlauf der Atemwegsverzweigungen der Scherstress relativ konstant bleibt, da er sich proportional zur Luftströmung geteilt durch den Atemwegsdurchmesser zum Quadrat verhält. In den tieferen Lungenabschnitten nimmt die Strömungsgeschwindigkeit zwar stark ab, gleichzeitig wird aber auch der Atemwegsdurchmesser kleiner (Tarran 2005). Diese Beobachtungen am Modell geben Hinweise darauf, dass auch in den tieferen Atemwegen bis in den Alveolarraum relevante Luftstrom-induzierte Scherkräfte wirken könnten. Besonders bei forcierter mechanischer Beatmung könnte die erzeugte Luftströmung bis in die Alveolen reichen und einen Scherstress am Alveolarepithel induzieren. Da bisher angenommen wurde, dass auf Alveolarebene eine Luftströmung nicht mehr vorhanden ist, sondern die Belüftung der Alveolen allein durch Diffusion erfolgt, ist die Wirkung von Luftstrom-induziertem Scherstress auf das Alveolarepithel *in vitro* bisher noch nicht untersucht worden.

#### 1.4 Mechanotransduktion

Mechanische Reize können ohne Zellen zu schädigen, eine Signaltransduktionskaskade initiieren (s.1.3). Die Umwandlung externer mechanischer Reize in intrazelluläre biochemische Signale wird Mechanotransduktion genannt. Die Mechanotransduktionskaskaden von mechanischem Stress in der Lunge, die z.B. Veränderungen in der Genexpression oder dem Zellstoffwechsel hervorrufen, sind noch nicht vollständig verstanden (Garcia et al. 2006). Mechanische Reize können über unterschiedliche zelluläre Strukturen detektiert werden. Als mechano- oder Scherstress-sensitive Elemente sind vor allem oberflächliche Strukturen wie dehnungssensitive Ionenkanäle, die Glykokalyx, Wachstumsfaktorrezeptoren oder die Plasmamembran selbst, aber auch intrazelluläre Strukturen wie das Extrazellu-

lärmatrix-Integrin-Zytoskelett-Netzwerk, Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle oder das Zytoskelett beschrieben worden (Yamamoto und Ando 2010; Han et al. 2005). Dehnungssensitive Ionenkanäle und Extrazellulärmatrix-Integrin-Zytoskelett-Verbindungen sind die am besten untersuchten Mechanorezeptoren (Garcia et al. 2006).

#### 1.4.1 Glykokalyx

Die Glykokalyx ist ein in der Literatur viel diskutierter Mechanorezeptor von Scherstress. Diese ca. 0,5 µm dünne Schicht auf der Außenseite der Plasmamembran eukaryotischer Zellen besteht aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen wie Heparansulfat, Chondrotinsulfat und Hyaluronsäure (Chappell et al. 2008). Besonders Heparansulfat wird eine mechanosensitive Funktion zugesprochen (Tarbell und Pahakis 2006). Die meisten Untersuchungen zur Glykokalyx wurden an Endothelzellen durchgeführt. So wird z.B. die Mechano-transduktion von Strömungs-induzierten *fluid shear stress* (FSS) am Endothel durch die Glykokalyx vermittelt (Weinbaum et al. 2007). Als Antwort auf FSS wird u.a. die NO-Produktion gesteigert (Florian et al. 2003). In Heparansulfatketten können drei unterschiedliche Regionen identifiziert werden: Erstens N-acetylierte Regionen (NAc), zweitens Transitionszonen (T) und drittens sulfatierte Regionen (S). Die Heparansulfatketten der Glykokalyx lassen sich experimentell mit den degradierenden Enzymen Heparinase I, Heparinase III oder K5-Lyase entfernen. Heparinase I spaltet die glykosidische Verbindung zwischen N-sulfatiertem Glucosamin und 2-O-sulfatierter Iduronsäure. Diese Verbindung kommt vor allem in Heparin und seltener in Heparansulfat vor, wo sie nur in den sulfatierten Domänen (S-Regionen) zu finden ist. Heparinase I kann zur Untersuchung der Bedeutung der S-Regionen-Integrität in Heparansulfaten (HS) verwendet werden.

Heparinase III katalysiert die Spaltung der glykosidischen Verbindung zwischen N-sulfatierten oder N-acetylierten Glucosaminen und Glucuronsäuren. Damit wirkt Heparinase III vor allem in nicht-sulfatierten Regionen (NAc-Regionen) und Übergangszonen des HS. Stark sulfatierte Regionen sind resistent gegen Heparinase III, sodass dieses Enzym zur Präparation der S-Domänen aus HS verwendet werden kann. So kann die Bioaktivität isolierter S-Regionen untersucht werden.

K5-Heparanlyase ist ein Enzym, das zuerst in der Schwanzregion der Bakteriophage K5 entdeckt wurde. Dort spielt es eine wichtige Rolle bei der Infektion durch Spaltung der Polysaccharidkapsel von *E. coli*. K5-Heparanlyase spaltet ausschließlich in den nicht-sulfatierten Regionen die glykosidische Bindung zwischen N-acetyliertem Glucosamin und Glucuronsäure und führt aufgrund der hohen Spezifität der NAc-Region (nahe der Proteoglykan-Ankerproteine) zur Entfernung der gesamten sulfatierten Region. Diese S-Regionen besitzen eine hohe biologische Aktivität.

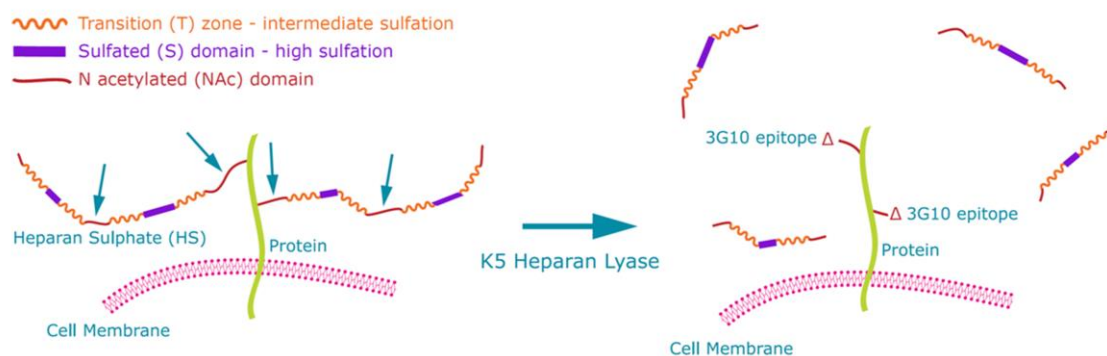


Abbildung 1: Darstellung der enzymatischen Entfernung der Heparansulfatketten der Glykokalyx durch die K5-Heparanlyase. Modifiziert nach *Iduron technical bulletin, Bacterial Heparinase Enzymes* (Iduron Ltd., Paterson Institute for Cancer Research, University of Manchester, UK).

Eine Degradierung der Heparansulfate mittels Heparinase III verhinderte während der Exposition mit FSS eine Strom-abhängige Ausrichtung der Endothelzellen (Yao et al. 2007) und glatten Muskelzellen (Kang et al. 2011) und inhibierte die Scherstress-induzierte Differenzierung von Endothelzellen (Nikmanesh et al. 2012). Es existieren unterschiedliche Konzepte über die mechanosensitive Funktion der Glykokalyx. Weinbaum et al. schreibt den an Verankerungsproteinen befestigten buschartigen Strukturen eine Art Biegesteifigkeit zu, die mechanischen Scherstress registrieren und ins Innere der Zelle weiterleiten können (Weinbaum et al. 2007). Thi et al. stellten das Konzept des „bumper cars“ auf, bei dem die Glykokalyx den FSS über direkte Interaktionen mit dem Aktinzytoskelett oder über indirekte Interaktionen mit Zellverbindungskontakten weitergibt und so einen Umbau in den Endothelzellen stimuliert (Thi et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass sofern die endotheliale Glykokalyx intakt ist, die Exposition mit FSS eine Scherkraft an den an Kernproteinen verankerten buschartigen Strukturen erzeugt, die als Drehmoment auf das Aktinzytoskelett übertragen wird. Erreicht das Drehmoment einen

bestimmten Schwellenwert, kommt es zur Ruptur von Adhäsionskontakten und zur Bildung von neuen *stress fibers* und Fokaladhäsionskontakten im Sinne einer Anpassungsreaktion auf Scherstress. Wenn die Glykokalyx dagegen beschädigt ist, wirkt der Scherstress direkt an der Plasmamembran. Die Zelle kann die oben beschriebenen Umbau- bzw. Anpassungsprozesse so nicht initiieren und sich nicht auf die veränderten Anforderungen einstellen (Tarbell und Ebong 2008; Thi et al. 2004).

Die endotheliale Glykokalyx wird pathophysiologisch bei Entzündungsreaktionen z.B. bei Sepsis, Arteriosklerose oder Diabetes degradiert (Tarbell und Ebong 2008). Die alveoläre Glykokalyx wird durch lokale Inflammationsprozesse z.B. bei bakteriellen Infektionen geschädigt (Chappell et al. 2009; Burke-Gaffney und Evans 2012). Weiter schädigt das durch die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren und oxidativem Stress verursachte beatmungsassoziierte Biotrauma die Glykokalyx. Wenn Glykokalyx-Modifikationen mit einer veränderten Mechanotransduktion am Alveolarepithel einhergehen würden, wäre das besonders relevant vor dem Hintergrund, dass gerade Patienten, die bereits ein ARDS entwickelt haben, prädisponiert sind, weitere beatmungsassoziierte Lungenschäden zu entwickeln. Viele Krankheitsbilder, die ein ARDS verursachen können, führen vermutlich zu Glykokalyx-Modifikationen der Lungenzellen. Eine notwendige mechanische Beatmung könnte daraufhin Inflammationsprozesse im vorgeschädigten Gewebe aggravieren und so zum progredienten Lungenversagen führen. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass in Lungen mit bereits existierenden Schäden eine mechanische Beatmung eine schädlichere Wirkung haben kann als in gesunden Lungen (Prost und Dreyfuss 2012).

#### 1.4.2 Calcium

Als zentrale Signaltransduktionsmoleküle sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an grundlegenden zellulären Prozessen wie z.B. Genexpression, Exozytose, Stoffwechsel und Apoptose beteiligt.  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert Zielstrukturen entweder direkt über spezifische Bindungsstellen, wie z.B. die Phospholipase A2 oder Proteinkinase C, oder indirekt nach vorheriger Bindung an Calmodulin, das daraufhin weitere Zielenzyme aktivieren kann. Während die  $[\text{Ca}^{2+}]$  im Extrazellulärraum im millimolaren Bereich liegt, beträgt die intrazelluläre  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  nur ca. 100 nM unter Ruhebedingung. Um die niedrige



$[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  aufrechtzuerhalten, werden ständig  $Ca^{2+}$ -Ionen aus dem Zytosol in intrazelluläre Speicher oder gegen den Konzentrationsgradienten aus der Zelle transportiert. Dies passiert primär aktiv über  $Ca^{2+}$ -ATPasen oder aus der Zelle zusätzlich sekundär aktiv über  $Ca^{2+}/3 Na^{+}$ -Austauschcarrier (NCX) (Silbernagl und Despopoulos 2012). Intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Speicher sind vor allem das Endoplasmatische Retikulum (ER) und die Mitochondrien. Aber auch im Nukleus, dem Golgi-Apparat, in membrangebundenen Endosomen und Lysosomen können  $Ca^{2+}$ -Ionen gelagert und freigesetzt werden (Clapham 2007).  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  kann durch einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus intrazellulären Speichern oder aus dem Extrazellularraum durch Öffnung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen erhöht werden.  $Ca^{2+}$ -Kanäle öffnen sich spannungsabhängig nach Membrandepolarisation, ligandengesteuert nach Bindung extrazellulärer oder intrazellulärer Signalmoleküle oder durch mechanische Reize, wie Dehnung oder Hitze. Weiter können  $Ca^{2+}$ -Ionen über unspezifische Kationenkanäle oder spezielle CRAC-Kanäle, die durch aus dem ER freigesetzte  $Ca^{2+}$ -Ionen aktiviert werden, einströmen.  $Ca^{2+}$ -Kanäle intrazellulärer Speicher öffnen häufig nach vorangegangener lokaler  $Ca^{2+}$ -Konzentrationserhöhung aufgrund eines externen  $Ca^{2+}$ -Einstroms ( $Ca^{2+}$ -induzierte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung) oder nach Bindung von Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) an den  $IP_3$ -Rezeptor (Silbernagl und Despopoulos 2012).  $Ca^{2+}$ -Signale können entweder in Form von transienten Anstiegen der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration oder aber auch als kurzzeitige, regelmäßig wiederkehrende Anstiege in Form sogenannter  $Ca^{2+}$ -Oszillationen auftreten und abhängig von Lokalisation und Frequenz unterschiedliche Reaktionen initiieren (Berridge et al. 1998).

#### 1.4.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) sind radikalische Intermediate, die aus der partiellen Reduktion von Sauerstoff ( $O_2$ ) entstehen. Diese Sauerstoffradikale entstehen entweder enzymatisch durch Elektronentransfer oder nicht-enzymatisch durch spontane Autooxidation von Sauerstoff. Durch Übertragung eines einzelnen Elektrons auf  $O_2$  wird ein Superoxidradikal gebildet ( $O_2^{\cdot-}$ ), das spontan oder durch Superoxiddismutasen katalysiert in Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) disproportioniert (Müller-Esterl 2011).  $H_2O_2$  kann dann durch Katalasen weiter zu Wasser und  $O_2$  abgebaut werden. Hauptquellen reaktiver Sauerstoffspezies sind die NADPH-Oxidase, die Xanthin-Oxidase, die entkoppelte

NO-Synthase und die mitochondriale Elektronentransportkette (Dikalov 2011). Aufgrund der hohen Reaktivität oxidieren ROS andere Moleküle, die dadurch chemisch modifiziert werden. Erhöhte Konzentrationen von ROS wirken als oxidativer Stress direkt schädigend auf zelluläre Makromoleküle, können physiologische Signalwege stören und Apoptose induzieren (Thannickal und Fanburg 2000). ROS können aber auch als Signalmoleküle fungieren (Thannickal und Fanburg 2000).

Zunehmend werden ROS auch eine Bedeutung bei der Entstehung von akuten Lungenschäden zugeschrieben. In der bronchoalveolären Lavage von ARDS-Patienten können meist hohe ROS-Konzentrationen nachgewiesen werden, die vermutlich aus Entzündungszellen, aber auch aus Lungenepithel und -endothelzellen freigesetzt werden (Carneseccchi et al. 2012). Es wird vermutet, dass ROS bei der Entstehung eines beatmungsassoziierten Biotraumas eine Rolle spielt (Slutsky und Tremblay 1998). ROS-vermittelte Schädigungen oder Aktivierungen als Antwort auf biomechanischen Stress können vermutlich Lungenschäden verstärken oder normale Reparaturvorgänge am Alveolarepithel verzögern bzw. sogar verhindern (Griffith et al. 2009). AEC, die zyklischem Dehnungsstress ausgesetzt waren, produzierten vermehrt ROS (Chapman et al. 2005). Durch Anwendung des Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) konnten proinflammatorische und proapoptotische ROS-induzierte Prozesse in Atemwegsepithelzellen von Ratten, die mechanischem Beatmungsstress ausgesetzt wurden, reduziert werden (Syrkina et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden AEC mit NAC inkubiert, um den Einfluss von zytosolischem ROS bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion während Luftstrom-Exposition zu untersuchen. Außerdem sollte durch Einsatz von Polyethylenglykol-Superoxid-dismutase (PEG-SOD) und -Katalase (PEG-Katalase) die eventuell entstehenden ROS näher spezifiziert werden.

Mitochondrien gehören zu den quantitativ wichtigsten intrazellulären ROS-Quellen. Durch den mitochondrialen Elektronen- und Protonentransfer von Komplex I zum Komplex VI wird über der inneren Mitochondrienmembran ein elektrochemischer Gradient aufgebaut, der im Komplex V die ATP-Synthase antreibt. Unter Normalbedingungen werden ca. 1-5 % der Elektronen nicht zum Aufbau dieses Gradienten genutzt, sondern reagieren mit  $\text{O}_2$  zu reaktiven Superoxiden. Superoxide entstehen bei hohem Membranpotential durch Nebenreaktionen hauptsächlich an den flavin-haltigen Nukleotiden von Komplex I und am Häm  $\text{b}_L$  von Komplex III (Müller-Esterl

2011). Der Atmungsketteninhibitor Rotenon blockiert selektiv die NADH-Verwertung an Komplex I, aber nicht den Zugang zur Atmungskette über Komplex II oder andere FADH<sub>2</sub>-abhängige Dehydrogenasen (Müller-Esterl 2011). In einer Studie von Chapman et al. inhibierte Rotenon eine durch mechanischen Stress induzierte ROS-Produktion in immortalisierten Lungenepithelzellen der Zelllinie A549 (Chapman et al. 2005). Mitochondriale ROS (mROS) sind auch in anderen Studien als Signaltransduktionsmoleküle identifiziert worden (Gutterman 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden mROS während Luftstromexposition epifluoreszenzmikroskopisch mittels eines genetischen redoxsensitiven Fluoreszenzmarkers gemessen. Außerdem wurden Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  nach Inkubation der AEC mit Rotenon untersucht.

Eine andere ROS-Quelle ist die NADPH-Oxidase (NOX), deren einzige Funktion anscheinend in der Produktion von ROS besteht (Lambeth 2004). Zuerst wurde die NADPH-Oxidase in neutrophilen Granulozyten beschrieben (NOX2, gp91phox), in denen ROS zur Abwehr von Krankheitserregern, dem sogenannten oxidativen *Burst*, produziert wird. Unter den sieben Isoenzymen NOX1-5, Duox1 und Duox2, ist NOX4 die weitverbreitetste Isoform (Altenhöfer et al. 2012). In AEC konnten NOX4, NOX1, DUOX1 und DUOX2 identifiziert werden (Carneseccchi et al. 2012). Die NOX4 produziert im Gegensatz zu den anderen Isoformen vermutlich H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an Stelle von Superoxiden (Takac et al. 2011). Sie wird an der Plasmamembran, in Mitochondrien, im Endoplasmatischen Retikulum und im Nukleus exprimiert (Altenhöfer et al. 2012) und ist konstitutiv aktiv (Lambeth et al. 2007; Lambeth 2004). Veränderungen in der Expression oder der Funktion der NADPH-Oxidasen können zur Entstehung von ARDS beitragen (Carneseccchi et al. 2012; Griffith et al. 2009). Die membranständigen NADPH-Oxidasen können durch mechanische Stimuli aktiviert werden und werden neben den mitochondrialen Enzymen als hauptsächliche ROS-Produzenten als Reaktion auf mechanischen Stress angesehen (Carneseccchi et al. 2012).

Die Aktivität der NOX lässt sich pharmakologisch relativ unspezifisch durch den Flavoproteininhibitor Diphenyleiodonium chloride (DPI) inhibieren (Wind et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente mit DPI durchgeführt, um den Einfluss der NOX am Ca<sup>2+</sup>-Signal während Luftstromexposition zu untersuchen. DPI inhibiert auch andere Flavoproteine wie z.B. die NO-Synthase. Spezifischer

kann die Funktion und Bedeutung der NOX in Zellen nach Herunterregulierung (*knockdown*) durch siRNA-vermittelte RNA-Interferenz untersucht werden (Altenhöfer et al. 2012). Deshalb wurde auch in der vorliegenden Arbeit ein siRNA-vermittelter *knockdown* der NOX vorgenommen. Zur Klärung des Einflusses der NO-Synthase wurden AEC außerdem mit dem spezifischen Inhibitor L-NG-Nitroarginine-Methylester (L-NAME) inkubiert.

### 1.5 Aktinzytoskelett

Aktin ist ein Strukturprotein des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen. Polymerisierte G-Aktin-Moleküle bilden das F-Aktin, das als Hauptbestandteil der Mikrofilamente des Zytoskeletts an zahlreichen zellulären Prozessen wie Adhäsion, Migration, Morphogenese, Zytokinese, Endo- und Phagozytose beteiligt ist (Tojkander et al. 2012). Zusammen mit Myosinfilamenten II bilden sie ein kontraktiles Netzwerk in Nicht-Muskelzellen (Pellegrin und Mellor 2007). Diese sogenannten *stress fibers* bestehen aus ~10-30 mit  $\alpha$ -Actinin verknüpften Aktinfilamentbündel, die über Fokaladhäsionskontakte mit der EZM verbunden sein können (Naumanen et al. 2008). *Stress fibers* bilden sich in unbeweglichen Zellen aus, die mechanischem Stress ausgesetzt sind. Die molekularen Mechanismen, die zur Bildung von *stress fibers* führen, sind noch nicht vollständig geklärt (Tojkander et al. 2012). Bei Kultivierung auf hartem Untergrund bilden Zellen dickere *stress fibers* aus und ordnen sich mit den Fokaladhäsionen entlang der Zell-Hauptachse an, anders als bei Kultivierung auf weichem Untergrund, wo die Fokaladhäsionskontakte kleiner und die *stress fibers* kaum ausgerichtet erscheinen (Tojkander et al. 2012). Die prominentesten *stress fibers* entstehen in Zellen, die erheblichem mechanischem Stress ausgesetzt werden: Kultivierte Endothelzellen, die Scherstress durch Flüssigkeitsstrom ausgesetzt waren, zeigten dicke, entlang der Längsachse der Zelle ausgerichtete *stress fibers* (Thi et al. 2004). Die Kontraktilität von *stress fibers* wird durch die *Myosin-light-chain-kinase* reguliert, die entweder  $\text{Ca}^{2+}$  / Calmodulin oder Rho-abhängig aktiviert wird. Der  $\text{Ca}^{2+}$  / Calmodulin-Signalweg vermittelt anscheinend eine lokale und schnellere Antwort (Tojkander et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen des Aktinfilamentgerüst der AEC nach Luftstromexposition untersucht.

## 1.6 Vorschädigung des Alveolarepithels durch Pneumokokken

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*, Pneumokokke) ist ein gram-positives bekapseltes Bakterium, das die menschliche Schleimhaut des Nasopharynx und der oberen Atemwege kolonisiert. Die Kombination aus Virulenzfaktoren und der Fähigkeit, die frühe Immunantwort der Wirtszelle zu umgehen, ermöglicht es dem Bakterium, aus den oberen Atemwegen in sterile Bereiche der unteren Atemwege zu gelangen und dort eine Infektion zu verursachen (Kadioglu et al. 2008).

Pneumokokken-Infektionen können in nicht-invasive und invasive Erkrankungen eingeteilt werden. Nicht-invasive Pneumokokken-Infektionen sind lokal begrenzt und nicht bakteriämisch wie z.B. die Sinusitis, akute Otitis media oder ambulant erworbene Pneumonie. Gelangen die Pneumokokken in die Blutbahn im Sinne einer Bakteriämie und kommt es zur Infektion größerer Organe, spricht man von einer invasiven Pneumokokken-Infektion wie z.B. bei der Meningitis (Drijkoningen und Rohde 2014). Als häufigste Erreger ambulant erworbener Pneumonien haben Pneumokokken-Infektionen eine große klinische und wirtschaftliche Bedeutung (Welte et al. 2012).

Die Virulenz von Pneumokokken wird einerseits durch Virulenzfaktoren, vor allem durch die Phagozytose-inhibierende Polysaccharidkapsel und das porenbildende Zytotoxin Pneumolysin vermittelt, andererseits ist die Fähigkeit zur Adhäsion und Internalisierung in die Wirtszelle maßgeblich für die Pathogenität verantwortlich. Einige Mechanismen der Interaktion von Pneumokokken mit der Zelloberfläche zur Kolonialisierung und Adhäsion sind bereits erforscht. So können z.B. Bakterienwand-gebundene Adhesine an Oberflächenrezeptoren oder EZM-Komponenten der Epithelzellen binden (Kadioglu et al. 2008). Neuere Ergebnisse zeigen eine Beteiligung von extrazellulärer Wirtszellen-RNA bei der Pneumokokken-Adhäsion an AEC (Zakrzewicz et al. 2016). Andere wichtige Virulenzfaktoren sind Proteasen, Oberflächenproteine und Pili zur Anheftung an Zellen (Barocchi et al. 2006). Pneumolysin ist ein zytosolisches Protein, dessen Freisetzung durch Autolyse (Hirst et al. 2004) oder durch Bakterienlyse nach Antibiotika-Gabe erfolgt (Spreer et al. 2003). Pneumolysin inhibiert die Bewegungen des respiratorischen Flimmerepithels, das im Rahmen der mukoziliären Clearance Pathogene aus den Atemwegen befördert (Steinfort et al. 1989). Außerdem wirkt Pneumolysin direkt toxisch auf Endothel- und Epithelzellen; so kommt es durch Porenbildung zur Schädigung der Epithelbarriere.

Dies ermöglicht dem Bakterium das Eindringen ins Gewebe (Henriques-Normark und Tuomanen 2013). Die Toxizität von Pneumolysin spielt möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung einer akuten Lungenschädigung bei Pneumokokken-Pneumonien (Rubins et al. 1993). Die ursächlichen molekularen Mechanismen, die zur Schädigung des Lungenepithels führen, sind allerdings noch nicht vollständig verstanden (Rai et al. 2015). Es gibt aktuell nur wenige Studien, die die  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  in Pneumokokken-infizierten Zellen untersucht haben. In Epithelzellen des Nasopharynx entsteht Pneumolysin-vermittelt ein  $Ca^{2+}$ -Signal, das u.a. eine Interleukin-8 Ausschüttung hervorruft und so möglicherweise Abwehrmechanismen induziert. Zur Simulation einer Infektion und Vorschädigung des Lungenepithels, können AEC mit Pneumokokken in vitro koinkubiert werden.

## 2 Fragestellung und Ziele

VALI ist eine schwerwiegende Komplikation bei beatmeten Intensivpatienten. Als Ursache wird ein durch mechanischen Stress initiiertes Entzündungsprozess der Alveolen diskutiert (Slutsky und Ranieri 2013). In zahlreichen experimentellen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass AEC auf mechanische Reize, wie z.B. Dehnung, mit einer Signaltransduktion reagieren, die über  $\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}$  oder mROS vermittelt wird. Während der Beatmung könnte in den Atemwegen bis hin zu den Alveolen ein Luftstrom-induzierter Scherstress wirken, über dessen Wirkung noch wenig bekannt ist (Spieth et al. 2014). Ziel dieser Arbeit war daher die erstmalige Untersuchung einer Mechanorezeption und -transduktion von Luftstrom-induziertem Scherstress in AEC. Außerdem sollte die Funktion der epithelialen Glykokalyx als potentiell mechanosensitive Struktur und Veränderungen des Aktinzytoskeletts nach Luftstromexposition überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Luftströmung an der Zelloberfläche von AEC ein Scherstress erzeugt, der konsekutiv eine Mechano-transduktion initiiert. Dazu wurden AEC in einer speziell angefertigten Luftstromkammer an ihrer apikalen Seite einer laminaren, periodischen Luftströmung ausgesetzt und fluoreszenzmikroskopisch Veränderungen der Fura-2 kalibrierten  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  und der roGFP2-Ratio als Ausdruck der mROS-Produktion gemessen. Weiter wurde der Frage nachgegangen, welche zellulären Strukturen und Mediatoren an der möglichen Mechano-transduktion von Luftstrom-induziertem Scherstress beteiligt sind. Durch Inkubation mit ROS-modifizierenden Substanzen, Glykokalyx-degradierenden Enzymen und Pneumokokken sollten eventuelle Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals weiter untersucht werden. Eine Immunfluoreszenz-Färbung der Aktinfilamente nach Luftstromexposition sollte mögliche *downstream*-Mechanismen im Sinne eines Anpassungsprozesses der AEC auf Scherstress aufdecken.

Ziel der Arbeit war es, durch Ergebnisse aus dem *in vitro*-Modell neue Aspekte zur Pathogenese vom beatmungsassoziierten Lungenschäden zu liefern und allgemein ein besseres Verständnis für Luftströmung als mechanischen Stimulus am Alveolarepithel zu entwickeln.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Kits und Proteine

Bezeichnung	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperanzinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
6 x Loading Buffer	Novagen, San Diego, USA
Antibiotika: Penicillin / Streptomycin (10000 U/ml / 10000 µg/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Antibiotikum: Kanamycin disulfate aus <i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aqua ad iniectabilia	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Bovine Serum Albumine (BSA)	Bio-Rad, Hercules, USA
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
cDNA Synthese-Mix	Qiagen, Venlo, Niederlande
Columbia-Agar mit 5 % Schafsblut	Oxoid / Thermo Fisher Sc., Waltham, USA
Dextran	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Diphenyleneiodonium chloride (DPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
dNTP Set 100 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol	J. T. Baker, Center Valley, PA, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fluoromount-G	Southern Biotech, Birmingham, USA
Formaldehyd 3,5 %	Büfa, Lübeck, Deutschland
FURA-2/AM	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Gel Pilot 100 bp Plus Ladder	Qiagen, Venlo, Niederlande
Glukose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin, 99,5 % wasserfrei	Th. Geyer, Renningen, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Fluka / Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Heparinase I ( <i>Flavobacterium Heparinum</i> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Heparinase III ( <i>Flavobacterium Heparinum</i> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hot StarTaq DNA Polymerase	Qiagen, Venlo, Niederlande
K5-Heparanlyase	Iduron, Manchester, Großbritannien
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
LB-Agar (Lenox)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-NG-Nitroarginine-Methylester (L-NAME)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
N-Acetylcystein (NAC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland



<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Omniscript RT Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Pluronic	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Polyethylenglykol-Katalase (P-Katalase)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polyethylenglykol-Superoxiddismutase (P-SOD)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Primer p(dT) <sub>15</sub> für cDNA Synthese (8 nmol)	Roche, Mannheim, Deutschland
Protector RNase Inhibitor (40 U/µl)	Roche, Mannheim, Deutschland
Reinigungsmittel RNase ZAP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNase-freies H <sub>2</sub> O	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Rotenon	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Roti-Safe Gel Stain	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Todd-Hewitt-Bouillon	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Transfektionsmittel: Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen, Carlsbad, USA
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin / EDTA Solution	Biochrom, Berlin, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xtreme Gene HP DNA	Roche, Mannheim, Deutschland

Tabelle 1: Chemikalien, Reagenzien, Kits und Proteine.

### 3.1.2 Medien und Puffer

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Dulbeco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin, Deutschland
LB-Medium (Broth Base)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Gibco / Invitrogen, Carlsbad, USA
S.O.C. Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Phosphate Buffered Saline Dulbecco ohne Ca <sup>2+</sup> (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tris-Acetat-EDTA-Puffer, 50x, pH 8,3 (TAE)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2: Medien und Puffer.

- THY-Medium: Todd-Hewitt-Bouillon (36,4 g), Hefeextrakt (5 g) ad 1 L Aqua dest.; sterilisiert bei 115 °C für 10 Minuten
- HBS-Puffer (pH 7,42): 20 mM HEPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 150 mM NaCl, 0,16 mM Dextran, 10 mM Glukose ad 1 L H<sub>2</sub>O (295 mOsm)
- HBS-Puffer Ca<sup>2+</sup>-frei + EGTA (pH 7,42): 20 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 150 mM NaCl, 0,16 mM Dextran, 10 mM Glukose, 0,5 mM EGTA, ad 1 L H<sub>2</sub>O
- TAE-Laufpuffer (1x): 20 ml TAE-Puffer (50x) ad 980 ml Aqua ad iniectionabilia (1:50 Verdünnung)

### 3.1.3 siRNA, Plasmid-DNA, kompetente Zellen und Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
<b>siRNA</b>	
On-Target Plus siRNA Control non-targeting Pool	Thermo Fisher Scientific Dharmacon, Waltham, USA
On-Target Plus siRNA Rat NOX4 Cat. 3-080114-10	Thermo Fisher Scientific Dharmacon, Waltham, USA
AllStars Neg. siRNA Alexa Fluor 488 Cat.: 1027284	Qiagen, Venlo, Niederlande
On-Target Plus Standard custom siRNA: FI-CCGUUUGCAUCGAUACUAAUU	Thermo Fisher Scientific Dharmacon, Waltham, USA
<b>Plasmid und kompetente Zellen</b>	
roGFP2 (305) Plasmid (ro2 mit mitochondrialer Ziel-Sequenz in pEGFP-N1 für die Expression in Säugetieren, pRA305)	Labor von Prof. Dr. J. Remington, Universität Oregon, USA
Library Efficiency DH5α Competent Cells	Invitrogen, Carlsbad, USA
<b>Antikörper</b>	
Atto 488 phalloidin, Ziege-anti-Rabbit IgG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Höchst 3342, Trihydrochloride, Trihydrate, polyclonaler IgG	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tabelle 3: siRNA, Plasmid-DNA, kompetente Zellen und Antikörper.

### 3.1.4 Primer

Die NOX4-Primer-Sequenz wurde der Publikation „Nox4 NAD(P)H Oxidase Mediates Src-dependent Tyrosine Phosphorylation of PDK-1 in Response to Angiotensin II: Role in Mesangial Cell Hypertrophy and Fibronectin Expression” ((Block et al. 2008) entnommen. Der GAPDH-Primer wurden mit der *Primer-Blast* Software des *National Center for Biotechnology Information* generiert und von Eurofins MEW Operon (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

(Online im Internet. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

[Stand: 07.01.2017 15:55 Uhr])

Name	Forward (5'→3')	Reward (5'→3')
NOX4 rat	GATGTTGGGCCTAGGATTGTGT	CAGCCAGGAGGGTGAGTGTCTAA
GAPDH rat	AGATCCACAACGGATACATT	TCCCTCAAGATTGTCAGCAA

Tabelle 4: Primer-Sequenz von NOX4 rat und GAPDH rat.

### 3.1.5 Geräte, Verbrauchsmaterial und Zubehör

Bezeichnung	Hersteller
6-well Platten	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA Greiner Bio-One, Kremsmünster, Deutschland
Becherglas mit Schraubdeckel, 250 ml	Schott, Mainz, Deutschland
Blockheizer SBH130DC	Stuart, Stone, Großbritannien
CO <sub>2</sub> -Inkubatoren (Brutschränke)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Sanyo, Moriguchi, Japan
<i>Collection tubes</i> (2 ml)	Qiagen, Venlo, Niederlande
Deckgläser, 24 x 60 mm	Marienfeld superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Elektrophorese-Netzgerät	Consort, Turnhout, Belgien
Elektrische Pipette: Accu Jet	Brand, Wertheim, Deutschland
Elektronisches Vorschaltgerät für Kurzbogen-Entladungslampe HBO/XBO	Leitungselektronik Jena, Jena, Deutschland
Eppendorfröhrchen, steril (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filterrad: Lambda 10-2 Optical Filter Changer	Sutter Instrument Company, Novato, USA
Filtersatz 400 nm	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Filtersatz 495 nm	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland
Filterset für Fura-2 F71-000	AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Germany
Gelkammer und Gelkämme	VWR International GmbH, Darmstadt
Hochauflösende Digitalkamera ( <i>Charge Coupled Device</i> , CCD) CoolSNAP-HQ	Photometrics, Tucson, USA
Impfösen, 10 µL	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kaltlichtlampe VSB HBO 100	Leistungselektronik Jena, Jena, Deutschland
Kolbenpipetten - Research 10/100/1000 - Reference 20	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryo-Kontainer 2-Propanol	Nalgene, Rochester, USA
Kryoröhrchen	Nunc / Nalgene, Rochester, New York, USA
Lampe: FlexiLux 600 Longlife	Schölly Fiberoptic, Denzlingen, Deutschland
LCD-Monitor	Fujitsu Computers Siemens, München, Deutschland
LCD-Monitor Imaging Microscopy	Visitron Systems, Puchheim, Germany
Mikroskop AxioTech Vario	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland
Mikroskop Olympus CK30	Olympus, Tokio, Japan
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen, Deutschland
Minishaker MS1	IKA, Staufen, Deutschland
NanoDrop-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Objektiv: Achromplan 100x / 1,0 W	Olympus, Tokio, Japan
Objektiv: Achromplan 40x / 0,80 W	Olympus, Tokio, Japan
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PC Imaging Microscopy	Visitron Systems GmbH, Puchheim, Germany
PCR Thermal Cycler P2X	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR-tube 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
pH-Meter	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Pipettenspitzen, steril 0,5-20 µL, 1250 µL, 2-200 µL	Biosphere/Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Plastikröhrchen, 50 ml, steril	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
QI Shredder	Qiagen, Venlo, Niederlande
Quecksilber-Dampfbrenner	Olympus, Tokio, Japan
Reflektorschieber 3 FL	Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland
Schüttler mit Inkubatorfunktion	New Brunswick Scientific / Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Transferpipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sicherheitswerkbank Klasse 2, Herasafe	Thermo Fisher Scientific Heraeus, Waltham, USA

Bezeichnung	Hersteller
Software ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Software MetaFluor Imaging V. 6.3r5	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA
Software Microsoft Office 2003	Microsoft, Redmond, USA
Software Sigma Plot, Version 12	Systat Software, Chicago, USA
Software SPSS Statistics Version 21	IBM, Armonk, USA
Software SynGene V. 6.01	GeneSnap (Synoptics), Cambridge, England
Spektrophotometer: Multiscan Spectrum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spritze Inject Solo, 20 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzenfilter 0,2µM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Stickstofftank LS750	Taylor Wharton, Minnetonka, USA
UV-Transilluminator-System: GeneGenius	Syngene, Cambridge, Großbritannien
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Wasserbad mit Schüttlerfunktion SW22	Julabo, Seelbach, Deutschland
Wattestäbchen, steril, 15 cm	Beese, Barsbüttel, Deutschland
Zählkammer Neubauer	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkultureinsätze (ThinCerts®) für 6-well-Platten, 0,4 µM Porengröße	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Biofuge Stratos	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Universal 32	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, 14 ml, steril	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA

Tabelle 5: Geräte, Verbrauchsmaterial und Zubehör.

### 3.1.6 Pneumokokken

Der Bakterienstamm *S. pneumoniae* D39 wurde von Prof. Dr. S. Hammerschmidt aus der Abteilung Genetik der Mikroorganismen des Interfakultären Instituts für Genetik und Funktionelle Genomforschung an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um bekapselte Serotyp 2 Pneumokokken vom D39 Stamm (NCTC 7466).

### 3.1.7 Zelllinie L2

Die Experimente wurden an AEC der Zelllinie L2 (CCL-149™, ATCC, Manassas, USA) durchgeführt. Diese spontan immortalisierten Zellen wurden aus weiblichen Ratten isoliert. Im Laufe der Zellkultur entwickelten sie AEC Typ I Charakteristika.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Bakterienkultur

Das Wachstum, die Vitalität und Reproduktionsfähigkeit der Stammkultur-Pneumokokken wurde im Labor der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. H. Rohde des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf untersucht. Die Kultivierung der Pneumokokken erfolgte auf Columbia-Schafsblutagarplatten, die über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Kolonien mit einem mit THY-Medium befeuchteten, sterilen Wattestäbchen abgenommen und jeweils in 50 ml-Plastikröhrchen, die mit 40 ml angewärmtem THY-Medium befüllt waren, resuspendiert und bei 37 °C im Wasserbad für 2 Stunden inkubiert. Die Bakterien-dichte wurde photometrisch bestimmt. Zu Beginn der Wachstumsphase lag die optische Dichte (OD) bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 600 nm bei 0,08. Wachstum erfolgte bis zu einer OD von 0,4-0,45.

Zur Bakterienernte wurden die 50 ml-Plastikröhrchen bei 3750 rpm und Raumtemperatur (RT) für 10 Minuten zentrifugiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes mit einer Pipette wurden die Bakterien in 5 ml THY-Medium + 20 % Glycerin resuspendiert. Der Inhalt von jeweils zwei 50 ml-Plastikröhrchen wurde gepoolt und die optische Dichte durch Zugabe von Bakteriensuspension bzw. Medium auf 0,17 eingestellt. Diese optische Dichte entsprach der Anzahl von  $10^7$  Bakterien pro Milliliter ( $10^7$  colony forming units, CFU). Je 100 µL dieser Bakteriensuspension wurde nun in kalte 1,5 ml-Eppendorfgefäße pipettiert und die Aliquots bei -80 °C gelagert.

Zur Verwendung der Pneumokokken in den Experimenten wurden die 100 µL Aliquots mit der Pneumokokken-Suspension langsam auf Eis aufgetaut. Bevor die Pneumokokken zu den Zellen gegeben wurden, waren diese für die epifluoreszenzmikroskopische  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung mit Fura-2 gefärbt worden (s. Abschnitt 3.2.6.3.1).

Danach mussten die Zellen auf den Objektträgern vorher dreimal gründlich mit HBS-Puffer gewaschen werden, um Antibiotika-Reste aus dem Medium zu entfernen. Dann wurden 50 µL der Pneumokokken-Suspension, d.h. etwa  $5 \cdot 10^5$  CFU, unverdünnt langsam auf die Zellen auf der Oberfläche der Objektträger pipettiert und diese für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Pneumokokken-Suspension wurde vor der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung verworfen, die Zellen wurden aber nicht gewaschen.

### 3.2.2 Zellkultur und Vorbereitung der Objektträger

#### 3.2.2.1 Kryokonservation und Auftauen von L2-Zellen

Um die Zellen zu einem späteren Zeitpunkt in Kultur nehmen zu können, wurde eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche, wie nachfolgend unter Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben, passagiert und das Zellpellet in 3 ml Kryokonservationsmedium (DMEM + 10 % DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde sofort auf drei Kryoröhrchen aufgeteilt und diese in 2-Propanol Kryo-Kontainern bei -80 °C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in einen Stickstoffbehälter (-196 °C) umgelagert.

Zu Beginn der Zellkultur wurde ein Kryoröhrchen für 2 Minuten bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Nach Desinfektion des Kryo-Röhrchens mit 70 %-igem Ethanol wurde die aufgetaute Zellsuspension in eine mit 30 ml angewärmtem Nährmedium gefüllte 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche pipettiert. Nach spätestens 24 Stunden wurde das Medium durch 12 ml neues Nährmedium ausgetauscht.

#### 3.2.2.2 Kultivierung der Zellen

Die L2-Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen im CO<sub>2</sub>-Inkubator (5 % CO<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub>, 37 °C, 97 % relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die Zellkulturarbeit erfolgte unter einer sterilen Werkbank mit *laminar flow* und streng sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden in 2400-5600 Zellen / cm<sup>2</sup> Dichte ausgesät. Das Kultur- bzw. Nährmedium bestand aus DMEM, 10 % FBS und 1 % Penicillin / Streptomycin-Lösung. Dreimal pro Woche wurde das Kulturmedium ausgetauscht. In den Experimenten wurden die Zellpassagen 10 bis 27 verwendet.

Beim Erreichen einer ca. 80 %-igen Konfluenz wurden die Zellen gesplittet und subkultiviert. Dazu wurde das verbrauchte Nährmedium aus der Zellkulturflasche

entfernt, die L2-Zellen dreimal mit 10 ml angewärmtem PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin / EDTA-Lösung für 4 Minuten bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator vom Zellkulturflaschenboden gelöst. Die vollständige Ablösung des Zellrasens von der Plastikoberfläche wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Durch Zugabe von 7 ml filtriertem FBS wurde die Trypsinaktivität gestoppt. Die Zellsuspension wurde dann in ein 14 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 1000 rpm und RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 3 ml Nährmedium resuspendiert und eine definierte Menge Zellsuspension (1:10 bis 1:5 Split-Ratio) in eine neue 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und wie oben beschrieben weiter kultiviert.

### 3.2.2.3 Zellzahlbestimmung und Vorbereitung der Objektträger

Um eine definierte Anzahl von Zellen auf den Objektträgern auszusäen, wurde zuerst die Zellzahl der Suspension in einer Neubauerkammer bestimmt. Dazu wurde die Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:5 verdünnt und 10 µL der Verdünnung in eine Neubauerkammer pipettiert. Die gefärbten Zellen wurden unter einem Lichtmikroskop gezählt. Die Zellzahl wurde mithilfe Formel (1) errechnet:

$$\frac{(\text{Anzahl der Zellen in vier Großquadraten} \cdot \text{Verdünnungsfaktor})}{5} \cdot 10000 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \quad (1)$$

Zur Vorbereitung der Objektträger für die Fluoreszenzmikroskopie-Experimente wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen in 1 ml Nährmedium auf die Sieboberfläche der Zellkultureinsätze gebracht (s. Abbildung 2) und 12 Stunden aufrecht in den Brutschrank gestellt. Nach ca. 24-stündiger Inkubation im CO<sub>2</sub>-Inkubator wurden die Zellkultureinsätze um 180° gedreht (s. Abbildung 2) und in eine mit 4 ml Nährmedium pro well befüllte 6-well-Platte gesetzt. In das Innere der Zellsiebe wurden zusätzlich 2 ml Nährmedium gefüllt, sodass die Zellen sowohl an apikaler, als auch an basaler Seite von Medium umgeben waren. Die Objektträger wurden weitere 24 Stunden im CO<sub>2</sub>-Inkubator belassen.



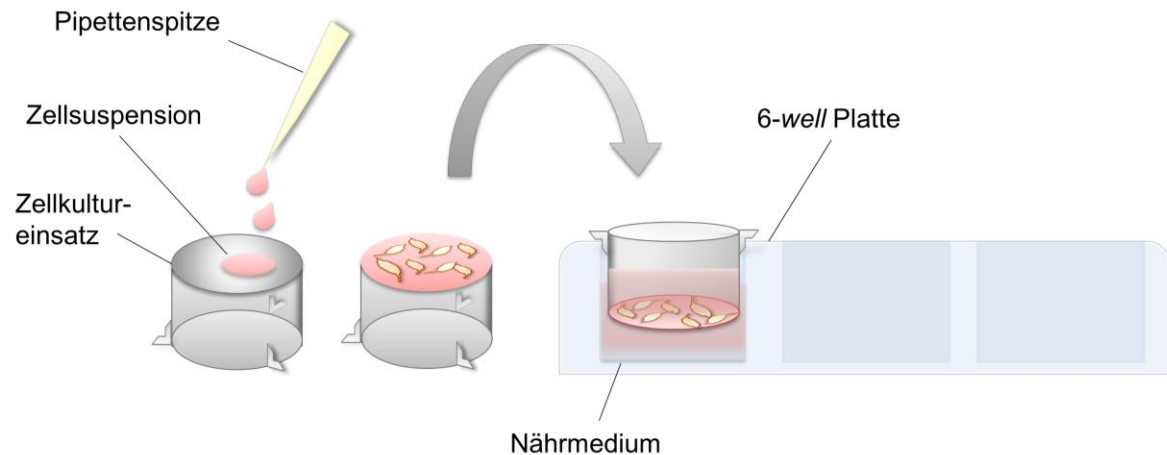


Abbildung 2: Vorbereitung der Objektträger. Für die Epifluoreszenzmikroskopie-Experimente in der Luftstromkammer (*Flow Chamber-Modell*) wurden ca.  $2 \cdot 10^5$  L2-AEC auf die permeable Membranoberfläche von speziellen Zellkultureinsätzen ausgesät. Nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellkultureinsätze mit den angewachsenen Zellen um  $180^\circ$  gedreht, in eine mit Nährmedium befüllte 6-Well-Platte gesetzt und zusätzlich im Inneren mit Nährmedium befüllt.

### 3.2.3 Transfektion

Für die Transfektion der Zellen auf den Zellsieben mit siRNA wurden 24 Stunden vorher Objektträger mit ca.  $1,6 \cdot 10^5$  Zellen vorbereitet. Es wurde 80 nM siRNA pro Well in 150  $\mu\text{L}$  Opti-MEM-Medium in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gelöst. Ohne Plastikkontakt wurden 7  $\mu\text{L}$  Transfektionsmittel Lipofectamine RNAiMAX dazu pipettiert, vorsichtig gemischt und die Lösung 15 Minuten bei RT inkubiert.

Für die Transfektion der Zellen auf den Zellsieben mit DNA wurden 24 Stunden vorher Objektträger mit ca.  $2 \cdot 10^5$  Zellen vorbereitet. Es wurde 1  $\mu\text{g}$  DNA in 100  $\mu\text{L}$  Opti-MEM-Medium in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gelöst. 3  $\mu\text{L}$  Transfektionsmittel X-tremeGene HP DNA wurde ohne Plastikkontakt dazupipettiert und die Lösung 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die jeweiligen Transfektionskomplexe tröpfchenweise auf die mit HBS-Puffer gespülten Zellen auf der Objektträgeroberfläche pipettiert und in den  $\text{CO}_2$ -Inkubator gestellt. Nach 24 Stunden wurden die Zellkultureinsätze, wie in Abschnitt 3.2.2.3 beschrieben, in 6-Well-Platten umgesetzt. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Evaluation der Transfektionseffizienz und die Messung.

### 3.2.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.4.1 Transformation

Zur Vervielfältigung der roGFP2-Plasmid-DNA wurde die natürliche Kompetenz von Bakterien, freie DNA aufzunehmen, genutzt. Bakterien des E. coli-Stamms DH5 $\alpha$  wurden auf Eis aufgetaut und 25  $\mu$ L der Bakteriensuspension in ein vorgekühltes 1,5 ml-Eppendorfgefäß abgefüllt. Maximal 10 ng/ $\mu$ L roGFP2-DNA wurde hinzugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde der Heizblock auf 42 °C und das Wasserbad mit Schüttelfunktion auf 37 °C vorgewärmt. Nach der Inkubation wurde das Bakterien-DNA-Gemisch für 45 Sekunden in den Heizblock gestellt und dann sofort 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 225  $\mu$ L S.O.C.-Medium wurde das Reaktionsgefäß bei 37 °C und etwa 200 rpm eine Stunde im Wasserbad mit Schüttelfunktion inkubiert.

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 35 g LB-Agar in 1 L H<sub>2</sub>O aufgelöst, autoklaviert und nach kurzer Abkühlungszeit 50  $\mu$ g/ml Kanamycin zugegeben. Je 25 ml der Agar-Antibiotika-Lösung wurden in runde Plastikgefäße gefüllt. Jeweils 200  $\mu$ L der Bakterien-Lösung wurden auf eine ausgehärtete Kanamycin-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 3.2.4.2 Plasmidpräparation

Zur Isolierung der roGFP2-DNA aus den Bakterien wurde eine Maxi-Prep mit dem „Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine Bakterienkultur in 200 ml LB-Medium mit 25  $\mu$ g/ml Kanamycin für ca. 12 Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert. 600  $\mu$ L der Bakterienlösung wurde abgenommen und mit 400  $\mu$ L 50 %-igem Glycerol gemischt und sofort bei -80°C eingefroren.

#### 3.2.4.3 Zellernte und RNA-Isolation

Nach den Epifluoreszenzexperimenten wurden die Zellen von den Zellsieben lysiert. Dazu wurden 100  $\mu$ L Mercaptoethanol auf die Oberfläche (425,4 mm<sup>2</sup>) gegeben und die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgestrichen. Das Lysat wurde in *collection tubes* (2 ml) überführt und die RNA entweder sofort mithilfe eines

kommerziellen Kits (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert oder zunächst bei - 80°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt aufbereitet. Die RNA-Konzentration ([RNA]) wurde UV-spektralphotometrisch am NanoDrop-1000 der Arbeitsgruppe von PD Dr. S. Loges des Instituts für Tumorbilogie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf ermittelt. Dazu wurde die optische Dichte bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  ( $OD_{260}$ ), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, und bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  ( $OD_{280}$ ), dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen. Da eine  $OD_{260}$  40  $\mu\text{g/ml}$  RNA entspricht, wurde Formel (2) für die Berechnung der [RNA] verwendet.

$$[RNA] \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = OD_{260} \cdot 40 \mu\text{g/ml} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \quad (2)$$

Eventuelle Verunreinigungen der isolierten RNA wurden anhand des Quotienten aus  $OD_{260}$  durch  $OD_{280}$  ermittelt. Der Quotient von reiner RNA liegt bei ungefähr 2,0. RNA-Proben, bei denen der Quotient stark abwich, wurden nicht weiterverwendet.

## 3.2.4.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mithilfe des „Omniscript RT Kit“ der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde 1 µg bzw. 2 µg RNA-Template eingesetzt (s. Tabelle 6 Mastermix). Die synthetisierten cDNAs wurden bei 4 °C gelagert.

Reagenz	Volumen [µL]
– 10x Buffer-RT	3
– dNTP Mix (5 mM/dNTP)	2
– Oligo-dT Primer [1 µM]	1
– RNase Inhibitor [10 U/µl]	1
– Omniscript RT [4 U/20µl]	1
– Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	ad 22
– 1 µg oder 2 µg RNA Template	x
Endvolumen	30 + x

Tabelle 6: Ansatz für eine RNA-Probe zur cDNA-Synthese (Mastermix).

## 3.2.4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Reagenz	Volumen [µL]
– Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	28,75
– 10x Puffer	5
– Q-Solution	10
– 10 mM dNTPs	1
– Primer forward	1
– Primer reward	1
– Taq-Polymerase	0,25
Endvolumen	47

Tabelle 7: PCR Mastermix für eine Probe.

Für jede Probe wurden 3 µL cDNA bei 2 µg umgeschriebener RNA (bzw. 6 µL bei 1 µg umgeschriebener RNA) in 0,2 ml-PCR-*tubes* pipettiert, 47 µL Mastermix dazugegeben (s. Tabelle 7), gevortext und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in den PCR-Cycler gesetzt und ein geeignetes Programm ausgewählt (s. Tabelle 8).

Schritt	Temperatur	Dauer	Bemerkung
Denaturierung	95 °C	15 min	
Denaturierung	94 °C	45 sec	
Hybridisierung	NOX4: 59,4 °C GAPDH: 50,1 °C	35 Zyklen	Gradient 15 <sup>1</sup>
Elongation	72 °C	1 min	
Abschließende Elongation	72 °C	10 min	
Abkühlung und Lagerung	4 °C	∞	
<sup>1</sup> Gradient 15: 50,1 °C, 50,5 °C, 51,3 °C, 52,7 °C, 54,4 °C, 56,4 °C, 58,3 °C, 60,3 °C, 62,6 °C, 64 °C, 64,7 °C, 65,7 °C			

Tabelle 8: PCR-Programm zur Amplifikation des NOX4-Gens.

Zur Herstellung eines 1 %-igen Agarose-Gels wurden 666 mg Agarose mit 66 ml TAE-Laufpuffer (1x) in einem Becherglas mit Schraubdeckel in der Mikrowelle aufgekocht und durch wiederholtes Schwenken aufgelöst. Sobald die Lösung handwarm war, wurden 3 µL der Nukleinsäure-Färbereagenz Roti-Safe dazugegeben und das Gel in eine vorher zusammengestellte Gelkammer mit Gelkamm gegossen. Nach ca. 15 Minuten war das Gel abgekühlt, sodass der Gelkamm vorsichtig entfernt werden konnte. Jeweils 6 µL der PCR-Produkt-Proben wurden auf Parafilm mit 3 µL 6 x Loading Buffer durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und die 9 µL Probe in die Taschen des 1 %-igen Agarose-Gels aufgetragen. Zur Bestimmung der Größe der PCR-Produkte wurden 6 µL 100 Bp Plus Marker in eine der äußeren Taschen des Gels pipettiert. Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte für 45 Minuten bei 120 V und 74 mA. Die eingelagerte DNA im Gel konnte mittels UV-Transilluminator sichtbar und ein Bild mit der Software SynGene (SynGene, Cambridge, Großbritannien) aufgenommen, bearbeitet und abgespeichert werden. Die quantitative Auswertung erfolgte densitometrisch mit der Software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

### 3.2.5 Das *Flow Chamber*-Modell

Zur Exposition von AEC mit mechanischem Scherstress durch Luftströmung wurde in den Experimenten eine spezielle Luftstrom-Kammer (*Flow Chamber*-Modell) verwendet. Das *Flow Chamber*-Modell wurde von der Arbeitsgruppe Klinisches Sensing und Monitoring von Herrn Prof. Dr. rer. nat. E. Koch an der Medizinischen

Fakultät der Technischen Universität Dresden im Arbeitsbereich Medizinische Physik und Biomedizinische Technik entwickelt und hergestellt (Spiegel et al. 2006). Zur Untersuchung der Mechanotransduktion von Luftstrom-induziertem Scherstress in AEC entstand eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe Lungenforschung der Klinik für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Die *Flow Chamber* setzt sich aus drei Teilen zusammen: Einer Zellkulturkammer mit angrenzendem Luftstromkanal, einer Pumpstation und einer Kontrolleinheit (s. Abbildung 5). Die 22,6 cm x 12 cm x 2 cm große Zellkulturkammer aus Polycarbonat verfügt über sechs runde Vertiefungen, in die spezielle Zellsiebe eingesetzt werden können. Im Gegensatz zur konventionellen *air-liquid-interface* Zellkultur wurden die hier verwendeten AEC auf der Zellsieb-Außenseite kultiviert (s. Abschnitt 3.2.2.3 und Abbildung 2), sodass die apikale Seite der Zellen nach Einsetzen in die Zellkulturkammer direkt in den 1 mm breiten und 80 mm langen Luftstromkanal zeigte. Innen wurden die Zellsiebe mit 2 ml angewärmten HBS-Puffer befüllt, wodurch die Zellen durch die 0,4  $\mu$ m großen Poren der Zellsiebmembran während des Experiments feucht gehalten wurden.

Die Luftströmung wurde in der Pumpstation durch zwei sich symmetrisch gegeneinander bewegende Kolbenpumpen generiert, die sich entlang von miteinander verbundenen Zahnradstangen bewegten. Die Bewegung der Zahnradstangen wurde von einem elektrischen Motor angetrieben.

Der Luftstromkanal war mit Silikonschläuchen an die beiden Kolbenpumpen angeschlossen. Die Bewegungen der Kolbenpumpen wurden ständig durch eine optische Lichtschranke kontrolliert. Mithilfe eines von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. E. Koch programmierten Profils („Position mit SUB-VI komplett Notifier.vi“) der Software LabView (National Instruments, Austin, USA) konnten die Frequenz und das Pumpvolumen eingestellt werden (s. Abbildung 3). Die Software erstellte jeweils einen Graphen für die Position der Kolbenpumpen und die Strömungsgeschwindigkeit (s. *Position Chart* und *Strom Chart* in Abbildung 3 unten), sodass die Kontinuität des angewendeten Volumens und Druckes der Luftströmung während des Experiments überprüft werden konnte.

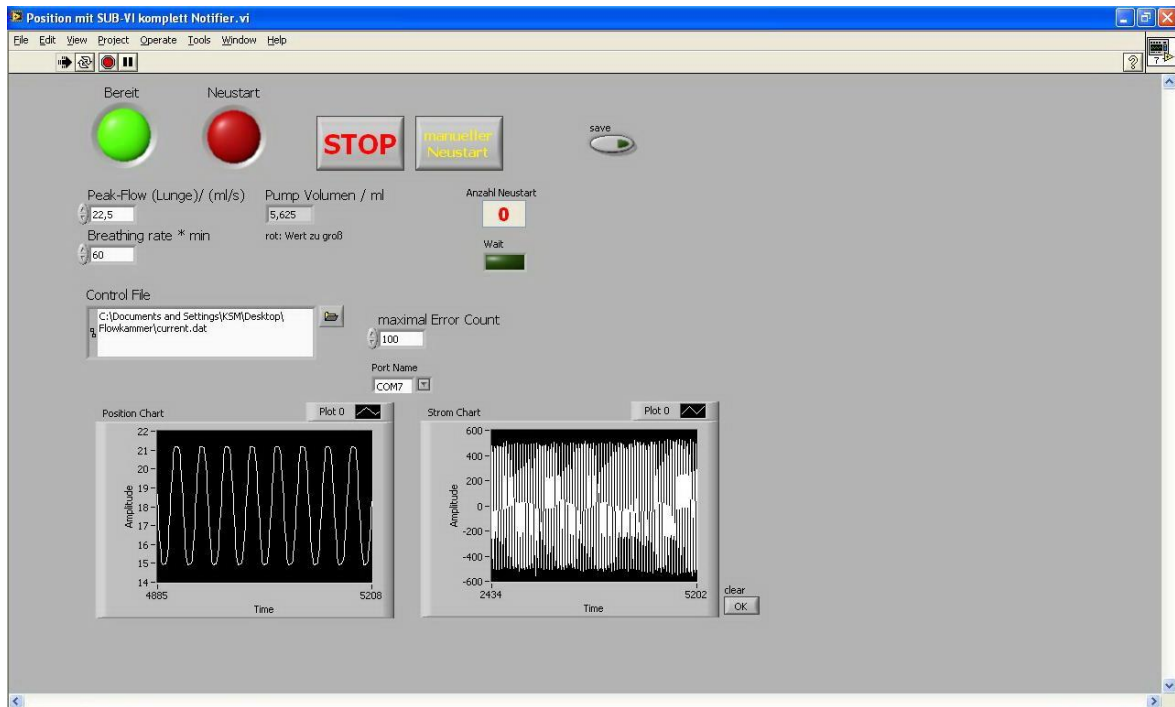


Abbildung 3: Bedienoberfläche der LabView Software zur Steuerung der Luftstrom-Parameter der *Flow Chamber*. *Position Chart* (links unten), *Strom Chart* (rechts unten).

Die Einstellung der Parameter Luftströmungsgeschwindigkeit und Scherstress orientierten sich an den Berechnungen von Chhabra und Prasad 2010) und (Tarran 2005). In den Experimenten wurden folgende Einstellungen zur Erzeugung des Luftstrom-Scherstresses verwendet:

- Pumpvolumen: 5,625 ml
- Pumpfrequenz: 1 Hz (60 pro Minute)
- *Peak-Flow*: 22,5 ml/s

### 3.2.5.1 Scherstress-Berechnung

Die Berechnung des zu erwartenden Scherstresses ( $\tau$ ), der auf die Oberfläche des Alveolarepithelzell-Monolayers im *Flow Chamber*-Modell wirkte, wurde von Wissenschaftlern der Universität Dresden durchgeführt. Folgender Algorithmus wurde verwendet:

$$\tau = \left( \frac{6 \cdot \mu}{b \cdot h^2} \right) \cdot f \cdot V \quad (3)$$

$\tau$ : Scherstress (Schubspannung)

$\mu$ : Viskosität von Wasserdampf-gesättigter Luft bei 22°C ( $17,1 \cdot 10^{-6}$  Pa\*s)

$b$ : Breite des Luftstromkanals (8 cm)

$h$ : Höhe des Luftstromkanals (0,1 cm)

$f$ : Pumpfrequenz (1 Hz)

$V$ : Volumenstrom (5,625 ml/s)

Der Scherstress im Luftstromkanal betrug nach diesen Berechnungen 7,2 mPa.

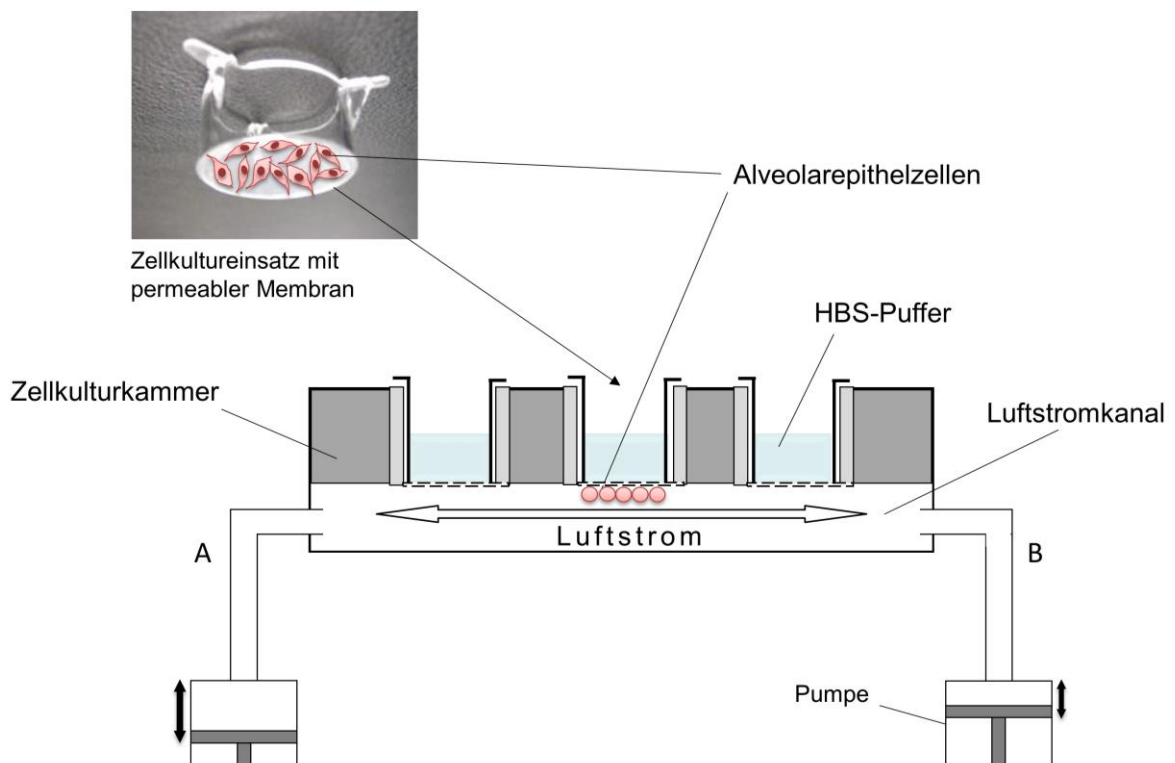


Abbildung 4: Schema des nach Spiegel et al. (2006) modifizierten *Flow Chamber* Modells mit eingesetztem Zellkultureinsatz und darauf kultivierten Alveolarepithelzellen (s. Foto oben links).



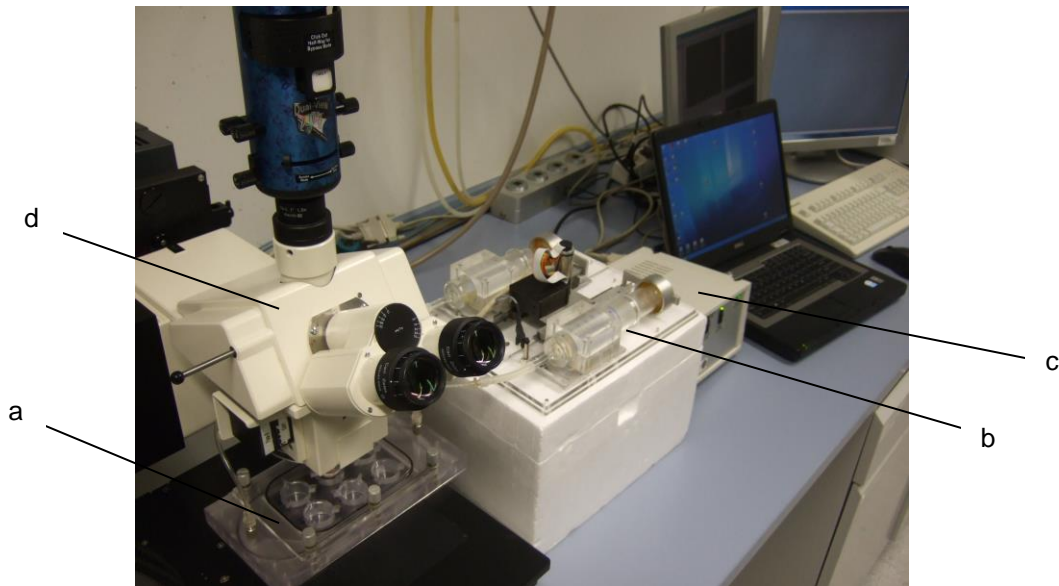


Abbildung 5: Experimenteller Versuchsaufbau. *Flow Chamber* Modell mit Zellkulturkammer (a), Pumpstation (b) und Kontrolleinheit (c) und Epifluoreszenzmikroskop (d).

### 3.2.6 Fluoreszenzmikroskopie

#### 3.2.6.1 Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszierende Farbstoffe (Fluorochrome) können durch Licht bestimmter Wellenlängen angeregt werden, d.h. die Elektronen erreichen dadurch ein höheres Energieniveau. Fallen die Elektronen auf das ursprüngliche Energieniveau zurück, wird Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Das emittierte Licht ist typischerweise langwelliger als das zur Anregung benötigte Licht und kann mithilfe eines Detektors quantifiziert werden.

#### 3.2.6.2 Aufbau des Epifluoreszenzmikroskops

Bei der Fluoreszenzmikroskopie mit dem Auflichtmikroskop (Axiotech Vario) wird das zu beobachtende Objekt von oben mit Licht einer leuchtstarken Lichtquelle (100 W Quecksilberdampflampe) angeleuchtet. Das Licht erreicht durch ein Shutter-kontrolliertes Filterrad und eine Blende (*Lambda 10-2 Optical Filter Changer*) einen optischen Filter (Anregungsfilter), der nur Licht einer speziellen Wellenlänge passieren lässt, das zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes führt. Durch den Filter für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung mittels Fura-2 konnte Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm (Exzitation) und 510 nm (Emission) passieren. Ein Strahlteiler

(Interferenzfilter) lenkte das Licht durch das Objektiv auf die Fluorochrom beladenen (z.B. mit Fura-2) bzw. exprimierenden (z.B. roGFP2) Zellen, in dem dann die Fluoreszenz entstand. Das typischerweise langwelligere emittierte Licht wurde vom Objektiv gesammelt und traf wieder auf den Strahlenteiler, der dieses Licht passieren ließ. Das am Präparat reflektierte Anregungslicht wurde durch den Strahlenteiler und einen Sperrfilter (Emissionsfilter) wieder zur Lampe gelenkt. Das emittierte Fluoreszenzlicht gelangte zum Okular bzw. zu einer hochauflösenden Digitalkamera (*Charge Coupled Device*, CCD). Die digitalen Bilder wurden von der Software MetaFluor® Version 6.3r5 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) verarbeitet, gespeichert und konnten später ausgewertet und quantifiziert werden. Auch die Belichtungszeit und Exzitationswellenlängen konnten über die Software MetaFluor® eingestellt werden. Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 alle 10 Sekunden für 50 ms mit der Wellenlänge 340 nm und für 220 ms mit der Wellenlänge 380 nm angeregt. Zur Messung von ROS im Mitochondrium wurden die roGFP2-exprimierenden Zellen mit 387 nm und 495 nm für jeweils 100 ms angeregt.

### 3.2.6.3 Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ mittels Fura-2-AM

Fura-2/AM ist ein membrangängiger Fluoreszenzfarbstoff, der in der hydrolysierten Form mit intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen Chelatkomplexe bilden kann und durch eine dadurch induzierte Konformationsänderung Veränderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  als Fluoreszenzänderungen anzeigt. Die im Austausch gegen eine negativ geladene Carboxylgruppe eingefügte neutrale Acetoxymethylester-Gruppe (AM) ermöglicht eine passive Diffusion ins Zytosol der Zellen. Endogene Esterasen spalten die AM-Gruppe ab, sodass Fura-2 die Membran nicht mehr passieren kann und im Zytosol der Zelle bleibt (O'Connor und Silver 2013). Wenn Fura-2  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gebunden hat, wird das Exzitationsmaximum des Fura-2-Moleküls von 363 nm ( $\text{Ca}^{2+}$ -frei) in den Blau-Bereich nach 335 nm ( $\text{Ca}^{2+}$ -gebunden) verschoben. Das Emissionsmaximum bleibt relativ unverändert bei ~ 510 nm.

### 3.2.6.3.1 Fura-2/AM Ansatz

Unter Lichtschutz wurden 50 µg Fura-2/AM in dem vom Hersteller gelieferten Kunststoffröhrchen in 10 µl Pluronic aufgelöst, mindestens 30 Sekunden gevortext und mit 90 µl HBS verdünnt und wiederholt gevortext (500 µM *working solution*). Es wurden Aliquots zu 20 µL in 1,5 ml-Eppendorfgefäße abgefüllt und bei -20°C eingefroren. Am Versuchstag waren 20 µl gelöstes FURA-2/AM in 980 µl HBS verdünnt (10 µM Endkonzentration) und im Wasserbad bei 37°C angewärmt worden, bevor die Zellen damit gefärbt wurden.

### 3.2.6.3.2 Fura-2 Ratio *Imaging*

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurden die auf den Zellkultureinsätzen kultivierten L2-Zellen für 60 Minuten bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator mit 10 µM Fura-2/AM beladen. Dazu wurden die Zellkultureinsätze in einer 6-*well*-Platte zweimal mit HBS-Puffer gewaschen und in ein mit 1 ml Fura-2/AM-Lösung gefülltes *well* gesetzt, sodass die Sieboberfläche mit dem Zellrasen vollständig bedeckt war.

Nach dreimaligem vorsichtigen Spülen der Zellen mit 2 ml HBS-Puffer wurde die überschüssige Flüssigkeit vom Zellsiebrand vorsichtig mit einem Zellstoff abgetupft und die Zellsiebe dann in die vorgesehene Einbuchtung der *Flow Chamber* eingebracht. Das Zellsieb wurde mit 2 ml angewärmtem HBS-Puffer befüllt und die Zellkulturkammer der *Flow Chamber* mit dem eingesetzten Zellsieb und den Fura-2 beladenen L2-AEC unter dem Objektiv des Epifluoreszenzmikroskops positioniert (s. Abbildung 5 und Abbildung 6).

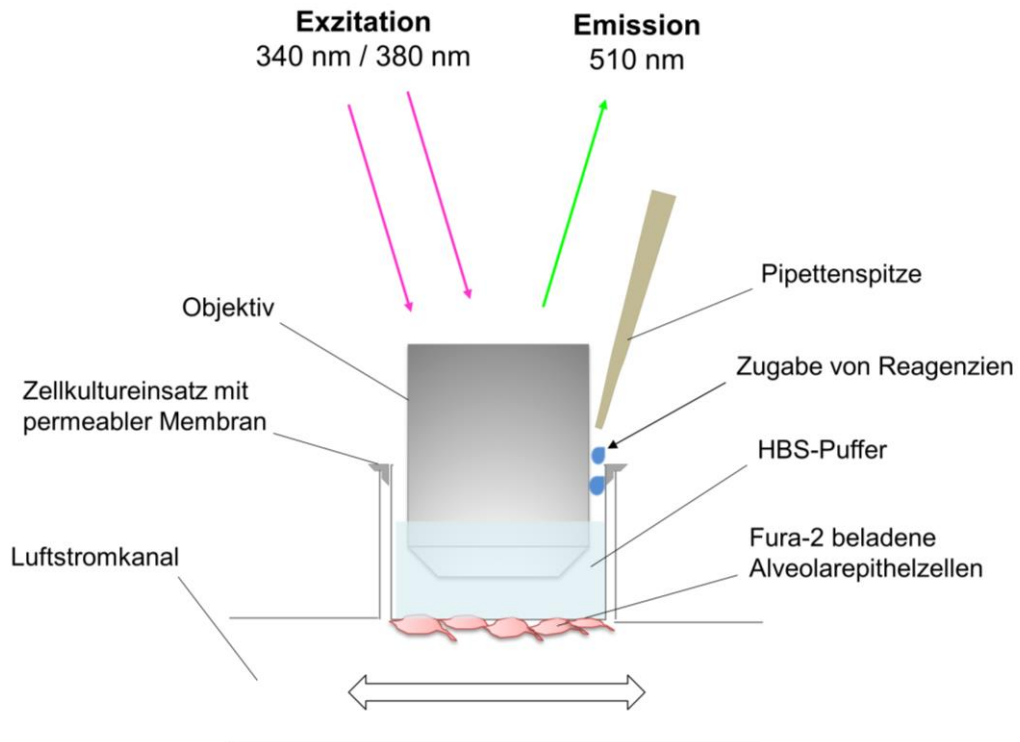


Abbildung 6:  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung in Alveolarepithelzellen mittels Epifluoreszenzmikroskop. Exzitation mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm. Emission von Licht der Wellenlänge 510 nm.

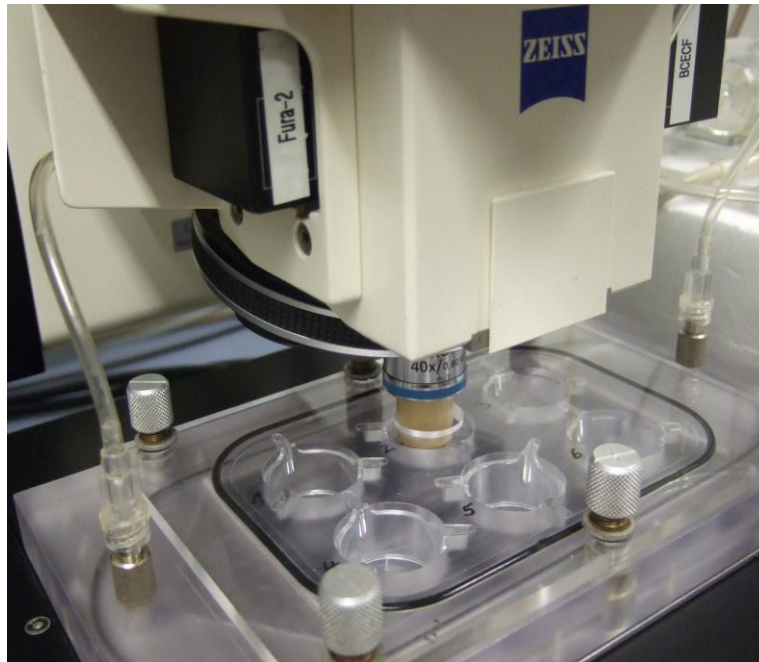


Abbildung 7: *Flow Chamber* Zellkulturkammer mit eingesetztem Zellsieb unter dem Epifluoreszenzmikroskop.

Wie oben beschrieben wird Fura-2 typischerweise mit den Exzitationswellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt (s. auch Abbildung 4). Nach Exzitation wurde aus den beiden emittierten Fluoreszenzintensitäten eine Ratio gebildet. Die Berechnung der Ratio und die daraus resultierende, nach Grynkiewicz kalibrierte  $[Ca^{2+}]$  (s. Abschnitt 3.2.6.3.3) wurde durch die Software MetaFluor® durchgeführt. Während des Experiments konnten in MetaFluor® sowohl die Originalintensitäten der gemessenen Wellenlängen als auch die errechnete Ratio in Falschfarben oder Graustufen angezeigt werden. Zusätzlich konnten Messpunkte auf den Bildern ausgewählt werden und alle Messwerte in Echtzeit graphisch dargestellt und abgespeichert werden.

## 3.2.6.3.3 Kalibrierung

Die Kalibrierung der Fura-2 Ratio erfolgte nach der Grynkiewicz-Gleichung (Grynkiewicz *et al.* 1985):

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \left( \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \cdot \left( \frac{R - Visc \cdot R_{min}}{Visc \cdot R_{max} - R} \right) \quad (4)$$

$K_d$	Dissoziationskonstante bei 37°C (Fura-2/AM: 224 nmol/l)
$\lambda 1$	Exzitationwellenlänge 1: 340 nm
$\lambda 2$	Exzitationwellenlänge 2: 380 nm
$F_{\lambda 1}$	Fluoreszenzintensität bei 340 nm Exzitationwellenlänge
$F_{\lambda 2}$	Fluoreszenzintensität bei 380 nm Exzitationwellenlänge
$R$	Ratio der Fluoreszenzintensitäten $F_{\lambda 1} / F_{\lambda 2}$
$R_{max}$	Ratio der Fluoreszenzintensitäten $F_{\lambda 1} / F_{\lambda 2}$ bei maximaler $[Ca^{2+}]$
$R_{min}$	Ratio der Fluoreszenzintensitäten $F_{\lambda 1} / F_{\lambda 2}$ bei minimaler $[Ca^{2+}]$
$S_{f2}$	Intensität bei Exzitation mit $\lambda 2$ 380 nm in $Ca^{2+}$ -freier Umgebung
$S_{b2}$	Intensität bei Exzitation mit $\lambda 2$ 380 nm in $Ca^{2+}$ -haltiger Umgebung
$Visc$	Viskositätskoeffizient (Wert 1 für wässrige Lösungen, je nach Versuchsprotokoll zwischen 0,7 und 0,85)

Tabelle 9: Legende zur Grynkiewicz-Gleichung.

Zur Kalibrierung wurden bei identischer Belichtungszeit und Filtereinstellung durch Messungen bei  $\lambda 1 = 340$  nm sowie  $\lambda 2 = 380$  nm Werte für  $R_{max}$ ,  $R_{min}$ ,  $S_{b2}$ , und  $S_{f2}$  zuerst unter  $Ca^{2+}$ -freien Bedingung mit  $Ca^{2+}$ -freiem Puffer und EGTA und dann mit  $Ca^{2+}$ -haltigem Puffer ermittelt. Die Kalibrierung wurde als Protocol-Datei in der Software MetaFluor gespeichert (Name: Cal\_Fura\_2.Januar).

## 3.2.6.4 Messung von mROS mittels roGFP2

roGFP2 ist ein redox-sensitives, grün-fluoreszierendes Protein, das 2004 an der Universität Oregon (USA) entwickelt wurde und als Biosensor für ROS verwendet werden kann (Hanson *et al.* 2004). Die Reduktions-Oxidations-Sensitivität beruht auf eingefügten Cystein-Gruppen an den Aminosäuren-Positionen 147 und 204, die abhängig vom Redoxstatus der Zelle Disulfidbrücken bilden können. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins und so zur Änderung der fluoreszierenden Eigenschaften. Kristallstrukturanalysen zeigten, dass im oxidierten

roGFP2 feste Disulfidbindungen und Strukturänderungen in der Hauptkette entstehen, die wahrscheinlich zu den Änderungen der Spektralfarbe führen. Das Exzitationsmaximum von vollständig oxidiertem roGFP2 (Disulfidform) liegt bei 400 nm, das Exzitationsmaximum der vollständig reduzierten Form (Thiolform) bei 490 nm. Die Emission erfolgt bei Licht der Wellenlänge 510 nm. roGFP2 zeigt intrazelluläre Änderungen im Redoxpotential in Echtzeit als schnelle, reversible Ratio-Änderung an (Hanson et al. 2004).

Da das eingesetzte roGFP2 Plasmid an die Zielsequenz der E1 $\alpha$  Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase gebunden war, wurde es selektiv in der mitochondrialen Matrix exprimiert. Mit dem Fluoreszenzmarker roGFP2 ist eine zielgerichtete Messung mitochondrialen ROS (mROS) möglich. Fehlerquellen wie eine nicht-uniforme Aufnahme, eine Ausschwemmung des Indikators oder Autooxidation können minimiert werden.

### 3.2.7 Immunfluoreszenz der Aktinfilamente und Zellkerne

Zur Doppelfärbung der Aktinfilamente und der Zellkerne wurden die AEC auf Zellsieben wie für die Fluoreszenzmikroskop-Experimente kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 3,5 %-igem Formaldehyd für 10 Minuten bei RT fixiert. Wieder wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und dann für 4 Minuten in 0,1 % Triton X in PBS inkubiert. Als nächstes erfolgte die Färbung des F-Aktins mit dem fluoreszierenden Antikörper Alexa phalloidin 488 mit 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS + 1 % BSA für 20 Minuten bei RT und Dunkelheit. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Gegenfärbung mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33342 für 10 Minuten bei RT und Dunkelheit. Wieder wurden die Zellen mit PBS und schließlich mit Aqua ad iniectabilia gewaschen und mit Fluoromount-G eingedeckelt. Die gefärbten Zellsiebe wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop AxioTech Vario mit einem 40 x-Wasserimmersionsobjektiv und mit einem 100 x-Ölimmersionsobjektiv bei 488 nm (Aktin) und 340 nm (Zellkern) untersucht und jeweils 10 Bilder an unterschiedlichen Stellen auf dem Zellsieb aufgenommen.

### 3.2.8 Glykokalyxdegradierung

Wie in Abschnitt 1.4.1 beschrieben, ist ein Hauptbestandteil der Glykokalyx das Glykosaminoglykan Heparansulfat. Zur Entfernung der Heparansulfatketten wurden AEC mit den Enzymen Heparinase I, Heparinase III oder K5-Heparanlyase inkubiert (s. Tabelle 10).

### 3.2.9 Angewendete Substanzen

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Inkubationszeit [min]</b>
Fura-2/AM	20 $\mu$ M	60
DPI	10 $\mu$ M	10-60
Heparinase I	30 mU/ml	60
Heparinase III	100 mU/ml	60
K5-Heparanlyase	8 mU/ml	30
L-NAME	500 $\mu$ M	60
NAC	1 mM	60
PEG-Katalase	200 U/ml	60
PEG-SOD	10 U/ml	60
Rotenon	50 $\mu$ M	10-60

Tabelle 10: Konzentrationen und Inkubationszeiten der verwendeten Substanzen.



### 3.2.10 Experimentelles Versuchsprotokoll

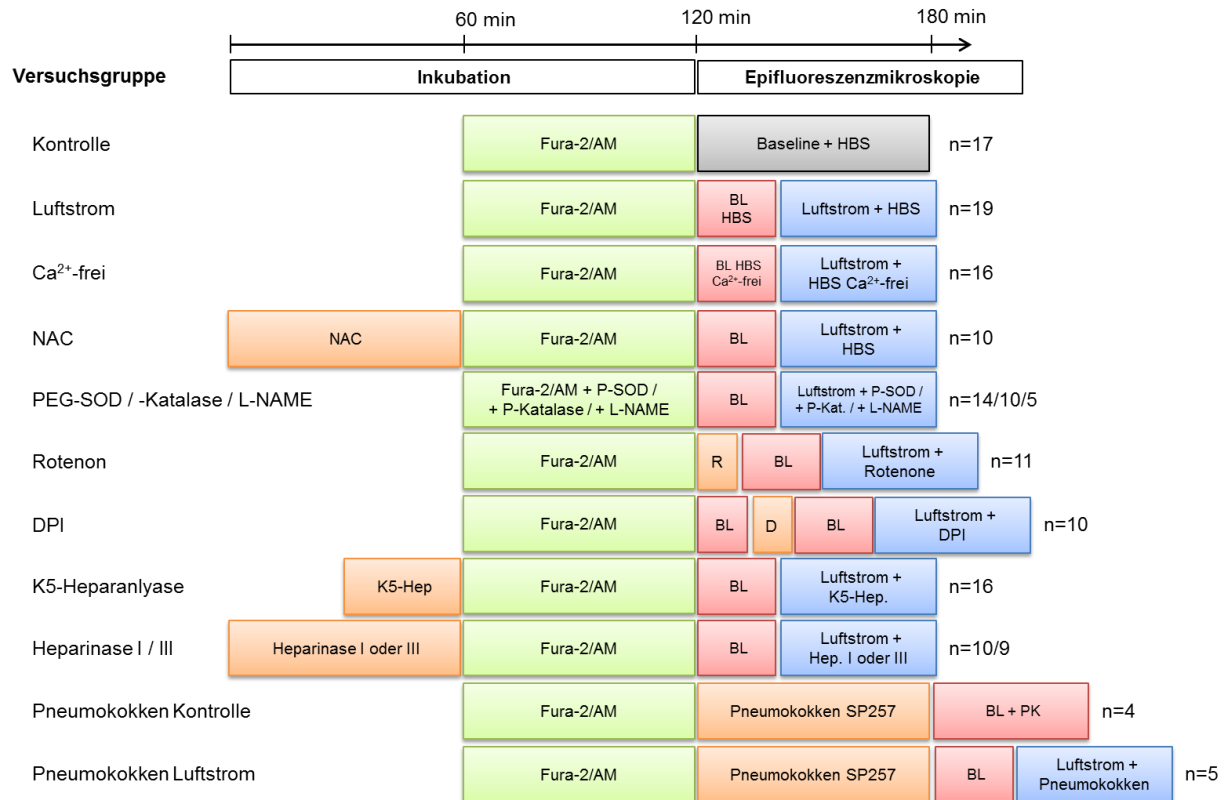


Abbildung 8: Experimentelles Protokoll. n: Versuchsanzahl; BL: *baseline*; HBS: HBS-Puffer, NAC: N-Acetylcystein; P-SOD: Polyethylenglykol-Superoxiddismutase; P-Kat.: Polyethylenglykol-Katalase; R: Rotenon; D: DPI; K5-Hep.: K5-Heparanlyase; Hep. I / III: Heparinase I oder III; PK: Pneumokokken SP257

### 3.2.11 Auswertung

Nach Versuchsende konnten die gespeicherten Bilder der Fluoreszenzmessung mit der Software MetaFluor® abgespielt und erneut ausgewertet werden. Zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten konnten kreisförmige Messregionen in das Zytosol der Zellen gesetzt werden und mittels „log“ Funktion die durchschnittlichen Intensitäten der einzelnen Wellenlängen (*average wave length*), die Ratio der beiden Wellenlängen und die kalibrierte Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in eine Excel-Datei (Microsoft Office 2003, Microsoft, Redmond, USA) übertragen werden. Aus den Werten der Exceldatei wurden Liniengraphen mit der Software Sigma Plot 12 (Systat Software, Chicago, USA) erstellt.

Bei den  $\text{Ca}^{2+}$ -Experimenten wurden pro Versuch jeweils zehn Zellen zur Auswertung herangezogen. Dazu wurden in jeder Zelle fünf repräsentative Oszillationsamplituden in den ersten 20 Minuten (Messung unter Ausgangsbedingung, d.h. *baseline*) und fünf repräsentative Oszillationsamplituden während der Luftstromexposition (ab der 20. Minute) gemessen. Die Werte wurden in einer weiteren Exceldatei notiert und für jede Zelle eine mittlere *baseline*- und eine mittlere Luftstrom-Amplitude errechnet. Aus den mittleren Amplituden der zehn Zellen unter Ausgangsbedingung und während Luftstromexposition wurde der Mittelwert gebildet und dann die Differenzen zwischen Luftstromexpositions-Amplituden und *baseline*-Amplituden für jeden Versuch errechnet.

Nach Messung der mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies mittels roGFP2 wurde die Steigung der Ratio und die maximale Ratio-Oszillationsamplitude während Luftstromexposition gegenüber Ausgangsbedingung ermittelt.

### 3.2.12 Statistik

Da die intrazellulär gemessenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen Schwankungen unterlegen waren, die zu einer schiefen Verteilung des Datensatzes führten, wurden die gemessenen Amplituden bzw. Amplituden-Differenzen logarithmiert.

Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) von n unabhängigen Experimenten dargestellt. Es wurde eine deskriptive Statistik durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (One Way Analysis of Variance, ANOVA) mit nachfolgendem LSD Post-hoc-Test analysiert. Der t-Test wurde zur Berechnung der Signifikanzen bei der Messung mittels roGFP2 verwendet. Das Signifikanzniveau betrug  $p < 0,05$ . Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software SPSS Statistics Version 21 (IBM, Armonk, USA).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Epifluoreszenzmikroskopie-Experimente

#### 4.1.1 $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Messungen

##### 4.1.1.1 Das Luftstrom-induzierte $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Signal in AEC

Um die Wirkung von laminarer periodischer Luftströmung auf L2-AEC zu untersuchen, wurden die Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  mithilfe des  $Ca^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 epifluoreszenzmikroskopisch gemessen. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Fura-2 Ratio in AEC eines Experiments unter Ausgangsbedingung (d.h. ohne Luftstromexposition, s. Abbildung 9 a) und während Luftstromexposition (s. Abbildung 9 b) in Falschfarbendarstellung. Das  $Ca^{2+}$ -haltige Zytoplasma der AEC stellte sich unter Ausgangsbedingungen unter dem Mikroskop kontinuierlich blau bis grün dar. Während der Luftstromexposition konnte in einzelnen AEC ein wiederholt auftretender, roter Farbumschlag beobachtet werden (s. Abbildung 9 b). Diese Farbänderung in den Rotbereich bedeutete eine Zunahme der Fura-2 Ratio und damit eine Zunahme der  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ .

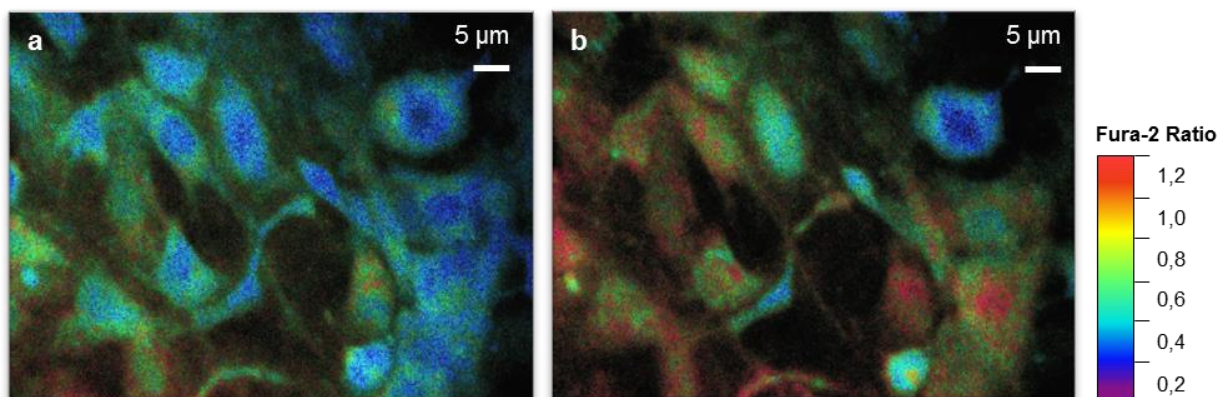


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopbild der Fura-2 Ratio (340 nm / 380 nm) in Falschfarben in L2-AEC, (a) unter Ausgangsbedingung, (b) während Luftstromexposition.

Der  $Ca^{2+}$ -Anstieg dauerte nur wenige Sekunden und bildete sich meist sofort bis auf das Ausgangsbedingungs-niveau zurück. Dabei blieb die mittlere  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  während Luftstromexposition konstant. Die mittlere Oszillationsamplitude dieses kurzzeitigen  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiegs betrug 120-200 nM.

Graphisch dargestellt zeigten die AEC während der Messung unter Ausgangsbedingung  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen mit niedriger Amplitude im Mittel um  $(17,7 \pm 0,6)$  nM ( $n = 172$ ). Während der Luftstromexposition nahmen die Amplituden dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen zu (s. Abbildung 10, rote Pfeile), was je nach Ausprägung fluoreszenzmikroskopisch durch einen Farbumschlag in den Rotbereich erkennbar war (s. Abbildung 9 b).

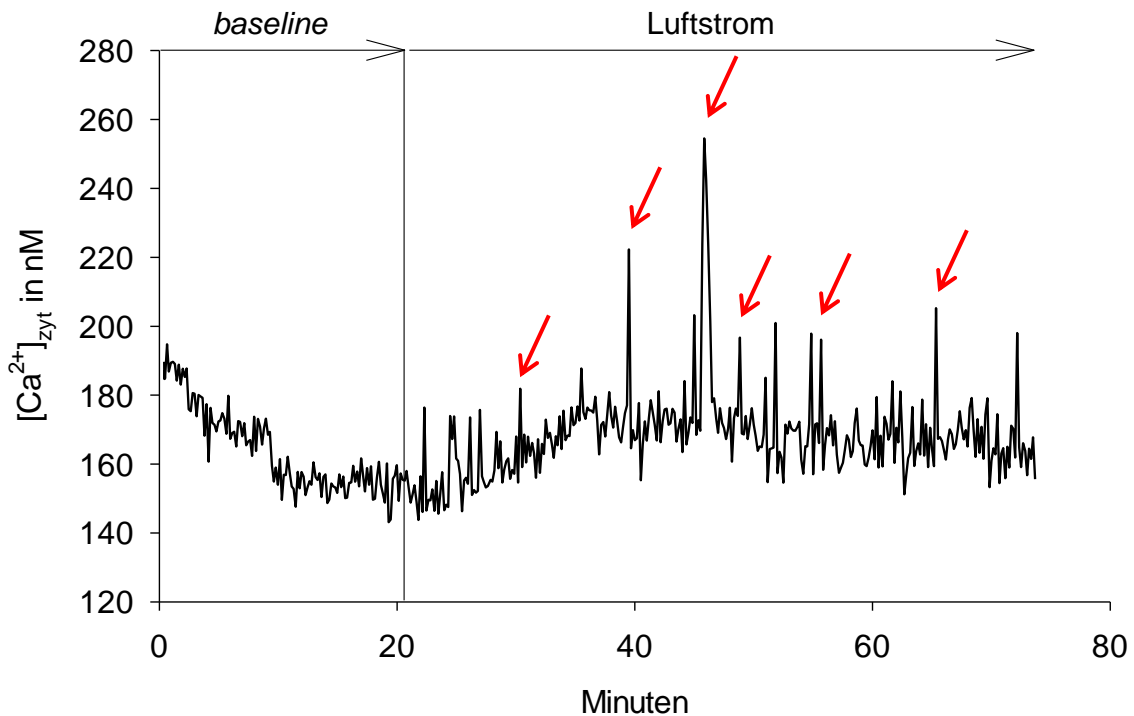


Abbildung 10:  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  in nM in einer exemplarischen AEC während eines Experiments unter Ausgangsbedingung (*baseline*) und während Luftstromexposition. Die roten Pfeile zeigen auf  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Oszillationen mit erhöhter Amplitude.

Ohne Luftstromexposition nahm die mittlere  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Oszillationsamplitude ( $A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ ) der Kontrollgruppe um  $(0,4 \pm 1,3)$  nM bzw.  $(7,1 \pm 6,0)$  % vs. Ausgangsbedingung zu ( $n = 17$ ). Die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  in den L2-AEC war auch unter Ausgangsbedingung, d.h. ohne Luftstromexposition, geringen Schwankungen unterlegen. Während der Luftstromexposition stieg  $A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  in der Luftstromgruppe um  $(5,3 \pm 0,9)$  nM bzw.  $(40,9 \pm 8,5)$  % signifikant an ( $n = 19$ ). Im Folgenden wird diese spezifische Antwort (d.h. die Zunahme der mittleren  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Oszillationsamplitude gegenüber Ausgangsbedingung ( $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ )) Luftstrom-induziertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal genannt.

Zur Untersuchung der Herkunft des  $\text{Ca}^{2+}$  bei der Luftstrom-induzierten  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  wurden Experimente mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freien und EGTA versetzten Puffer durchgeführt. Unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingung war das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal vollständig inhibiert.  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  schwankte während Luftstromexposition um  $(-0,3 \pm 1,2)$  nM bzw.  $(5,1 \pm 5,8)$  % ( $n = 16$ , s. Abbildung 11). Der negative Wert für  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  ergab sich aus der Auswertung, da dabei die Differenz zwischen  $A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  in der *baseline* und während Luftstromexposition ermittelt wurde.

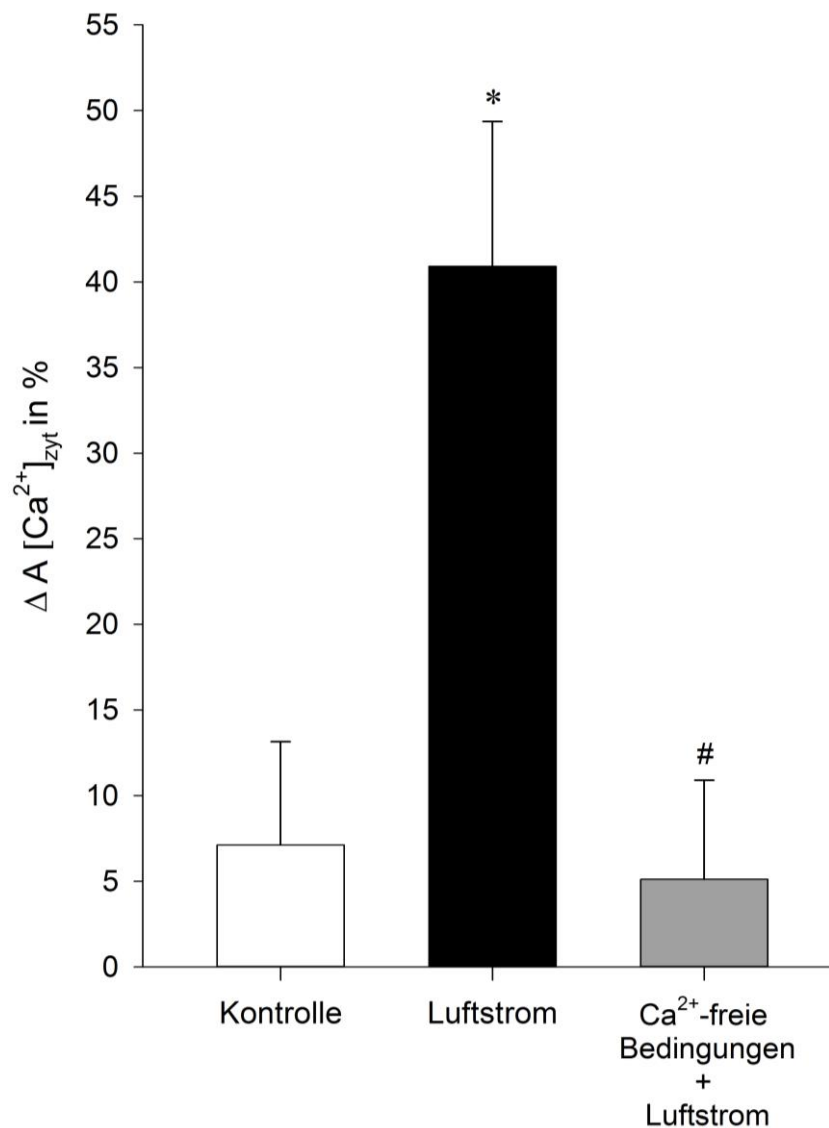


Abbildung 11:  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  in Prozent. Dargestellt sind Kontroll- (weiß) und Luftstromgruppe (schwarz) und die Versuchsgruppe, die unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen durchgeführt wurde (grau). (\* ( $p < 0,05$ ) vs. Kontrolle, # ( $p < 0,05$ ) vs. Luftstrom).

#### 4.1.1.3 ROS-modifizierende Substanzen

Um den Einfluss von ROS am Luftstrom-induziertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu untersuchen, wurden AEC mit unterschiedlichen Antioxidantien bzw. redoxaktiven Substanzen inkubiert. Nach Vorinkubation mit dem Antioxidans NAC betrug  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  ( $0,9 \pm 1,8$ ) nM bzw. ( $15,2 \pm 13,0$ ) % und lag damit unter dem Wert der Luftstromgruppe ( $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}} = (40,9 \pm 8,5)$  %, ( $n = 10$ )).

Nach Inkubation mit dem Superoxidation-degradierenden Enzym PEG-SOD kam es zu einer Zunahme von  $A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  auf ( $4,2 \pm 2,2$ ) nM bzw. um ( $33,1 \pm 13,9$ ) % vs. Ausgangsbedingungen ( $n = 14$ ).

Alveolarepithelzellen, die vorher mit dem  $\text{H}_2\text{O}_2$  metabolisierendem Enzym PEG-Katalase inkubiert wurden, zeigten eine Zunahme von  $A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  von ( $4,0 \pm 1,2$ ) nM bzw. ( $32,4 \pm 11,0$ ) % vs. Ausgangsbedingungen ( $n = 10$ ).

Die Inkubation mit dem mitochondrialen Komplex I Inhibitor Rotenon hatte keinen Effekt auf das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal:  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  betrug ( $7,6 \pm 1,9$ ) nM bzw. ( $47,8 \pm 10,8$ ) % ( $n = 11$ ).

Eine vollständige Inhibition des Luftstrom-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals wurde durch Inkubation mit dem unspezifischen Flavoproteininhibitor DPI erreicht. Während Luftstromexposition betrug  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  ( $-0,5 \pm 1,7$ ) nM bzw. ( $-1,7 \pm 8,4$ ) % ( $n = 10$ ).

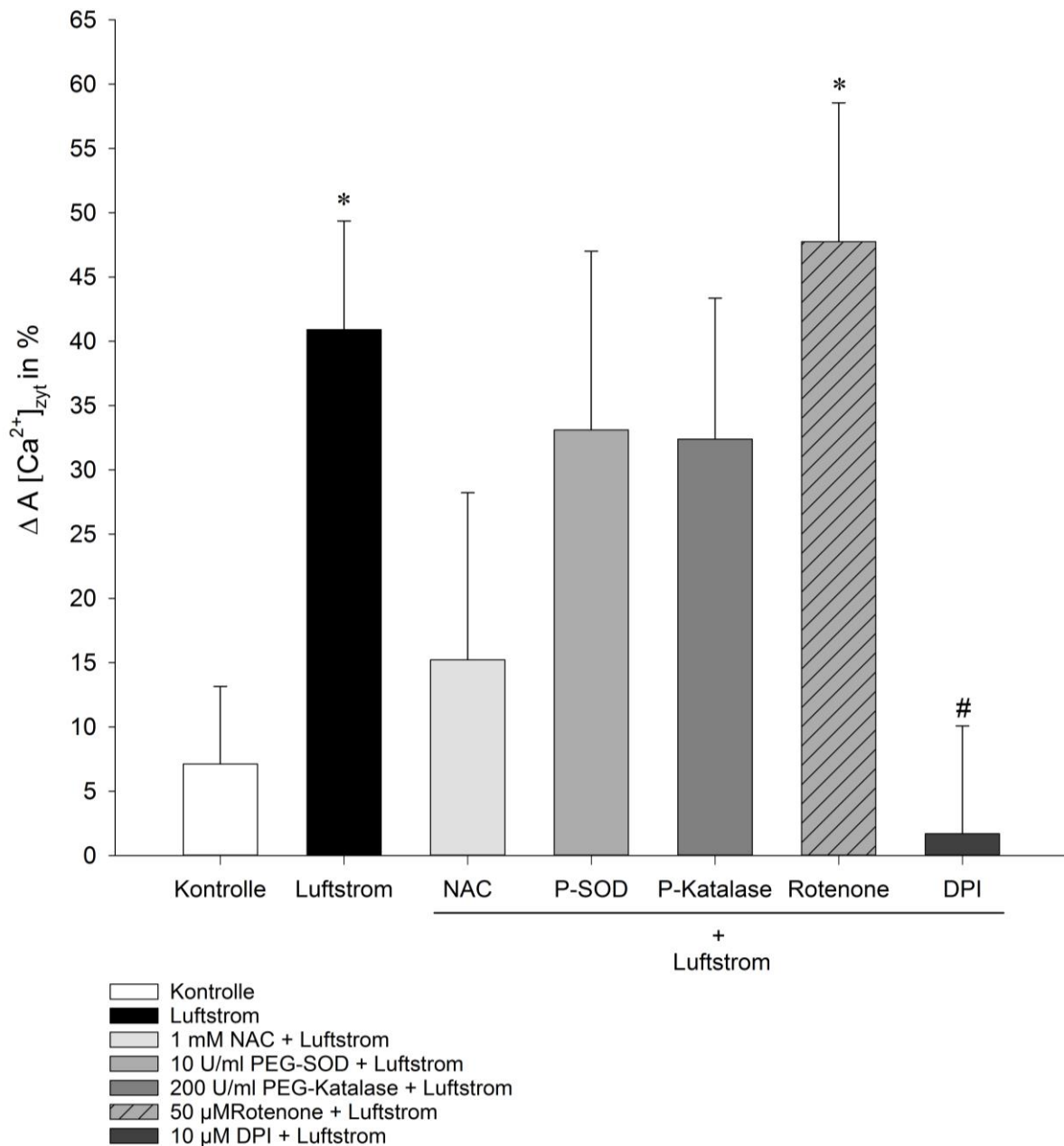


Abbildung 12:  $\Delta A [Ca^{2+}]_{zyt}$  in Prozent. Dargestellt sind Kontroll- (weiß) und Luftstromgruppe (schwarz) und die Versuchsgruppen, bei denen redoxaktive Substanzen angewendet wurden (grau/gemustert, s. Legende). (\* ( $p < 0,05$ ) vs. Kontrolle, # ( $p < 0,05$ ) vs. Luftstrom).

#### 4.1.1.4 Herunterregulierung der NOX4-Genexpression

Da nach Inkubation mit DPI das Luftstrom-induzierte  $Ca^{2+}$ -Signal vollständig inhibiert war, wurden die von DPI inhibierten Enzymsysteme genauer untersucht. Eine Gruppe dieser sogenannten Flavoenzyme sind die NADPH-Oxidasen (s. Ab-

schnitt 1.4.3). Um den Einfluss der NADPH-Oxidasen zu untersuchen, wurde zunächst die Expression der unterschiedlichen Isoformen auf Gen-Ebene mittels PCR untersucht. Eine spezifische DNA-Sequenz der Isoform NOX4 konnte in cDNA-Proben von L2-AEC mithilfe von geeigneten NOX4 Primern in der PCR repliziert werden und war deutlich in den auf Agarose-Gelen aufgetragenen PCR-Produkten erkennbar. Um den Einfluss der NADPH-Oxidase 4 auf das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu untersuchen, wurde die Transkription des NOX4-Gens durch siRNA vermittelte RNA-Interferenz inhibiert. Nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde die Herunterregulierung der NOX4 in cDNA aus Zellen, die zuvor mit siRNA gegen NOX4 transfiziert wurden, semiquantitativ mithilfe einer PCR und anschließender Auftragung der Produkte auf ein Agarose-Gel ermittelt. Durch Analyse der Bandenintensitäten mithilfe der Software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) konnte eine ca. 90 %-ige Herunterregulierung in den mit siRNA gegen das NOX4-Gen transfizierten Zellen festgestellt werden.

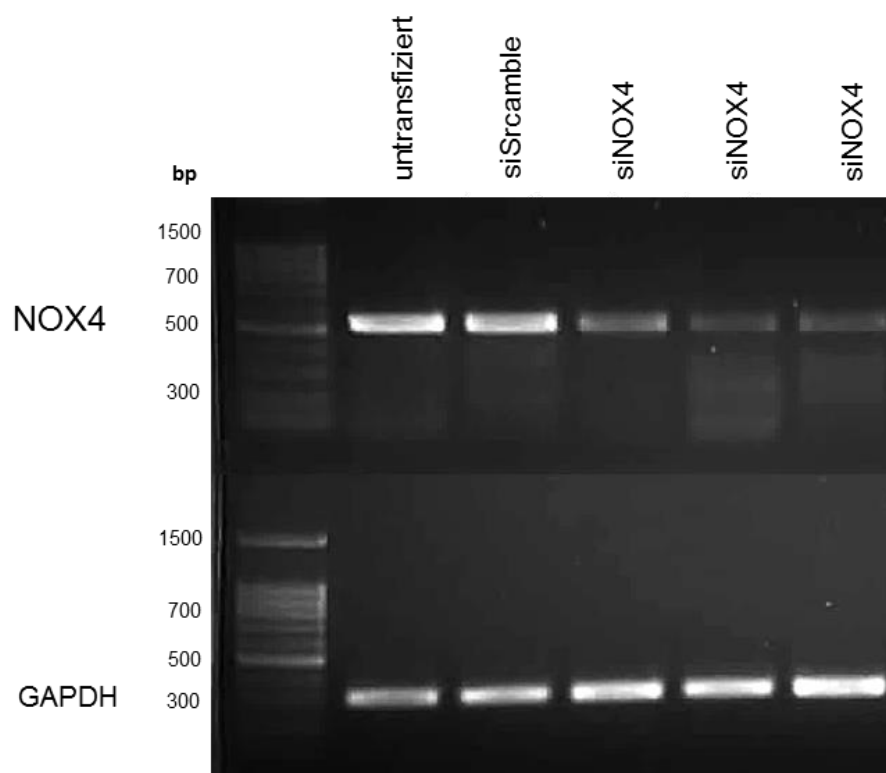


Abbildung 13: PCR-Gel zur Überprüfung der Herunterregulierung der NOX4-Genexpression. Obere Banden: NOX4, untere Banden: *housekeeping gene* GAPDH; Proben von links nach rechts: untransfizierte Zellen, mit 80 nM Kontroll-siRNA (*scrambled* siRNA) transfizierte Zellen, mit 80 nM siRNA gegen NOX4 transfizierte Zellen. Die Letzteren zeigten ein deutlich abgeschwächtes Banden-Signal, d.h. die Konzentration der NOX4 war in diesen Zellen deutlich verringert.



Die Zellen, die mit unspezifischer Kontroll-siRNA (siScramble) transfiziert worden waren, zeigten eine Zunahme der  $A[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  von  $(8,0 \pm 2,5)$  nM bzw.  $(45,1 \pm 13,6)$  % vs. Ausgangsbedingung ( $n = 7$ ) und damit keine signifikant unterschiedliche Antwort auf Luftstromexposition im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen (s. Abbildung 14, Luftstromgruppe (schwarzer Balken):  $\Delta A[Ca^{2+}]_{\text{zyt}} = (40,9 \pm 8,5)$  %). Nach Herunterregulierung des NOX4-Gens mittels siRNA-vermittelter RNA-Interferenz war das Luftstrom-induzierte  $Ca^{2+}$ -Signal verstärkt. Die Zellen dieser Gruppe (siNOX4) wiesen ein signifikant höheres  $Ca^{2+}$ -Signal während Luftstromexposition auf als Zellen mit unbeeinflusster NOX4-Transkription (siScramble- und Luftstromgruppe).  $\Delta A[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  während Luftstromexposition betrug nach NOX4-Herunterregulierung  $(13,9 \pm 2,9)$  nM bzw.  $(104,5 \pm 24,7)$  % ( $n = 18$ ).

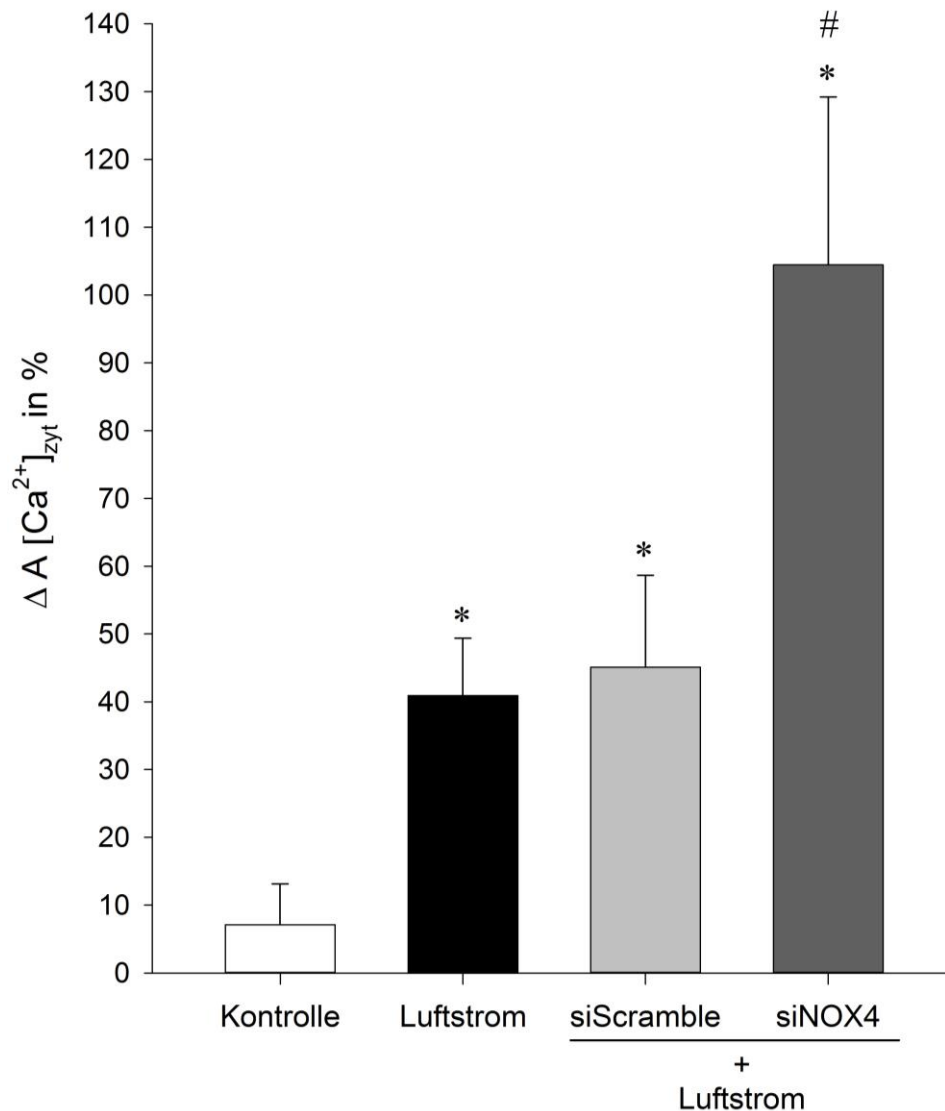


Abbildung 14:  $\Delta A [Ca^{2+}]_{zyt}$  in Prozent. Dargestellt sind Kontroll- (weiß) und Luftstromgruppe (schwarz) und die Versuchsgruppen, die 48 Stunden vorher entweder mit 80 nM *scrambled* siRNA (hellgrau) oder mit 80 nM NOX4 siRNA (dunkelgrau) transfiziert wurden. (\* ( $p < 0,05$ ) vs. Kontrolle, # ( $p < 0,05$ ) vs. Luftstrom).

#### 4.1.1.5 Inhibition der NO-Synthase

Eines der von DPI inhibierten Flavoenzyme ist die Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase). Um den Einfluss der NO-Synthase auf das Luftstrom-induzierte  $Ca^{2+}$ -Signal zu beurteilen, wurde das Enzym selektiv durch den kompetitiven Inhibitor L-NG-Nitroarginine-Methylester (L-NAME) gehemmt. Die Inkubation mit L-NAME als Inhibitor der NO-Synthase wirkte gegensätzlich zur Inhibition mit DPI.

Nach L-NAME betrug  $\Delta A [Ca^{2+}]_{zyt}$  ( $12,8 \pm 2,8$ ) nM bzw.  $122,3 \pm 29,9$  % ( $n = 5$ ) und war damit gegenüber der Luftstromgruppe signifikant erhöht.

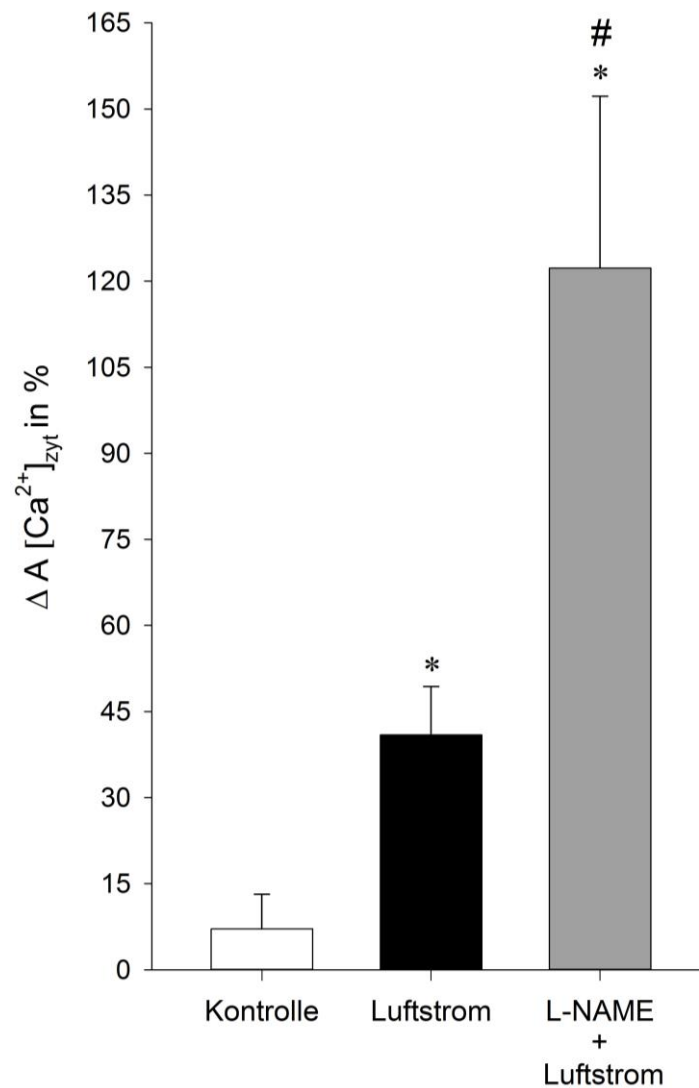


Abbildung 15:  $\Delta A [Ca^{2+}]_{zyt}$  in Prozent. Dargestellt sind Kontroll- (weiß) und Luftstromgruppe (schwarz), die Versuchsgruppen, die vor Versuchsbeginn mit  $500 \mu\text{M}$  L-NAME inkubiert wurden (grau). (\* ( $p < 0,05$ ) vs. Kontrolle, # ( $p < 0,05$ ) vs. Luftstrom).

#### 4.1.1.6 Inkubation mit Pneumokokken

Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, sind vorgeschädigte Lungen besonders anfällig für die Entstehung weiterer, beatmungsassoziierter Lungenschäden. Eine Form der Vorschädigung ist die bakterielle Infektion durch Pneumokokken. Um diesen Zustand zu simulieren, wurden AEC vor Versuchsbeginn 60 Minuten lang mit Pneumokokken im Brutschrank inkubiert.

In AEC, die vor Versuchsbeginn mit Pneumokokken inkubiert und unter Ausgangsbedingungen gemessen worden waren, schwankte  $\Delta A [Ca^{2+}]_{zyt}$  um  $(1,9 \pm 1,4)$  nM bzw.  $(14,1 \pm 7,8)$  % ( $n = 4$ ) und unterschied sich damit nicht von der Kontrollgruppe ohne Pneumokokken-Inkubation (Kontrollgruppe:  $\Delta A [Ca^{2+}]_{zyt} = (7,1 \pm 6,0)$  %).

Nach Pneumokokken-Vorinkubation nahm  $\Delta A [Ca^{2+}]_{zyt}$  während Luftstromexposition um  $(15,8 \pm 7,4)$  nM bzw.  $(109,3 \pm 26,5)$  % zu ( $n = 5$ ). Damit war  $\Delta A [Ca^{2+}]_{zyt}$  in der Luftstromgruppe nach Pneumokokken-Inkubation signifikant größer als  $\Delta A [Ca^{2+}]_{zyt}$  in der Luftstromgruppe ohne Pneumokokken-Inkubation.

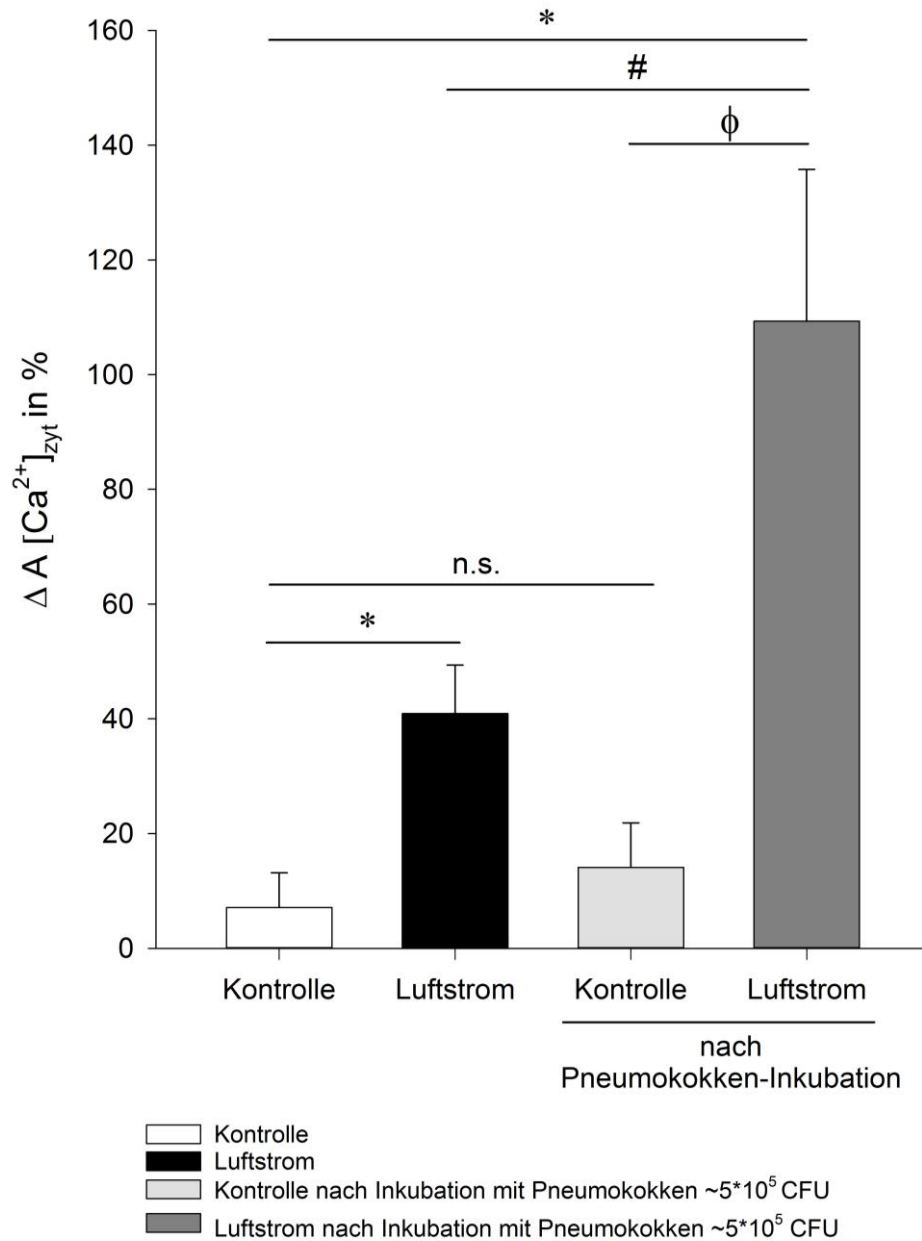


Abbildung 16:  $\Delta A [Ca^{2+}]_{zyt}$  in Prozent. Dargestellt sind Kontroll- (weiß) und Luftstromgruppe (schwarz) ohne vorherige Pneumokokken-Inkubation, sowie Kontroll- (hellgrau) und Luftstromgruppe (dunkelgrau) nach vorherige Pneumokokken-Inkubation mit  $\sim 5 \cdot 10^5$  CFU. (\* ( $p < 0,05$ ) vs. Kontrolle, # ( $p < 0,05$ ) vs. Luftstrom,  $\phi$  ( $p < 0,05$ ) vs. Kontrolle nach Pneumokokken-Inkubation, n.s. = nicht signifikant).

#### 4.1.1.7 Glykokalyx-Degradation

Eine andere Form der Vorschädigung des Lungenepithels ist der Verlust der Glykokalyx der Zelloberfläche wie z.B. der Abbau von Heparansulfatketten (s. Abschnitt 1.4.1). Um eventuelle Veränderungen in der Mechanotransduktion von Luftstrom-Scherstress zu untersuchen, wurden die oberflächlichen Heparansulfatketten der Glykokalyx durch enzymatischen Verdau entfernt.

Die differenzierte Glykokalyx-Degradation durch die drei angewendeten Enzyme hatte unterschiedliche Auswirkungen auf das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Nach Inkubation der AEC mit K5-Heparanlyase und Heparinase I war das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal abgeschwächt.  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  betrug nach K5-Heparanlyase Inkubation ( $1,1 \pm 1,8$ ) nM bzw. ( $18,0 \pm 11,9$ ) % ( $n = 16$ ). Nach Heparinase I war  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  ( $2,5 \pm 2,9$ ) nM bzw. ( $9,9 \pm 11,8$ ) % signifikant reduziert im Vergleich zur Luftstromgruppe ( $n = 10$ ). Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, die zuvor mit Heparinase III inkubiert wurden, ein signifikant erhöhtes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal als Antwort auf Luftstromexposition gegenüber Ausgangsbedingung. Es kam zu einer Zunahme der  $A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  auf ( $10,3 \pm 4,9$ ) nM bzw. ( $79,1 \pm 39,5$ ) % vs. Ausgangsbedingung ( $n = 9$ ).

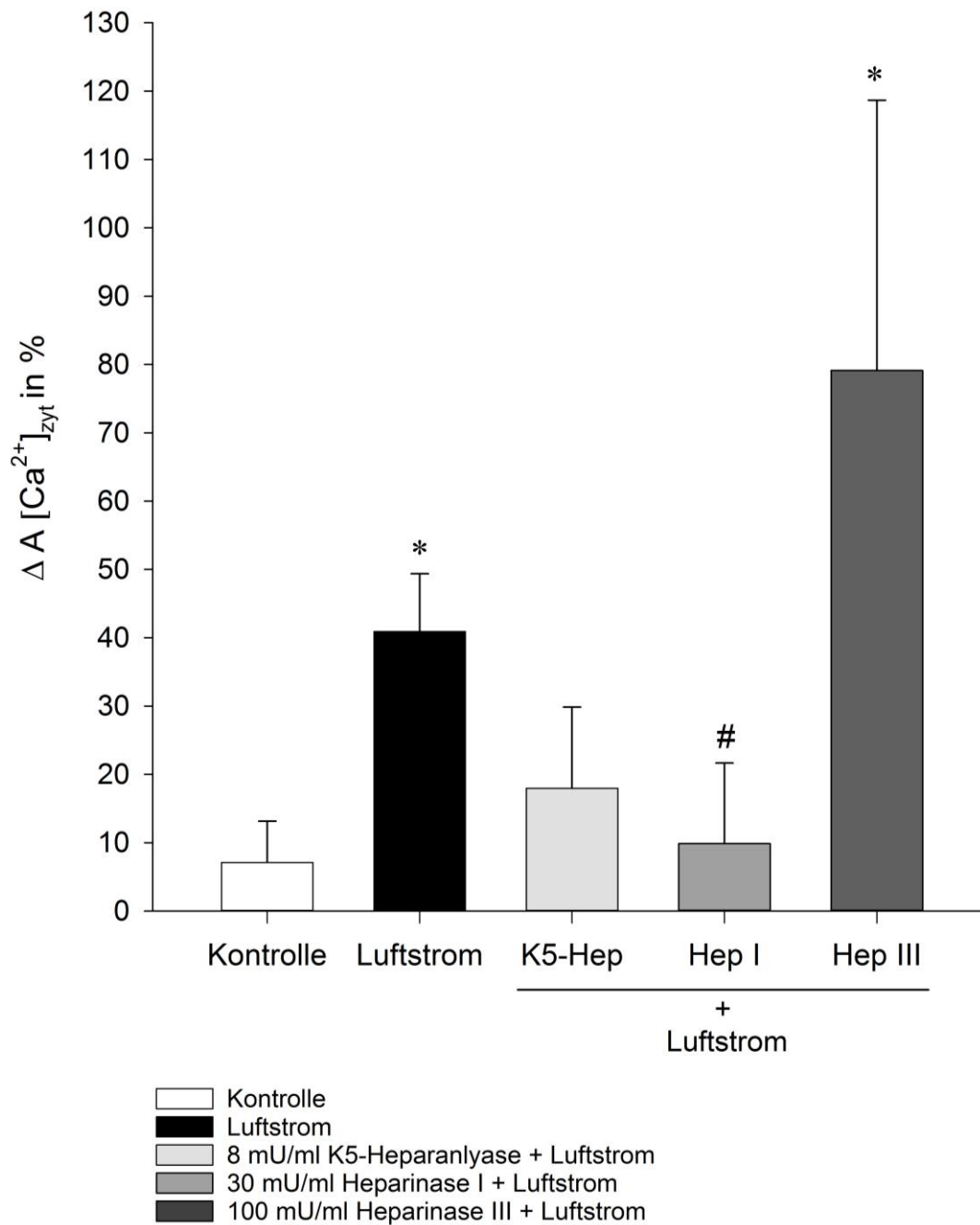


Abbildung 17:  $\Delta A [Ca^{2+}]_{zyt}$  in Prozent. Dargestellt sind Kontroll- (weiß) und Luftstromgruppe (schwarz) und die Versuchsgruppen, die nach Glykokalyx-Degradation mittels K5-Heparanlyase (hellgrau), Heparinase I (mittelgrau) oder Heparinase III (dunkelgrau) durchgeführt wurden. (\* ( $p < 0,05$ ) vs. Kontrolle, # ( $p < 0,05$ ) vs. Luftstrom).

#### 4.1.2 mROS-Produktion während Luftstromexposition

Zur Messung der mROS-Produktion wurden die AEC mit roGFP2, einem redoxsensitiven GFP transfiziert, das eine spezifische mitochondriale Zielsequenz der Pyruvatdehydrogenase E1 $\alpha$  Untereinheit enthielt. Nach 48 Stunden wurde die Transfektionseffizienz fluoreszenzmikroskopisch evaluiert. Die mitochondriale Expression war an dem spezifischen Verteilungsmuster der fluoreszierenden Proteine zu erkennen (s. Abbildung 18). Zur ROS-Messung in den Mitochondrien wurden Zellen ausgewählt, in denen einerseits die roGFP2-Fluoreszenzintensität deutlich erkennbar, andererseits das Signal nicht zu stark war (z.B. s. Abbildung 18 eingekreiste Zelle).

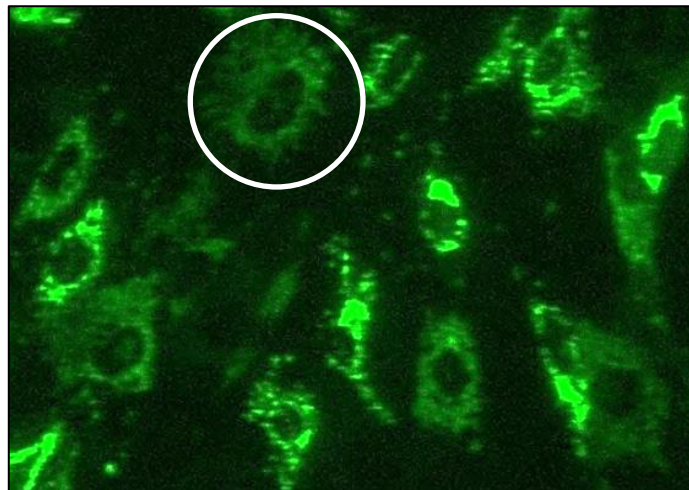


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopbild der roGFP2 Expression in den Mitochondrien von L2-AEC. Der weiße Kreis markiert beispielhaft eine Zelle mit GFP2-Expression, die zur mROS-Messung ausgewählt wurde.

Die ROS-Produktion in den Mitochondrien von L2-AEC wurde epifluoreszenzmikroskopisch in Echtzeit ermittelt. Während der 60-minütigen Messung unter Ruhe- bzw. Ausgangsbedingung stieg die mitochondriale roGFP2 Ratio nicht signifikant an (s. Abbildung 19). Zur Überprüfung der Reaktionsfähigkeit des exprimierten roGFPs wurde am Ende des Versuches H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Positivkontrolle dazugegeben. Als Reaktion auf die Zugabe exogener ROS kam es zu einem Anstieg der roGFP2 Fluoreszenzintensität, sodass diese Messmethode für ROS validiert werden konnte. Während Luftstromexposition wurde ein kontinuierlicher Anstieg der roGFP2 Ratio (387 nm / 495 nm) beobachtet (s. Abbildung 20), was bedeutete, dass das in den Mitochondrien exprimierte roGFP2 vorwiegend in der oxidierten Form vorlag.



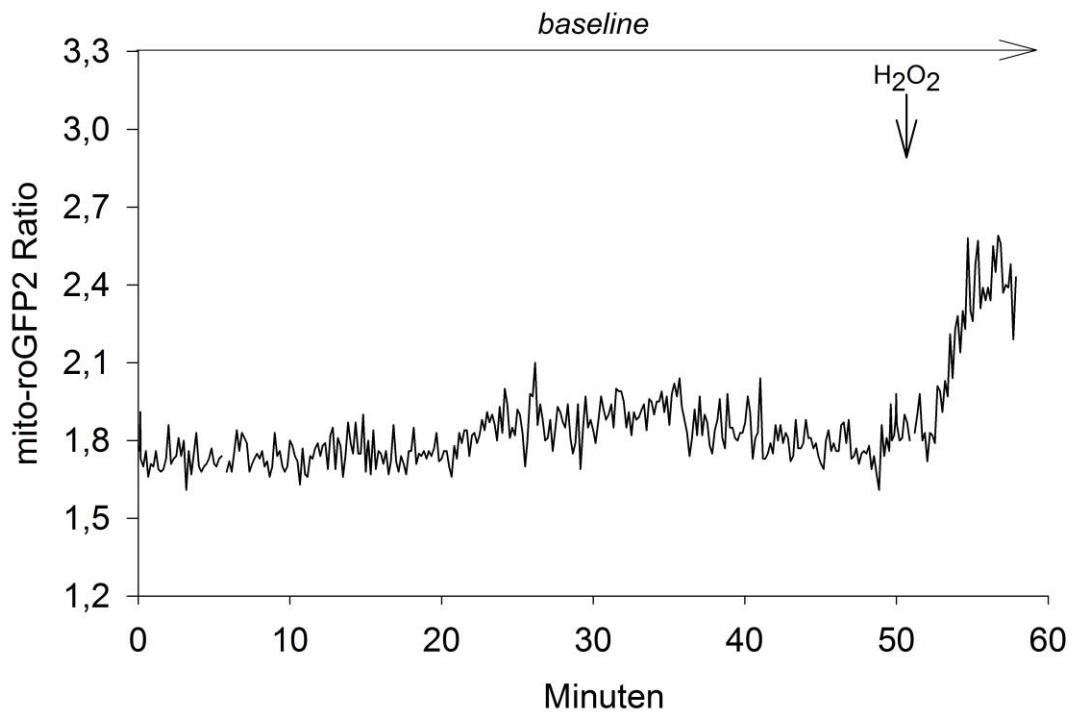


Abbildung 19: Ratio (387 / 495 nm) des mitochondrial exprimierten roGFP2 in einer exemplarischen AEC während einer Messung unter Ausgangsbedingung. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde am Ende des Versuchs als Positivkontrolle hinzugegeben.

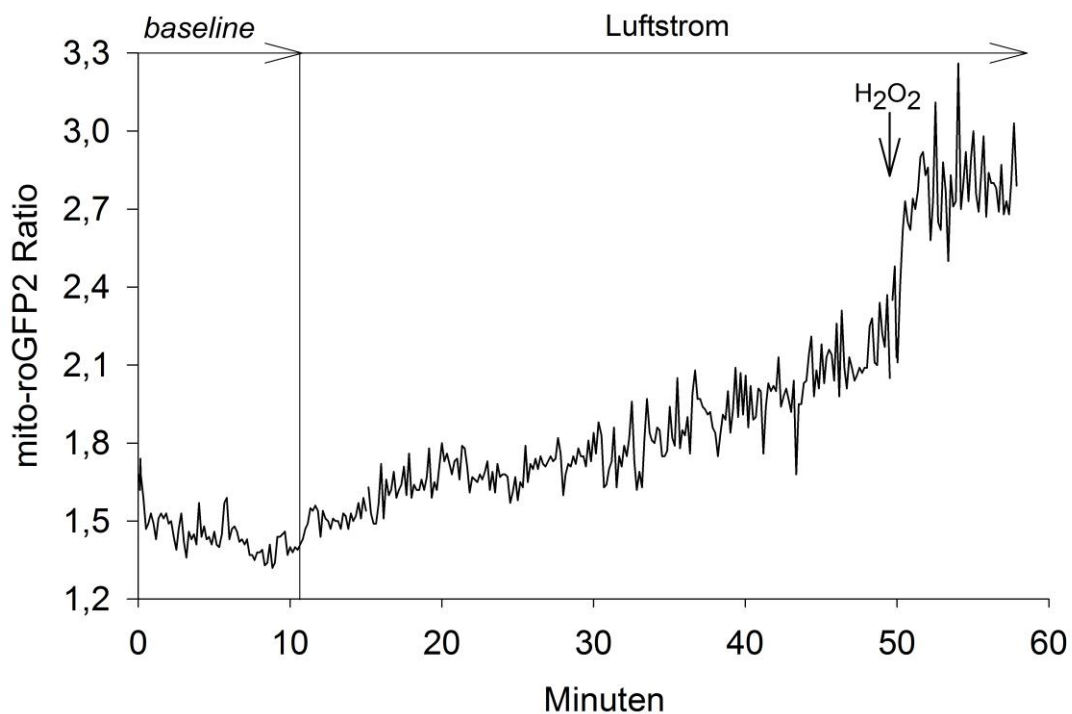


Abbildung 20: Ratio (387 / 495 nm) des mitochondrial-exprimierten roGFP2 in einer exemplarischen AEC während einer Messung während Luftstromexposition. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde am Ende des Versuchs als Positivkontrolle hinzugegeben.

Zur quantitativen Auswertung wurde der absolute Anstieg der roGFP2 Ratio während Ausgangsbedingungen in den ersten 20 Minuten des Experiments und während der Luftstromexposition (ab der 20. Minute des Experiments) analysiert (s. Liniengraph Abbildung 19 und Abbildung 20). Unter Ausgangsbedingungen betrug die Zunahme der mitochondrialen roGFP2 Ratio pro Zeitintervall ( $\Delta$  mito-roGFP2 Ratio /  $\Delta$  Zeitintervall)  $(0,2 \pm 0,9)$  1/Stunde ( $n = 5$ ). Während der Luftstromexposition stieg der Wert auf  $(1,1 \pm 0,2)$  ( $n = 5$ ) signifikant an, was einer ca. 6-fachen Zunahme entspricht (s. Abbildung 21). Wie in Abbildung 20 erkennbar, kam es während Luftstromexposition nicht nur zur Steigerung der mito-roGFP2 Ratio, sondern auch zu einer Zunahme der Oszillationsamplituden der mito-roGFP2 Ratio. Erhöhte Ratio-Oszillationsamplituden waren auch nach Zugabe der Positivkontrolle  $H_2O_2$  zu erkennen (s. Abbildung 20).

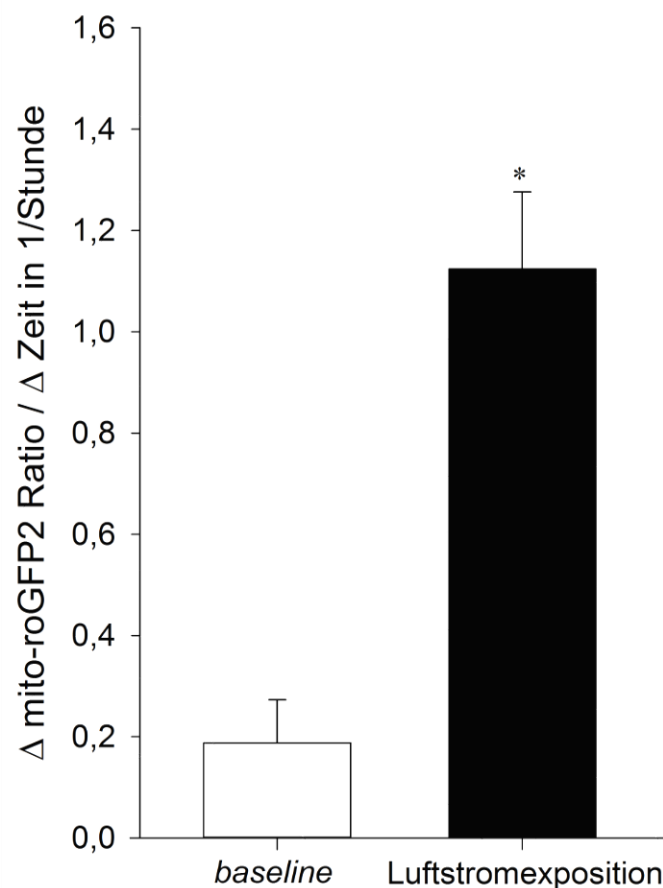


Abbildung 21: Zunahme der roGFP2 Steigung in der baseline (weiß) und während Luftstromexposition (schwarz). (\*  $p < 0,05$  vs. *baseline*).

## 4.2 Immunfluoreszenz-Experimente

### 4.2.1 Aktinfilament-Reorganisation nach Luftstromexposition

Luftstrom wirkt als externer mechanischer Reiz auf die Zelloberfläche von AEC. Um der Frage nachzugehen, ob dieser externe Stimulus intrazellulär zu Veränderungen am Zytoskeletts führt und so eventuell in ein biochemisches Signal umgewandelt wird, wurden die AEC entweder 60 Minuten an Raumluft unter Ausgangsbedingung inkubiert (Kontrolle) oder 60 Minuten der definierten Luftströmung im *Flow Chamber*-Modell ausgesetzt. Nach Fixierung der Zellen wurden die F-Aktin-filamente und Zellkerne mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt und die Präparate unter dem Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Die AEC der Kontrollpräparate zeigten ein gleichmäßig verteiltes, filigranes Aktin-filament-Netzwerk (s. Abbildung 23). An einigen Stellen war das Immunfluoreszenz-signal stark ausgeprägt. Nach Luftstromexposition schienen die Zellkörper der AEC kontrahiert und die Aktinfilamente verdichtet und insgesamt dicker (s. Abbildung 22). Auffällig war das starke Immunfluoreszenzsignal an der Zellmembran. Diese Beobachtungen sprechen für die Bildung *von stress fibers* in AEC während Luft-stromexposition.

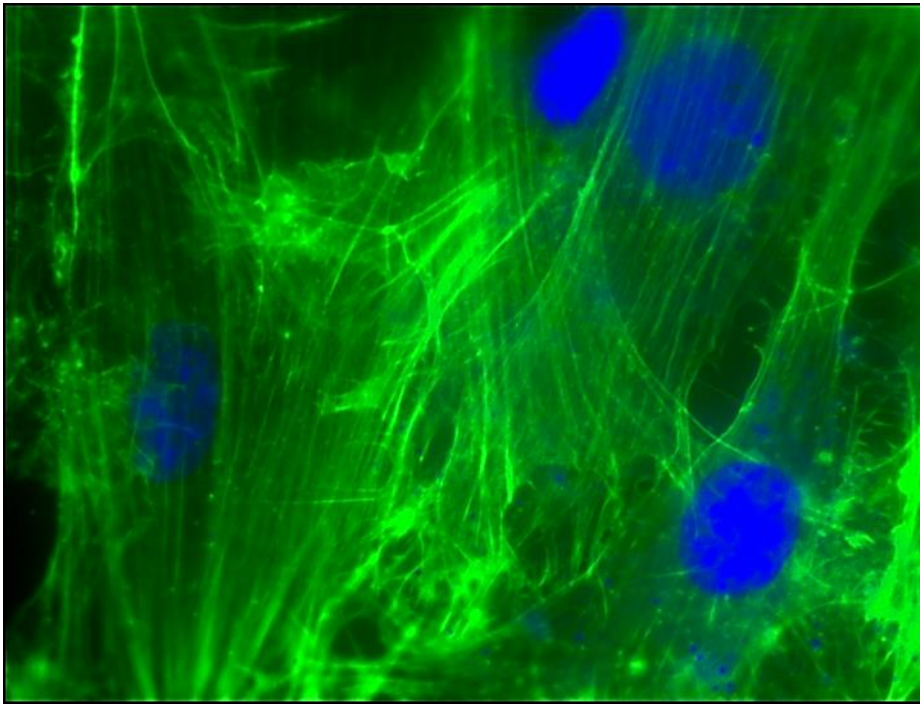


Abbildung 23: Immunfluoreszenzbild der F-Aktinfilamente (grün) und Zellkerne (blau) in L2-AEC nach Kontrollbedingungen (d.h. 60-minütige Exposition an Raumluft)

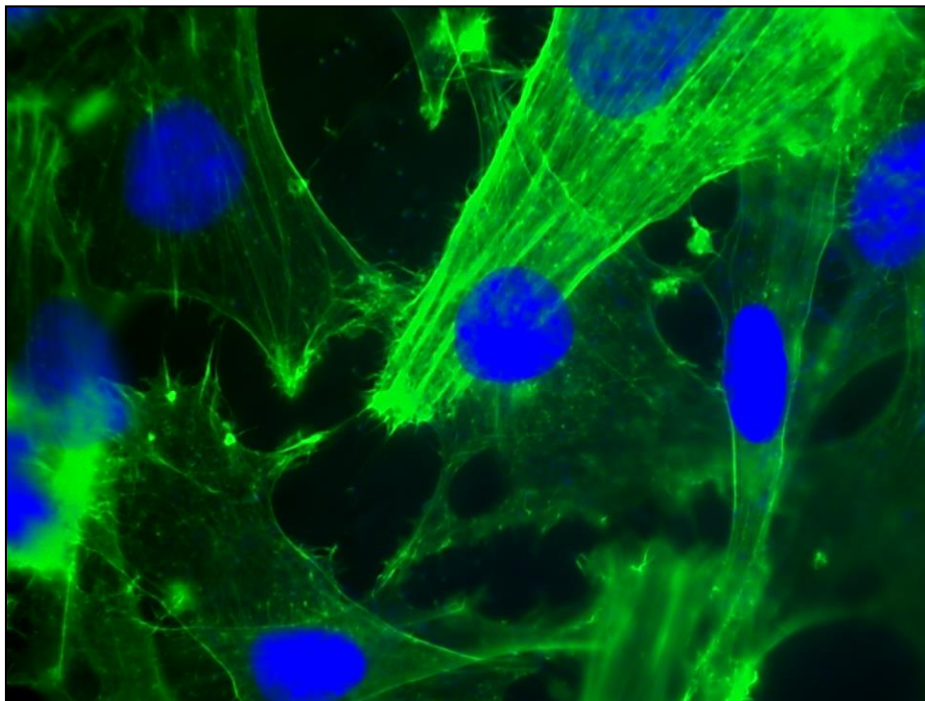


Abbildung 22: Immunfluoreszenzbild der F-Aktinfilamente (grün) und Zellkerne (blau) in L2-AEC nach 60-minütiger Luftstromexposition.

## 5 Diskussion

Trotz zahlreicher Studien ist die Pathogenese des beatmungsassoziierten Lungenschadens noch nicht vollständig erforscht. In den letzten Jahren wurde vor allem die Bedeutung von Dehnungsstress untersucht, der pathologisch bei mechanischer Beatmung mit zu großem Tidalvolumen oder durch zyklische Atelektasenbildung in einigen Lungenabschnitten entsteht. Über die Auswirkungen von Scherstress, der durch Luftströmung bei Atmung und mechanischer Beatmung an der Zelloberfläche erzeugt wird, ist dagegen nur wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob Luftstrom-induzierter Scherstress in AEC eine Mechanotransduktion hervorruft und so zur Entstehung eines beatmungsassoziierten Biotraumas beitragen kann. Die *in vitro*-Experimente im *Flow Chamber*-Modell ermöglichten es erstmalig, auf experimenteller Basis den Einfluss von Luftstrom auf AEC zu untersuchen.

In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass während der Exposition mit einer definierten laminaren periodischen Luftströmung die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Oszillationsamplituden in L2-AEC signifikant zunehmen. Diese Zunahme spricht für das Vorhandensein einer zellulären Antwort im Sinne einer Mechanotransduktion auf mechanischen Stress in Form von Luftstrom und wurde in der vorliegenden experimentellen Studie zum ersten Mal beschrieben.

Es konnte gezeigt werden, dass das Luftstrom-induzierte  $Ca^{2+}$ -Signal von einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellularraum getragen wird. Weiter wurde festgestellt, dass das Luftstrom-induzierte Signal anscheinend unabhängig von zytosolischen ROS entsteht, da die Antioxidantien NAC, PEG-SOD und PEG-Katalase das Luftstrom-induzierte  $Ca^{2+}$ -Signal nicht signifikant beeinflussten. Im Gegensatz dazu wirkte der unspezifische Flavoproteininhibitor DPI stark inhibierend auf das Luftstrom-induzierte  $Ca^{2+}$ -Signal. Ein verstärktes  $Ca^{2+}$ -Signal als Antwort auf Luftströmung wurde nach Herunterregulierung der NOX4, nach Inhibition der NO-Synthase durch L-NAME und nach Koinkubation mit Pneumokokken beobachtet. Nach einer enzymatischen Glykokalyx-Degradation war das Luftstrom-induzierte  $Ca^{2+}$ -Signal je nach angewendetem Enzym entweder verstärkt oder inhibiert. Außerdem wurde während Luftstromexposition bei den Experimenten mit den roGFP2-transfizierten Zellen eine verstärkte ROS-Produktion in den Mitochondrien

gemessen. Auch zellstrukturelle Veränderungen konnten nach Luftstromexposition beobachtet werden: Nach 60-minütiger Luftstromexposition kam es anscheinend zu einer Reorganisation des Aktinfilament-Netzwerkes und zur Ausbildung von sogenannten *stress fibers*.

## 5.1 Diskussion der Methoden

### 5.1.1 Diskussion des *Flow Chamber*-Modells

Ein wesentlicher Kritikpunkt am *Flow Chamber*-Modell ist die unvollständige Abbildung der physiologischen Gegebenheiten im Alveolus. Die geometrische Konfiguration der AEC im *Flow Chamber*-Modell entspricht nicht der Anordnung der Zellen in den kugelförmigen Alveolen. Für die Experimente wurden Alveolar-epithelzell-Monolayer auf den ebenen Membranflächen der Zellkultureinsätze kultiviert. Die Luftströmung im Modell wirkte also linear auf die Zelloberfläche, während *in vivo* im Inneren der sphärischen Alveolen vor allem turbulente Strömungen vorkommen. Außerdem entsprach die statische Anordnung der AEC auf den Zellkultureinsätzen nicht den physiologischen Gegebenheiten. Während physiologischer Atmung oder maschineller Beatmung wird die Basalmembran der AEC periodisch gedehnt. Es ist bereits gut untersucht, dass eine Dehnung der AEC-Basalmembran eine Mechanotransduktion einleitet und proinflammatorische Prozesse hervorrufen kann (Vlahakis et al. 1999). Da aber das Ziel war, die bisher noch unbekannte Wirkung von Luftstrom-induziertem Scherstress auf das Alveolar-epithel zu untersuchen, bot der experimentelle Aufbau des *Flow Chamber*-Modells optimale Bedingungen, diese innovative Fragestellung zu bearbeiten. Im Modell konnte selektiv die Wirkung von Luftstrom-induziertem Scherstress auf AEC ohne den Einfluss einer Basalmembrandehnung untersucht werden. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde der experimentelle Aufbau entsprechend gewählt und Kompromisse in der physiologischen Übertragbarkeit in Kauf genommen.

Da zurzeit keine zuverlässigen *in vivo*-Messmethoden zur Ermittlung der Stärke des Scherstress oder der Luftstromgeschwindigkeit im Alveolarraum vorhanden sind, sind die in dieser Studie gewählten physikalischen Werte für Scherstress und Luftströmung lediglich Schätzungen die auf den Scherstress-Berechnungen aus zwei

unterschiedlichen Publikationen basieren (s. Abschnitt 3.2.5.1). Nucci et al. kalkulierten mithilfe eines mathematischen Modells Werte 412 bis 450 mPa für den mittleren atmungsassoziierten Scherstress in der 9. Generation des Bronchialbaums (s. Abschnitt 1.3.1). In Tarrans rotierendem Zellkammersystem wurden Scherstress-Werte von 40 bis 200 mPa gemessen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Luftstrom-definierenden Parameter so gewählt, dass der Scherstress ungefähr 7,2 mPa betrug.

Ein weiterer kritischer Punkt der Arbeit betrifft die Durchführung der fluoreszenzmikroskopischen Experimente an AEC bei Raumtemperatur. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde jeweils ein Zellkultureinsatz aus dem Brutschrank genommen und zur Messung in das *Flow Chamber*-Modell eingesetzt. Der Luftstrom, dem die Zellen ausgesetzt waren, wurde aus Raumluft generiert. Eine Austrocknung der Zellen durch die ca. 40-minütige Luftstromexposition wurde durch eine ständige Befeuchtung durch die permeable Membran der mit angewärmtem HBS befüllten Zellkultureinsätze verhindert. Um die Viabilität der Luftstrom exponierten L2-AEC zu beweisen, wurde am Ende der  $\text{Ca}^{2+}$ -Experimente 100  $\mu\text{M}$  Adenosintriphosphat (ATP) hinzugegeben. ATP bindet an Purinrezeptoren und führt zu einem schnellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in AEC. Die Zellen reagierten erwartungsgemäß auf ATP mit einer  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Erhöhung, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Zellen während des Versuchs intakt und vital waren.

Da die in der Studie verwendeten L2-AEC keinen Surfactant produzierten, wirkte die Luftströmung nicht an der physiologischen Zell-Surfactant-Luft-Grenze, sondern direkt auf der Zelloberfläche. Eine Wiederholung der Experimente an einer Surfactant-produzierenden Zelllinie oder Experimente mit exogener Surfactant-Gabe wären nötig, um sich den physiologischen Gegebenheiten anzunähern und die Ergebnisse zu validieren.

Obwohl das *Flow Chamber*-Modell nicht die reale Situation im Alveolus abbilden konnte, liefert diese experimentelle Arbeit wichtige Ergebnisse zur Beurteilung der Wirkung von Luftströmung auf AEC. Zum ersten Mal konnte ein spezifisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal als Antwort auf Luftstrom-Scherstress in Alveolarepithelzellen gemessen werden. Diese Beobachtung wird Grundlage weiterer Untersuchungen zur Mechanotransduktion von Luftstrom-Scherstress am Alveolarepithel sein.

### 5.1.2 Diskussion der Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmessungen werden durch zelluläre Faktoren wie eine ungleichmäßige Aufnahme des Farbstoffes in die Zelle, Kompartimentalisierung in Zellorganellen, aber auch instrumentelle Störung und intrinsische Faktoren des Farbstoffes beeinflusst. Durch die Messung der Gesamtfluoreszenz eines Fluoreszenzfarbstoffes, die aus zwei verschiedenen, voneinander unabhängigen Formen des Farbstoffes emittiert wird, ist es möglich, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unabhängig von der intrazellulären Farbstoffkonzentration und -verteilung, sowie den oben genannten Störfaktoren zu ermitteln (O'Connor und Silver 2013). Die Bildung der Ratio aus den einzelnen Fluoreszenzintensitäten verhindert außerdem fehlerhafte Messungen aufgrund von *Photobleaching*.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$

In dieser Studie wurde gezeigt, dass Luftstrom-induzierter Scherstress zu einer Zunahme der  $A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  gegenüber Ausgangsbedingung in AEC führt. Intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale erscheinen als kurze transiente Anstiege der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ , sogenannte *Ca<sup>2+</sup>-sparks* oder *Ca<sup>2+</sup>-puffs*, die entweder durch Rekrutierung anderer Kanäle ein globales intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal hervorrufen oder in unmittelbarer Nähe zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal direkt zelluläre Prozesse aktivieren (Berridge et al. 1998).  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale können als repetitive Zunahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  in Form von Oszillationen auftreten, die in Frequenz oder Amplitude unterschiedliche Informationen codieren und so spezifische Signale in der Zelle auslösen können (Berridge et al. 1998). Diese „ $\text{Ca}^{2+}$ -Codierung“ von zellulären Signalen ist sehr komplex und noch nicht vollständig erforscht.

Während der Luftstromexposition nahmen die Amplituden der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Oszillationen in den AEC zu. Trotz der Schwierigkeit Amplituden-codierte Signale *in vitro* zu detektieren, konnte die Relevanz dieser Veränderungen in unterschiedlichen Studien gezeigt werden. So ist z.B. die Genexpression abhängig von variierenden Amplituden der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (Berridge et al. 1998). Das in dieser Arbeit beschriebene  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal unterscheidet sich in der Ausprägung des absoluten  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiegs deutlich von einem Liganden-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal z.B. nach Gabe von



ATP, bei dem es zu einem vielfachen Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt. Wahrscheinlich bilden aber gerade subtile Veränderungen im  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Muster die physiologische Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$  als Signaltransduktionsmolekül realistischer ab. Da das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal während Luftstromexposition unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen ausblieb, kann davon ausgegangen werden, dass die gemessenen Fura-2 Ratio-Änderungen tatsächlich durch die sich ändernden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und nicht durch instrumentelle oder experimentelle Messartefakte entstehen.

### 5.2.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellularraum

Wie in Abschnitt 1.4.2 erläutert, kann ein zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg einerseits durch einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Extrazellularraum, andererseits durch eine Entleerung intrazellulärer Speicher vor allem aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und den Mitochondrien erfolgen. In den Experimenten unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen blieb das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal aus. Daraus kann geschlossen werden, dass es während Luftstromexposition zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellularraum in die Zelle kommt.

### 5.2.3 Mediatoren-vermittelter $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom

Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal als indirekte Konsequenz nach Aktivierung einer Mechanotransduktionskaskade kann bei der Einwirkung von Scherstress an Endothelzellen beobachtet werden. Zuerst induziert Scherstress eine verstärkte ATP-Freisetzung aus Endothelzellen. ATP bindet an den Purinrezeptor  $\text{P2X}_4$ , der als ligandengesteuerter Kationen-Kanal  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle einströmen lässt (Yamamoto et al. 2003). Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration korreliert anscheinend mit der Intensität des Scherstress (Yamamoto et al. 2003). Ramsingh et al. beobachteten, dass ein dünner Flüssigkeitsfilm auf Alveolarepithelzellen der Zelllinie A549 eine Spannkraft induziert, die einen transienten  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstieg und eine verstärkte ATP-Freisetzung hervorruft. Eine mechanische Stimulation durch die Luft-Flüssigkeits-Grenze (*air-liquid-interface*) und eine dadurch stimulierte ATP-Freisetzung könnte u.a. bei Zellkulturarbeiten unter dem Abzug der sterilen Werkbank auftreten (Ramsingh et al. 2011).

Der Einfluss von löslichen Faktoren auf das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal konnte nicht untersucht werden, da der Versuchsaufbau die Analyse freigesetzter Stoffe nicht zuließ: Die Zellkultureinsätze waren mit Pufferlösung gefüllt, die durch eine dünne, permeable Membran von den AEC getrennt wurde (s. Abbildung 2). Parakrine Stoffe müssten nach ihrer Freisetzung durch die Membran in den sich darüber befindenden Puffer diffundieren, um später nachweisbar zu sein. Trotz des fehlenden Nachweises ist eine Beeinflussung des Luftstrom-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals durch lösliche Mediatoren denkbar. Es wäre z.B. möglich, dass während Luftstromexposition in L2-Zellen genau wie in A549-AEC am *air-liquid-interface* vermehrt ATP freigesetzt wird.

#### 5.2.3.1 Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle

Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal als direkte Konsequenz auf mechanischen Stress kann durch mechanosensitive Kanäle vermittelt werden. Viele Kanäle haben neben ihrer bekannten Hauptfunktion zusätzlich mechanosensitive Eigenschaften. Dazu zählen mehrere TRP-Kanäle (*transient receptor potential channels*), einige spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle (z.B. ENaC),  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (L-/N-/T-Typ) und die vor kurzem identifizierten Piezo-Kanäle (Gu und Gu 2014). Mechanosensitive Kanäle sind häufig mit der EZM und dem Zytoskelett verbunden und registrieren Spannung an der Plasmamembran. Abhängig vom Dehnungszustand befinden sie sich in einem ständigen Gleichgewicht zwischen geöffnetem und geschlossenem Zustand (Haswell et al. 2011). Der allgemein geringe Expressionsgrad und die molekulare Heterogenität von mechanosensitiven Ionenkanälen in unterschiedlichen Zelltypen erschweren die Untersuchung dieser Strukturen (Xiao und Xu, X Z Shawn 2010; Xiao und Xu, X Z Shawn 2010). Aufgrund der Vielzahl potentiell beteiligter Ionenkanäle und dem Mangel an spezifischen Inhibitoren, konnte der Einfluss der Kanäle im Luftstrom-Modell nicht weiter untersucht werden. Auf Grundlage der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse lassen sich so nur Vermutungen über eine mögliche Beteiligung von mechanosensitiven Kanälen bei der Mechanotransduktion aufstellen. An AEC konnte gezeigt werden, dass Dehnung TRPV2-Kanäle aktiviert und zu einer Zunahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  führt (Fois et al. 2012). Im Zusammenhang mit Scherstress am Endothel sind besonders TRPV4-Kanäle untersucht worden. TRPV4 ist ein multimodal aktivierbarer moderat selektiver  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, der durch

hypoosmotischen Stress, mechanischen Scherstress, Temperaturen  $> 27\text{ °C}$  und durch einige Chemikalien aktiviert werden kann (O'Neil und Heller 2005; Gu und Gu 2014). TRPV4-Kanäle sind vermutlich bei Raumtemperatur ( $22\text{-}24\text{ °C}$ ) nicht durch Scherstress aktivierbar (O'Neil und Heller 2005), bei physiologischen Temperaturen ( $37\text{ °C}$ ) wurde jedoch eine schnelle Aktivierung beobachtet (Gao et al. 2003). Da die *Flow Chamber*-Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, ist es unwahrscheinlich, dass das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal über TRPV-Kanäle vermittelt wurde.

Hervorzuheben sind auch die bis jetzt noch wenig erforschten mechanosensitiven Kanäle Piezo1 und Piezo2, die besonders stark in der Lunge exprimiert werden (Coste et al. 2010; Coste et al. 2012). Die relativ großen Piezo-Kanäle (bestehend aus ca. 2500 Aminosäuren und 34-39 Transmembrandomänen) sind in oder nahe der Plasmamembran lokalisiert und weisen keine Homologien zu anderen spannungsabhängigen Ionenkanälen auf (Gu und Gu 2014). Ein nicht-selektiver Kationeneinstrom durch Piezo-Kanäle als Reaktion auf Dehnung bzw. Berührung der Membran wurde zuerst in einer Gliom-Zelllinie untersucht. Zurzeit gibt es noch keine Untersuchungen zur Expression von Piezo-Kanälen am Alveolarepithel. Eine Beteiligung dieser Kanäle bei der Mechanotransduktion am Alveolarepithel ist aber denkbar.

#### 5.2.4 ROS als Signaltransduktionsmolekül

Wie in der Einleitung erwähnt, lassen neuere Forschungsergebnisse vermuten, dass niedrige ROS-Konzentrationen als wichtige Signalmoleküle in zahlreichen Signaltransduktionsprozessen wirken. Auch die Interaktion zwischen den Mediatoren  $\text{Ca}^{2+}$  und ROS ist weiter ins Forschungsinteresse gerückt (Hidalgo und Donoso 2008). Es wird inzwischen angenommen, dass hohe Konzentrationen von ROS die Entstehung eines beatmungsassoziierten Lungenschadens initiieren können. ROS-vermittelte Schäden oder Aktivierungen als Folge von biomechanischem Stress könnten Lungenschäden verstärken oder normale Reparaturvorgänge am Alveolarepithel verzögern oder verhindern (Griffith et al. 2009). Um den Einfluss von ROS auf das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu untersuchen, wurden die AEC mit Antioxidantien bzw. mit ROS-metabolisierenden Substanzen inkubiert.

#### 5.2.4.1 NAC

Nach Inkubation mit dem Antioxidans NAC war das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zwar schwächer ausgeprägt als in der Luftstromgruppe, die zytosolische  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Oszillationsamplitude vs. Ausgangsbedingungen verringerte sich aber nicht signifikant. In zahlreichen experimentellen Studien wurde die antioxidative Wirksamkeit von NAC belegt (Dodd et al. 2008). Dabei wirkt NAC sowohl direkt antioxidativ als auch indirekt antioxidativ, indem es nach Deacetylierung zu Cystein als Substrat die Glutathionsynthese der Zelle stimuliert und so die antioxidative Kapazität der Zellen erhöht. Die geringere Ausprägung des Luftstrom-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach Inkubation mit NAC könnte Folge einer vergrößerten antioxidativen Kapazität sein. Möglicherweise entstehen während Luftstromexposition vermehrt ROS im Zytosol, die dann durch NAC vermehrt degradiert werden und so zu einer Abschwächung des ROS-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals führen. Die Verringerung des Luftstrom-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach NAC könnte auch Folge der Regulierung von redoxsensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen sein.

#### 5.2.4.2 PEG-SOD und PEG-Katalase

Um die Entstehung von ROS weiter zu untersuchen, wurden die AEC mit PEG-SOD und PEG-Katalase behandelt. Nach Inkubation mit PEG-SOD bzw. -Katalase konnte kein inhibierender Effekt auf das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in den L2-AEC beobachtet werden.

In unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Studien konnte der antioxidative Effekt der PEG-SOD und der PEG-Katalase gezeigt werden. So wurde in kultivierten Endothelzellen nach Inkubation mit PEG-SOD oder PEG-Katalase eine erhöhte Enzymaktivität nachgewiesen, die die Zelle vor schädigenden Einflüssen von ROS schützte (Beckman et al. 1988). Inkubation von primär-isolierten Typ II-Ratten-AEC mit PEG-SOD und PEG-Katalase zeigten ebenfalls eine höhere Resistenz gegen oxidativen Stress (Walther et al. 1991). Außerdem reduzierte PEG-SOD die Sauerstofftoxizität im E. coli-assoziierten Lungenschaden, hatte aber keinen Effekt bei der Therapie des Endotoxin-induzierten ARDS oder beim Asbest-induzierten Zellschaden im Tiermodell (Veronese et al. 2002). Die fehlende Wirkung der PEG-SOD bzw. -Katalase Inkubation auf das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal könnte daran liegen, dass eventuell entstehende ROS der Degradierung dieser Enzyme nicht

zugänglich sind oder aber, dass Luftstromexposition keine forcierte ROS-Produktion stimuliert oder das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal unabhängig davon entsteht.

#### 5.2.4.3 DPI

In den Experimenten mit dem unspezifischen Flavoproteininhibitor DPI war das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal vollständig inhibiert. Dieser deutliche Effekt nach DPI könnte aufgrund der geringen Spezifität der Inhibition zahlreiche Ursachen gehabt haben. Zuerst wurde die hypoglykämische Wirkung von DPI durch Blockade der Glukoneogenese und der Zellatmung in Rattenleberzellen erforscht (Holland et al. 1973). Später konnte gezeigt werden, dass DPI den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) (Gatley und Sherratt 1976), die NADPH-Oxidase (Cross und Jones 1986), die Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase) (Stuehr et al. 1991), die Xanthin-Oxidase (Doussi re und Vignais 1992) und die NADH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktasen (Tew 1993) inhibiert. In experimentellen Studien wird DPI meistens zur Inhibition der NADPH-Oxidasen verwendet (O'Donnell et al. 1993). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass DPI außer Flavoproteinen auch unspezifisch Ionenkanäle blockiert. In isolierten Glomus Typ 1 Zellen des Glomus aorticus (Wyatt et al. 1994) und isolierten glatten Muskelzellen aus Pulmonalarterien (Weir et al. 1994) wurden  $\text{K}^{+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle durch DPI reversibel gehemmt. Weiter wurde in trachealen glatten Muskelzellen ein inhibierender Effekt von DPI auf die interne  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe SERCA und die Cholinesterase festgestellt (Tazzeo et al. 2009). Möglicherweise blockierte DPI in den AEC ähnlich wie in den Glomuszellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und verhinderte so den Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  während der Luftstromexposition.

#### 5.2.4.4 Rotenon

Ein anderes Zielenzym von DPI ist der mitochondriale Atmungskettenkomplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase). Um eine Beteiligung der Mitochondrien an dem Luftstrom-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu untersuchen, wurden die Zellen mit Rotenon behandelt. Rotenon inhibiert die mitochondriale Elektronentransportkette, indem es am Komplex I die hydrophobe Tasche blockiert, die auch als Bindungsstelle für den

Elektronenakzeptor Ubiquinon (Coenzym Q) dient. Dadurch kann dort keine Elektronen-Übertragung vom Eisen-Schwefel-Zentrum erfolgen (Rassow 2012).

Rotenon hatte bei den in dieser Studie beschriebenen Experimenten keinen Effekt auf das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Die vollständige Inhibition des Luftstrom-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach DPI ist somit wahrscheinlich nicht durch Beeinflussung des mitochondrialen Atmungskettenkomplex I verursacht. Das spezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal entsteht anscheinend unabhängig von der mitochondrialen ROS-Produktion.

#### 5.2.4.5 Herunterregulierung der NOX4-Genexpression

Wie in der Einleitung beschrieben sind NADPH-Oxidasen eine der hauptsächlichsten ROS-Quellen und auch durch mechanische Stimuli aktivierbar (Browning et al. 2012). Der beim beatmungsassoziierten Biotrauma entstehende oxidative Stress wird zwar vor allem aus extrinsischen Quellen, wie Phagozyten, freigesetzt, teilweise aber auch von Alveolarepithel- und Endothelzellen produziert (Lee und Yang 2012). Veränderungen der Expression und der Funktion von NADPH-Oxidasen sind an der Entstehung eines akuten Lungenschadens beteiligt (Carneseccchi et al. 2012). Der Einfluss von NOX-Isoformen bei der Entstehung eines beatmungsassoziierten Biotraumas ist noch ungenügend erforscht.

Um festzustellen, ob das vollständige Ausbleiben des Luftstrom-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach DPI Folge einer NOX-Inhibition war, wurde zuerst die Expression der einzelnen Isoformen in L2-AEC analysiert. In AEC bzw. unteren Atemwegszellen sind vor allem DUOX1, DUOX2, NOX1, NOX2 und NOX4 identifiziert worden. Ihre Funktion ist mit der Säuresekretion, der antimikrobiellen und der antiviralen Abwehr assoziiert (Lee und Yang 2012). Nur die NOX4 konnte in den L2-AEC auf molekularbiologischer Ebene reproduzierbar nachgewiesen werden. NOX4 wird in der Plasmamembran, aber auch in den Membranen von ER, Mitochondrien und Zellkern exprimiert und produziert vermutlich vor allem  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Carneseccchi et al. 2012; Altenhöfer et al. 2012). Um die Rolle der NOX4 am Luftstrom-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal spezifischer zu untersuchen, wurde die Transkription des NOX4-Gens in den AEC mittels siRNA-Interferenz herunterreguliert. Wider Erwarten führte die Herunterregulation der Expression des NOX4-Gens zu einem zur DPI Inhibition gegenteiligen Effekt: Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort während Luftstromexposition war verstärkt.

Eine Expression der NOX4 wirkte hier inhibierend auf das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, d.h. bei verminderter bzw. fehlender NOX4-Expression bzw. -Aktivität verstärkt sich die zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf Luftstromexposition. Die Zellen reagierten anscheinend sensibler auf den Luftstrom. In anderen experimentellen Studien wurde gezeigt, dass auch NADPH-Oxidasen neben den mitochondrialen Enzymen maßgeblich ROS als Antwort auf mechanischem Stress produzieren (Carneseccchi et al. 2011). Zyklische mechanische Dehnung erzeugt ROS via mitochondrialer und NOX-abhängiger Signalwege in AEC (Chapman et al. 2005). Auch Scherstress durch sich ändernden Blutfluss am Pulmonalendothel aktiviert die NOX (Browning et al. 2012).

Eventuell nimmt die NOX4 im *Flow Chamber*-Modell eine protektive Rolle ein. Möglicherweise hält die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion der NOX4 wichtige zelluläre Vorgänge aufrecht, die nach der Herunterregulierung gestört werden. Auch in anderen experimentellen Modellen konnte der NOX4 eine protektive Rolle zugeschrieben werden. In experimentellen Krankheitsmodellen in Kardiomyozyten schien die NOX4 akut zwar zur Schädigung beizutragen, subakut aber durch Stimulation der Angiogenese die kardiale Funktion zu unterstützen (Zhang et al. 2010). Auch im Gefäßsystem soll die NOX4 vor ischämischen und inflammatorischen Stress schützen (Schröder et al. 2012). In der Lunge ist die NOX4 bei der Entstehung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose beteiligt (Carneseccchi et al. 2011). Außerdem gibt es Hinweise, dass durch Inhibition der NOX4 in AEC die TGF- $\beta$ 1-abhängige Apoptose und die Differenzierung zu Myofibroblasten verhindert werden kann (Carneseccchi et al. 2012). Diese Beobachtung konnte aber noch nicht ausreichend in anderen Studien belegt werden (Altenhöfer et al. 2012). Weiter stellt sich die Frage, ob allein der Funktionsverlust der NOX4 und der durch Herunterregulation dieses Enzyms gestörte Zell-Stoffwechsel für die starke Zunahme der zytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Oszillationsamplitude verantwortlich ist. Untersuchungen in Endothelzellen zeigten, dass die NOX4 stark auf posttranslationaler Ebene reguliert wird, d.h. die mRNA-Konzentrationen korreliert nicht zwangsläufig mit der Protein-Konzentration (Peshavariya et al. 2009). Aufgrund methodischer Schwierigkeiten ist es bisher im Rahmen der Forschungsarbeiten für diese Dissertation nicht gelungen, die NOX4 in L2-AEC auf Proteinebene nachzuweisen. Entsprechend war es auch nicht möglich, den NOX4-*knockdown* auf Proteinebene zu validieren. Folglich erlauben

die Ergebnisse der *knockdown*-Experimente keine endgültigen Aussagen zur Bedeutung der NOX4 bei der Mechanotransduktion von Luftstrom.

#### 5.2.4.6 Inhibition der NO-Synthase

Wie oben beschrieben, inhibiert DPI auch die NO-Synthase. In AEC wird die endotheliale (eNOS, NOS3) und induzierbare (NOS2) NO-Synthase exprimiert (Pechkovsky et al. 2002; Asano et al. 1994). Um den Einfluss der NO-Produktion durch die NO-Synthase auf das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu untersuchen, wurden Experimente mit N<sub>G</sub>-Nitro-L-Arginin-methyl-ester (L-NAME) durchgeführt. L-NAME ist ein Analogon der nicht essentiellen Aminosäure L-Arginin, die dem Enzym als Substrat zur NO-Synthase dient. L-NAME blockiert als kompetitiver Antagonist die NO-Synthasen 1-3.

Nach Inkubation mit L-NAME zeigten die AEC ein signifikant verstärktes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal auf Luftstromexposition. Die NO-Synthase bzw. NO selbst scheint protektiv auf das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu wirken. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass NO Alveolarepithelzellen vor der toxischen Wirkung von oxidativem Stress schützt. In kultivierten fetalen Ratten-AEC inhibierte eine stimulierte endogene NO-Produktion die ROS-induzierte Erhöhung der Permeabilität des Monolayers (Gutierrez et al. 1996). Die 60-minütige Exposition von laminarer, periodischer Luftströmung könnte die Expression bzw. Proteinbiosynthese der induzierbaren NO-Synthase stimulieren. Da das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal aber sofort während der Luftstromexposition sichtbar wurde, ist es wahrscheinlicher, dass der Effekt von L-NAME auf dieses Signal durch eine Beeinflussung der eNOS entsteht.

#### 5.2.5 Inkubation mit Pneumokokken

Experimentelle Studien zeigten, dass mechanische Beatmung die systemische und pulmonale Inflammationsreaktion bei einer bakteriellen Infektion exazerbiert (Dhanireddy et al. 2006). Um den Einfluss der Infektion mit Pneumokokken auf die Mechanotransduktion von Luftstrom-Scherstress zu untersuchen, wurden die AEC vor den Epifluoreszenzmikroskopie-Experimenten mit Pneumokokken inkubiert. Die Versuche simulierten eine Pneumokokken-Infektion und ermöglichten es, die Reaktion vorgeschädigter Zellen auf Luftstrom zu untersuchen.



Pneumokokken-inkubierte AEC zeigten unter Ausgangsbedingungen keine signifikanten Unterschiede in der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  oder im  $Ca^{2+}$ -Signalmuster. In einer Studie mit Epithelzellen aus dem Respirationstrakt konnte gezeigt werden, dass es nach Inkubation mit Pneumokokken zu einem  $Ca^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER kommt (Asmat et al. 2011). Unter Ruhebedingungen schien die Vorinkubation mit Pneumokokken keinen Effekt auf die Alveolarepithelzellen zu haben. Während Luftstromexposition nahm die mittlere  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Oszillationsamplitude dagegen signifikant zu und war auch signifikant gegenüber der Luftstromgruppe vergrößert. Anscheinend reagierten die mit Pneumokokken koinkubierten Zellen sensitiver auf die Stimulation mit Luftstrom-Scherstress. Es ist unklar, ob eventuell Bakterien-Rückstände auf dem Zellmonolayer während der Messung auf die Luftstromexposition reagierten oder ob vorangegangene Prozesse während der Inkubation in den AEC das  $Ca^{2+}$ -Signal hervorgerufen haben. Zur Klärung dieser Frage sollten weitere Experimente ausgeführt werden.

#### 5.2.6 Mechanotransduktion über die Glykokalyx

Die Glykokalyx ist ein in vielen Studien diskutierter Mechanorezeptor von Scherstress. So wird z.B. Strömungs-induzierter FSS am Endothel über die Glykokalyx vermittelt (Weinbaum et al. 2007). Um die Bedeutung der Glykokalyx bei der Mechanorezeption von Luftstrom am Alveolarepithel zu untersuchen, wurden die oberflächlichen Heparansulfate enzymatisch entfernt. Dazu wurden die Zellen entweder mit Heparinase I, Heparinase III oder K5-Heparanlyase inkubiert (zur genaueren Wirkungsweise s. Abschnitt 1.4.1). Obwohl alle angewendeten Enzyme die Heparansulfatketten modifizierten, zeigten sich in den AEC nach den unterschiedlichen Behandlungen teilweise gegensätzliche Reaktionen auf die Luftstromexposition. Das Luftstrom-induzierte  $Ca^{2+}$ -Signal war nur nach Behandlung mit Heparinase I signifikant inhibiert. Heparinase I spaltet innerhalb spezieller sulfatierter Regionen von Heparansulfat, sodass möglicherweise die Integrität dieser sulfatierten Domänen eine wichtige Voraussetzung für die intakte Mechanorezeption von Luftstrom-Scherstress ist. Auch nach Behandlung der Zellen mit K5-Heparanlyase war das Luftstrom-induzierte  $Ca^{2+}$ -Signal abgeschwächt, was auch für die Rolle von Heparansulfat als Mechanorezeptor sprechen könnte. Die K5-Heparanlyase und die Heparinase III schneiden beide in nicht-sulfatierten

Regionen des Heparansulfates. Im Unterschied zu Heparinase III entfernt die K5-Heparanlyase die Heparansulfatketten vollständig, da dieses Enzym sehr spezifisch nur in der N-acetylierten Region der Heparansulfatkette nahe dem Ankerprotein schneidet (s. Abbildung 1). Im Gegensatz zur Inhibition durch Heparinase I kam es nach der Behandlung mit Heparinase III zu einer signifikanten Zunahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, was durch an der Plasmamembran verbliebene Heparansulfatketten vermittelt worden sein könnte. Die widersprüchlichen Ergebnisse erlauben es nicht, eine endgültige Aussage zur Rolle der Glykokalyx als Mechanosensor bei der Mechanotransduktion von Luftstrom-Scherstress zu treffen. Außerdem wurde keine Durchflusszytometrie durchgeführt, mit der das wirkliche Ausmaß der Degradation der Heparansulfatketten hätte evaluiert werden können. In der aktuellen Literatur finden sich hauptsächlich Übersichtsartikel über die endotheliale Glykokalyx, in denen unterschiedliche Modelle zur Funktion diskutiert werden. Möglicherweise registrieren die buschartigen Strukturen der Glykokalyx durch ihrer Biegesteifigkeit mechanischen Scherstress und leiten ihn über assoziierte Verankerungsproteine in das Innere der Zelle (Weinbaum et al. 2007). Weiter könnte das in der Einleitung erwähnte Konzept des „*bumper cars*“ auf Alvelarepithelzellen übertragen werden. Dabei interagiert die Glykokalyx bei Exposition mit FSS direkt mit dem Aktinzytoskelett oder indirekt über Zellverbindungskontakten und stimuliert so einen Umbau in den Endothelzellen (Thi et al. 2004). Vielleicht registrierten die nach Heparinase III-Verdau am Ankerprotein verbliebenen Heparansulfatketten der AEC den Luftstrom-induzierten Scherstress sensitiver und induzierten daraufhin einen Mechanotransduktionsprozess, der analog zum „*bumper car*“ Modell sich in einem verstärkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zeigte. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass eine intakte Glykokalyx FSS als Drehkraft auf das Aktinzytoskelett und auf *Core*-Proteine überträgt. Abhängig von der Stärke des mechanischen Reizes kommt es zur Ruptur von Adhäsionskontakten und zur Bildung von neuen *stress fibers* und Fokaladhäsionskontakten; d.h. es finden in Reaktion auf den neu aufgetretenen Scherstress Adaptionsprozesse in der Zelle statt (Tarbell und Ebong 2008). Im Gegensatz dazu fehlen diese Adaptionsprozesse, wenn die Glykokalyx nicht intakt ist. Der Scherstress wirkt scheinbar direkt an der Plasmamembran (Tarbell und Ebong 2008). Möglicherweise ist das abgeschwächte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nach K5-Heparanlyase und Heparinase I Ausdruck des fehlenden Anpassungsprozesses auf Scherstress. Es könnte aber auch sein, dass

die Heparansulfatketten der Glykokalyx als eine Art Pufferschicht fungieren, die durch Scherstress entstehende mechanische Kräfte abschwächt. Fehlt diese Schutzschicht wirkt der Luftstrom ungebremst mit hoher Intensität direkt an der Plasmamembran und induziert dort unabhängig von Heparansulfaten eine Mechanotransduktion, die sich in dem verstärkten Signal äußert.

Nach Luftstromexposition konnte eine vermehrte Bildung von *stress fibers* in den AEC beobachtet werden. In Kongruenz zu den oben beschriebenen Anpassungsprozessen in Endothelzellen, könnte der Luftstrom-Scherstress in AEC ebenfalls zu strukturellen Veränderungen führen. Um einen Zusammenhang zwischen der Glykokalyx und dem Aktinzytoskelett zu untersuchen, sollten Immunfluoreszenz-Experimente mit Glykokalyx-degradierten AEC durchgeführt werden.

Bei einer enzymatischen Abspaltung der Heparansulfate wird zusätzlich die daran gebundene extrazelluläre Superoxiddismutase (ecSOD, SOD3) entfernt. Die ecSOD schützt die Heparansulfate vor ROS-vermittelter Degradation. (Kliment et al. 2008) zeigten 2008, dass abgespaltene Heparansulfatkettenfragmente Chemotaxis von Neutrophilen Granulozyten induzieren. Auch andere Studien bestätigten die antioxidative Funktion von Heparansulfat-Proteoglykanen (Kumagai et al. 2009). Die ecSOD könnte eventuell auch Einfluss auf die ROS-Produktion während der Luftstromexposition gehabt haben. Ob es beim Fehlen der ecSOD dabei zu einer Zunahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals wie nach Heparinase III oder einer Abnahme wie nach K5-Heparanlyase kommt, lässt sich auf Grundlage der experimentellen Beobachtungen nicht abschließend erklären. Da die AEC nach der Inkubation mit den Glykokalyx-degradierenden Enzymen mit PBS gespült wurden, ist eine Beteiligung von löslichen Heparansulfatfragmenten unwahrscheinlich.

#### 5.2.7 mROS als Signaltransduktionsmolekül

Nachdem während Luftstromexposition Änderungen im  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Oszillations-Muster der AEC festgestellt wurden, wurde untersucht, ob durch die Stimulation auch vermehrt reaktive Sauerstoff- oder Stickstoffspezies entstehen. Eine Messung von ROS oder reaktiven Stickstoffspezies im Zytosol mithilfe von redoxsensitiven Fluoreszenzindikatoren (CM-H<sub>2</sub>DCFDA, DAF-FM) oder zytosolischen roGFP2 war aufgrund methodischer Schwierigkeiten nicht erfolgreich. Da neben den NADPH-Oxidasen die Mitochondrien die quantitativ bedeutendsten ROS-Quellen sind,

wurde die mROS-Produktion mithilfe des genetischen Fluoreszenzfarbstoffes roGFP2, der nur im mitochondrialen Matrixraum exprimiert wird, gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass es während der Luftstromexposition in den Mitochondrien der AEC zu einer deutlichen Zunahme der ROS-Konzentration kommt, was sich durch einen stetigen Anstieg der roGFP2 Ratio äußerte. Die Oszillationsamplituden der roGFP2-Ratio waren ebenfalls vergrößert. Ähnliches wurde auch nach Gabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Positivkontrolle beobachtet, was darauf hindeutet, dass eine Zunahme der Oszillationsamplituden bei erhöhten ROS-Konzentrationen auftritt.

In Mitochondrien entstehen hauptsächlich Superoxide durch Reduktion eines Elektrons von elementarem Sauerstoff als Nebenprodukt der mitochondrialen Elektronentransportkette. Von den sieben bekannten mROS-produzierenden Stellen innerhalb der Atmungskette, können nur die Qo-Bindungsstelle des Komplex III und die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase  $\text{O}_2^-$  in den mitochondrialen Intermembranraum freisetzen, von wo sie theoretisch leichter ins Zytosol gelangen (Sena und Chandel 2012). Im Mitochondrium entstehende  $\text{O}_2^-$  werden durch die Mn-SOD (SOD2) in der mitochondrialen Matrix und durch die Cu/Zn-SOD (SOD1) im mitochondrialen Intermembranraum in das stabilere  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgewandelt (Fukai und Ushio-Fukai 2011).  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist Membran-durchgängig und kann über Aquaporine auch über die innere Mitochondrienmembran transportiert werden (Bienert et al. 2006).  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird in den Mitochondrien u.a. durch Peroxiredoxine, Glutathionperoxidasen und Katalasen eliminiert (Kowaltowski et al. 2009). Mittels der roGFP2-Messung konnte ROS im mitochondrialen Matrixraum detektiert werden, da der redoxensitive Fluoreszenzmarker die Zielsequenz einer Unter-einheit des dort lokalisierten Pyruvatdehydrogenasekomplexes exprimiert (s. Abschnitt 3.2.6.4). In wieweit die im Mitochondrium gebildeten ROS das Zytosol erreichen, konnte nicht ermittelt werden. Weiter konnte der genaue Entstehungsort der mROS nicht präzisiert werden.

Eine erhöhte mROS-Konzentration spielt vermutlich eine Rolle bei der Mechano-transduktion von Luftstrom-induziertem Scherstress. Guzy und Schumacker zeigten, dass die mitochondriale Elektronentransportkette eine Funktion als  $\text{O}_2$ -Sensor in der Zelle übernimmt und bei Hypoxie reaktiv ROS produziert, um die Gen-expression zu verändern (Guzy und Schumacker 2006). Die mROS-Produktion in den AEC im Luftstrom-Modell könnte analog dazu als eine Art Alarmsystem

funktionieren, dass bei sich verändernden extrazellulären Gegebenheiten aktiv wird. Dabei wäre die produzierte mROS-Menge proportional zur Stärke des Stressors (Sena und Chandel 2012). So würde die verstärkte Luftstrom-induzierte mROS-Produktion eine Anpassungsreaktion der AEC auf die veränderten Umgebungsbedingungen darstellen.

Die Regulierung der mROS-Produktion ist noch nicht vollständig verstanden; der Redoxstatus des Mitochondriums scheint dabei aber eine wichtige Rolle einzunehmen. Eine Erhöhung des Protonengradienten, der durch den elektrochemischen Gradienten über der inneren mitochondrialen Membran aufrechterhalten wird, führt zu einer erhöhten ROS-Produktion in Mitochondrien (Sena und Chandel 2012). Die mROS-Produktion kann auch durch  $\text{Ca}^{2+}$  beeinflusst werden. Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verringert das Potential über der inneren mitochondrialen Membran und verbessert den Elektronentransport, sodass unter Umständen vermehrt ROS entsteht (Kowaltowski et al. 2009). Das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal könnte so Ursache der mROS-Produktion sein. Der fehlende Effekt von Rotenon könnte dafürsprechen, dass das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal unabhängig von mROS entsteht. Um genauere Aussagen zur Kausalität zu treffen, müsste die mROS-Konzentration in AEC unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen gemessen werden. Neuere Untersuchungen geben auch Hinweise auf einen möglichen *Crosstalk* zwischen Mitochondrien und NADPH Oxidasen (Wosniak et al. 2009; Dikalov 2011). Eine Aktivierung von NADPH-Oxidasen erhöht vermutlich die mROS-Produktion und umgekehrt. Um mögliche Interaktionen festzustellen, sollte die Auswirkung einer NOX-Inhibition auf die mROS-Produktion im Luftstrom-Modell in weiteren Experimenten untersucht werden.

#### 5.2.8 Aktinveränderungen während Luftstromexposition

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Luftstrom-Scherstress-Exposition auf die Aktinfilamente der AEC untersucht. Dazu wurden die Zellen nach Luftstromexposition fixiert und die F-Aktin-Filamente mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Nach 60-minütiger Luftstromexposition waren deutliche Veränderungen im Aktinfilamentnetzwerk der AEC zu erkennen. Im Gegensatz zu Zellen der Kontrollgruppe, die 60 Minuten Raumlufte ohne Luftströmung ausgesetzt waren, schienen die Aktinfilamente verdichtet und linearer angeordnet. Die Zellkörper

waren kontrahiert und die Abstände zwischen den Zellen vergrößert. An den Zellmembranen konnten verdichtete Aktinfilamente identifiziert werden.

Die beobachteten Veränderungen der Aktinfilamente in den L2-AEC nach Luftstromexposition beinhalten wahrscheinlich die Bildung von *stress fibers*, die zur Kontraktion der Zellkörper und der Verdichtung der Filamente führte. Eine der Hauptfunktionen des Netzwerkes aus Aktin *stress fibers* ist es, einen robusten Widerstand gegen wirkende mechanische Kräfte zu bilden (Pellegrin und Mellor 2007). So könnten die Reorganisation des Aktingerüstes und die Bildung von *stress fibers* eine Anpassungsreaktion der AEC auf den mechanischen Stress durch Luftströmung sein.

*Stress fibers* spielen auch eine Rolle in der Mechanorezeption: Mechanische Stimuli können über die von *stress fibers* erzeugte kontraktile Kraft auf Fokaladhäsionskontakten übertragen werden und u.a. die Konformation von mechanosensitiven Fokaladhäsionsproteinen verändern und die Zusammensetzung und Dynamik dieser Kontakte regulieren (Tojkander et al. 2012). Außerdem können externe mechanische Stimuli auch durch EZM-Proteine (z.B. Fibronectin) über Integrine (Fokaladhäsionskontakte) und assoziierte Plaqueproteine auf das Aktinzytoskelett übertragen werden. Integrine interagieren möglicherweise entweder direkt oder indirekt über assoziierte Makromolekülkomplexe mit bestimmten mechanosensitiven Kanälen (z.B. TRP-Kanäle). Mechanosensitive Ionenkanäle können so auch durch Zug an Aktinfilamenten aktiviert werden (Martinac 2014). Der Zusammenhang dieser Zellverbindungsstrukturen wurden von Ingber und Jamieson im „*tensegrity model*“ beschrieben; durch eine Verknüpfung über Fokaladhäsionskontakte entsteht ein isometrisch vorgedehntes Netzwerk, das wahrscheinlich zur Zellstabilisation beiträgt (Ingber 2003a; Ingber 2003b). Die beiden Zytoskelettkomponenten Mikrofilamente und Intermediärfilamente stabilisieren gegen Zug, Mikrotubuli wirken Kompression entgegen (Ingber 2008). Eine Kontraktion der *stress fibers* in AEC als Antwort auf Luftstrom-Scherstress könnte eine Mechano-transduktion induzieren, die z.B. wie oben beschrieben zu einer Beeinflussung der Adhäsionskontakte oder einer Aktivierung von mechanosensitiven Ionenkanälen führt. Um der Frage nachzugehen, ob die Aktinreorganisation und die *stress fiber* Bildung primär Folge der direkten mechanischen Stimulation durch Luftstrom-Scherstress oder aber sekundär abhängig vom Luftstrom-induzierten  $Ca^{2+}$ -Signal entsteht, müssten die Aktin-Immunfluoreszenz-Experimente unter  $Ca^{2+}$ -freien

Bedingungen durchgeführt werden. Weiter sollte das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal unter Inhibition der Zytoskeltreorganisation untersucht werden, um die Rolle der Aktinfilamente als Mechanorezeptoren von Luftstrom-Scherstress zu prüfen.

Außerdem könnten durch Interaktionen des Aktinzytoskeletts mit den Mitochondrien weitere zelluläre Prozesse initiiert werden. Die Verbindungen von Zytoskelett und Mitochondrien sind in vielen Zelltypen essentiell für die mitochondriale Morphologie, Motilität und Verteilung (Boldogh und Pon 2006). So erfolgt z.B. der Transport der Mitochondrien innerhalb der Zelle über lange Strecken durch Mikrotubuli, für kurze Distanzen und die Immobilisation der Mitochondrien wird allerdings das Aktinzytoskelett benötigt. Eine Fixierung der Mitochondrien ist vermutlich wichtig, um die Mitochondrien an Orten zu halten, an denen viel ATP verbraucht wird (Schwarz und Leube 2016). Möglicherweise beeinflussen Veränderungen im Aktinnetzwerk auch die mROS-Produktion oder *vice versa*. Ergänzend zu den Experimenten dieser Arbeit sollten mROS-Messungen während Luftstromexposition in AEC erfolgen, deren Zytoskeltreorganisation inhibiert wurde. So könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen der mROS-Produktion und der Aktinreorganisation untersucht werden.

### 5.3 Luftstrom-Scherstress am Alveolarepithel und Ausblick

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse können folgende Aussagen über die Mechanotransduktion von Luftstrom in Alveolarepithelzellen getroffen werden: Der im *Flow Chamber*-Modell erzeugte Luftstrom bewirkte durch Scherstress einen mechanischen Reiz an der Alveolarepithelzelloberfläche (s. Abbildung 24). Als Reaktion auf diese Umgebungsveränderungen kam es zu einer Zunahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Oszillationsamplituden und zu einer Produktion von mROS in den AEC. Die Frage, welche Zellstrukturen dabei maßgeblich als Mechanosensor fungieren und welche Rolle die Glykokalyx einnimmt, kann anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Denkbar wäre eine Beteiligung mechanosensitiver Zellstrukturen wie die Plasmamembran oder EZM. Diese könnten Scherstress registrieren und z.B. an zelluläre Strukturen wie das EZM-Integrin-Aktin-Netzwerk weitergeben. Über eine Verknüpfung von Mitochondrien in dieses Netzwerk könnten es zu einer stimulierten mROS-Produktion kommen. Eine andere mögliche

Konsequenz der Scherstress-Exposition wäre der direkte Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Extrazellularraum über geöffnete mechanosensitive Kanäle (s. Abbildung 24, Ionenkanal).  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen könnten dann zu einer Reorganisation der Aktin-filamente führen. Auf Basis der Experimente lassen sich keine Aussagen über mögliche *Downstream*-Effekte aufstellen. Möglicherweise zeigen die Aktin-Veränderungen nach Luftstromexposition eine Anpassung der AEC an den Scherstress. Unklar bleibt auch, ob die mROS-Produktion den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bewirkt oder *vice versa*.

Das in dieser Arbeit beschriebene Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal gibt Hinweise auf das Vorhandensein einer Signaltransduktion als Antwort auf Luftstrom-induzierten Scherstress in AEC. Um die an dem Signal beteiligten Transmitter und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu identifizieren und Aussagen über *Downstream*-Effekte des spezifischen Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals zu treffen, sollten weitergehende Untersuchungen am *Flow Chamber* Model durchgeführt werden. Da in diesem experimentellen Aufbau die *in vivo*-Bedingungen nicht vollständig simuliert werden können, ist eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf die klinische Situation des beatmungsassoziierten Lungenschadens nicht zulässig. In wieweit diese Ergebnisse auf die klinische Situation der Entstehung eines Biotraumas während mechanischer Atmung übertragen werden können, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.



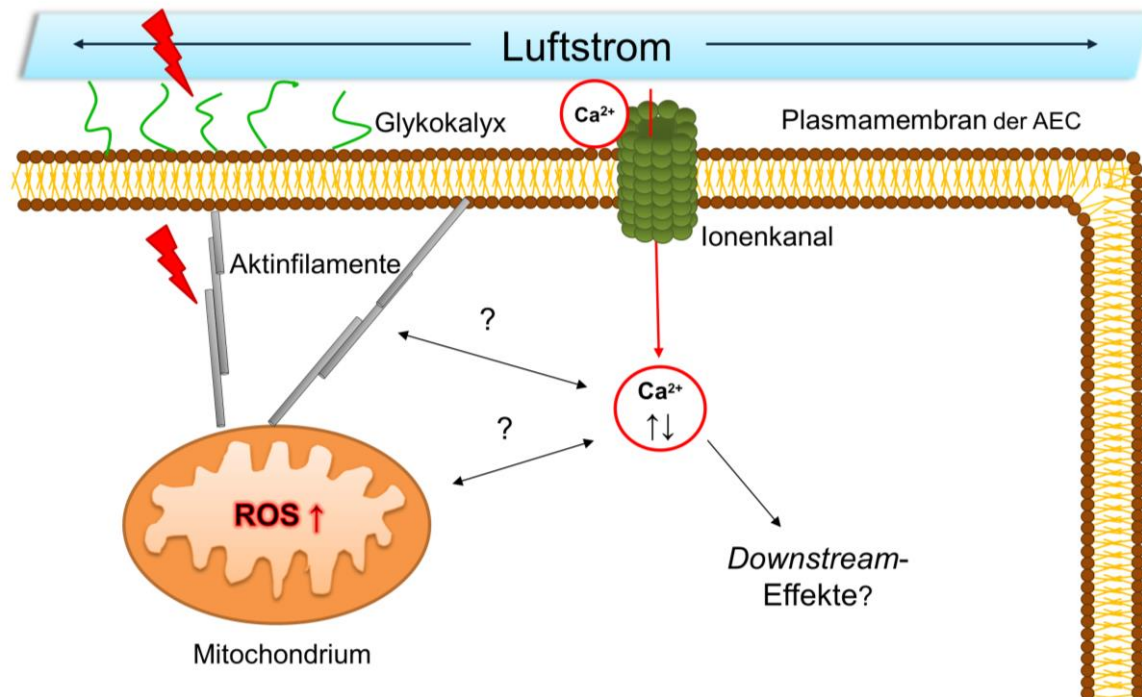


Abbildung 24: Schema der hypothetischen Mechanotransduktion von Luftstrom-Scherstress am Alveolarepithel. Die Blitze symbolisieren den mechanischen Reiz.

#### 5.4 Einordnung in klinische Beobachtungen und Konsequenzen

Die Beobachtung, dass Luftstrom-induzierter Scherstress eine Mechanotransduktion in AEC hervorruft, ist vor allem auch vor dem Hintergrund aktueller klinischer Studien relevant. In der Theorie ist die Hochfrequenzventilation (HFOV) in homogen-belüfteten Lungen eine geeignete Beatmungstherapie für Patienten mit Lungenschäden: Ein suffizienter Gasaustausch wird unter Anwendung eines geringen Tidalvolumens und damit geringer Gefahr einer Überdehnung sichergestellt (Fan et al. 2013). Der relativ hohe konstante mittlere Atemwegsdruck hält den endexpiratorischen Druck aufrecht, sodass progressiv atelektatische Alveolen rekrutiert werden können (Fan et al. 2013). Durch das endexpiratorische Lungenvolumen wird auch die Atelektasenbildung und das Volutrauma reduziert (Harr et al. 2012). Dem gegenüber steht die Wirkung der hochfrequent oszillierenden Luftströmung, die einen Scherstress am Alveolarepithel erzeugen könnte. Dabei ist bisher ungeklärt, inwieweit Scherstress auf Alveolarebene wirklich wirkt.

In tierexperimentellen Studien war die HFOV durch deutlich geringere Freisetzung proinflammatorischer Marker und einer verbesserten Oxygenierung der konventionellen, nicht-protaktiven Beatmung überlegen. Neuere Studien, die HFOV mit protaktiven Beatmungsstrategien verglichen, zeigten dagegen keinen klaren Vorteil der HFOV (Harr et al. 2012). Albert et al. verglichen 2011 im Tiermodell die Effekte unterschiedlicher *Open-lung*-Beatmungskonzepte u.a. HFOV mit der Beatmung mit protaktivem Tidalvolumen. Die Oxygenierung war unter HFOV zwar verbessert, histologisch zeigten sich aber stärkere Einblutungen in den Lufträumen. Laut einer 2013 aktualisierten Metaanalyse mit sechs eingeschlossenen Studien und 365 Patienten hatte eine HFOV gegenüber einer konventioneller Ventilation ein geringeres Therapieversagensrisiko und eine um 23 % reduzierte Krankenhaus-Mortalität (Sud et al. 2013). In zwei klinischen randomisierten Multi-Center-Studien konnte dagegen nicht nur kein Vorteil von HFOV gegenüber anderer Druck- und Volumen limitierter Beatmungsformen von ARDS-Patienten festgestellt werden, sondern sogar ein Überlebensnachteil in der HFOV-Gruppe (Malhotra und Drazen 2013). Die OSCILLATE (*Oscillation for Acute Respiratory Distress Syndrom Treated Early*) Studie zeigte, dass die Krankenhaus-Mortalität in der HFOV-Gruppe um 47 % höher lag als in der Kontrollgruppe (35 %) (Ali und Ferguson 2011). In der OSCAR-Studie (*Oscillation in ARDS*) konnten keine signifikanten Unterschiede im *Outcome* der HFOV-Gruppe und der konventionellen Ventilations-Gruppe festgestellt werden. Die Todesrate durch alle Ursachen nach 28 Tagen betrug 41,7 % in der HFOV-Gruppe und 41,1 % in der Gruppe mit konventioneller mechanischer Beatmung (Young et al. 2013).

Das in dieser Arbeit beschriebene *Flow Chamber*-Modell simuliert eine niederfrequente Oszillationsbeatmung. Die beobachteten *in vitro* Effekte könnten bei einer vielfach höherfrequenten HFOV prägnantere Auswirkungen haben und möglicherweise zur Entwicklung eines Biotraumas führen. Das Luftstrom-induzierte  $Ca^{2+}$ -Signal als Reaktion der AEC auf Luftstrom-Scherstress im Sinne einer Mechano-transduktion könnte daher neue Aspekte zur Pathogenese des beatmungsassoziierten Lungenschadens liefern. Luftstrom-Scherstress evoziert in AEC möglicherweise zelluläre Prozesse, deren *Downstream*-Effekte bei der Entstehung eines Biotraumas mitwirken könnten. Vor allem die Experimente mit vorgeschädigten AEC z.B. nach Glykokalyx-Degradation oder Pneumokokken Koinkuba-

tion könnten die Auswirkungen von verstärktem Luftstrom-Scherstress in vorgeschädigten Lungen gut simulieren und Hinweise auf pathophysiologische Mechanismen geben.

## 6 Zusammenfassung

Der beatmungsassoziierte Lungenschaden (*Ventilator-associated lung injury*, VALI) ist eine schwerwiegende Komplikation bei Intensivpatienten. Als Ursache wird ein durch mechanischen Stress initiiertes Entzündungsprozess der Alveolen diskutiert. In zahlreichen experimentellen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Alveolarepithelzellen (AEC) auf mechanische Reize, wie z.B. Dehnung, mit einer Signaltransduktion reagieren, die über zytosolisches Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (mROS) vermittelt wird. Während der Beatmung wirkt in den Atemwegen bis hin zu den Alveolen ein Luftstrom-induzierter Scherstress, über dessen Wirkung noch wenig bekannt ist. Ziel dieser Arbeit war daher die erstmalige Untersuchung einer Mechanorezeption und -transduktion von Luftstrom-induziertem Scherstress in AEC. Die Funktion der epithelialen Glykokalyx als potentiell mechanosensitive Struktur und Veränderungen des Aktinzytoskeletts nach Luftstromexposition wurden überprüft.

Kultivierte AEC (Zelllinie L2) wurden entweder nach Färbung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 zur Messung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ ) oder nach Transfektion mit dem redoxsensitiven genetischen Fluoreszenzmarker roGFP zur Messung der mROS-Produktion in einer speziellen Luftstromkammer einer laminaren, periodischen Luftströmung ausgesetzt (7,2 mPa Scherstress). Die Messung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  oder der mROS-Produktion erfolgte kontinuierlich mittels Epifluoreszenzmikroskopie. Zur weiteren Untersuchung des  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Signals wurden AEC vor Versuchsbeginn u.a. im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium, mit ROS-modifizierenden Substanzen oder mit Glykokalyx-degradierenden Enzymen inkubiert oder die ROS-produzierende NADPH-Oxidase 4 (NOX4) herunterreguliert. Außerdem erfolgte nach 60-minütiger Luftstromexposition eine Immunfluoreszenz (IF)-Färbung der F-Aktinfilamente der AEC.

Während der Luftstromexposition kam es zu einer Zunahme der mittleren  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Oszillationsamplitude gegenüber Ausgangsbedingungen ( $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ ) um  $(5,3 \pm 0,9)$  nM bzw.  $(40,9 \pm 8,5)$  % ( $p < 0,05$ ). Unter extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen oder nach Inkubation mit DPI war  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  inhibiert. Die Inkubation

der AEC mit Antioxidantien wie Acetylcystein, PEG-Katalase oder -Superoxid-dismutase beeinflusste das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal kaum. Nach siRNA-vermittelter Herunterregulierung der NADPH-Oxidase 4, Inkubation mit dem NO-Synthase Inhibitor L-NAME oder mit Pneumokokken kam es zu einer signifikanten Zunahme von  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  während Luftstromexposition. Die enzymatische Degradierung der Glykokalyx ergab widersprüchliche Ergebnisse. Die Änderung der roGFP-Fluoreszenzintensitätsratio pro Zeitintervall als Ausdruck der mROS-Produktion stieg während Luftstromexposition signifikant an. Im Vergleich zur Kontrollbedingung waren die Aktinfilamente in AEC nach Luftstromexposition verdichtet und es wurden vermehrt Stressfasern sichtbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass AEC auf Luftstromexposition mit einem spezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal und einer mROS-Produktion im Sinne einer Mechanotransduktion reagierte. Da unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen das Luftstrom-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal ausblieb, kann davon ausgegangen werden, dass dieses durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum generiert wird. Extrazelluläre ROS scheinen keinen direkten Einfluss auf  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  zu haben. Luftstrom-induzierter Scherstress führte in AEC zu einem Umbau im Aktinfilamentgerüst mit vermehrter Stressfaserbildung, was auf Anpassungsprozesse der AEC deuten könnte. Die Rolle der Glykokalyx als mechanosensitive Struktur konnte nicht abschließend beurteilt werden. Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen dem  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Signal, der mROS Produktion und den Aktinfilamentveränderungen sowie die Frage, inwieweit diese Mechanotransduktionsprozesse zur Pathogenese des VALI beitragen, werden Gegenstand weiterer Forschung sein.

## Summary

Ventilator-associated lung injury (VALI) is a serious problem in critical ill patients. An inflammatory process of the alveoli initiated by mechanical stress is discussed as a major cause. In many experimental studies, it has already been shown that alveolar epithelial cells (AEC) applied to mechanical stimuli, e.g. strain, react with a signal transduction mediated via cytosolic calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) and mitochondrial reactive oxygen species (mROS). During breathing, air flow-induced shear stress acts in the respiratory tracts up to the alveoli but the effect of it is still little known. The aim of this thesis was therefore to study the mechanoreception and -transduction of airflow-induced shear stress in AEC. The function of the epithelial glycocalyx as a potentially mechanosensitive structure and alterations of the actin cytoskeleton after air flow exposure were examined.

Cultivated AEC (cell line L2) were detected either after staining with the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive fluorescent dye Fura-2 for measuring the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) or after transfection with the redox-sensitive genetic fluorescence marker roGFP for measuring the mROS production in a specific airflow chamber, where they were exposed to a laminar, periodic airflow (7.2 mPa Scherstress). The  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  or mROS production was measured continuously by epifluorescence microscopy. To further investigate the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  signal, AEC were measured either in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium, after incubation with ROS-modifying substances or with glycocalyx-degrading enzymes or after knockdown of the ROS-producing NADPH oxidase 4 (NOX4). In addition, an immunofluorescence (IF) staining of the F-actin filaments of AEC was carried out after air exposure for 60 minutes.

During air flow exposure, the mean  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  oscillation amplitude was increased by  $(5.3 \pm 0.9)$  nM and  $(40.9 \pm 8.5)$  % ( $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) ( $p < 0.05$ ). During  $\text{Ca}^{2+}$ -free conditions or after incubation with DPI,  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  was inhibited. The incubation of AEC with antioxidants such as acetylcysteine, PEG-catalase or -superoxide dismutase hardly influenced the airflow-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signal. After siRNA-mediated knockdown of NOX4, incubation with the NO synthase inhibitor L-NAME or with pneumococci,  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  was significant increased during air flow exposure. The enzymatic degradation of the glycocalyx gave contradictory results. The change in

the roGFP fluorescence intensity ratio per time interval as an expression of the mROS production increased significantly during air flow exposure. In comparison to the IF control staining, the actin filaments in AEC were compressed after air flow exposure and stress fibers were exposed.

The results show that AEC responded to airflow exposure with a specific  $\text{Ca}^{2+}$  signal and mROS production in the sense of mechanotransduction. Since the airflow-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signal was excluded under  $\text{Ca}^{2+}$ -free conditions, it can be assumed that this is generated by a  $\text{Ca}^{2+}$  inflow from the extracellular space. Extracellular ROS do not seem to have a direct effect on  $\Delta A [\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . Airflow-induced shear stress resulted in a change in the actin filament framework with increased stress fiber formation in AEC, which might point to adaptation processes of the AEC. The role of glycocalyx as a mechanosensitive structure could not be conclusively assessed. The investigation of the correlation between the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  signal, the mROS production and the actin filament changes, as well as the question how these mechano-transduction processes contribute to the pathogenesis of VALI will be analysed in further experiments.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

$\Delta A[Ca^{2+}]_{zyt}$	Zunahme der mittleren zytosolische $[Ca^{2+}]$ -Oszillationsamplitude gegenüber Ausgangsbedingung
$A[Ca^{2+}]_{zyt}$	mittlere $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Oszillationsamplitude
AEC	<i>alveolar epithelial cells</i> , Alveolarepithelzellen
AK	Antikörper
AM	Acetoxymethylester
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BL	<i>baseline</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderalbumin
$Ca^{2+}$	Calcium-Ionen
$[Ca^{2+}]_{zyt}$	zytosolische Calcium-Konzentration
cDNA	<i>copy DNA</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CFU	<i>colony forming units</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPI	Diphenyleneiodoniumchlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessig
ENaC	<i>epithelial Na<sup>+</sup> channel</i> , epithelialer Natriumkanal
engl.	englisch
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
eSOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
EZM	Extrazellulärmatrix
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fetales Rinderserum



---

FSS	<i>fluid shear stress</i>
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GSH	Glutathion
GS-SH	Glutathion-Disulfid
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBS	HEPES-Puffer, s. HEPES
Hep. I	Heparinase I
Hep. III	Heparinase III
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperanzinyl)-ethansulfonsäure
HS	Heparansulfat
KG	Körpergewicht
L-NAME	L-NG-Nitroarginine-Methylester
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mROS	mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies
n	Versuchsanzahl
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxid
OD	Optische Dichte
p	Signifikanzniveau
PaO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion

PEEP	<i>positive end-expiratory pressure</i> , positiver endexpiratorischer Druck
PEG-	Polyethylenglykol-
PEG-SOD	Polyethylenglykol-Superoxiddismutase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
[RNA]	RNA-Konzentration
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
SOD	Superoxiddismutase
TRP	<i>Transient receptor potential channel</i>
V	Volt
VALI	<i>ventilator associated lung injury</i>
VILI	<i>ventilator induced lung injury</i>
Vf	Verdünnungsfaktor
$\lambda$	Wellenlänge

## 8 Literaturverzeichnis

1. Albert S, Kubiak BD, Vieau CJ, Roy SK, DiRocco J, Gatto LA, Young JL, Tripathi S, Trikha G, Lopez C, Nieman GF (2011) Comparison of "open lung" modes with low tidal volumes in a porcine lung injury model. *J. Surg. Res.* 166:e71-81. doi:10.1016/j.jss.2010.10.022.
2. Ali S, Ferguson ND (2011) High-Frequency Oscillatory Ventilation in ALI/ARDS. *Critical Care Clinics* 27:487–499. doi:10.1016/j.ccc.2011.04.006.
3. Altenhöfer S, Kleikers, Pamela W. M., Radermacher KA, Scheurer P, Rob Hermans, J. J., Schiffers P, Ho H, Wingler K, Schmidt, Harald H. H. W. (2012) The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 69:2327–2343. doi:10.1007/s00018-012-1010-9.
4. Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS (1994) Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:10089–10093.
5. Asmat TM, Agarwal V, Rath S, Hildebrandt J, Hammerschmidt S (2011) Streptococcus pneumoniae Infection of Host Epithelial Cells via Polymeric Immunoglobulin Receptor Transiently Induces Calcium Release from Intracellular Stores. *Journal of Biological Chemistry* 286:17861–17869. doi:10.1074/jbc.M110.212225.
6. Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, Hemsley C, Albiger B, Kanth A, Dahlberg S, Fernebro J, Moschioni M, Masignani V, Hultenby K, Taddei AR, Beiter K, Wartha F, Euler A von, Covacci A, Holden DW, Normark S, Rappuoli R, Henriques-Normark B (2006) A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:2857–2862. doi:10.1073/pnas.0511017103.
7. Baum J, Rathgeber J (2010) Grundlagen der maschinellen Beatmung; Einführung in die Beatmung für Ärzte und Pflegekräfte; 47 Tabellen. Thieme, Stuttgart [u.a.].
8. Beckman JS, Minor RL, White CW, Repine JE, Rosen GM, Freeman BA (1988) Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J. Biol. Chem.* 263:6884–6892.
9. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, Gattinoni L, van Haren F, Larsson A, McAuley DF, Ranieri M, Rubenfeld G, Thompson BT, Wrigge H, Slutsky AS, Pesenti A (2016) Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA* 315:788–800. doi:10.1001/jama.2016.0291.

10. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium - a life and death signal. *Nature* 395:645–648. doi:10.1038/27094.
11. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1758:994–1003. doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.015.
12. Block K, Eid A, Griendling KK, Lee D, Wittrant Y, Gorin Y (2008) Nox4 NAD(P)H Oxidase Mediates Src-dependent Tyrosine Phosphorylation of PDK-1 in Response to Angiotensin II: Role in Mesangial Cell Hypertrophy and Fibronectin Expression. *Journal of Biological Chemistry* 283:24061–24076. doi:10.1074/jbc.M803964200.
13. Boldogh IR, Pon LA (2006) Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 1763:450–462. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.02.014.
14. Braune S, Kluge S (2013) Akutes Lungenversagen - ein Update. *Dtsch med Wochenschr* 138:1019–1022. doi:10.1055/s-0032-1333051.
15. Browning EA, Chatterjee S, Fisher AB (2012) Stop the flow: a paradigm for cell signaling mediated by reactive oxygen species in the pulmonary endothelium. *Annu. Rev. Physiol.* 74:403–424. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153324.
16. Burke-Gaffney A, Evans TW (2012) Lest we forget the endothelial glycocalyx in sepsis. *Crit Care* 16:121. doi:10.1186/cc11239.
17. Carnesecchi S, Deffert C, Donati Y, Basset O, Hinz B, Preynat-Seauve O, Guichard C, Arbiser JL, Banfi B, Pache J, Barazzone-Argiroffo C, Krause K (2011) A Key Role for NOX4 in Epithelial Cell Death During Development of Lung Fibrosis. *Antioxidants & Redox Signaling* 15:607–619. doi:10.1089/ars.2010.3829.
18. Carnesecchi S, Pache J, Barazzone-Argiroffo C (2012) NOX enzymes: potential target for the treatment of acute lung injury. *Cell. Mol. Life Sci.* 69:2373–2385. doi:10.1007/s00018-012-1013-6.
19. Chapman KE, Sinclair SE, Zhuang D, Hassid A, Desai LP, Waters CM (2005) Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 289:L834-41. doi:10.1152/ajplung.00069.2005.
20. Chappell D, Jacob M, Becker BF, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M (2008) Expedition Glykokalyx. Ein neu entdecktes "Great Barrier Reef.". *Der Anaesthesist* 57:959–969. doi:10.1007/s00101-008-1445-4.
21. Chappell D, Westphal M, Jacob M (2009) The impact of the glycocalyx on microcirculatory oxygen distribution in critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol* 22:155–162. doi:10.1097/ACO.0b013e328328d1b6.

22. Chen Z, Song Y, Hu Z, Zhang S, Chen Y (2015) An estimation of mechanical stress on alveolar walls during repetitive alveolar reopening and closure. *J Appl Physiol* 119:190–201. doi:10.1152/jappphysiol.00112.2015.
23. Chhabra S, Prasad AK (2010) Flow and Particle Dispersion in a Pulmonary Alveolus—Part I: Velocity Measurements and Convective Particle Transport. *J. Biomech. Eng.* 132:51009. doi:10.1115/1.4001112.
24. Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131:1047–1058. doi:10.1016/j.cell.2007.11.028.
25. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330:55–60. doi:10.1126/science.1193270.
26. Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, Spencer KS, Kim SE, Schmidt M, Mathur J, Dubin AE, Montal M, Patapoutian A (2012) Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* 483:176–181. doi:10.1038/nature10812.
27. Cross AR, Jones OT (1986) The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem. J.* 237:111–116.
28. Desai LP, Chapman KE, Waters CM (2008) Mechanical stretch decreases migration of alveolar epithelial cells through mechanisms involving Rac1 and Tiam1. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 295:L958-L965. doi:10.1152/ajplung.90218.2008.
29. Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, O'Mahony DS, Glenny RW, Martin TR, Liles WC (2006) Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Invest* 86:790–799. doi:10.1038/labinvest.3700440.
30. Dietl P, Haller T, Frick M (2012) Spatio-temporal aspects, pathways and actions of Ca(2+) in surfactant secreting pulmonary alveolar type II pneumocytes. *Cell calcium* 52:296–302. doi:10.1016/j.ceca.2012.04.010.
31. Dikalov S (2011) Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radical Biology and Medicine* 51:1289–1301. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.033.
32. Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M (2008) N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther* 8:1955–1962. doi:10.1517/14728220802517901.
33. Douglas WH, Kaighn ME (1974) Clonal isolation of differentiated rat lung cells. *In vitro* 10:230–237.

34. Doussi re J, Vignais PV (1992) Diphenylene iodonium as an inhibitor of the NADPH oxidase complex of bovine neutrophils. Factors controlling the inhibitory potency of diphenylene iodonium in a cell-free system of oxidase activation. *Eur. J. Biochem.* 208:61–71.
35. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G (1988) High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137:1159–1164. doi:10.1164/ajrccm/137.5.1159.
36. Dreyfuss D, Soler P, Saumon G (1995) Mechanical ventilation-induced pulmonary edema. Interaction with previous lung alterations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151:1568–1575. doi:10.1164/ajrccm.151.5.7735616.
37. Drijkoningen JJC, Rohde GGU (2014) Pneumococcal infection in adults: burden of disease. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 Suppl 5:45–51. doi:10.1111/1469-0691.12461.
38. Edwards YS (2001) Stretch stimulation: its effects on alveolar type II cell function in the lung. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 129:245–260.
39. Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, Freeman G (1975) Transformation of alveolar Type 2 cells to Type 1 cells following exposure to NO<sub>2</sub>. *Experimental and Molecular Pathology* 22:142–150. doi:10.1016/0014-4800(75)90059-3.
40. Fan E, Villar J, Slutsky AS (2013) Novel approaches to minimize ventilator-induced lung injury. *BMC Med* 11:85. doi:10.1186/1741-7015-11-85.
41. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM (2003) Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ. Res.* 93:e136-42. doi:10.1161/01.RES.0000101744.47866.D5.
42. Fois G, Wittekindt O, Zheng X, Felder ET, Miklavc P, Frick M, Dietl P, Felder E (2012) An ultra fast detection method reveals strain-induced Ca(2+) entry via TRPV2 in alveolar type II cells. *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 11:959–971. doi:10.1007/s10237-011-0365-4.
43. Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 15:1583–1606. doi:10.1089/ars.2011.3999.
44. Gajic O, Dara SI, Mendez JL, Adesanya AO, Festic E, Caples SM, Rana R, St Sauver, Jennifer L, Lymp JF, Afessa B, Hubmayr RD (2004) Ventilator-associated lung injury in patients without acute lung injury at the onset of mechanical ventilation. *Crit. Care Med.* 32:1817–1824.

45. Gao X, Wu L, O'Neil RG (2003) Temperature-modulated diversity of TRPV4 channel gating: activation by physical stresses and phorbol ester derivatives through protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 278:27129–27137. doi:10.1074/jbc.M302517200.
46. Garcia C, Prota L, Morales MM, Romero PV, Zin WA, Rocco P (2006) Understanding the mechanisms of lung mechanical stress. *Braz J Med Biol Res* 39:697–706. doi:10.1590/S0100-879X2006000600001.
47. Gatley SJ, Sherratt SA (1976) The effects of diphenyleneiodonium on mitochondrial reactions. Relation of binding of diphenylene[125I]iodonium to mitochondria to the extent of inhibition of oxygen uptake. *Biochem. J.* 158:307–315.
48. Gattinoni L, Pesenti A (2005) The concept of "baby lung". *Intensive Care Med* 31:776–784. doi:10.1007/s00134-005-2627-z.
49. Griffith B, Pendyala S, Hecker L, Lee PJ, Natarajan V, Thannickal VJ (2009) NOX Enzymes and Pulmonary Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 11:2505–2516. doi:10.1089/ars.2009.2599.
50. Gu Y, Gu C (2014) Physiological and Pathological Functions of Mechanosensitive Ion Channels. *Mol Neurobiol.* doi:10.1007/s12035-014-8654-4.
51. Gutierrez HH, Nieves B, Chumley P, Rivera A, Freeman BA (1996) Nitric oxide regulation of superoxide-dependent lung injury: oxidant-protective actions of endogenously produced and exogenously administered nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 21:43–52.
52. Gutterman DD (2005) Mitochondria and reactive oxygen species: an evolution in function. *Circulation Research* 97:302–304. doi:10.1161/01.RES.0000179773.18195.12.
53. Guzy RD, Schumacker PT (2006) Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* 91:807–819. doi:10.1113/expphysiol.2006.033506.
54. Han B, Lodyga M, Liu M (2005) Ventilator-induced lung injury: role of protein-protein interaction in mechanosensation. *Proc Am Thorac Soc* 2:181–187. doi:10.1513/pats.200501-008AC.
55. Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, Remington SJ (2004) Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* 279:13044–13053. doi:10.1074/jbc.M312846200.
56. Harr JN, Stahel PF, Levy PD et al (2012) High-Frequency Ventilation. In: Vincent J, Hall JB (Hrsg) *Encyclopedia of Intensive Care Medicine*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 1114–1119.

57. Haswell ES, Phillips R, Rees DC (2011) Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it? *Structure* 19:1356–1369. doi:10.1016/j.str.2011.09.005.
58. Henriques-Normark B, Tuomanen EI (2013) The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3. doi:10.1101/cshperspect.a010215.
59. Hidalgo C, Donoso P (2008) Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid. Redox Signal.* 10:1275–1312. doi:10.1089/ars.2007.1886.
60. Hirst RA, Kadioglu A, O'callaghan C, Andrew PW (2004) The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clinical and experimental immunology* 138:195–201. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02611.x.
61. Hobi N, Ravasio A, Haller T (2012) Interfacial stress affects rat alveolar type II cell signaling and gene expression. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 303:L117-29. doi:10.1152/ajplung.00340.2011.
62. Holland PC, Clark MG, Bloxham DP, Lardy HA (1973) Mechanism of action of the hypoglycemic agent diphenylethylideneiodonium. *J. Biol. Chem.* 248:6050–6056.
63. Hyzy RC (2017) Ventilator-associated lung injury. [http://www.uptodate.com/contents/ventilator-associated-lung-injury?source=search\\_result&search=vali&selectedTitle=1~22](http://www.uptodate.com/contents/ventilator-associated-lung-injury?source=search_result&search=vali&selectedTitle=1~22). Zugegriffen: 11. Januar 2017.
64. Ingber DE (2003a) Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J. Cell. Sci.* 116:1157–1173.
65. Ingber DE (2003b) Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J. Cell. Sci.* 116:1397–1408.
66. Ingber DE (2008) Tensegrity and mechanotransduction. *J Bodyw Mov Ther* 12:198–200. doi:10.1016/j.jbmt.2008.04.038.
67. Ingber DE, Jamieson JD (1985) Cells as tensegrity structures: architectural regulation of histodifferentiation by physical forces transduced over basement membrane. In *Gene Expression During Normal and Malignant Differentiation*. Academic Press.
68. International Consensus Conferences in Intensive Care Medicine (1999) Ventilator-associated Lung Injury in ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 160:2118–2124. doi:10.1164/ajrccm.160.6.ats16060.



69. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature reviews. Microbiology* 6:288–301. doi:10.1038/nrmicro1871.
70. Kang H, Fan Y, Deng X (2011) Vascular smooth muscle cell glycocalyx modulates shear-induced proliferation, migration, and NO production responses. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 300:H76-H83. doi:10.1152/ajpheart.00905.2010.
71. Kliment CR, Tobolewski JM, Manni ML, Tan RJ, Enghild J, Oury TD (2008) Extracellular superoxide dismutase protects against matrix degradation of heparan sulfate in the lung. *Antioxid. Redox Signal.* 10:261–268. doi:10.1089/ars.2007.1906.
72. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto, Nadja C., Castilho RF, Vercesi AE (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 47:333–343. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004.
73. Kumagai R, Lu X, Kassab GS (2009) Role of glycocalyx in flow-induced production of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 47:600–607. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.034.
74. Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4:181–189. doi:10.1038/nri1312.
75. Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B (2007) Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 43:319–331. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.028.
76. Lee I, Yang C (2012) Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochem. Pharmacol.* 84:581–590. doi:10.1016/j.bcp.2012.05.005.
77. Liu M, Tanswell AK, Post M (1999) Mechanical force-induced signal transduction in lung cells. *Am. J. Physiol.* 277:L667-83.
78. Luecke T, Herrmann P, Quintel M (2000) Hochfrequenzoszillationsventilation (HFOV) bei akuter Lungenschädigung und ARDS. *Der Anaesthesist* 49:972–980. doi:10.1007/s001010070033.
79. Lüllmann-Rauch R (2009) Taschenlehrbuch Histologie; 10 Tabellen. Thieme, Stuttgart, New York, NY.
80. Mahto SK, Tenenbaum-Katan J, Greenblum A, Rothen-Rutishauser B, Sznitman J (2014) Microfluidic shear stress-regulated surfactant secretion in alveolar epithelial type II cells in vitro. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 306:L672-L683. doi:10.1152/ajplung.00106.2013.
81. Malhotra A, Drazen JM (2013) High-frequency oscillatory ventilation on shaky ground. *N. Engl. J. Med.* 368:863–865. doi:10.1056/NEJMe1300103.

82. Martinac B (2014) The ion channels to cytoskeleton connection as potential mechanism of mechanosensitivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838:682–691. doi:10.1016/j.bbamem.2013.07.015.
83. Müller-Esterl W (2011) *Biochemie; Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg.
84. Naumanen P, Lappalainen P, Hotulainen P (2008) Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J Microsc* 231:446–454. doi:10.1111/j.1365-2818.2008.02057.x.
85. Nikmanesh M, Shi Z, Tarbell JM (2012) Heparan sulfate proteoglycan mediates shear stress-induced endothelial gene expression in mouse embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Biotechnol. Bioeng.* 109:583–594. doi:10.1002/bit.23302.
86. Nucci G, Suki B, Lutchen K (2003) Modeling airflow-related shear stress during heterogeneous constriction and mechanical ventilation. *J Appl Physiol* (1985) 95:348–356. doi:10.1152/jappphysiol.01179.2001.
87. O'Connor N, Silver RB (2013) Ratio imaging: practical considerations for measuring intracellular Ca<sup>2+</sup> and pH in living cells. *Methods Cell Biol.* 114:387–406. doi:10.1016/B978-0-12-407761-4.00016-6.
88. Oczenski W (2012) *Atmen - Atemhilfen; Atemphysiologie und Beatmungstechnik*. Thieme, Stuttgart, New York, NY.
89. O'Donnell BV, Tew DG, Jones OT, England PJ (1993) Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem. J.* 290 (Pt 1):41–49.
90. O'Neil RG, Heller S (2005) The mechanosensitive nature of TRPV channels. *Pflugers Arch* 451:193–203. doi:10.1007/s00424-005-1424-4.
91. Pechkovsky DV, Zissel G, Goldmann T, Einhaus M, Taube C, Magnussen H, Schlaak M, Muller-Quernheim J (2002) Pattern of NOS2 and NOS3 mRNA expression in human A549 cells and primary cultured AEC II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L684-92. doi:10.1152/ajplung.00320.2000.
92. Pellegrin S, Mellor H (2007) Actin stress fibres. *J. Cell. Sci.* 120:3491–3499. doi:10.1242/jcs.018473.
93. Peshavariya H, Jiang F, Taylor CJ, Selemidis S, Chang, Catherine W. T, Dusting GJ (2009) Translation-Linked mRNA Destabilization Accompanying Serum-Induced Nox4 Expression in Human Endothelial Cells. *Antioxidants & Redox Signaling* 11:2399–2408. doi:10.1089/ars.2009.2579.
94. Plataki M, Hubmayr RD (2010) The physical basis of ventilator-induced lung injury. *Expert Review of Respiratory Medicine* 4:373–385. doi:10.1586/ers.10.28.

95. Prost N de, Dreyfuss D (2012) How to prevent ventilator-induced lung injury? *Minerva Anesthesiol* 78:1054–1066.
96. Rai P, Parrish M, Tay IJJ, Li N, Ackerman S, He F, Kwang J, Chow VT, Engelward BP (2015) Streptococcus pneumoniae secretes hydrogen peroxide leading to DNA damage and apoptosis in lung cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:E3421-30. doi:10.1073/pnas.1424144112.
97. Ramsingh R, Grygorczyk A, Solecki A, Cherkaoui LS, Berthiaume Y, Grygorczyk R (2011) Cell deformation at the air-liquid interface induces Ca<sup>2+</sup>-dependent ATP release from lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 300:L587-95. doi:10.1152/ajplung.00345.2010.
98. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS (2012) Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 307:2526–2533. doi:10.1001/jama.2012.5669.
99. Rassow J (2012) *Biochemie; 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen]*. Thieme, Stuttgart.
100. Ravasio A, Hobi N, Bertocchi C, Jesacher A, Dietl P, Haller T (2011) Interfacial sensing by alveolar type II cells: a new concept in lung physiology? *AJP: Cell Physiology* 300:C1456-C1465. doi:10.1152/ajpcell.00427.2010.
101. Roan E, Waters CM (2011) What do we know about mechanical strain in lung alveoli? *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 301:L625–L635.
102. Rubins JB, Duane PG, Clawson D, Charboneau D, Young J, Niewoehner DE (1993) Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infect Immun.*:1352–1358.
103. Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, Kruse C, Luedike P, Michaelis UR, Weissmann N, Dimmeler S, Shah AM, Brandes RP (2012) Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ. Res.* 110:1217–1225. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.267054.
104. Schwarz N, Leube RE (2016) Intermediate Filaments as Organizers of Cellular Space: How They Affect Mitochondrial Structure and Function. *Cells* 5. doi:10.3390/cells5030030.
105. Sena LA, Chandel NS (2012) Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell* 48:158–167. doi:10.1016/j.molcel.2012.09.025.
106. Silbernagl S, Despopoulos A (2012) *Taschenatlas Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

107. Slutsky AS, Ranieri VM (2013) Ventilator-Induced Lung Injury. *N Engl J Med* 369:2126–2136. doi:10.1056/NEJMra1208707.
108. Slutsky AS, Tremblay LN (1998) Multiple System Organ Failure. *Am J Respir Crit Care Med* 157:1721–1725. doi:10.1164/ajrccm.157.6.9709092.
109. Spiegel P, Wendel M, Popp A, Mehner M, Fischer B, Koch T, Koch E (2006) Lung cell culture chamber for time-lapse microscopy during application of air-flow induced shear-stress. *Biomedizinische Technik*.
110. Spieth PM, Bluth T, Gama De Abreu M, Bacelis A, Goetz AE, Kiefmann R (2014) Mechanotransduction in the lungs. *Minerva anesthesiologica* 80:933–941.
111. Spreer A, Kerstan H, Bottcher T, Gerber J, Siemer A, Zysk G, Mitchell TJ, Eiffert H, Nau R (2003) Reduced Release of Pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* In Vitro and In Vivo after Treatment with Nonbacteriolytic Antibiotics in Comparison to Ceftriaxone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:2649–2654. doi:10.1128/AAC.47.8.2649-2654.2003.
112. Steinfort C, Wilson R, Mitchell T, Feldman C, Rutman A, Todd H, Sykes D, Walker J, Saunders K, Andrew PW (1989) Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in vitro. *Infection and immunity* 57:2006–2013.
113. Stuehr DJ, Fasehun OA, Kwon NS, Gross SS, Gonzalez JA, Levi R, Nathan CF (1991) Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J.* 5:98–103.
114. Sud S, Sud M, Friedrich JO, Wunsch H, Meade MO, Ferguson ND, Adhikari, Neill K J (2013) High-frequency ventilation versus conventional ventilation for treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2:CD004085. doi:10.1002/14651858.CD004085.pub3.
115. Syrkina O, Jafari B, Hales CA, Quinn DA (2008) Oxidant stress mediates inflammation and apoptosis in ventilator-induced lung injury. *Respirology* 13:333–340. doi:10.1111/j.1440-1843.2008.01279.x.
116. Takac I, Schroder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD, Shah AM, Morel F, Brandes RP (2011) The E-loop Is Involved in Hydrogen Peroxide Formation by the NADPH Oxidase Nox4. *Journal of Biological Chemistry* 286:13304–13313. doi:10.1074/jbc.M110.192138.
117. Tarbell JM, Ebong EE (2008) The Endothelial Glycocalyx: A Mechano-Sensor and -Transducer. *Science Signaling* 1:pt8. doi:10.1126/scisignal.140pt8.
118. Tarbell JM, Pahakis MY (2006) Mechanotransduction and the glycocalyx. *J. Intern. Med.* 259:339–350. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01620.x.

119. Tarran R (2005) Normal and Cystic Fibrosis Airway Surface Liquid Homeostasis: The Effects of Phasic Shear Stress and Viral Infections. *Journal of Biological Chemistry* 280:35751–35759. doi:10.1074/jbc.M505832200.
120. Tazzeo T, Worek F, Janssen LJ (2009) The NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium is also a potent inhibitor of cholinesterases and the internal Ca<sup>2+</sup> pump. *British Journal of Pharmacology* 158:790–796. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00394.x.
121. Tew DG (1993) Inhibition of cytochrome P450 reductase by the diphenyliodonium cation. Kinetic analysis and covalent modifications. *Biochemistry* 32:10209–10215.
122. Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 279:L1005–L1028.
123. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network (2000) Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine* 342:1301–1308. doi:10.1056/NEJM200005043421801.
124. Thi MM, Tarbell JM, Weinbaum S, Spray DC (2004) The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a "bumper-car" model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:16483–16488. doi:10.1073/pnas.0407474101.
125. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P (2012) Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J. Cell. Sci.* 125:1855–1864. doi:10.1242/jcs.098087.
126. Veronese FM, Caliceti P, Schiavon O, Sergi M (2002) Polyethylene glycol–superoxide dismutase, a conjugate in search of exploitation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:587–606. doi:10.1016/S0169-409X(02)00029-7.
127. Villar J, Blanco J, Añón JM, Santos-Bouza A, Blanch L, Ambrós A, Gandía F, Carriedo D, Mosteiro F, Basaldúa S, Fernández RL, Kacmarek RM (2011a) The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive Care Med* 37:1932–1941. doi:10.1007/s00134-011-2380-4.
128. Villar J, Blanco J, Zhang H, Slutsky AS (2011b) Ventilator-induced lung injury and sepsis: two sides of the same coin? *Minerva Anesthesiol* 77:647–653.
129. Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, Hubmayr RD (1999) Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 277:L167-73.

130. Walther FJ, Wade AB, Warburton D, Forman HJ (1991) Augmentation of Superoxide Dismutase and Catalase Activity in Alveolar Type II Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4:364–368. doi:10.1165/ajrcmb/4.4.364.
131. Waters CM, Sporn, Peter H S, Liu M, Fredberg JJ (2002) Cellular biomechanics in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283:L503-9. doi:10.1152/ajplung.00141.2002.
132. Webb HH, Tierney DF (1974) Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am. Rev. Respir. Dis.* 110:556–565.
133. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER (2007) The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng* 9:121–167. doi:10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959.
134. Weir EK, Wyatt CN, Reeve HL, Huang J, Archer SL, Peers C (1994) Diphenyleneiodonium inhibits both potassium and calcium currents in isolated pulmonary artery smooth muscle cells. *J. Appl. Physiol.* 76:2611–2615.
135. Welte T, Torres A, Nathwani D (2012) Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax* 67:71–79. doi:10.1136/thx.2009.129502.
136. Wind S, Beuerlein K, Eucker T, Müller H, Scheurer P, Armitage ME, Ho H, Schmidt H, Winkler K (2010) Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. *British Journal of Pharmacology* 161:885–898. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00920.x.
137. Wirtz HR, Dobbs LG (1990) Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. *Science* 250:1266–1269.
138. Wirtz HR, Dobbs LG (2000) The effects of mechanical forces on lung functions. *Respir Physiol* 119:1–17.
139. Wosniak J, Santos, Célio X. C., Kowaltowski AJ, Laurindo, Francisco R. M. (2009) Cross-Talk Between Mitochondria and NADPH Oxidase: Effects of Mild Mitochondrial Dysfunction on Angiotensin II-Mediated Increase in Nox Isoform Expression and Activity in Vascular Smooth Muscle Cells. *Antioxidants & Redox Signaling* 11:1265–1278. doi:10.1089/ars.2009.2392.
140. Wyatt CN, Weir EK, Peers C (1994) Diphenylene iodonium blocks K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in type I cells isolated from the neonatal rat carotid body. *Neurosci. Lett.* 172:63–66.
141. Xiao R, Xu, X Z Shawn (2010) Mechanosensitive channels: in touch with Piezo. *Curr. Biol.* 20:R936-8. doi:10.1016/j.cub.2010.09.053.

142. Yamamoto K, Ando J (2010) [Blood flow sensing mechanism via calcium signaling in vascular endothelium]. *Yakugaku Zasshi* 130:1407–1411.
143. Yamamoto K, Sokabe T, Ohura N, Nakatsuka H, Kamiya A, Ando J (2003) Endogenously released ATP mediates shear stress-induced Ca<sup>2+</sup> influx into pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H793-803. doi:10.1152/ajpheart.01155.2002.
144. Yao Y, Rabodzey A, Dewey CF (2007) Glycocalyx modulates the motility and proliferative response of vascular endothelium to fluid shear stress. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 293:H1023-H1030. doi:10.1152/ajpheart.00162.2007.
145. Young D, Lamb SE, Shah S, MacKenzie I, Tunnicliffe W, Lall R, Rowan K, Cuthbertson BH (2013) High-Frequency Oscillation for Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 368:806–813. doi:10.1056/NEJMoa1215716.
146. Zakrzewicz D, Bergmann S, Didiasova M, Giaimo BD, Borggreffe T, Mieth M, Hocke AC, Lochnit G, Schaefer L, Hammerschmidt S, Preissner KT, Wygrecka M (2016) Host-derived extracellular RNA promotes adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to endothelial and epithelial cells. *Scientific reports* 6:37758. doi:10.1038/srep37758.
147. Zhang M, Brewer AC, Schröder K, Santos, Celio X C, Grieve DJ, Wang M, Anilkumar N, Yu B, Dong X, Walker SJ, Brandes RP, Shah AM (2010) NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:18121–18126. doi:10.1073/pnas.1009700107.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. A. E. Goetz für die Möglichkeit am Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin meine Dissertation durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. med. R. Kiefmann für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und seine unermüdliche Unterstützung bei dieser Arbeit, die er durch Anregungen und konstruktive Kritik voranbrachte. Sein Anspruch an Präzision und Wissenschaftlichkeit prägte meine Ausbildung und förderte meine Freude an Forschung.

Frau Dr. rer. nat. M. Kiefmann für ihre ständige, geduldige Hilfestellung bei allen inhaltlichen und methodischen Schwierigkeiten im Laboralltag.

Frau Dr. med. C. Olotu für den wissenschaftlichen Austausch und wertvolle Anregungen.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungslabor der Arbeitsgruppe Lungenforschung, die nicht nur durch ihr kompetentes, fachliches und methodisches Wissen, sondern auch durch ihre kollegiale und hilfsbereite Art die Arbeitsatmosphäre des Labors auch bei Schwierigkeiten angenehm gestalteten und damit zur Fertigstellung dieser Arbeit beitrugen.

Den Arbeitsgruppen „Klinisches Sensoring und Monitoring“ und „*Pulmonary Engineering Group*“ der Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus Dresden für die Bereitstellung der *Flow Chamber* und die technische Unterstützung.

Meiner Familie für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums.

Meinem Freund Simon für seine ermunternde und unkomplizierte Hilfe zu jeder Zeit.



## **10 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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.

Unterschrift: \_\_\_\_\_