

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Prof. Dr. med. Alwin Goetz  
Ärztlicher Leiter des Zentrums

Prof. Dr. med. Christian Zöllner  
Klinikdirektor

## **Analyse der funktionellen Purinrezeptorexpression auf L2- und R3/1-Zellen**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Cornelia Ronneburg  
aus Lüneburg

Hamburg 2018

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 23.04.2019**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Rainer Kiefmann**

**Prüfungsausschuss, 2. Gutachter : PD Dr. Friedrich Nolte**

Meinen Eltern gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Fragestellung</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>8</b>
2.1 Die Lunge: Alveolarepithelzellen (AEZ) Typ I und Typ II .....	8
2.2 Purinrezeptoren.....	8
2.3 Die Rolle von ATP für den Organismus und speziell für AEZ.....	14
2.4 Die Rolle von Calcium für den Organismus und speziell für AEZ.....	15
2.5 Pneumonie: Entstehung und Risiken .....	15
2.6 Streptokokkus pneumoniae .....	16
2.7 Zelllinien R3/1 und L2.....	17
2.8 Für P2X- und P2Y-Rezeptoren verwendete Agonisten .....	18
2.9 Weitere verwendete Substanzen .....	19
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.1 Material .....	20
3.1.1 Purinrezeptor-Agonisten/Antagonisten und Reagenzien .....	20
3.1.2 Substanzen und Membranen .....	21
3.1.3 Puffer, Lösungen und Medikamente .....	22
3.1.4 Kits .....	23
3.1.5 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)-Reagenzien .....	24
3.1.6 Oligonukleotidprimer .....	25
3.1.7 Antikörper für Western Blot .....	26
3.1.8 Geräte und Zubehör.....	26
3.1.9 Software .....	28
3.1.10 Zellen.....	28
3.1.11 Bakterien .....	29
3.2 Methoden .....	29
3.2.1 Zellkultur der L2- und R3/1-Zellen.....	29
3.2.2 Inkubation von L2- und R3/1-Zellen mit Pneumokokken .....	29
3.2.3 Grundsätzliche Funktion des Mikroskops Olympus BX 40 .....	30
3.2.4 Prinzip intrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Messung durch Epifluoreszenzmikroskopie ...	30

3.2.5	Kalibrierung nach Grynkiewicz .....	31
3.2.6	Versuchsvorbereitung für L2- und R3/1-Zellversuche .....	31
3.2.7	Versuchsabläufe: L2- und R3/1-Zellen .....	31
3.2.8	Software und Auswertung MetaFluor® .....	32
3.2.9	cDNA-Analyse (RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, RT-PCR) .....	32
3.2.10	Optische Darstellung der amplifizierten DNA .....	34
3.2.11	Western Blot .....	34
3.2.12	Statistik .....	36
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
4.1	Mikroskopische Darstellung von L2- und R3/1-Zellen .....	37
4.2	Effekte von spezifischen Agonisten und Antagonisten auf die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ von L2- und R3/1-Zellen .....	38
4.3	Einflüsse auf die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ von L2- und R3/1-Zellen bei Inkubation mit Pneumokokken und ATP .....	46
4.4	Darstellung der mRNA von L2- und R3/1-Zellen mittels PCR .....	47
4.5	L2- und R3/1-Zellen: Darstellung auf Proteinebene mittels Western Blot .....	48
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
5.1	Bedeutung der Calciumsignale bei in-vitro-Versuchen mit L2- und R3/1-Zellen .....	49
5.2	Eingrenzung und Nachweis potentieller Purinrezeptoren mittels PCR und Western Blot .....	51
5.3	Beeinflussung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ bei L2- und R3/1-Zellen .....	52
5.4	Purinrezeptoren in AEZ verglichen mit pulmonalem Endothel .....	53
5.5	Perspektiven bezüglich der Erkenntnisse über pulmonale P2X- und P2Y-Rezeptoren .....	54
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>58</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>64</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>66</b>
<b>11.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>67</b>

**12. Eidesstattliche Versicherung .....68**

## 1. Fragestellung

Es ist bisher in der Literatur nicht ausreichend geklärt, welche Purinrezeptoren in Alveolarepithelzellen (AEZ) vorkommen. Deshalb sollte die Purinrezeptorexpression von AEZ in dieser Arbeit im Vordergrund stehen und war Grund der Untersuchung.

Ein essentieller Faktor, um die Atmung aufrecht zu erhalten und ein Kollabieren einzelner Lungenabschnitte zu verhindern, ist Surfactant [6]. Somit ist ein funktionierender Surfactantfilm lebensnotwendig. Da Purinrezeptoren zur Surfactantbildung und Sekretion beitragen, ist es wichtig, dass diese genau charakterisiert sind [50].

Dass im Zuge einer durch *Streptokokkus pneumoniae* ausgelösten Pneumonie Atelektasen vorkommen können, ist bekannt [50]. Durch den direkten Zusammenhang von Surfactantmenge und Atelektasen ist es möglich, dass *S. pneumoniae* die notwendige Surfactantsekretion herabsetzen. Die Pneumonie ist eine sehr häufig auftretende Infektionserkrankung. Sie stellt sogar weltweit die häufigste, auf einer Infektionskrankheit beruhende Todesursache bei Kindern unter fünf Jahren dar [8]. Somit ist die erweiterte Grundlagenforschung der Wirkweise von *S. pneumoniae* obligat.

L2- und R3/1-Zellen (Rattenlunge) sind die einzigen immortalen AEZ-Typ I- und Typ II-ähnlichen Zellen, die für diese Untersuchung in Betracht kamen. In Frage gestellt war, welche Purinrezeptoren (P2X und P2Y) bei L2- und R3/1-Zellen funktional exprimiert sind. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass *S. pneumoniae* an humanen Adenokarzinomen-AEZ (A549) zu einer Unterdrückung des ATP-induzierten, P2Y-vermittelten  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstieges führten [50]. In diesem Zusammenhang stellte sich des Weiteren die Frage, welche Auswirkungen *S. pneumoniae* diesbezüglich auf L2- und R3/1-Zellen haben.

Diese Fragen sollten in dieser Arbeit mittels Untersuchungen am Calciumsignaling von L2- und R3/1-Zellen beantwortet werden. Der Calciumhaushalt der AEZ steht in direktem Zusammenhang mit der Surfactantsekretion und der purinergen Signaltransduktion von P2X- und P2Y-Rezeptoren.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Die Lunge: Alveolarepithelzellen (AEZ) Typ I und Typ II**

AEZ Typ I bedecken 95% der Alveolaroberfläche. Diese flachen, großflächigen Zellen machen jedoch nur 8% der gesamten Zellen der menschlichen Lunge aus [43], [44]. AEZ Typ I bilden mit der Basalmembran und dem Kapillarendothel die Blut-Luft-Schranke. Hier findet der Gasaustausch statt. AEZ Typ I sind in entscheidendem Maße am Ionen- und Flüssigkeitstransport beteiligt [6].

AEZ Typ II bedecken zu 5% die Alveolaroberfläche. Der Anteil – bezogen auf die Gesamtzellzahl der menschlichen Lunge – beträgt bei AEZ Typ II 15% [43], [44]. Diese kubischen Mikrovilli tragenden Zellen sind für die Surfactantbildung und für das Surfactantrecycling verantwortlich. Die Surfactantsekretion wird durch ATP als parakrinen Mediator stimuliert [14]. ATP bindet an Purinrezeptoren, mit folgender Aktivierung der Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>)-Kaskade und daraus resultierendem Calciumanstieg im Zytosol [16]. Der Calciumanstieg erzeugt eine Fusion von Lamellenkörpern mit der Plasmamembran. Nur so kann Surfactant in den Alveolus ausgeschüttet werden [16]. Surfactant setzt die Oberflächenspannung herab. Dies hält das Volumen der Lunge aufrecht und verhindert ein Kollabieren (Atelektase). Surfactant hat weitere entscheidende Aufgaben. Surfactant assoziierte Proteine (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D) sind Co-Faktoren, die den Umsatz des Surfactant regulieren, den Surfactantfilm stabilisieren und als Opsonine der unspezifischen Abwehr fungieren [6].

Des Weiteren sind AEZ Typ II auch am Ionentransport beteiligt [13]. Sie proliferieren und differenzieren sich zu AEZ Typ I im Zuge von Reparaturmechanismen bei Lungenverletzung [13].

### **2.2 Purinrezeptoren**

Viele entscheidende biochemische Prozesse werden über Purinrezeptoren, die in der Zellmembran lokalisiert sind, vermittelt, wie zum Beispiel neuronale Mechanismen, Immunantworten, endokrine und exokrine Sekretion, vasale Kontraktionsmechanismen, Thrombozytenaggregation und Zellproliferation [17].

Purinrezeptoren teilen sich in mehrere Gruppen auf. P<sub>1</sub>-Adenosinrezeptoren (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>) reagieren auf Adenosine [17]. Ihre Antagonisten sind unter anderem Xanthine.

Die Signaltransduktion findet G-Protein-gekoppelt statt [17]. P1-Adenosinrezeptoren kommen beispielsweise im ZNS, im Herz, im Darm und in der Milz vor [18]. P2-Purinrezeptoren unterteilen sich in P2X- und P2Y-Rezeptoren [17]. Bei P2X-Rezeptoren liegen sieben Isoformen vor (P2X<sub>1-7</sub>) [17]. Bezüglich P2Y-Rezeptoren sind bisher acht Isoformen bekannt. Diese sind P2Y<sub>1,2,4,6</sub>, P2Y<sub>11-14</sub> [17]. Eine genauere Übersicht über das Vorkommen von P2X- und P2Y-Rezeptoren liefert Tab. 1. P2X-Rezeptoren sind ionotrop. Nach Aktivierung findet ein Ioneneinstrom von extrazellulär in den Intrazellulärraum statt [19]. P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Kationenkanäle und für Natrium, Kalium und Calcium durchlässig [17].

Die metabotropen P2Y-Purinrezeptoren vermitteln die Freisetzung von Calciumionen innerhalb des Intrazellulärraums [19]. Dies geschieht G-Protein-gekoppelt, über den Weg der IP3-Kaskade, aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) [19]. Sowohl die ionotrope als auch die metabotrope Rezeptoraktivierung findet mittels Adenosintriphosphat (ATP) statt [17]. Zahlreiche Agonisten sind bereits erforscht, die den Effekt von ATP imitieren [19] (s. Tab. 1).

## Purinrezeptoren im menschlichen Körper

Rezeptor	Vorkommen	Agonisten	Antagonisten
P2X <sub>1</sub>	glatte Muskulatur, Thrombozyten, Kleinhirn, Dorsalhorn des Rückenmarks	α,β-meATP, ATP, BzATP, 2MeSATP	Suramin
P2X <sub>2</sub>	glatter Muskel, ZNS, Retina, chromaffine Zellen, Ganglien	ATP, 2MeSATP, α,β-meATP	Suramin
P2X <sub>3</sub>	sensible Neuronen, sympathische Neuronen	2MeSATP, ATP, α,β-meATP	Suramin
P2X <sub>4</sub>	ZNS, Hoden, Kolon	ATP, α,β-meATP, 2MeSATP	TNP-ATP*
P2X <sub>5</sub>	proliferative Hautzellen, Darm, Blase, Thymus, Rückenmark	ATP, α,β-meATP, 2MeSATP	Suramin
P2X <sub>6</sub>	ZNS, Motoneuronen des Rückenmarks	Funktioniert nicht als Homomultimer	Suramin
P2X <sub>7</sub>	apoptotische Immunzellen, Pankreas, Hautzellen	BzATP, ATP, 2MesATP, α,β-me ATP	oxidiertes ATP
P2Y <sub>1</sub>	Epithelzellen, Endothelzellen, Thrombozyten, Immunzellen, Osteoklasten	2MesATP, ATP, ADP	PPADS*
P2Y <sub>2</sub>	Epithelzellen, Endothelzellen, Immunzellen, Zellen der Nierentubuli, Osteoblasten	UTP, ATP	Suramin
P2Y <sub>4</sub>	Endothelzellen, Thymus, Milz	UTP, ATP	Suramin
P2Y <sub>6</sub>	Epithelzellen, Plazenta, Thymus, T-Zellen	UDP, UTP, ATP	Suramin, PPADS
P2Y <sub>11</sub>	Milz, Granulozyten (intestinal)	BzATP, ATP	Suramin
P2Y <sub>12</sub>	Thrombozyten, Gliazellen	ADP, ATP	2-MeSAMP
P2Y <sub>13</sub>	Milz, Gehirn, Lymphknoten, Knochenmark, Erythrozyten	ADP, ATP, 2MesATP	2-MeSAMP
P2Y <sub>14</sub>	Plazenta, Fettgewebe, Gehirn	UDP Glucose, UDP Galactose	

Tab. 1 Modifiziert aus Burnstock, 2012 [18]. \*PPADS: Pyridoxal-Phosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonische Säure, \* TNP-ATP: Trinitrophenyl-Adenosintriphosphat. S. auch 2.8.

Aufbau von P2X-Rezeptoren: Die in der Zellmembran lokalisierten P2X-Rezeptor-Isoformen (P2X<sub>1-7</sub>) bestehen grundsätzlich aus mehreren Untereinheiten (s. Abb. 1). Jede Untereinheit verfügt über zwei transmembranäre Helices (TM1, TM2) mit intrazellulären N- und C-Termini [20]. Zwei transmembranäre Helices werden durch eine Ektodomäne in Form einer extrazellulären schleifenförmigen Ligandenbindungsstelle verbunden. Diese extrazelluläre flexible Schleife ist aus zehn Cysteinresten und einer Folge von Disulfidbrücken aufgebaut [20]. Die hydrophobe H5-Region, die in der Nähe des Kanaleingangs lokalisiert ist, stellt die Bindungsstelle für ATP oder dessen Derivate dar. Drei der genannten Untereinheiten bilden einen funktionellen homo- oder heterotrimeren P2X-Rezeptor und somit einen Ionenkanal [20]. Wird ein P2X-Rezeptor aus drei Untereinheiten einer Isoform aufgebaut, bezeichnet man diesen als Homotrimer. Ein heterotrimerer Rezeptor liegt bei Bildung einer Pore aus unterschiedlichen Isoformen vor [20].

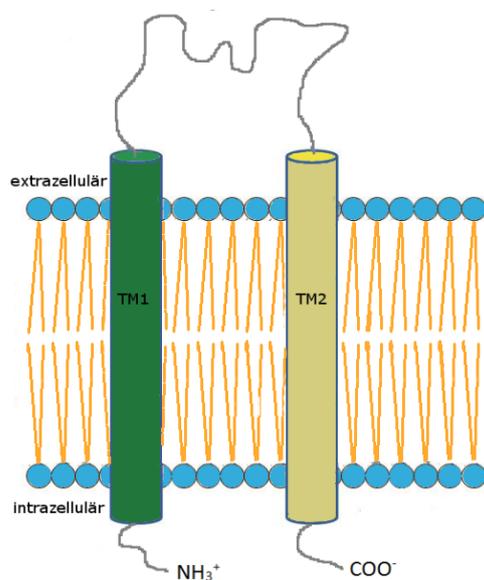


Abb. 1 Schematische Darstellung einer Untereinheit des P2X-Rezeptors mit Ektodomäne, zwei transmembranären Helices (TM1, TM2), auch Domänen genannt, und intrazellulärem N- und C-Terminus. Modifiziert aus Kawate et al., 2009 [20], Browne et al. 2010 [21].

Ionenpassage bei P2X-Rezeptoren: Durch Agonistenkontakt erfolgt der Ioneneinstrom durch den Ionenkanal des P2X-Rezeptors von extra- nach intrazellulär. Die Ionenpassage geschieht passiv entlang des Konzentrationsgefälles [19].

Sobald ein ATP-Molekül an zwei Lysinreste der hydrophoben H5-Bindungsstelle andockt, öffnet sich der Ionenkanal. Die TM-Helices, die zuvor einen verschlossenen Kanal

darstellten, öffnen diesen nun, indem sie in rotierender Art und Weise ihre Konformation ändern [21] (s. auch Abb. 2).

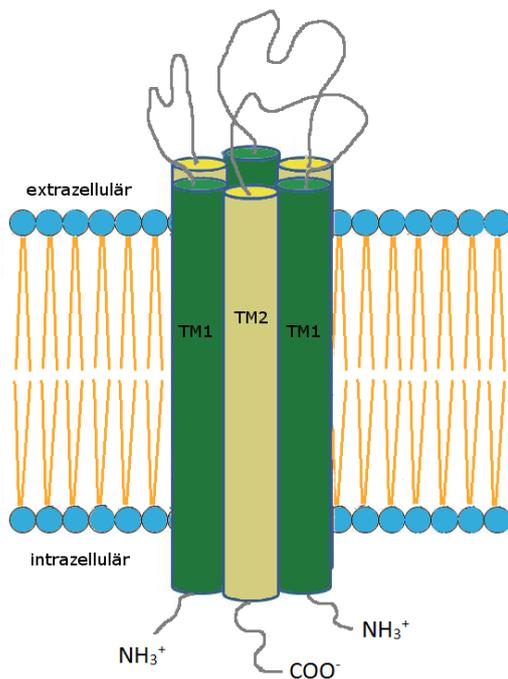


Abb. 2 Schematische Darstellung des P2X-Rezeptors. Drei Untereinheiten stellen ein Trimer dar, wodurch ein Ionenkanal – in diesem Fall mit leicht geöffneter Pore – entsteht. Modifiziert aus Kawate et al., 2009 [20], Browne et al., 2010 [21].

Aufbau von P2Y-Rezeptoren: Innerhalb der Zellmembran befinden sich sieben  $\alpha$ -helikale Domänen, die mit einem intrazellulären C-Terminus und einem extrazellulären N-Terminus verknüpft sind [23]. Genannte  $\alpha$ -helikale Domänen – auch als transmembranäre Domänen bezeichnet – sind durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre schleifenartige Gebilde, sog. loops, verbunden [24] (s. auch Abb. 3).

G-Protein-gekoppelter Rezeptormechanismus am Beispiel der P2Y-Rezeptoren: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen die umfangreichste Familie der intrazellulär, bzw. in der Zellmembran verankert gelegenen Rezeptoren dar [17]. Sobald die extrazelluläre Bindung des Liganden an den Domänen 3, 5, 6 und 7 des P2Y-Rezeptors stattgefunden hat, ändert sich die Konformation aller sieben transmembranären Domänen [22]. Diese Konformationsänderung überträgt sich auf das G-Protein. G-Proteine bestehen aus drei Teilen, der  $\alpha$ -Untereinheit und den undissoziierbaren  $\beta\gamma$ -Untereinheiten [24]. Die  $\alpha$ -Untereinheit bindet Guanosindiphosphat (GDP), das bei Rezeptoraktivierung durch den GTP *exchange factor* (GEF) gegen Guanosin triphosphat (GTP) ausgetauscht wird. Im Folgenden wird die Phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) durch die isolierte  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert.

PLC $\beta$  spaltet membranständiges IP<sub>2</sub>, woraus die Bildung von IP<sub>3</sub> und Diacylglycerin (DAG) resultiert [24]. Die IP<sub>3</sub>-Kaskade führt dazu, dass aus dem ER Calcium durch geöffnete Kanäle ins Zytosol freigesetzt wird. Die intrazelluläre Calciumkonzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> steigt somit an [22], [24]. Diese komplexe biochemische Signalkaskade ist im Wesentlichen in Abb. 4 zusammengefasst.

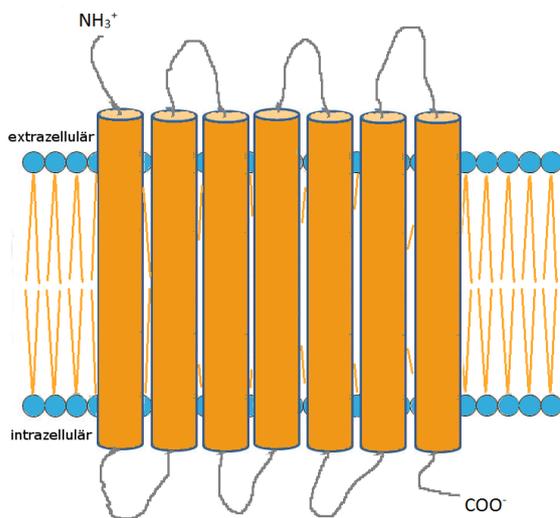


Abb. 3 Schematische Darstellung eines P<sub>2</sub>Y-Rezeptors mit sieben Domänen (hier orange), N- und C-Terminus und loops. Modifiziert aus Burnstock et al., 1998 [22], Alberts et al., 2011 [24].

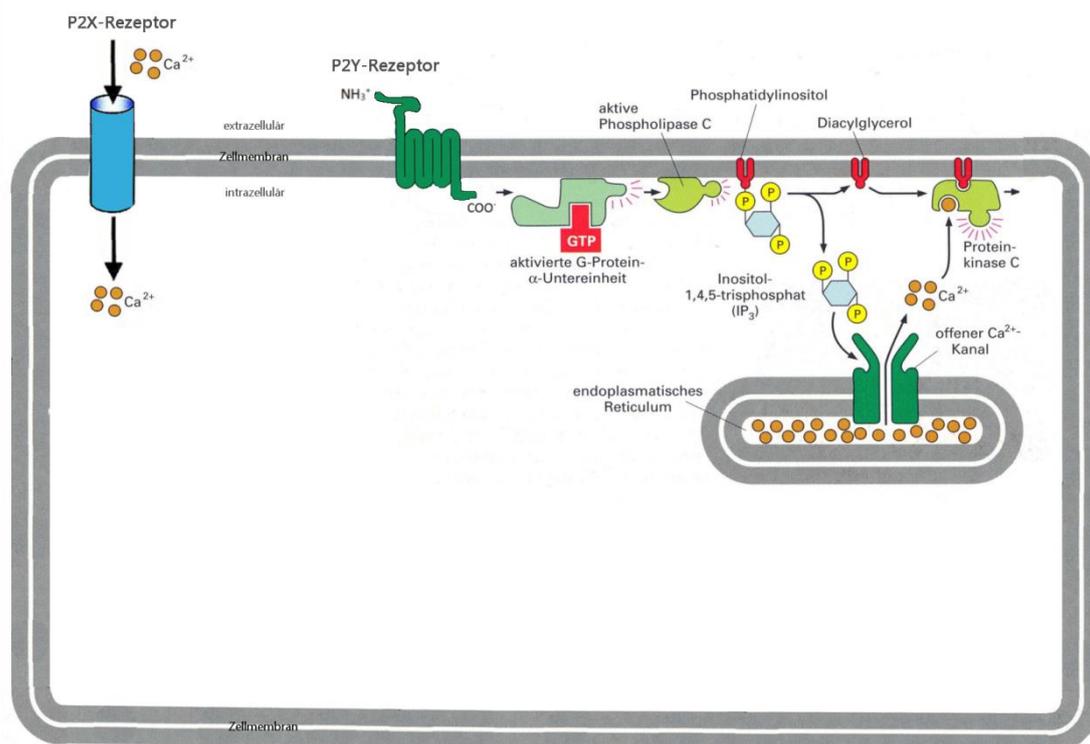


Abb. 4 Schematische Darstellung einer Zelle mit je einem P2X- und P2Y-Rezeptor. Die Abbildung zeigt nicht alle Zellbestandteile. Die Pore des P2X-Rezeptors (hier blau) ist geöffnet, Calciumionen strömen nach intrazellulär. Durch Aktivierung des P2Y-Rezeptors (hier grün) wird die G-Protein-gekoppelte IP<sub>3</sub>-Signalkaskade in Gang gesetzt. Dies führt zu einer Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER. Modifiziert aus Alberts et al., 2011 [24].

### 2.3 Die Rolle von ATP für den Organismus und speziell für AEZ

ATP stellt den entscheidenden Energielieferanten des Körpers dar und spielt dementsprechend im Organismus bei vielen unterschiedlichen Prozessen eine Rolle. ATP liefert bei jeglicher Muskelkontraktion die nötige Energie oder dient als neuronaler Kotransmitter. Sowohl im Gehirn als auch auf Rückenmarksebene wirkt ATP regulierend bei der Reizweiterleitung. Bei vielen verschiedenen aktiven Stofftransporten durch Zellmembranen hindurch wird ATP als Energielieferant genutzt. Auch bei der Proteinbiosynthese wird Energie durch Spaltung von ATP bereitgestellt.

Purinrezeptoren sind wichtige, vielfältig exprimierte Signalmoleküle. ATP stellt hierbei den physiologischen Agonist der Purinrezeptoren dar [25].

ATP vermittelt über Purinrezeptoren in den Lungenalveolen eine wichtige Funktion. Um überschüssige Flüssigkeit aus den Alveolen zu entfernen, gelangen bei AEZ Typ I und

Typ II Na<sup>+</sup>-Ionen apikal über Amilorid-sensitive Natriumkanäle, sog. ENaC (*epithelial sodium channel*) ins Zellinnere [13]. Basolateral werden diese über Natrium-Kalium-ATPasen wieder hinausgeschleust. Aufgrund des elektrochemischen Gradienten folgen Wasser (über Aquaporine oder mittels Diffusion) und Chlorid [13]. Es wird jedoch angenommen, dass AEZ Typ I verglichen mit AEZ Typ II die entscheidendere Rolle bezüglich des Ionentransports spielen. Die  $\alpha$ -2-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase kommt nur bei AEZ Typ I vor und macht ca. 60% des Flüssigkeitstransportes des Alveolarepithels aus. Dieser Flüssigkeitstransport ist essentiell, um Ödembildungen zu verhindern [13].

## 2.4 Die Rolle von Calcium für den Organismus und speziell für AEZ

Calcium stellt einen wichtigen Mineralstoff im menschlichen Körper dar. Abgesehen von der wesentlichen Bedeutung von Ca<sup>2+</sup> für Knochen und Zähne, spielt es eine Rolle bei der Muskelkontraktion und Blutgerinnung [42]. Eine Vielzahl zellulärer Prozesse wird durch Ca<sup>2+</sup> gesteuert, so wird Ca<sup>2+</sup> intrazellulär im ER und in den Mitochondrien gespeichert [24]. Der Transport über die Membran erfolgt mittels Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Antiport oder Ca<sup>2+</sup>-ATPase nach extra- und mittels spannungsgesteuerten oder ligandengesteuerten Calciumkanälen nach intrazellulär [46]. Calmodulin bindet in einem Calcium-Calmodulin-Komplex das freie Ca<sup>2+</sup>, wodurch Calcium-Calmodulin-Kinasen (CaM-Kinasen) aktiviert werden. Dies ist der Beginn von vielen enzymatischen Vorgängen [46].

Bei AEZ Typ II löst der Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> die Exozytose von Surfactant aus [16]. Surfactant reduziert die Oberflächenspannung im Alveolus und verhindert somit den alveolären Kollaps [46]. Der intrazelluläre Calciumanstieg wird u.a. physiologisch durch die atmungsbedingte Dehnung der Alveolen ausgelöst [46], vor allem aber wie beschrieben durch purinerge Stoffwechselwege nach Aktivierung von P2X- und P2Y-Rezeptoren [49], [14].

## 2.5 Pneumonie: Entstehung und Risiken

Die Pneumonie ist eine entzündliche Erkrankung des Lungenparenchyms, die beispielsweise durch eine Infektion mit Bakterien, Viren oder Pilzen ausgelöst werden kann [10]. Das komplexe Lungensystem und die Atmung können durch eine Pneumonie stark beeinträchtigt werden. Als Entzündungsantwort werden vermehrt Makrophagen freigesetzt und es kommt zur Einwanderung von Granulozyten [11]. Die inflammatorische Reaktion des Epithels führt zu einer Barriere- und Permeabilitätsstörung, es kommt zu alveolärer Ödembildung [50]. Die verminderte Surfactantsekretion und der gesteigerte

Surfactantabbau bedingen die Entstehung von Atelektasen [50]. Die physiologischen Zellvorgänge in den AEZ werden empfindlich gestört. Der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Lungenentzündung ist das grampositive Bakterium *Streptokokkus pneumoniae* [29]. Eine Pneumonie nimmt auch heute noch oft letalen Verlauf.

Die Pneumonie stellt (neben anderen Lungenerkrankungen) nach der koronaren Herzkrankheit und Schlaganfällen die dritthäufigste Todesursache bei Erwachsenen dar [8]. Die Infektionswege sind vielfältig. Erreger können sowohl durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion als auch über direktes Einatmen von Aerosolen in die unteren Atemwege gelangen.

Eine Pneumonie kann ambulant (*community-acquired-pneumonia*, CAP) oder nosokomial (*hospital-acquired-pneumonia*, HAP) erworben werden [30]. In Deutschland erkranken jährlich 400.000 bis 600.000 Menschen an CAP, im Vergleich dazu bis zu 120.000 an HAP [30]. Nosokomial erworbene Pneumonien werden oft durch Vorerkrankungen begünstigt (HIV, Diabetes mellitus, COPD, Malignome, Alkoholabusus etc.) [4]. Definitionsgemäß ist von einer HAP erst 48 Stunden nach Klinikaufnahme zu sprechen [4]. Daher tritt diese Art der Pneumonie eher bei längeren Krankenhausaufenthalten auf, insbesondere auf der Intensivstation. Häufig kommt es durch die Notwendigkeit der maschinellen Beatmung zur HAP, die in diesem Fall noch genauer klassifiziert als VAP (*ventilator-associated pneumonia*) bezeichnet wird [4].

Anatomisch betrachtet können einzelne Lungenlappen (Lobärpneumonie), die terminalen Bronchien und Alveolen oft beider Lappen (Bronchopneumonie) oder lediglich einzelne Alveolarbereiche (alveoläre Pneumonie) betroffen sein [4].

Nach erfolgreicher Adhäsion am Rachenepithel werden Pneumokokken in die tieferen Atemwege aspiriert. In den Alveolen bildet sich entzündliches Exsudat als Abwehrreaktion [4].

Das klinische Erscheinungsbild mit Begleiterscheinungen und der Schweregrad einer Pneumonie können stark variieren. Schwere Verläufe sind beispielsweise durch Entzündungsausbreitung in Form einer Pleuritis, eines Lungenabszesses oder einer Perikarditis gekennzeichnet [9].

## **2.6 Streptokokkus pneumoniae**

Das Bakterium *Streptokokkus pneumoniae* gehört zur Gattung der Streptokokken und wird auch kurz als Pneumokokke bezeichnet [11]. Pneumokokken besiedeln die

Rachenschleimhaut bis zu 70% aller gesunden Menschen, wobei diese vorzugsweise ungekapselt sind [11]. Pneumokokken sind lanzettenförmige, fakultativ anaerobe, grampositive Diplokokken. Mittlerweile sind 85 verschiedene Serogruppen bekannt [11]. Sie unterscheiden sich durch die Ausprägung der Polysaccharidkapsel [11]. Je dicker diese Kapsel, desto größer ist die Pathogenität. Die Kapsel schützt *S. pneumoniae* vor Phagozytose durch Makrophagen und hemmt die Initiierung der alternativen Komplementkaskade [15]. Bei kapsellosen Formen geht man von Apathogenität aus. Pneumokokken gehören zu den alpha-hämolisierenden Streptokokken [11]. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von *S. pneumoniae in vitro* auf AEZ untersucht. Dazu dienten die Zelllinien L2 und R3/1 der Rattenlunge, s. 2.7.

## **2.7 Zelllinien R3/1 und L2**

R3/1-Zellen: Bei den hier verwendeten R3/1-Zellen handelte es sich um immortalisierte AEZ Typ I-ähnliche Zellen. Dabei wurden AEZ Typ II-Zellen aus der Rattenlunge (in diesem Fall aus der fetalen Han-Wistar Ratte) primär isoliert. Diese differenzierten in Kultur zu AEZ Typ I-ähnlichen Zellen und verloren somit die charakteristischen Typ II-Merkmale. Es konnten jedoch, wenn auch nur schwach exprimiert, Surfactantproteine nachgewiesen werden [28].

L2-Zellen: Die ebenfalls immortalisierten L2-Zellen entstammten der adulten Lewis-Rattenlunge. Sie entsprachen eher AEZ Typ II. L2-Zellen enthalten grundsätzlich zahlreiche Lamellenkörper im Zytoplasma. Auch das Vorkommen von Peroxisomen in L2-Zellen ist eine Gemeinsamkeit mit AEZ Typ II [26], [27].

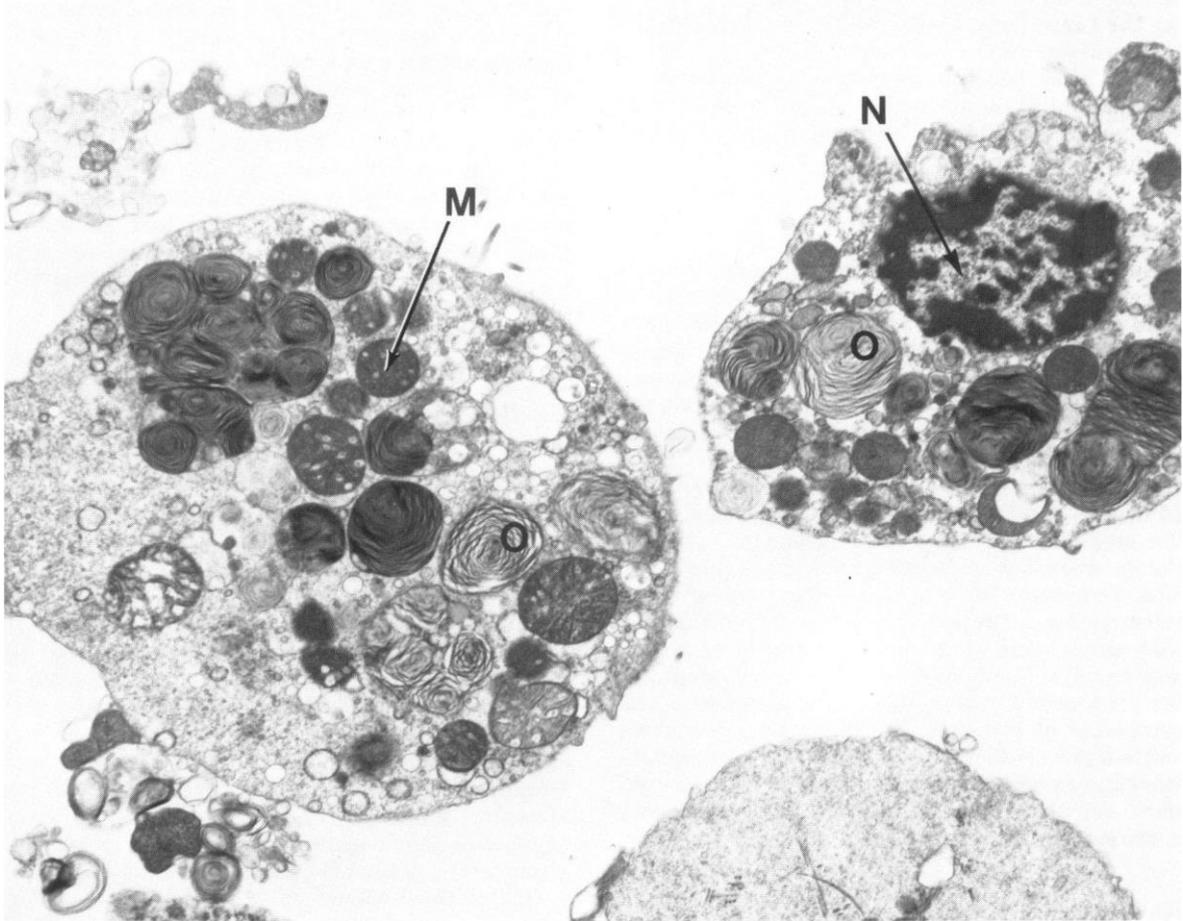


Abb. 5 Elektronenmikroskopische Aufnahme von L2-Zellen mit klar abgegrenzten Strukturen. „N“ steht für Nucleus, „M“ für Mitochondrium, „O“ für Lamellenkörper (Douglas et al., 1976) [27].

## 2.8 Für P2X- und P2Y-Rezeptoren verwendete Agonisten

Ein Baustein der Untersuchungen von L2- und R3/1-Zellen stellte die Inkubation dieser Zelllinien mit potentiellen Agonisten dar. Es sollte gezeigt werden, inwieweit diese Auswirkungen auf die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  der untersuchten Zellen haben. An dieser Stelle werden die verwendeten potentiellen Agonisten beschrieben.

**ATP:** Adenosin-5'-Triphosphat ist der natürlich vorkommende potentielle Agonist. Bisher erforschte P2X- und P2Y-Rezeptoren weisen fast alle ATP als aktiv in Erscheinung tretenden Agonisten auf. Die Ausnahmen bilden P2X<sub>6</sub> und P2Y<sub>14</sub> (s. auch Tab. 1).

**BzATP:** 2',(3')-O(4-Benzoylbenzoyl)-ATP ist ein synthetisch hergestellter Agonist der Rezeptoren P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>7</sub> und P2Y<sub>11</sub>. Seine agonistische Aktivität soll bis zu 100-mal höher sein als die von ATP [41].

**$\alpha,\beta$ -meATP:**  $\alpha,\beta$ -Methylen-Adenosin-5'-Triphosphat ist ein synthetisch erzeugter Agonist der Rezeptoren P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub> und P2X<sub>7</sub>. Bei den Rezeptoren P2X<sub>2</sub> und P2X<sub>4-7</sub> fungiert  $\alpha,\beta$ -meATP lediglich als Partialagonist.  $\alpha,\beta$ -me-ATP bindet nicht an P2Y-Rezeptoren.  $\alpha,\beta$ -meATP ist weniger potent als ATP und 2MeSATP [22].

**2MeSATP:** Auch 2-(Methylthio)-Adenosin-5'-Triphosphat wird synthetisch hergestellt. Die Substanz wirkt als Agonist an P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>13</sub> [22].

**UDP:** Das Nukleotid Uridin-5'-Diphosphat besteht aus der Nukleinbase Uracil, einer Ribose und zwei Phosphaten. Es dient im menschlichen Körper als Coenzym bei der Glycosylierung und spielt eine Rolle bei der DNA-Synthese [42]. Nach bisherigem Kenntnisstand ist UDP Agonist an P2Y<sub>6</sub>- und P2Y<sub>14</sub>-Rezeptoren (s. Tab. 1).

**UTP:** Uridin-5'-Triphosphat unterscheidet sich zu UDP durch die dritte Phosphatgruppe. UTP ist ein Bestandteil der RNA und stellt ein Coenzym beim Glukosestoffwechsel dar [42]. Bezüglich der Purinrezeptoren P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> und P2Y<sub>6</sub> hat UTP Agonistenfunktion (s. Tab. 1).

## 2.9 Weitere verwendete Substanzen

**Thapsigargin:** Thapsigargin ist pflanzlichen Ursprungs. Auf zellulärer Ebene hemmt es die Ca<sup>2+</sup>-ATPase des endoplasmatischen und sarcoplasmatischen Retikulums (SERCA= sarcoendoplasmatische Retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase). Somit verhindert es die Beförderung von Calcium aus dem Zytosol ins endoplasmatische/sarcoplasmatische Retikulum [31]. Die Zellmembran wird vermutlich durch den entleerten Calciumspeicher für bestimmte Ionen permeabel. Dieses Ungleichgewicht des intrazellulären Ionenhaushalts führt zum Zelltod. Somit wirkt Thapsigargin zytotoxisch. Daher gilt Thapsigargin als Hoffnungsträger in der Krebsforschung. Wenn es gelingt, genannte Toxizität ausschließlich auf Krebszellen auszurichten, könnten bestimmte Tumore in ihrem Wachstum inhibiert werden. Klinische Studien wurden diesbezüglich bereits begonnen [45].

**EGTA:** Ethylenglycol-bis-(2-Aminoethyl)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure ist ein Calciumchelator, der nicht in vivo auftritt. EGTA wird des Weiteren als Inhibitor angewandt, da es Metalloproteasen hemmt [32].

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

Die in den Versuchen verwendeten Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt, wobei die Reagenzien gemäß des Reinheitsgrades pro analysi vorlagen.

##### 3.1.1 Purinrezeptor-Agonisten/Antagonisten und Reagenzien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Adenosin-5'-Triphosphat-Dinatriumsalz (ATP)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Aqua ad iniectabilia	Baxter Healthcare SA, Zürich, Schweiz
Thapsigargin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Fura-2 (Fluoreszenzfarbstoff)	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pluronic F-127 Lösung	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethylenglycol-bis-(2-Aminoethyl)-N, N, N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Uridin-5'-Diphosphat Dinatriumsalz-Hydrat (UDP)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Uridin-5'-Triphosphat-Trinatriumsalz (UTP)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
$\alpha,\beta$ -Methylen-Adenosin-5'-Triphosphat-Litiumsalz( $\alpha,\beta$ -meATP)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) Adenosin-5'-Triphosphat- Triethylammoniumsalz (BzATP)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
2-(Methylthio) Adenosin-5'- Triphosphat Tetranatriumsalz- Hydrat (2MeSATP)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
ECL-Reagenz	Novex life technologies (jetzt Thermo Fisher), Marienfeld, Deutschland
Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH)	MWG, Ebersberg, Deutschland

### 3.1.2 Substanzen und Membranen

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Nitrozellulosemembran-Filter Papier Sandwich: 0,45µM Porengröße	Novex life technologies (jetzt Thermo Fisher), Marienfeld, Deutschland
Milchpulver „Blotting grade“	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BenchMark™ Proteinmarker	Novex life technologies (jetzt Thermo Fisher), Marienfeld, Deutschland
GelPilot® DNA Molekulargewichtsmarker	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
GelPilot® Farbstoffe (Xylene Cyanol, Bromphenol Blue, Orange G)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
NuPage Bis-Tris-Gel-Platten (4- 12%, 1,0mm x12 well)	Novex life technologies (jetzt Thermo Fisher), Marienfeld, Deutschland

Trypanblau

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,  
Deutschland

### 3.1.3 Puffer, Lösungen und Medikamente

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Fetales Bovines Serum (FBS)	Novex life technologies (jetzt Thermo Fisher), Marienfeld, Deutschland
Zellmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Novex life technologies (jetzt Thermo Fisher), Marienfeld, Deutschland
Laufpuffer "NuPage MOPS (3-Morpholinpropansulfonsäure) SDS ( <i>sodiumdodecylsulfate</i> ) Running Buffer"	Novex life technologies (jetzt Thermo Fisher), Marienfeld, Deutschland
Puffer "Nupage LDS ( <i>lithiumdodecylsulfate</i> ) Sample Buffer"	Novex life technologies (jetzt Thermo Fisher), Marienfeld, Deutschland
Reducing Agent	Novex life technologies (jetzt Thermo Fisher), Marienfeld, Deutschland
Transferpuffer	Novex life technologies (jetzt Thermo Fisher), Marienfeld, Deutschland
Tween 20	Novex life technologies (jetzt Thermo Fisher), Marienfeld, Deutschland
2-Mercaptoethanol (98%)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Ethanol (70%)	J.T Baker, Deventer, Niederlande

DNA Gel Ladepuffer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ladepuffer	Novagen, Merck, Darmstadt, Deutschland
RIPA-Puffer (Lyse & Extraktion)	Novex life technologies (jetzt Thermo Fisher), Marienfeld, Deutschland
HBS-Puffer	20mM HEPES, 1mM CaCl <sub>2</sub> , 1mM MgCl <sub>2</sub> , 5mM KCl, 150 mM NaCl, 10mM Glucose, ad 1l ddH <sub>2</sub> O, pH: 7,4
HBS-Puffer Ca <sup>2+</sup> -frei	20mM HEPES, 1mM MgCl <sub>2</sub> , 5mM KCl, 150mM NaCl, 10mM Glucose, ad 1l ddH <sub>2</sub> O, pH: 7,4
PBS (Puffer)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin-Lösung	Novex life technologies (jetzt Thermo Fisher), Marienfeld, Deutschland
Penicillin, Streptomycin 100.000 I.E./ml, 10.000µg/ml	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

### 3.1.4 Kits

Produkt	Hersteller
RNeasy plus Mini Kit 250	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hot Star Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Omniscript RT-Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

### 3.1.5 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)-Reagenzien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat -Mix	Thermo Scientific, Waltham, USA
taq-Polymerase	Hot Star Taq DNA Polymerase Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

### 3.1.6 Oligonukleotidprimer

Purinrezeptor Ratte		Oligonukleotidsequenz	Basenpaare
P2Y <sub>1</sub>	forward	5'-TTG TGG TGG TGG CGA TCT CCC C-3'	309 bp
	reverse	5'-GTT TTC ATC ACA TGG AAA GGG AT-3'	
P2Y <sub>2</sub>	forward	5'-CCT GGT CTG TTA CGT GCT CA-3'	452 bp
	reverse	5'-GCT GGT GTG GAG CTC TGT CCT-3'	
P2Y <sub>4</sub>	forward	5'-GGC ATT GTC AGA CAC CTT GTA-3'	616 bp
	reverse	5'-AAG GCA CGA AGC AGA CAG CAA-3'	
P2Y <sub>6</sub>	forward	5'-ACG CTT CCT CTT CTT CTA TGC CA-3'	329 bp
	reverse	5'-TAG CAG GCC AGT AAG GCT GT-3'	
P2Y <sub>11</sub>	forward	5'-CTG GTG GTT GAG TTC CTG GT-3'	252 bp
	reverse	5'-GTT GCA GGT GAA GAG GAA GC-3'	
P2Y <sub>12</sub>	forward	5'-TGC AAT GCC GAG AAC ACT CT-3'	181 bp
	reverse	5'-CCC CAC CTT CCT GTC CTT TC-3'	
P2Y <sub>13</sub>	forward	5'-GTT CAT CCA CAT CCC CAG CA-3'	399 bp
	reverse	5'-CCC AGG GGA CTC TTT AGG GA-3'	
P2Y <sub>14</sub>	forward	5'-GTT GCC AGG ATC CCC TAC AC-3'	399 bp
	reverse	5'-ACT TTT CTG CGT GCT GTA GA-3'	
P2X <sub>1</sub>	forward	5'-GAA GTG TGA TCT GGA CTG GCA CGT-3'	451 bp
	reverse	5'-GCG TCA AGT CCG GAT CTC GAC TAA-3'	
P2X <sub>2</sub>	forward	5'-GAA TCA GAG TGC AAC CCC AA-3'	357 bp
	reverse	5'-TCA CAG GCC ATC TAC TTG AG-3'	
P2X <sub>3</sub>	forward	5'-TGG CGT TCT GGG TAT TAA GAT CGG-3'	439 bp
	reverse	5'-CAG TGG CCT GGT CAC TGG CGA-3'	
P2X <sub>4</sub>	forward	5'-GAG GCA TCA TGG GTA TCC AGA TCA AG-3'	446 bp
	reverse	5'-GAG CGG GGT GGA AAT GTA ACT TTA G-3'	
P2X <sub>5</sub>	forward	5'-GCC GAA AGC TTC ACC ATT TCC ATA A-3'	417 bp
	reverse	5'-CCT ACG GCA TCC GCT TTG ATG TGA TAG -3'	
P2X <sub>6</sub>	forward	5'-AAA GAC TGG TCA GTG TGT GGC GTT-3'	418 bp
	reverse	5'-TGC CTG CCC AGT GAC AAG AAT GTC CAA-3'	
P2X <sub>7</sub>	forward	5'-GTG CCA TTC TGA CCA GGG TTG TAT AAA-3'	353 bp
	reverse	5'-GCC ACC TCT GTA AAG TTC TCT CCG ATT-3'	

Tab. 2 Oligonukleotidprimer für P2X- und P2Y-Rezeptoren. Es sind jeweils die erwarteten Basenpaare angegeben.

### 3.1.7 Antikörper für Western Blot

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-P2Y <sub>2</sub>	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel
Anti-P2Y <sub>6</sub>	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel
Anti-P2X <sub>3</sub>	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel
Anti-P2X <sub>4</sub>	Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel

### 3.1.8 Geräte und Zubehör

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Lichtmikroskop CK 30	Olympus, Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BX 40 F4	Olympus, Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland
Shutter Lambda10-2	HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland
CCD-Kamera	Cool Snap HQ <sup>2</sup> , Roper Scientific, Planegg, Deutschland
Kaltlichtlampe U-RFL-T	Olympus, Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland
Filterset Fura-2 F71-000	AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland
Wasserbad GFL	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zellkultur-Inkubatorschrank (CO <sub>2</sub> -Incubator)	Sanyo, Moriguchi, Japan

Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Vortexer VF <sub>2</sub>	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge (Pico 17)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Photometer Nanodrop Spectrophotometer ND 1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Geldokumentationssystem Consort EV 231	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Thermozykler: PX2 Thermal Cycler	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
pH-Meter	Beckmann, Pasadena, USA
XCell SureLock® Mini Cell	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Block Heater (Stuart SBH 130 DC)	Barloworld Scientif. Ltd, Staffordshire, UK
Electrophoresis Power Supply Consort E835	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Shake Temp SW 22	Julabo, Seelbach, Deutschland
Silent Rocker	CTI, Idstein, Deutschland
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filmentwickler: Agfatek	Agfa, Mortsel, Belgien

Neubauer Zählkammer

NanoEnTek, Pleasanton, USA

Kulturflaschen (T75)

Sarstedt inc., Newton, USA

### 3.1.9 Software

#### Produkt

MetaFluor®: The Intracellular Ion Analysis Software 1992-2007

#### Hersteller

Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA

SigmaPlot 12®

Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland

GIMP 2.8.14 (GNU Image Manipulation Program)

Peter Mattis, Spencer Kimball & Co. Free Software Foundation, Berkeley, USA

Microsoft Office Excel® 2010

Microsoft Corporation, Redmond, USA

The R Foundation for Statistical Computing, R® version 3.2.0

The R Foundation (Open Source Software)

### 3.1.10 Zellen

L2-Zellen: Die verwendeten L2-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Thea Koch (Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universität Dresden) zur Verfügung gestellt.

R3/1-Zellen: Dr. Roland Koslowski (Medizinisch-Theoretisches Zentrum, Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Fakultät, TU Dresden) stellte diese Zelllinie netterweise bereit.

### 3.1.11 Bakterien

Die verwendeten Pneumokokken (*S. pneumoniae* des Stammes D39) stammten freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Hammerschmidt (Leiter der Abteilung Genetik der Mikroorganismen, Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald).

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur der L2- und R3/1-Zellen

Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen mit DMEM-Nährmedium, das 10% filtriertes FBS (fetales bovines Serum) und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung enthielt, bis zum Erreichen einer 80%-igen Konfluenz kultiviert.

Passage der Zellen: Zunächst wurde der Zellrasen dreimal mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen. Darauf folgten die Zugabe von 0,05% Trypsin-Lösung und die vierminütige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Ablösung der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Trypsinaktivität wurde mit 10% FBS gehemmt und die gesamte Suspension bei 1000 rpm und Raumtemperatur für fünf Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DMEM resuspendiert.

Zellzahlbestimmung: Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt. Die Zählung erfolgte mittels Neubauerkammer. Die Zellzahl wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\frac{(\text{Zellen pro Neubauerkammer} * 4)}{5} * 10000 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

Für die Fluoreszenzmikroskopie-Experimente wurden die Zellen jeweils zwei Tage vor Versuchsbeginn auf geeignete Objektträger ausgesät. Um am Versuchstag eine optimale Zellkonzentration auf den Objektträgern zu erhalten, wurden je 1×10<sup>5</sup> L2- und R3/1-Zellen ausgesät und für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 3.2.2 Inkubation von L2- und R3/1-Zellen mit Pneumokokken

Die Lebendpneumokokken wurden bei -20°C gelagert, zu Versuchsbeginn schonend bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend vorsichtig durchmischt.

Das antibiotikahaltige Medium auf den Zellen wurde gegen antibiotikafreies DMEM ausgetauscht. Es wurden anschließend  $1 \times 10^7$  CFU (*colony forming units*) der Pneumokokken zu den Zellen gegeben. Die Inkubation der L2- und R3/1-Zellen fand unter S2-Bedingungen statt. Danach erfolgte die zweistündige Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Anschließend wurden die Pneumokokken mit FBS abgewaschen.

### **3.2.3 Grundsätzliche Funktion des Mikroskops Olympus BX 40**

Das Licht der Kaltlichtlampe durchlief ein Filterrad- und ein Blendensystem. Die Exzitation von Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm und die Emission von 500 nm sind diesbezüglich maßgebend. Dabei wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 mit 340 nm und 380 nm angeregt. Die entstehenden fluoreszierenden Bilder wurden mittels einer CCD-Kamera aufgezeichnet.

### **3.2.4 Prinzip intrazellulärer $\text{Ca}^{2+}$ -Messung durch Epifluoreszenzmikroskopie**

Mit einem speziell geeichten Epifluoreszenzmikroskop und dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 können intrazelluläre Calciumkonzentrationen ermittelt werden. Diese Form der Mikroskopie beruht auf der Tatsache, dass die verwendete eingehende Lichtstrahlung den zu erregenden Farbstoff (hier Fura-2) zum Aussenden von Strahlung anderer Wellenlänge bewegt (Fluoreszenz). Fura-2 ist ein gängiger Calciumindikator, da eine hohe Affinität zwischen Calciumionen und Fura-2 besteht [7].

Fura-2 bildet mit Calcium einen Chelatkomplex [1]. Dadurch wird Licht einer anderen Wellenlänge emittiert als bei  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Umgebung.

Fura-2 ist primär an Esterderivate gebunden, um nach intrazellulär zu diffundieren [2]. Intrazellulär wird dann durch unspezifische Esterasen der A1-Rest abgespalten. Somit ist Fura-2 intrazellulär gefangen. Die Fura-2 geladenen Zellen werden mit ultraviolettem Licht bestrahlt. Fura-2 bindet intrazellulär an Calciumionen und fluoresziert. Unter der Voraussetzung der Anregungswellenlängen (340 nm und 380 nm) entspricht die Intensität des angeregten Fura-2 der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  [3].

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Messung wird die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  über das Verhältnis (Ratio) der Emissionsraten bei Anregungswellenlängen von 340 nm und 380 nm ermittelt. Mittels Kalibration wird somit die Fura-2-Ratio in  $\text{Ca}^{2+}$ -Daten umgerechnet.

### 3.2.5 Kalibrierung nach Grynkiewicz

Die Kalibrierung der Fura-2-Ratio erfolgte mittels folgender Formel [3]:

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

Legende der Variablen nach Grynkiewicz:

[Ca <sup>2+</sup> ]	Calciumkonzentration intrazellulär in nmol
Kd	Dissoziationskonstante für Fura-2, bzgl. der Temperatur 37°C = 224 nmol/l
S <sub>f2</sub>	Intensität bei λ 380nm in Ca <sup>2+</sup> -freier Umgebung (in Kalibrierung gemessen)
S <sub>b2</sub>	Intensität bei λ 380nm in Ca <sup>2+</sup> -haltiger Umgebung (in Kalibrierung gemessen)
R	Ratio (Quotient des emittierten Lichtes bei Anregung mit 340 nm und 380 nm; (in Versuch gemessen)
R <sub>min</sub>	kleinstmögliche Ratio für Fura-2 (in Kalibrierung gemessen)
R <sub>max</sub>	größtmögliche Ratio für Fura-2 (in Kalibrierung gemessen)
Visc	Viskositätskoeffizient (wässrige Lösung, je nach Protokoll zwischen 0,7 und 0,85)

### 3.2.6 Versuchsvorbereitung für L2- und R3/1-Zellversuche

Die jeweiligen Versuchsreihen unterschieden sich lediglich durch die in den Experimenten verwendeten P2-Rezeptoragonisten.

Färbung: Nach Entfernen des Nährmediums wurden 5µM Fura-2 in 500 µl HBS auf die Zellen gegeben. Die Inkubation fand für 45 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank statt. Im Anschluss erfolgte die dreimalige Waschung der Zellproben mittels HBS Puffer.

### 3.2.7 Versuchsabläufe: L2- und R3/1-Zellen

Die Versuche mittels Epifluoreszenzmikroskopie fanden unter abgedunkelten Lichtverhältnissen und bei Raumtemperatur statt. Die Experimente wurden mit Hilfe der Software MetaFluor® durchgeführt. Es wurde ein zellreicher Abschnitt mit klar sichtbaren Zellkernen und definierten Zellgrenzen ausgewählt. Pro Versuch wurden zehn Zellen im Zytosol markiert. Nach einer fünfminütigen Baseline erfolgte die Zugabe des jeweiligen Purinrezeptoragonisten. Die Messung wurde danach noch mindestens 15 Minuten

weitergeführt. Analog konnten Entwicklung der Fura-2-Ratio und der Calciumkonzentration in nmol verfolgt werden.

### **3.2.8 Software und Auswertung MetaFluor®**

Die Berechnung der Calciumkonzentration und die graphische Darstellung wurden mittels der Software MetaFluor® vorgenommen. MetaFluor® errechnet die Ratio aus den Wellenlängen 340 nm und 380 nm, dem K<sub>d</sub>-Wert und in Abhängigkeit der Kalibration des Mikroskops. In einer weiteren graphischen Darstellung ist die zytosolische Calciumkonzentration in Echtzeitmessung dargestellt, wobei sich auf der Ordinate die intrazelluläre Calciumkonzentration in nmol befindet. Die Abszisse zeigt die Zeit in Minuten.

Die graphische Auswertung der Calciumkonzentration erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel® und SigmaPlot®.

### **3.2.9 cDNA-Analyse (RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, RT-PCR)**

Die RNA wurde aus den Zellen wie folgt isoliert: Im ersten Schritt erfolgte die Waschung der Zellen mit PBS. 2-Mercapto-Ethanol und RLT-Lysepuffer wurden anschließend zur Lyse auf die Zellen gegeben.

Daraufhin wurden die Zellen vom Boden des Objektträgers mechanisch gelöst und zwei Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Lysat wurde mittels RW1-Waschpuffer erneut gewaschen eine Minute bei 10.000 rpm und zentrifugiert. Es folgte eine photometrische Messung mittels Spectralphotometrie der Wellenlängen 260 nm und 280 nm.

Dann wurde die mRNA mit 0,2U/μl Omniscript Reverse Transkriptase 60 Minuten bei 37°C inkubiert, um diese in die benötigte *template* DNA (cDNA = *complementary DNA*) umzuschreiben (*reverse transcription*).

Die Amplifikation von cDNA der L2- und R3/1-Zellen wurde mittels RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) durchgeführt.

Dafür erfolgte die temperaturbedingte Denaturierung der cDNA. Dies ermöglichte Primern, an die Stränge der Template-DNA zu hybridisieren (Annealing). Die DNA-Polymerase elongierte die einzelnen DNA-Stränge mit Nukleotiden (dNTPs). Als Negativkontrolle diente die Durchführung beschriebener PCR mittels ddH<sub>2</sub>O.

### RT-PCR-Ansatz:

0,25µl	taq-Polymerase
3µl	DNA
5µl	10xPCR-Puffer
10µl	Q-Lösung
1µl	dNTP-Mix
1µl	Primer forward
1µl	Primer reverse
ad 50µl	ddH <sub>2</sub> O

Der Cycler wurde wie folgt programmiert:

Vorlauf: Denaturierung (Aktivierung Taq-Polymerase) bei 95°C für 900 s.

1.	Denaturierung	45 s	94°C
2.	Annealing	45 s	*jeweilige Temperatur
3.	Elongation	60 s	72°C

Die Schritte 1-3 wurden dreißigmal wiederholt. Abschluss: Zusätzliche Elongation von 600 s bei 72°C.

### \*Jeweilige Annealingtemperatur:

<b>Rezeptor</b>	<b>Annealing- temperatur in °C</b>
P2X <sub>1</sub>	61
P2X <sub>2</sub>	54
P2X <sub>3</sub>	61
P2X <sub>4</sub>	59,3
P2X <sub>5</sub>	60,3
P2X <sub>6</sub>	61
P2X <sub>7</sub>	60,3
P2Y <sub>1</sub>	58
P2Y <sub>2</sub>	58
P2Y <sub>4</sub>	54
P2Y <sub>6</sub>	55
P2Y <sub>11</sub>	55
P2Y <sub>12</sub>	55
P2Y <sub>13</sub>	58
P2Y <sub>14</sub>	58

### 3.2.10 Optische Darstellung der amplifizierten DNA

Die DNA-Amplifikate wurden mittels eines 1%igen Agarosegels aufgetrennt. Die Laufzeit betrug 50 Minuten bei einer Spannung von 120 Volt.

### 3.2.11 Western Blot

Das grundsätzliche Ziel des Western Blots ist der spezifische Nachweis von Zielproteinen. Als Träger dient eine Nitrozellulosemembran. Mittels Antigen-Antikörperreaktion können Proteine nachgewiesen werden.

Proteinextraktion: Zuerst wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit RIPA-Puffer lysiert (100 µl/6-well, 250 µl/T25, 800 µl/T75 Flasche). Es folgte eine dreißigminütige Inkubation auf Eis. Die geernteten Zellen wurden dann in Eppendorfgeläße überführt und 20 Minuten bei 4°C und 10.000 rpm zentrifugiert. Nicht sofort verwendete Proben wurden bei -80°C eingefroren.

Vorbereitung der Proteinproben: Zu den Zelllysaten wurden je folgende Puffer hinzu pipettiert:

5,0 µl Nupage LDS Puffer, 0,5 µl Reduktions-Puffer, 20 µl Protein in RIPA-Puffer.

Danach erfolgte die kurze Zentrifugation der Zellen (10 s, 5000 rpm) mit anschließender fünfminütiger Erhitzung der Proben bei 95°C. Die Proben wurden dann erneut auf Eis gelagert, um sie abzukühlen.

Gelelektrophorese: Nun konnten die Proteine der Proben mittels Gelelektrophorese im XCell SureLock® Mini Cell-System aufgetrennt werden. Das Gel lief für 50 Minuten bei 200 Volt. Dazu wurde die Gelelektrophoresekammer mit 4-12% NuPage Bis-Tris-Gel-Platten (Polyacrylamid) bestückt. Anschließend wurde der Kamm entfernt und 5% NuPage MOPS SDS-Laufpuffer hinzugegeben. Im Anschluss wurde entsprechender Proteinmarker der Konzentration 0,1 µg/µl in die Geltaschen pipettiert.

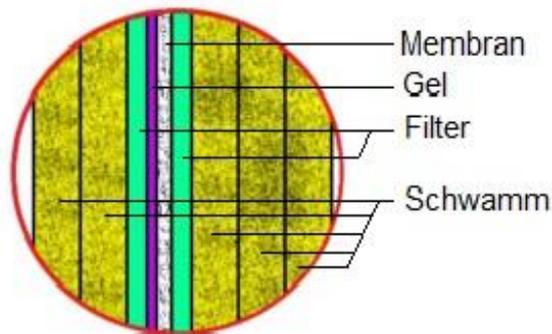


Abb. 6 *Blotting*: Zur Vorbereitung wurde der Transferpuffer aus ddH<sub>2</sub>O und Methanol (10%) angesetzt. Der Transfer der Proben auf die Membran fand nach abgebildetem Aufbau statt.

*Blocking*: Auf das *Blotting* folgte der *Blocking*-Vorgang. Dazu wurde zuerst Waschpuffer mit 0,1% Tween 20 und PBS angesetzt. Dieser wurde im Anschluss mit 5% Milchpulver versetzt, um *Blocking*-Puffer herzustellen. Darauf folgte das *Blocking* der geblotteten Membran mithilfe des *Blocking*-Puffers im dafür geeigneten Rüttler für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

*Antikörper*: Nun konnte die Membran mit dem je vorgesehenen Antikörper inkubiert werden. Die Membran wurde mit Parafilm bedeckt und inkubierte über Nacht bei 4°C auf genanntem Rüttler.

*Sekundär-Antikörper*: Am nächsten Tag folgte eine viermalige zehninütige Waschung mit Waschpuffer auf dem Rüttler. Danach wurde die Membran mit Sekundärantikörpern (1:8000, in *Blocking*-Puffer) 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine einmalige Waschung mit reinem PBS für zehn Minuten.

*Detektionsreagenz*: Die Membran wurde auf eine Klarsichthülle gelegt und mit dem Detektionsreagenz ECL bedeckt. Es folgte eine dreiminütige Inkubation. Anschließend wurde die Membran von der Detektionsreagenz befreit, indem man sie vorsichtig abtropfen ließ. Die Membran wurde zwischen eine zweite Klarsichthülle gelegt und von Luftblasen befreit. Im Anschluss wurde der Film in der Dunkelkammer maschinell entwickelt.

### **3.2.12 Statistik**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels der Open Source Statistiksoftware „R“ (The R Foundation for Statistical Computing, R© version 3.2.0). Die einzelnen Gruppen wurden mittels t-Test mit gleichen Varianzen auf Signifikanz untereinander geprüft. Hierbei gab es jeweils t-Tests für verbundene Stichproben (Intragruppenvergleiche) und t-Tests für unverbundene Stichproben (Intergruppenvergleiche).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Mikroskopische Darstellung von L2- und R3/1-Zellen

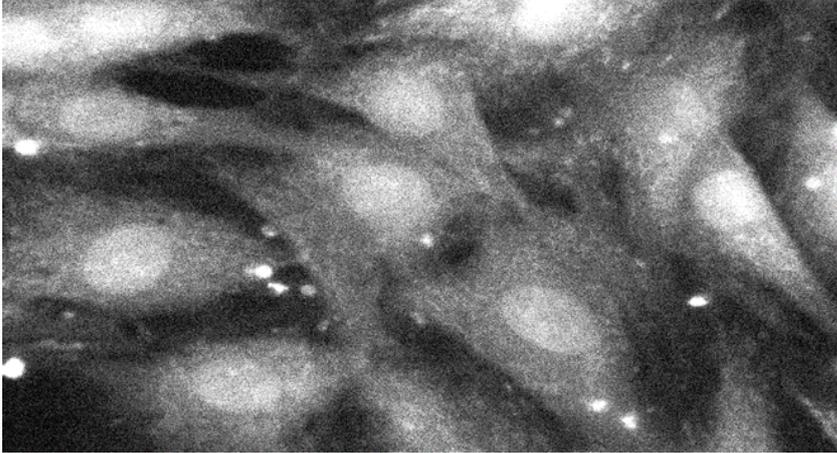


Abb. 7 L2-Zellen, die mit Fura-2 gefärbt wurden. Es sind deutliche Nucleoli und ein großer Zytosolanteil erkennbar.

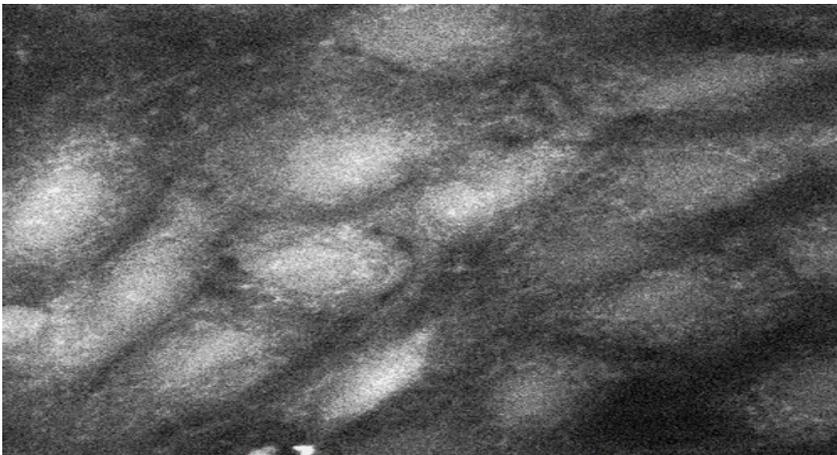


Abb. 8 R3/1-Zellen, die mit Fura-2 gefärbt wurden. Diese weisen im Gegensatz zu L2-Zellen eine andere Kern/Plasma-Relation auf. R3/1-Zellen haben weniger Zytosol, der Zellkern tritt größer in Erscheinung.

## 4.2 Effekte von spezifischen Agonisten und Antagonisten auf die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ von L2- und R3/1-Zellen

Insgesamt wurden acht P2-Rezeptoragonisten und der Einfluss von Pneumokokken auf AEZ (L2- und R3/1-Zellen) getestet. Durch Epifluoreszenzmikroskopie und den  $Ca^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 konnte die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  *in vitro* ermittelt werden.

Anhand von Graphiken sollen im Folgenden einige Versuche veranschaulicht werden. Die Anzahl der Kurven entspricht der Anzahl der getesteten Zellen pro Versuch.

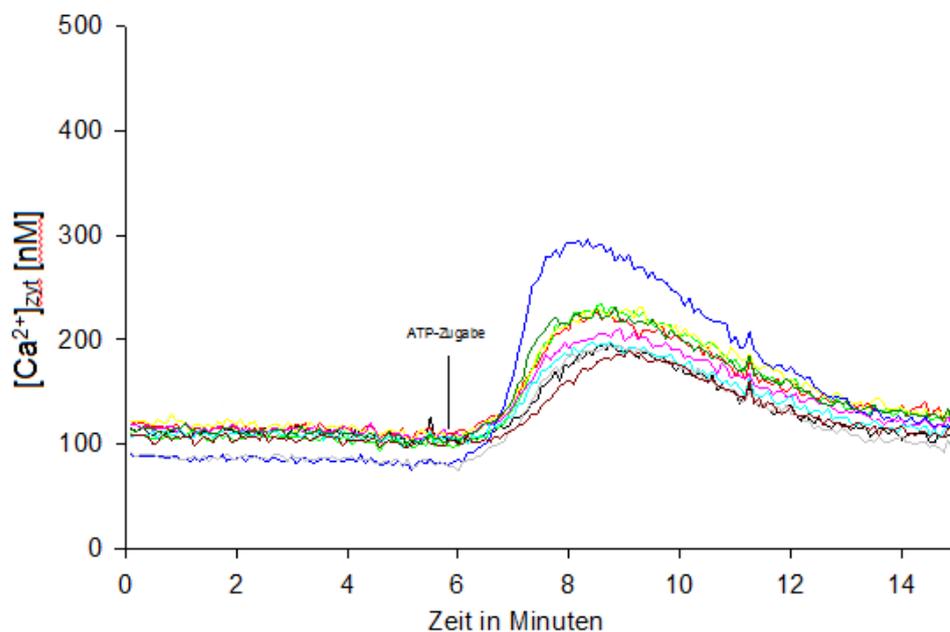


Abb. 9 L2-Zellen bei ATP-Inkubation: Es wurden  $100\mu M$  ATP appliziert. Die Latenzzeit betrug wenige Sekunden. Die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  stieg an und kehrte langsam zu den Ausgangswerten zurück.

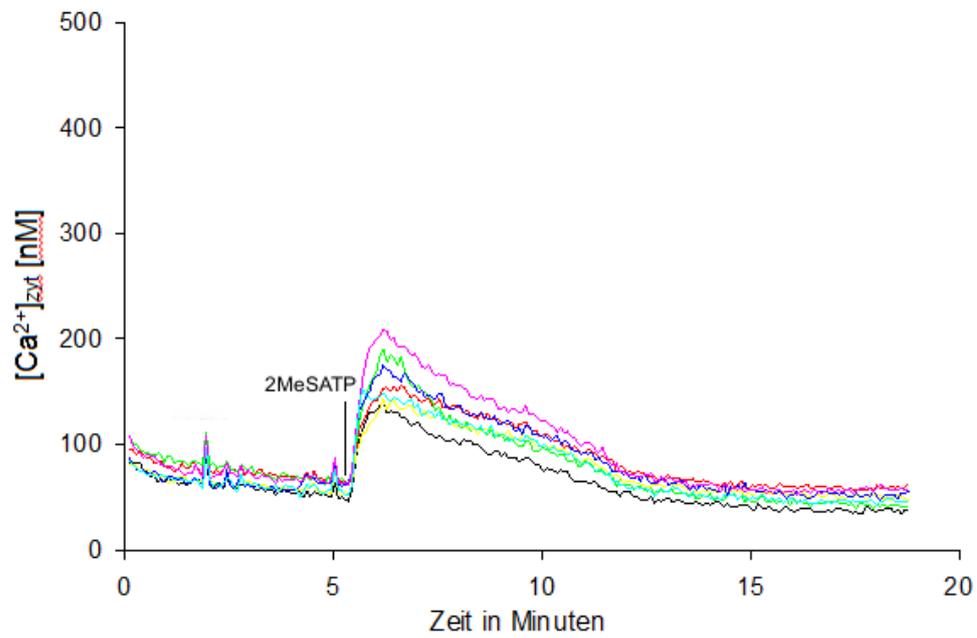


Abb. 10 L2-Zellen bei 2MeSATP-Inkubation (100 $\mu$ M): Auch hier war ein deutlicher, steiler Konzentrationsanstieg nach Inkubation mit 2MeSATP sichtbar.

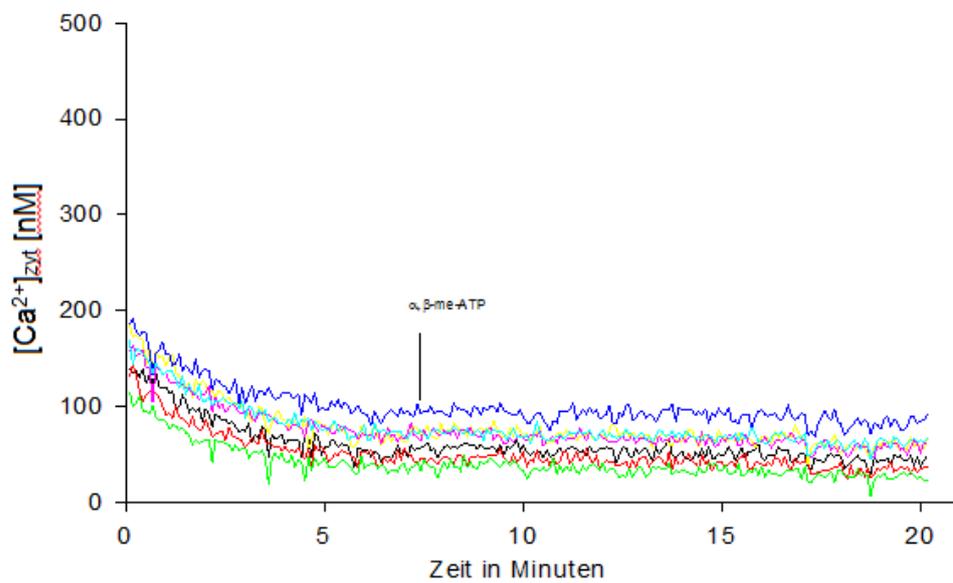


Abb. 11 L2-Zellen bei  $\alpha,\beta$ -me-ATP-Inkubation (100 $\mu$ M): Es war kein Kurvenanstieg nach Zugabe von  $\alpha,\beta$ -me-ATP zu beobachten.

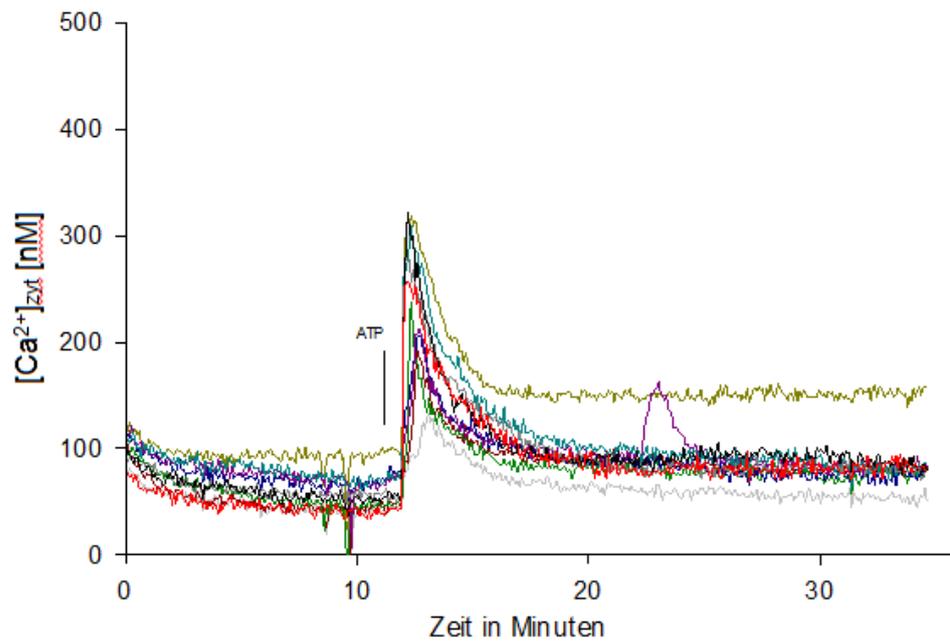


Abb. 12 R3/1-Zellen bei ATP-Inkubation: Hier wurden 100 $\mu$ M ATP appliziert. Die Latenzzeit betrug wenige Sekunden. Die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  stieg steil an und kehrte langsam zu den Ausgangswerten zurück.

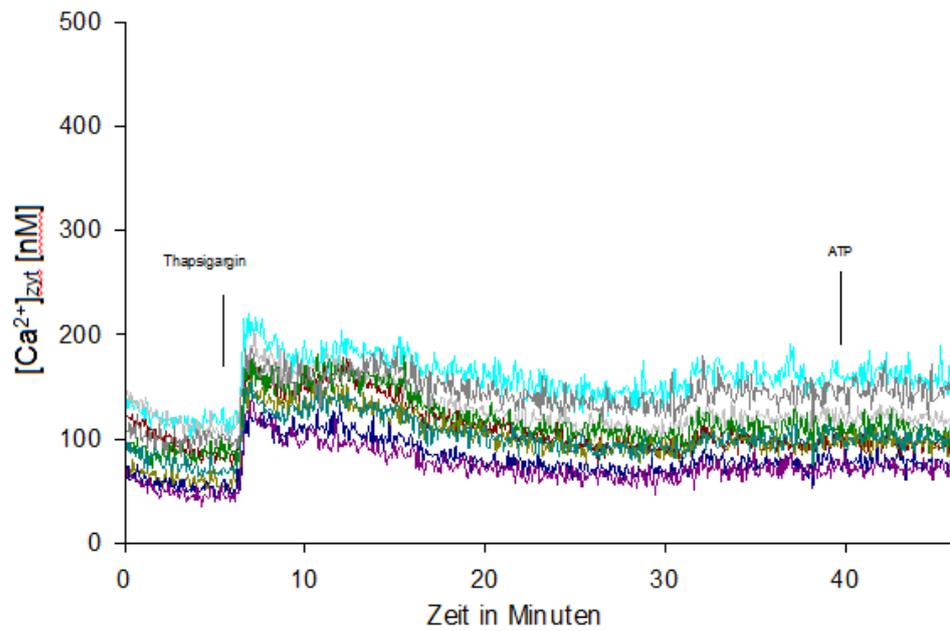


Abb. 13 R3/1-Zellen bei Thapsigargin-Inkubation: Nach Thapsigarginapplikation ( $15\mu\text{M}$ ) stieg die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  im Vergleich zur Ausgangsbedingung um 100% an. Die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  kehrte dann fast auf die Ausgangswerte zurück. Anschließend wurden  $100\mu\text{M}$  ATP zugegeben. Die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  stieg dann nur leicht oder gar nicht an.

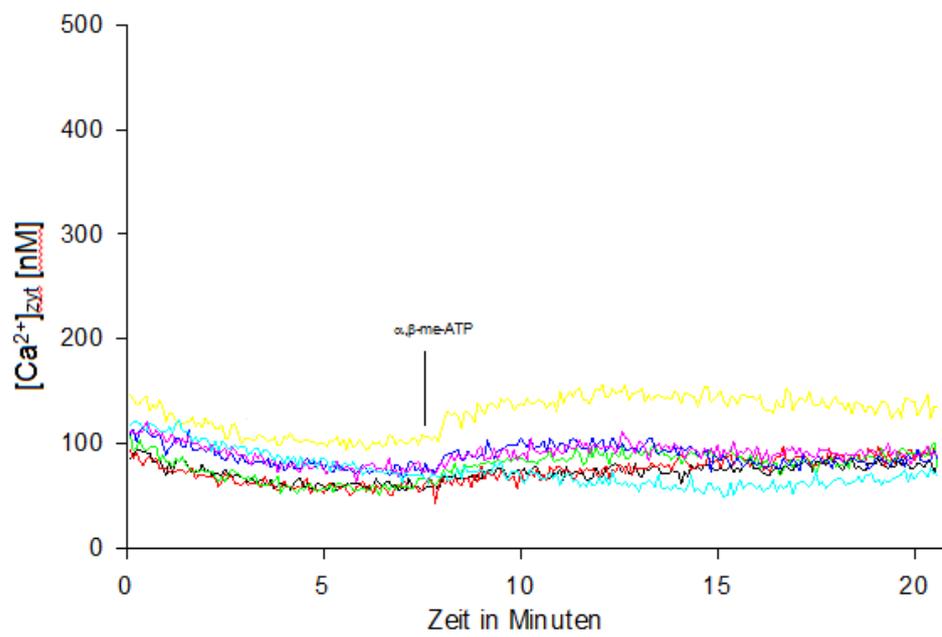


Abb. 14 R3/1-Zellen bei  $\alpha, \beta$ -meATP-Inkubation ( $100\mu\text{M}$ ): Nach Zugabe von  $\alpha, \beta$ -meATP war ein minimaler Kurvenanstieg sichtbar.

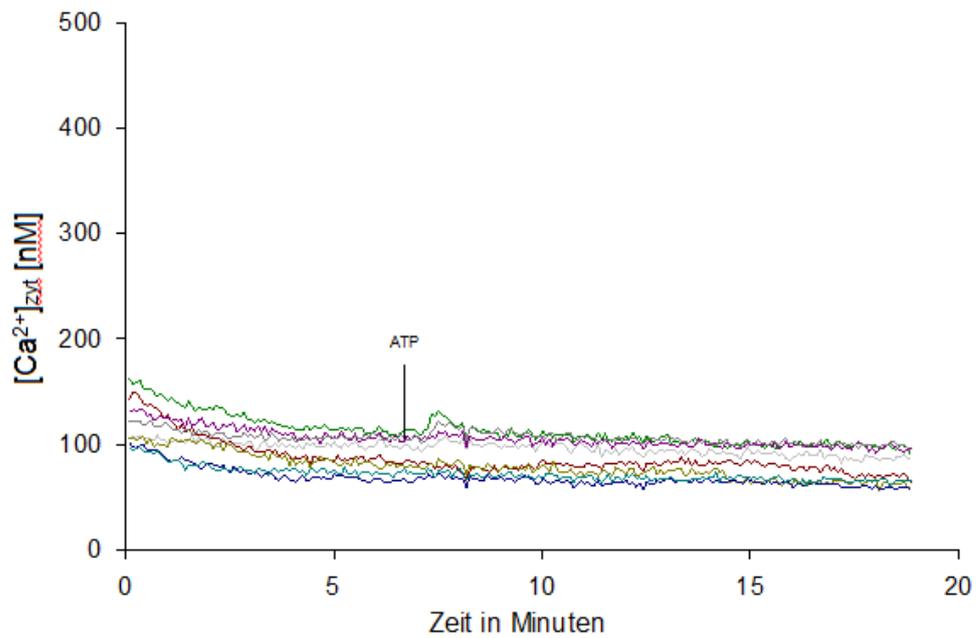


Abb. 15 L2-Zellen, inkubiert mit Pneumokokken (vor Versuchsbeginn) und anschließender ATP (100 $\mu$ M)-Zugabe: Die Mehrheit der Zellen zeigt keinerlei Reaktion auf die ATP-Inkubation.

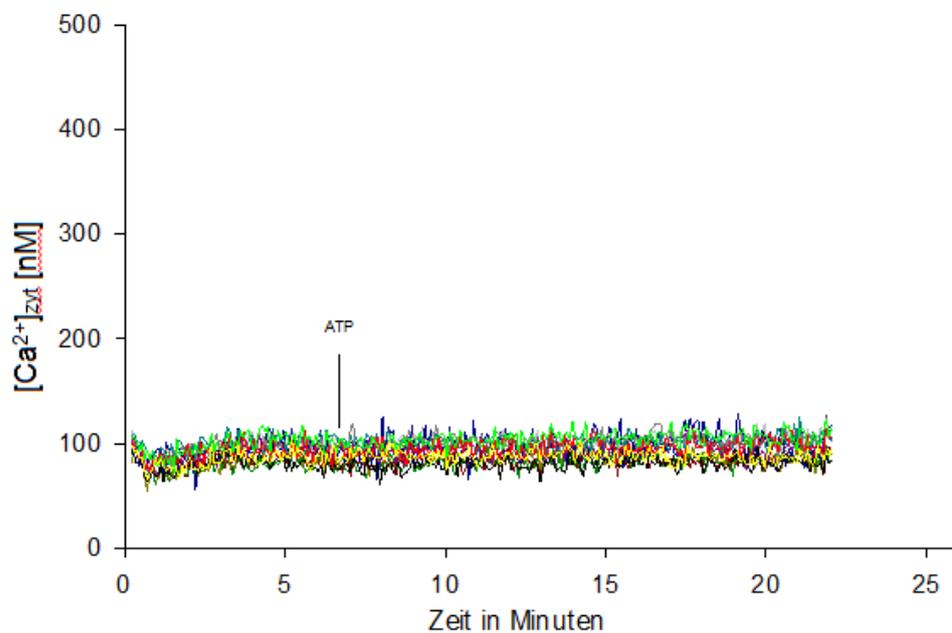


Abb. 16 R3/1-Zellen, inkubiert mit Pneumokokken (vor Versuchsbeginn) und anschließender ATP (100 $\mu$ M)-Zugabe: Anhand dieses einzelnen Versuches ist kein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  erkennbar.

Die Abbildungen 17 und 18 zeigen den durch die Stimulation mit verschiedenen P2-Rezeptoragonisten induzierten Anstieg von  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  in L2- und R3/1-Zellen gegenüber den Ausgangsbedingungen ( $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ ).

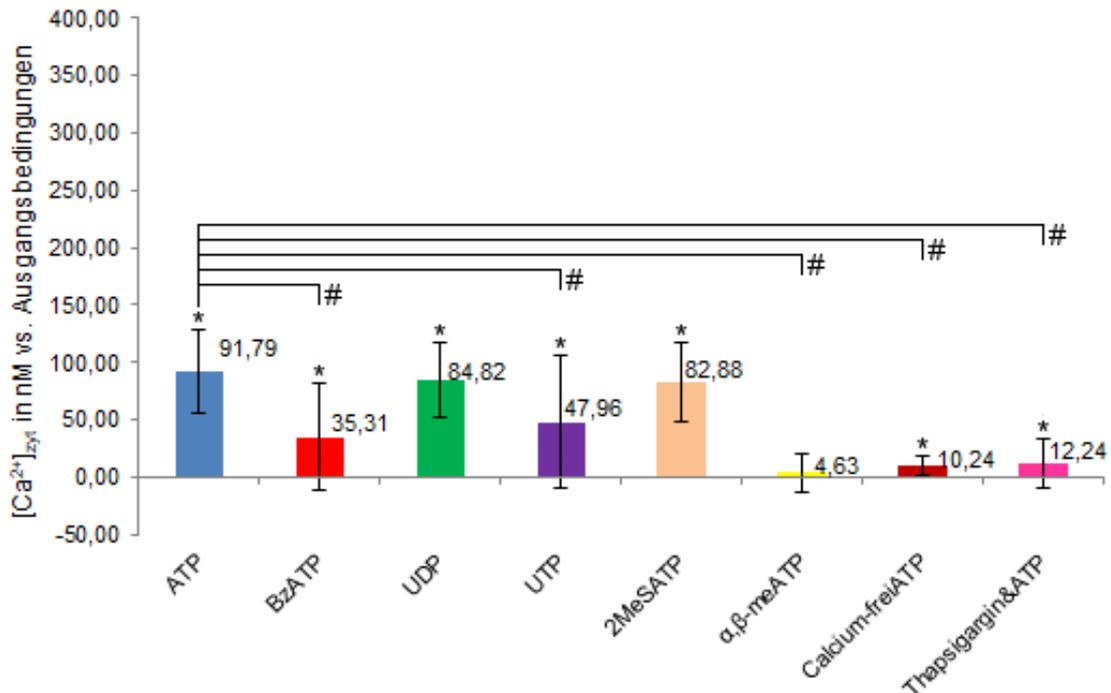


Abb. 17 Graphische Darstellung des Calciumanstieges versus Ausgangsbedingungen ( $\Delta[Ca^{2+}]_{zyt}$ ) in L2-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen P2-Rezeptoragonisten. (MW $\pm$ SD\* = p<0,001 versus Ausgangsbedingungen. # = p<0,001 versus ATP).

Nach Inkubation mit allen verwendeten P2-Rezeptoragonisten waren Anstiege der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  bei L2-Zellen zu beobachten. Am deutlichsten stiegen jedoch die intrazellulären Konzentrationen bei Hinzugabe von ATP, UDP und 2MeSATP im Vergleich zum Ausgangswert. Bei Versuchen mit Thapsigargin, ATP unter calciumfreien Bedingungen und  $\alpha,\beta$ -meATP war der gemessene Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  verhältnismäßig gering.

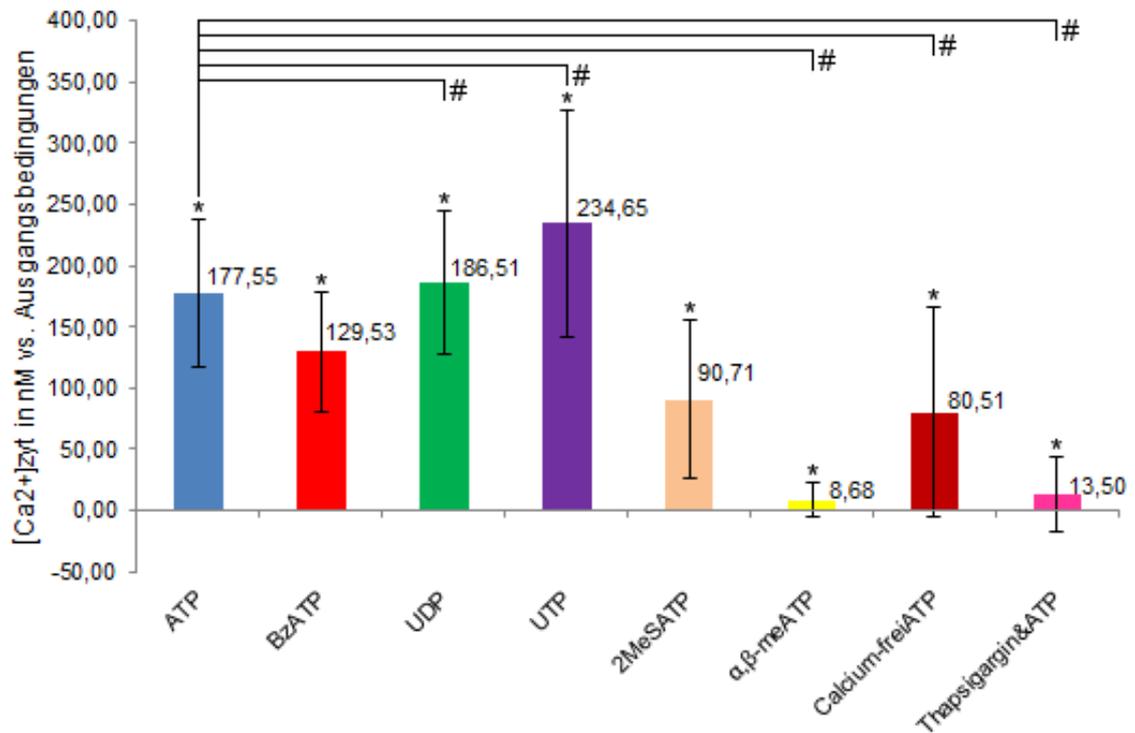


Abb. 18 Graphische Darstellung des Calciumanstieges versus Ausgangsbedingungen ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ ) von R3/1-Zellen unter Inkubation mit verschiedenen P2-Rezeptoragonisten. (MW $\pm$ SD \* =  $p < 0,001$  versus Ausgangsbedingungen # =  $p < 0,001$  versus ATP).

Auch die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  von R3/1-Zellen stieg bei Inkubation mit jedem P2-Rezeptoragonisten an. Die höchsten Konzentrationsanstiege wurden bei Versuchen mit UTP, UDP und ATP erzielt.

Im Unterschied zu Versuchen mit der Zelllinie L2 lag bei R3/1-Zellen ein hoher Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  bei Inkubation mit ATP unter calciumfreien Bedingungen ( $\text{Ca}^{2+}$ -frei ATP) vor. Eine Gemeinsamkeit beider untersuchter Zelllinien stellt der niedrigste Konzentrationsanstieg bei Versuchen mit  $\alpha,\beta$ -meATP dar.

### 4.3 Einflüsse auf die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ von L2- und R3/1-Zellen bei Inkubation mit Pneumokokken und ATP

Nach Inkubation von L2- und R3/1-Zellen mit Pneumokokken erhöhte ATP die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  nicht.

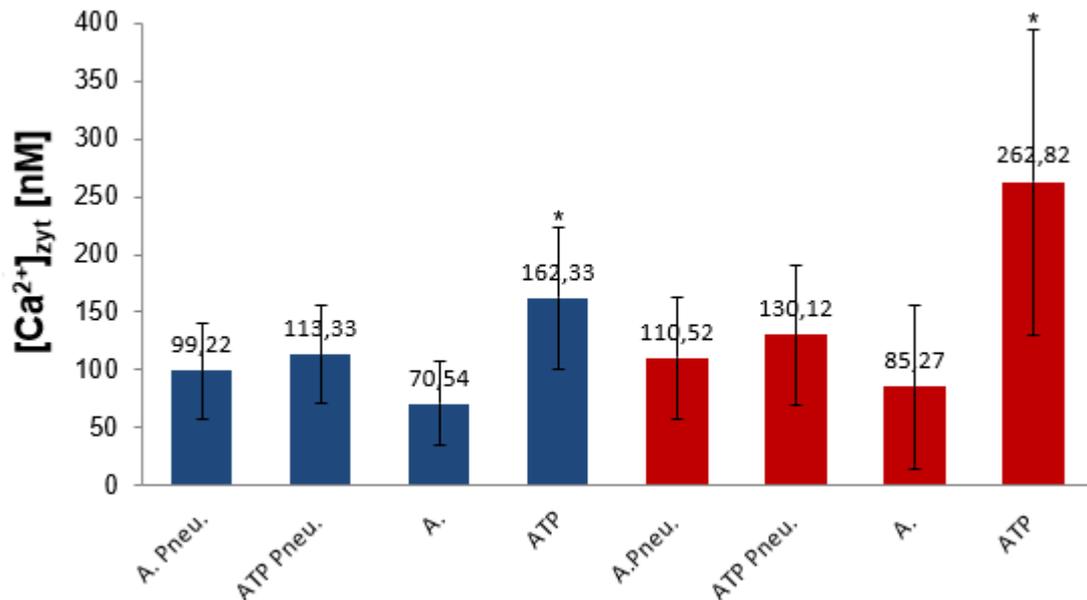


Abb. 19 Die Zelllinien L2 (blau) und R3/1 (rot) sind hier unter Pneumokokkeninkubation in ihrer Ausgangssituation (A. Pneu.) und unter Zugabe von 100 $\mu$ M ATP (ATP Pneu.) graphisch dargestellt. Zum Vergleich werden ebenfalls die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  der gleichen Zelllinien ohne Pneumokokken gezeigt („A.“ entspricht der Ausgangssituation, „ATP“ entspricht der Zellinkubation mit ATP).  $MW \pm SD < 0,01$  versus Ausgangsbedingungen.

#### 4.4 Darstellung der mRNA von L2- und R3/1-Zellen mittels PCR

Es wurden alle bisher bekannten P2X- und P2Y-Rezeptoren auf mögliches Vorkommen bei L2- und R3/1-Zellen in Betracht gezogen. Dementsprechend wurde mittels einer reverse Transkriptase-PCR (Polymerasekettenreaktion) nach mRNA der Subtypen der P2X-Familie (P2X<sub>1-7</sub>), bzw. mRNA der Subtypen der P2Y-Familie (P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub>) gesucht.

Am deutlichsten war die Expression der mRNA des P2X<sub>4</sub>-Rezeptors ablesbar. Dies betraf beide Zelllinien. Des Weiteren erfolgte der Nachweis von mRNA des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors, des P2Y<sub>6</sub>-Rezeptors und des P2X<sub>3</sub>-Rezeptors bei L2- und R3/1-Zellen.

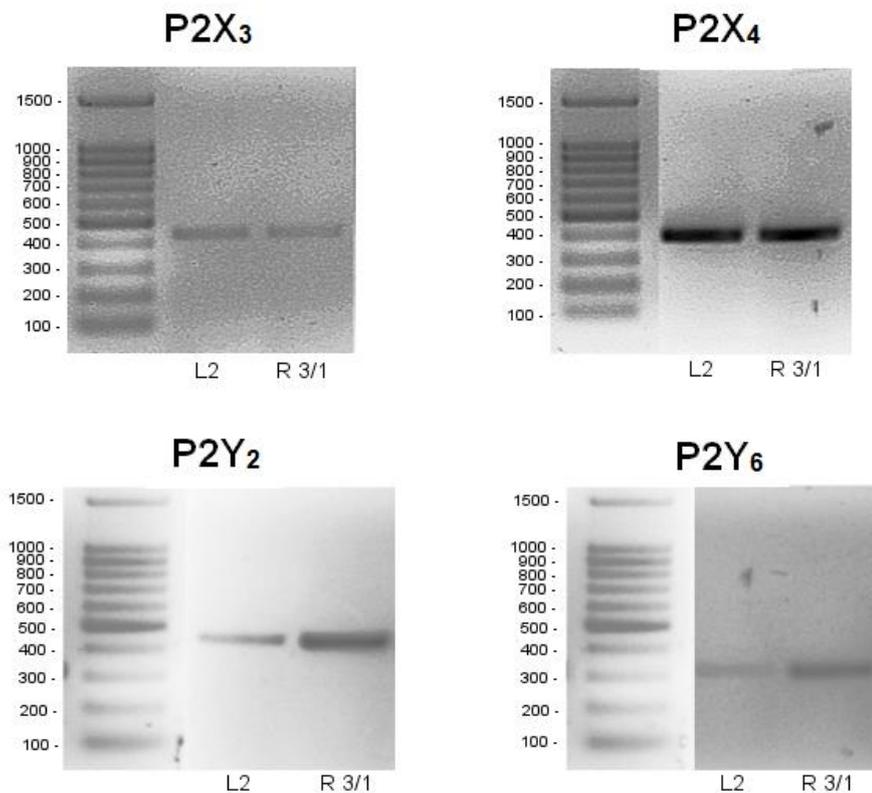


Abb. 20 Mittels reverse Transkriptase PCR dargestellte mRNA von P2X<sub>3</sub>-, P2X<sub>4</sub>-, P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-Rezeptoren bei der Zelllinie L2. R3/1-Zellen weisen ebenso sichtbar mRNA von P2X<sub>3</sub>-, P2X<sub>4</sub>-, P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-Rezeptoren auf.

#### 4.5 L2- und R3/1-Zellen: Darstellung auf Proteinebene mittels Western Blot

Durch Western Blot erfolgte die Identifizierung der Rezeptorproteine P2X<sub>3,4</sub> und P2Y<sub>2,6</sub> auf beiden untersuchten Zelllinien. Die Expression der einzelnen Rezeptorproteine konnte auf beiden Zelltypen in gleichem Maße nachgewiesen werden. Die einzige Ausnahme stellte der P2X<sub>3</sub>-Rezeptor dar. Dieser war bei R3/1-Zellen stärker exprimiert, als bei L2-Zellen.

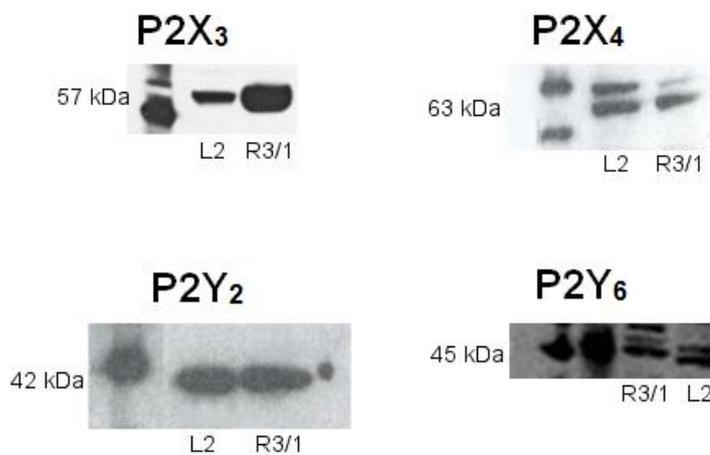


Abb. 21 Rezeptorproteine P2X<sub>3,4</sub> und P2Y<sub>2,6</sub> auf L2- und R3/1-Zellen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Bedeutung der Calciumsignale bei in-vitro-Versuchen mit L2- und R3/1-Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich die Frage nach der Existenz von in der Zellmembran lokalisierten P2X-Rezeptoren, die von tunnelförmiger Gestalt sind und unter ATP- Einfluss Calciumeinstrom ermöglichen. Des Weiteren war fraglich, ob die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  mittels G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptoren stattfindet, oder gar eine Koexistenz beider Purinrezeptortypen bei den untersuchten Zellen besteht.

Die im Folgenden dargestellte Versuchsreihe konnte Aufschluss über die Expression von P2Y-Rezeptoren geben. Der SERCA-Inhibitor Thapsigargin verhindert, dass  $Ca^{2+}$ -Ionen aus dem Zytosol zurück ins ER gelangen. Die  $Ca^{2+}$ -ATPase des ER wird somit inhibiert [31]. Dadurch steigt die zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration vorerst an.  $Ca^{2+}$ -ATPasen pumpen  $Ca^{2+}$ -Ionen über die Zellmembran nach extrazellulär. Die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  fällt.

Die Stimulation der Zellen mit ATP nach Thapsigarginvorbehandlung führt zu keinem signifikanten zytosolischen Konzentrationsanstieg. Das ER ist entleert, wodurch das ATP-Signal in diesem Fall keinen G-Protein-gekoppelten  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Anstieg induzieren kann. Sowohl L2- als auch R3/1-Zellen weisen bei ATP-Inkubation ohne Thapsigargin jedoch sehr hohe Konzentrationsanstiege auf. Dies deutet auf die funktionelle Bedeutung von in der Zellmembran lokalisierten P2Y-Rezeptoren hin. In einigen Fällen kommt es zu einem diskreten Anstieg der Calciumkonzentration. Entweder entleert sich das ER nicht immer vollständig, sodass ein geringer  $Ca^{2+}$ -Anteil über den P2Y-gesteuerten Weg ins Zytosol freigesetzt wird, oder  $Ca^{2+}$ -Ionen gelangen über P2X-Rezeptoren nach intrazellulär.

Mittels weiterer Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass Calciumionen bei L2-Zellen auch von extrazellulär über die Zellmembran ins Zytosol gelangen. Bei Versuchen in calciumfreier Umgebung wurden die Zellen mit  $Ca^{2+}$ -freiem Puffer, der EGTA enthielt, inkubiert. Bei Zugabe von ATP (unter calciumfreien Bedingungen) zeigte sich bei L2-Zellen kein signifikanter Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ . Da EGTA die Eigenschaft hat, extrazelluläre Calciumionen mittels Chelatkomplexbildung zu binden, stand nur wenig freies Calcium zur Verfügung. So gelangte kaum Calcium durch die Zellmembran ins Zytosol. Da bei Zellversuchen ohne EGTA-Einfluss hohe Anstiege der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  zu verzeichnen waren, konnte gezeigt werden, dass Mechanismen vorhanden sind, die Calciumionen nach intrazellulär transportieren. Wie sich in weiteren Versuchen bestätigen sollte, sind dies P2X-Rezeptoren.

Bezüglich der R3/1-Zellen waren unter calciumfreien Versuchsbedingungen starke intrazelluläre Calciumanstiege zu verzeichnen. Unter EGTA-Einfluss stieg nach ATP-Inkubation die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  auf fast das Doppelte an. Es ist möglich, dass P2Y-Rezeptoren bei dieser Zelllinie so stark exprimiert sind, dass die Calciumausschüttung in hohem Maße aus dem ER stattfindet. Bei R3/1-Zellen lässt sich die Funktionalität von P2X-Rezeptoren also nicht eindeutig durch EGTA-Versuche zeigen. Versuche mit Thapsigargin und EGTA lassen somit Schlüsse bezüglich der grundsätzlichen Frage der funktionellen Bedeutung von P2X- und P2Y-Rezeptoren in L2- und R3/1-Zellen zu.

Einen weiteren Hinweis auf die ausgeprägte Expressierung von P2Y-Rezeptoren in der Zelllinie R3/1 ergaben Versuche mit UDP und UTP. Vergleicht man bei L2- und R3/1-Zellen die Anstiege der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  unter UDP- und UTP-Stimulation, sind Unterschiede in der Ausprägung der Konzentrationsanstiege erkennbar. Bei R3/1-Zellen steigt die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  viel stärker bei UDP/UTP-Zugabe an als bei L2-Zellen. UDP und UTP sind Agonisten der P2Y-Rezeptoren. Die Versuchsergebnisse deuten auf hohe Aktivität von P2Y-Rezeptoren hin.

Tab. 3 stellt dar, in welchem Ausmaß ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  stattgefunden hat. ATP erzeugt deutliche Anstiege der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ , da es (bis auf P2Y<sub>14</sub>) Agonist aller bekannten P2X- und P2Y-Rezeptoren ist. Somit fungierte ATP als Kontrollsubstanz. UDP und UTP (außer UTP bezüglich L2-Zellen) ergaben ähnlich hohe Anstiege der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ . Insbesondere UTP hat auf alle verwendeten P2-Rezeptoragonisten (ohne ATP) bezogen bei R3/1-Zellen den höchsten Anstieg zu verzeichnen. Auch dies weist auf eine starke Funktionalität von P2Y-Rezeptoren hin.

Bei der Inkubation von L2-Zellen mit BzATP wurde ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  um 64,16% im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen festgestellt. Möglicherweise sind die entsprechenden Rezeptoren (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>11</sub>) hier schwächer exprimiert. Im Gegensatz dazu stieg die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  bei R3/1-Zellen um 140,78% im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen an. Dies deutet auf starke Funktionalität von P2X<sub>1</sub>-, P2X<sub>7</sub>-, P2Y<sub>11</sub>-Rezeptoren hin.

Bei beiden Zelllinien kam es nach Stimulation mit 2-mes-ATP zu einem deutlichen  $Ca^{2+}$ -Anstieg. L2-Zellen zeigten einen 190,19%igen Anstieg im Gegensatz zu den Ausgangsbedingungen. Bei R3/1-Zellen stieg die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  um 98,74% im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen an.

## Prozentualer Anstieg der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ bei Versuchen mit L2- und R3/1-Zellen

	L2-Zellen	R3/1-Zellen
Inkubation mit	Anstieg $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in %	Anstieg $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in %
ATP	130,12	208,22
BZATP	64,16	140,78
UDP	127,12	251,07
UTP	89,3	264,04
2-mes-ATP	190,19	98,74
Thapsigargin/ATP	10,77	18,15
ATP ( $Ca^{2+}$ -freie Bedingungen)	8,77	80,82
$\alpha\beta$ -me-ATP	8,18	10,23
Pneumo/ATP	17,74	14,22

Tab. 3 Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  bei L2- und R3/1-Zellen nach Stimulation mit P2-Agonisten und Inkubation mit entsprechenden Substanzen oder Pneumokokken im Vergleich zur Ausgangsbedingung.

## 5.2 Eingrenzung und Nachweis potentieller Purinrezeptoren mittels PCR und Western Blot

Ziel war es, das Expressionsmuster von Purinrezeptoren in L2- und R3/1-Zellen zu untersuchen. Es konnte mittels RT-PCR die mRNA der Rezeptoren P2X<sub>3,4</sub> und P2Y<sub>2,6</sub> bei R3/1-Zellen nachgewiesen werden (s. Tab. 4). Auch L2-Zellen wiesen die mRNA von P2X<sub>3,4</sub> und P2Y<sub>2,6</sub>-Rezeptoren auf (s. Tab. 4).

Mittels Western Blot konnten die Proteine von P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>6</sub> klar dargestellt werden. Die mittels RT-PCR aufgezeigte mRNA der P2X- und P2Y-Rezeptoren deckt sich mit den durch Western Blot ermittelten Rezeptorproteinen.

Es fällt eine Besonderheit auf.  $\alpha,\beta$ -meATP ist Agonist der Rezeptoren P2X<sub>1,2,3,4,5,7</sub> [18]. Die Calciumantwort nach Inkubation mit  $\alpha,\beta$ -meATP war nicht signifikant. Der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  betrug bei R3/1-Zellen 10,23% im Vergleich zur Ausgangssituation, bei L2-Zellen lediglich 8,18%. Dies kann mit mehreren Ansätzen erklärt werden. Erstens ist  $\alpha,\beta$ -meATP ein sehr schwacher Agonist [18]. Es ist möglich, dass deswegen keinerlei ausreichendes Calciumsignal gemessen werden konnte. Des Weiteren ist es möglich, dass P2X<sub>1,2,3,4,5,7</sub>-Rezeptoren unvollständig exprimiert sind und somit nicht voll funktionell oder nicht immer in die Zellmembran transferiert werden. Es konnte in dieser Arbeit lediglich die

Anwesenheit von P2X<sub>3,4</sub>-Rezeptorproteinen mittels Western Blot gezeigt werden, nicht jedoch ihre genaue Lokalisation. Für die Funktionalität der in L2- und R3/1-Zellen nachgewiesenen P2X-Rezeptoren (P2X<sub>3,4</sub>) spricht jedoch die Calciumantwort bei Inkubation mit 2MeSATP und BzATP. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression folgender Purinrezeptoren bei L2- und R3/1-Zellen gezeigt werden konnte (s. Tab. 4).

#### **Purinrezeptorexpression bei L2- und R3/1-Zellen**

<b>Purinrezeptoren</b>	<b>L2-Zellen</b>	<b>R3/1-Zellen</b>
P2X <sub>3</sub>	+	+
P2X <sub>4</sub>	+	+
P2Y <sub>2</sub>	+	+
P2Y <sub>6</sub>	+	+

Tab. 4 Vorhandene (+) Purinrezeptortypen bei L2- und R3/1-Zellen.

### **5.3 Beeinflussung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> bei L2- und R3/1-Zellen**

Der Verlauf einer Pneumonie stellt sich oft sehr problematisch dar. Noch immer gehören Infektionen der unteren Atemwege, wie Lungenentzündung und Bronchitis, zu den weltweit häufigsten tödlich verlaufenden Infektionskrankheiten [29]. Im Zuge der Pneumonie kommt es durch gestörte Flüssigkeitsreabsorption und verminderte Surfactantsekretion oft zu Atelektasen und Lungenödemen. Wie genau Pneumokokken zu diesen Prozessen beitragen, ist noch nicht detailliert bekannt. Die Flüssigkeitsreabsorption und Surfactantregulation werden im gesunden Organismus über ATP und Purinrezeptoren gesteuert. Im Rahmen von Untersuchungen am Alveolarepithel wurden bereits häufig L2- und R3/1-Zelllinien eingesetzt. Allerdings war hierbei bisher nicht klar, welche Purinrezeptoren diese Zellen exprimieren. Deshalb untersuchten wir L2- und R3/1-Zellen auf Exprimierung von Purinrezeptoren. Darüber hinaus sollte der Einfluss von *S. pneumoniae* auf das ATP-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Signal untersucht werden.

Bei beiden untersuchten Zelllinien (L2 und R3/1) konnte eindeutig gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Pneumokokken der physiologische Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> nach ATP-Stimulation inhibiert war. Dies ließ vermuten, dass Pneumokokken möglicherweise einen Einfluss auf Purinrezeptoren ausüben. Eine Möglichkeit, die diese Vermutung bestärken könnte, ist die Theorie, dass Pneumokokken die Internalisierung von Purinrezeptoren hervorrufen [14].

Diese Arbeit befasst sich mit der *in-vitro*-Untersuchung der Alveolarepithelzelllinien L2 und R3/1. Hierbei wurde mittels Epifluoreszenzmikroskopie das Calciumsignaling dieser Zellen dargestellt. Dabei ging es um die Inkubation der Zellen mit potentiellen Agonisten und die Auswirkungen von *S. pneumoniae*. Die zentrale Fragestellung nach der Expression von P2X- und P2Y-Rezeptoren wurde dahingehend beantwortet, dass eine Koexistenz von P2X- und P2Y-Rezeptoren bei diesen Zellen besteht.

#### **5.4 Purinrezeptoren in AEZ verglichen mit pulmonalem Endothel**

Purinrezeptoren sind in der Lunge an diversen zellulären Prozessen beteiligt, zum Beispiel an immunologischen Reaktionen. P2X- und P2Y-Rezeptoren sind auf eosinophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und Monozyten exprimiert [38]. Des Weiteren finden sich Purinrezeptoren auf Alveolarepithelzellen und Lungenfibroblasten [38]. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auf L2- und R3/1-Zellen sowohl P2X- als auch P2Y-Rezeptoren nebeneinander exprimiert werden.

An dieser Stelle soll ein Vergleich mit einem anderen Gewebetyp, dem pulmonalen Endothel, gezogen werden, da Parallelen zwischen AEZ und pulmonalem Endothel bestehen.

Das pulmonale Gefäßsystem ist aufgrund des Gasaustausches sehr weit verzweigt und stellt einen wichtigen Bestandteil des alveolären Systems dar. Das Alveolarepithel (insbesondere AEZ Typ I) und das Endothel der Lungenkapillaren sind sich sehr ähnlich. Beide Zelltypen sind flach, einschichtig angeordnet und je mit *Tight Junctions* verbunden. Die Basallaminae der Alveolarepithelzellen (Typ I) und des Endothels sind verschmolzen und bilden so zusammen (mit Surfactant) die Blut-Luft-Schranke [12].

Schon vom ersten Atemzug an bilden Purinrezeptoren eine Einheit mit dem pulmonalen Gefäßsystem. Speziell bei der Vasodilatation der pulmonalen Gefäße zum Zeitpunkt der Geburt spielen Purinrezeptoren hier eine Schlüsselrolle. Es wurde am Beispiel der Kaninchenlunge gezeigt, dass mehrere P2Y-Rezeptoren über den Mediator ATP die Erweiterung der Gefäße initiieren, um die Atmung außerhalb des Uterus zu ermöglichen. Dies sind im Speziellen P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>4</sub>. Diese Rezeptortypen sind sowohl im Lungenparenchym als auch im pulmonalen Endothel und in subendothelialen Schichten zu finden [40].

Die Vasodilatation der Lungengefäße wird grundsätzlich u.a. über endothelial lokalisierte P2Y-Rezeptoren gesteuert [33]. ATP erzeugt hierbei eine durch NO (Stickstoffmonoxid)

vermittelte Relaxation des Gefäßmuskels. Zu Beginn bindet ATP an entsprechenden, in der Zellmembran lokalisierten P2Y-Rezeptor. G-Protein-gekoppelt und IP3-vermittelt findet intrazellulär die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER statt.  $\text{Ca}^{2+}$  bindet an Calmodulin (CaM), das die NO-Synthase (eNOS) aktiviert. Es kommt zur Bildung von NO, woraus nach weiteren Schritten die Vasodilatation der Lungengefäße resultiert [47].

Vergleicht man P2Y-Rezeptoren humaner pulmonaler Endothelzellen (P2Y<sub>1,2,11,12,14</sub>) mit den in dieser Arbeit in AEZ-Zellen (Ratte) nachgewiesenen P2Y-Rezeptoren, ist lediglich das Vorkommen des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors identisch [39]. Allerdings ist es möglich, dass auch im pulmonalen Endothel eine Koexistenz von P2X- und P2Y-Rezeptoren besteht. Bei *in-vitro*-Versuchen mit Endothelzellen der Rattenlunge zeigten sich P2X-Rezeptoren als Regulatoren der Vasokonstriktion [5].

Es fällt auf, dass P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren sowohl in AEZ der Ratte (L2- und R3/1-Zellen) als auch in pulmonalen Endothelzellen des Kaninchens und des Menschen exprimiert sind. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in menschlichen pulmonalen Endothelzellen die Purinrezeptorvielfalt der P2Y-Rezeptoren am größten ist.

Grundsätzlich besteht eine Koexistenz von P2X- und P2Y-Rezeptoren nicht nur bei AEZ. Auch Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen oder Lymphozyten, exprimieren P2X und P2Y-Rezeptoren parallel. Ebenso wie bei AEZ finden sich hier beispielsweise P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren [48] (s. Tab. 1).

## **5.5 Perspektiven bezüglich der Erkenntnisse über pulmonale P2X- und P2Y-Rezeptoren**

P2X- und P2Y-Rezeptoren sind im menschlichen Körper ubiquitär exprimiert. Diese Signalmoleküle sind für viele Funktionen und Abläufe verantwortlich. So kommen Purinrezeptoren neben dem Nervensystem auch im Herz-Kreislaufsystem und bei den zellulären Bestandteilen des Blutes, wie beispielsweise bei Thrombozyten und T-Zellen vor. In fast allen Organen findet man spezifische Signalkaskaden, die Purinrezeptor-assoziiert sind. Auch im Knochenmark und auf Hautzellen sind Purinrezeptoren lokalisiert (s. Tab. 1). Diese Arbeit lieferte Informationen über die Expression von P2X- und P2Y-Rezeptoren in AEZ. Das grundsätzliche Vorhandensein von P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>6</sub> in Epithelzellen war bereits bekannt.

ATP fungiert über P2X- und P2Y-Rezeptoren als parakriner Mediator im Lungenepithel. Hierbei kommt es nach Aktivierung der IP3-Kaskade zur Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ , wodurch

die physiologische Flüssigkeitsreabsorption und Surfactantsekretion reguliert werden [35]. Diese Vorgänge sind essentiell zur Aufrechterhaltung des Lungenvolumens. Bei durch Pneumonie bedingter Veränderung des Flüssigkeitshaushaltes der Alveolen und verminderter Surfactantsekretion kann es zu Atelektasen und Ödembildung kommen. Die ausreichende Ventilation der Lunge ist beeinträchtigt. Komplikationen der Pneumonie nehmen auch heute noch oft einen letalen Verlauf. Da Purinrezeptoren aufgrund ihrer starken Expressierung und ihrer mannigfaltigen Funktion einen wichtigen Angriffspunkt für Medikamente darstellen können, sind diese für die pharmakologische Forschung interessant.

Betrachtet man P2Y-Rezeptoren aus pharmakologischer Sicht, sind bisher relativ wenige Medikamente auf dem Markt, dessen Wirkstoffe über Purinrezeptoren greifen. Beispiele stellen die Thrombozytenaggregationshemmer (TAH) Clopidogrel (Plavix®), Ticlopidin (Ticlid®) und Prasugrel (Efient®) dar. Diese werden bei koronarer Herzkrankheit, Implantation von koronaren Stents oder bei Angioplastien eingesetzt. TAH wirken als irreversible Antagonisten von P2Y<sub>12</sub>-Rezeptoren. Sie verhindern die ADP-induzierte Aggregation von Thrombozyten. Auch der Wirkstoff Ticagrelor (Brilique®) gehört zu den TAH und greift über die Hemmung des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors. In diesem Fall erfolgt die Hemmung jedoch reversibel [36]

P2X-Rezeptoren aus pharmakologischer Sicht: Bezüglich der P2X-Rezeptoren gibt es zum jetzigen Zeitpunkt eine noch kleinere Auswahl an Pharmaka. Es wurde jedoch beobachtet, dass das Bisphosphonat Minodronsäure P2X<sub>2</sub>- und P2X<sub>3</sub>-Rezeptoren effektiv hemmen kann. Neben der Osteoklastenhemmung hat Minodronsäure auch analgetische Wirkung. Diese Erkenntnis ist somit durchaus von Interesse bei schmerzhaften Knochenstoffwechselerkrankungen und Knochenmetastasen [37]. Es ist denkbar, dass P2X-Rezeptoren Hoffnungsträger für neuartige Analgetika oder immunmodulatorische Pharmaka (P2X<sub>1-6</sub>) sein können. Weitere Ansätze diesbezüglich werden zur Zeit erforscht.

Die weiterführende Forschung bezüglich einer pharmakologischen Rezeptormodulation von P2X- und P2Y-Rezeptoren erscheint sinnvoll, da diese Rezeptoren einen Angriffspunkt für Pneumokokken darstellen. Allein wegen ihrer Lokalisation sind purinerge Rezeptoren grundsätzlich für pharmazeutische Zwecke geeignet. Da Purinrezeptoren in der Zellmembran lokalisiert sind und ihre Bindungsstellen extrazellulär liegen, stellen sie günstige Angriffspunkte für Arzneimittel dar. Ein Großteil, etwa 60%, der für Arzneistoffe in Frage kommenden Angriffspunkte befinden sich in der Zellmembran [34].

## 6. Zusammenfassung

Purinrezeptoren sind im Organismus ubiquitär verbreitet und erfüllen beispielsweise maßgebliche Aufgaben im Nervensystem, der Immunabwehr, der Lungenfunktion und bei der Blutgerinnung. Aufgrund ihrer zahlreichen Funktionen ist es erforderlich, möglichst detailliertes Wissen über diese Rezeptorform mit ihren Subtypen (P2X, P2Y etc.) zu erlangen. In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Frage nach der Expression von P2X- und P2Y-Rezeptoren bei AEZ Typ I und Typ II. Diese Lungenzellen erfüllen essentielle Aufgaben wie beispielsweise Gasaustausch und Surfactantsekretion.

Um die Frage nach der Purinrezeptorexpression zu beantworten, stützte sich der Versuchsaufbau auf drei Säulen. Zuerst wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen bei R3/1- und L2-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der ATP-induzierte Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration bei R3/1-Zellen vorwiegend aus intrazellulären Speichern erfolgte, während es bei L2-Zellen zumindest anteilig auch zu einem extrazellulären Calciumeinstrom kam. Der ausgeprägteste Calciumanstieg konnte bei R3/1-Zellen durch Stimulation mit UTP, gefolgt von UDP und ATP hervorgerufen werden, während bei L2-Zellen ATP als stärkster Agonist fungierte, vor UDP und 2MeSATP. Als nächstes konnte die Rezeptorexpression auf RNA-Ebene (zweite Säule) untersucht werden, wobei bei L2- und R3/1-Zellen mRNA von P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>6</sub> nachweisbar war. Daher musste weiterführend der Rezeptornachweis auf Proteinebene (dritte Säule) erbracht werden. Es gelang der Nachweis der Rezeptoren P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>6</sub> bei beiden untersuchten Zelllinien. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte somit die Expression von P2X- und P2Y-Rezeptoren bei AEZ Typ I- und Typ II-ähnlichen Zellen aufgezeigt werden.

*S. pneumoniae* induzierte Pneumonien können mit Atelektasen und Lungenödemen einhergehen. Purinrezeptoren spielen in der gesunden Lunge eine entscheidende Rolle bei der Surfactantsekretion und Flüssigkeitsreabsorption. Um mögliche Auswirkungen von Pneumokokken auf die purinerge Signaltransduktion dieser Purinrezeptoren aufzuzeigen, wurden *in-vitro*-Versuche mit *S. pneumoniae* durchgeführt. Die Annahme, dass die Anwesenheit dieser Pneumonie verursachenden Bakterien Einfluss auf die Funktion von Purinrezeptoren hat, wurde eindrucksvoll bestätigt. *S. pneumoniae* hemmte Purinrezeptoren in ihrer Funktion und setzte somit den ATP-induzierten Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  herab. Die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  stieg daher bei ATP-Stimulation nicht signifikant an.

## 7. Summary

Purinergic receptors are spread ubiquitously through the organism and fulfil essential roles. For instance in the nervous system, in the immune response, in lung functions and in coagulation. Due to their numerous functions, it is necessary to gain detailed knowledge about this type of receptor and its subtypes (P2X, P2Y, etc.). The focus of this study was the question of expression of P2X- and P2Y-receptors on AEC type I and II. These lung cells have important functions, for example gaseous exchange and surfactant secretion.

To answer the question of purinergic receptor expression, the experimental set-up rested on three pillars. First,  $Ca^{2+}$ -measurements of R3/1- and L2-cells were taken. It was found that the ATP-induced increase of cytosolic concentration of calcium of R3/1-cells occurred predominantly in intracellular storages, while L2-cells showed at least partly an extracellular calcium influx. The most pronounced increase in calcium in R3/1-cells could be induced by stimulation with UTP, followed by UDP and ATP. In L2-cells ATP acted as the strongest antagonist, ahead of UDP and 2MeSATP. Next, receptor expression on the RNA-level was examined (second pillar). mRNA of P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>6</sub> could be detected in both L2- and R3/1-cells. Therefore further evidence for receptor expression had to be provided on the protein level (third pillar). It was possible to show expression of P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2Y<sub>2</sub> and P2Y<sub>6</sub> in both cell lines. The result of this work demonstrates expression of P2X- and P2Y-receptors in AEC type I- and type II-similar cells.

*S. pneumoniae* induced pneumonia can be associated with atelectases and pulmonary edema. Purinergic receptors of the healthy lung play a decisive role in surfactant secretion and fluid reabsorption. To show possible effects of pneumococci on purinergic signal transduction of these purinergic receptors, in-vitro tests with *S. pneumoniae* were conducted. The assumption that the presence of these bacteria, which cause pneumonia, has an effect on the function of purinergic receptors has thus been confirmed in an impressive way. *S. pneumoniae* inhibited purinergic receptors in their function and lowered the ATP-induced increase of  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ . Therefore the concentration of  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  did not rise significantly during ATP-stimulation.

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] Thermofisher Scientific (2018) Fluorescent Ca<sup>2+</sup>indicators excited with UV light, Section 19.2. Dreieich, [Online] URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/indicators-for-ca2-mg2-zn2-and-other-metal-ions/fluorescent-ca2-indicators-excited-with-uv-light.html>, zuletzt eingesehen am 26.08.2018.
  
- [2] Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T.J. (1982) Calcium homeostasis in intact lymphocytes: Cytoplasmic free Calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *The Journal of Cell Biology* 94(2): 325-34.
  
- [3] Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties, *The Journal Of Biological Chemistry* 25, 260(6): 3440-3450.
  
- [4] Kroegel C., Costabel U.(2014) *Klinische Pneumologie*, Thieme Verlag, Stuttgart, (Auflage 1), Kapitel 7.1.2, Seite 81.
  
- [5] Gomes P., Srinivas S.P., Vereecke J, Himpens B. (2005) ATP-Dependent Paracrine Intercellular Communication in Cultured Bovine Corneal Endothelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46(1): 104-113.
  
- [6] Jenkinson K. M., Reid J.J. (2000) Suramin The P<sub>2</sub>-purinoceptor antagonist suramin is a competitive antagonist at vasoactive intestinal peptide receptors in the rat gastric fundus. *British Journal of Pharmacology* 130(7): 1632-1638.
  
- [7] Takahashi A., Camacho,P. Leichleiter J.D., Herman B. (1999) Measurement of Intracellular Calcium, *Physiological Reviews*, 79(4): 1089-1125.
  
- [8] WHO (2018) Stellungnahme zu Pneumonie und Todesursachen weltweit, Genf, [Online] URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/index.html>, zuletzt eingesehen am 29.08.2018.
  
- [9] Bihl F., Cerny A. (2002) Bakterielle Pneumonien. *Der Internist* 43: 375-397.

- [10] Suttorp N. Mielke M., Kiehl W., Stückl B. (2003) Infektionskrankheiten verstehen, erkennen, behandeln, Thieme Verlag, Stuttgart, (Auflage 3), Kapitel 6, Seite 113.
- [11] Hahn H., Kaufmann S.H.E., Schulz T.F. (2009) Suerbaum S. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer Verlag, Berlin, (Auflage 6), Kapitel 26.4 - 5, Seiten 213-218.
- [12] Lüllmann-Rauch R. (2003) Histologie: Verstehen - Lernen - Nachschlagen, Thieme Verlag, Stuttgart, (Auflage 1), Kapitel 14.2, Seiten 286-293.
- [13] Dobbs L.D., Johnson M.D., Vanderbilt J., Allen L., Gonzalez R. (2010) The great big alveolar TI cell: Evolving concepts and paradigms. Cell physiology and biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry and Pharmacology 25(1): 55-62.
- [14] Olotu C., Lehmsiek F., Kiefmann M., Mecklenburg A., Hammerschmid S., Goetz A.E., Kiefmann R. (2012) *S. pneumoniae* inhibiert die Wirkung des parakrinen Mediators ATP am Alveolarepithel durch Interaktion am Purinrezeptor, Anästhesiologie & Intensivmedizin 53: 259.
- [15] Chudwin D.S., Artrip S.G., Korenblit A., Schiffman G., Rao S. (1985) Correlation of serum opsonins with *in vitro* phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. Infection and Immunity 50(1): 213-217.
- [16] 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 Journal 52(3-4): 296-302.
- [17] Burnstock G. (2006) Purine and pyrimidine receptors. Cellular and Molecular Life Sciences 64(12): 1471-1483.
- [18] Burnstock G. (2014) Purinergic signalling: from discovery to current developments. Experimental Physiology 99(1): 16-34.

- [19] Burnstock G., Fredholm B.B., North R.A., Verkhatsky A. (2010) The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta Physiologica (Oxf)* 199(2):93-147.
- [20] Kawate T, Michel J.C., Birdsong W.T, Gouaux E. (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X<sub>4</sub> ion channel in the closed state. *Nature* 30, 460 (7255): 592-598.
- [21] Browne L.E., Jiang L.H, North R.A (2010) New structure enlivens interest in P2X receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 31(5): 229-237.
- [22] Ralevic V., Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*. 50, No. 3: 413-492.
- [23] von Kügelgen I., Wetter A. (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedeberg's archives of Pharmacology* 362 (4-5): 310-323.
- [24] Alberts B., Johnson A., Lewis J, Raff M., Roberts K., Walter P. (2011), *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, (Auflage 5), Kapitel 15.2, Seiten 1027-1030.
- [25] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2011) *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, (Auflage 5), Kapitel 2.2.13, Seite 104.
- [26] Brahmajothi M.V., Mason S.N., Whorton A.R., McMahon T.J., Auten R.L. (2010) Transport Rather Than Diffusion - Dependent Route for Nitric Oxide Gas Activity in Alveolar Epithelium. *Free Radical Biology and Medicine*. 49(2): 294–300.
- [27] Douglas W.H.J., Farrell P.M. (1976) Isolation of Cells That Retain Differentiated Functions *in Vitro*: Properties of Clonally Isolated Type II Alveolar Pneumonocytes. *Environmental Health Perspectives* 16: 83-88.
- [28] Horáková L., Radziwon A., Endter S., Andersen R., Koslowski R., Radomski M.W., Doležal P., Ehrhardt C. (2009) Characterisation of the R3/1 cell line as an alveolar epithelial cell model for biopharmaceutical studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 36: 444-450.

- [29] WHO (2004) The Global Burden Of Disease, Genf, [Online] URL: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/2004\\_report\\_update/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/), zuletzt eingesehen am 20.12.2017.
- [30] Höffken G., Lorenz J., Kern W., Welte T., Bauer T., Dalhoff K., Dietrich E., Ewig S., Gastmeier P., Grabein B., Halle E., Kolditz M., Marre R., Sitter H. (2009) Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobielle Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen unteren Atemwegsinfektionen sowie ambulant erworbener Pneumonie. S3-Leitlinie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie, der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie und vom Kompetenznetzwerk CAPNETZ, Rheinbach, [Online] URL: <http://www.pneumologie.de/fileadmin/pneumologie/downloads/Leitlinien/Update>, zuletzt eingesehen am 20.12.2017.
- [31] Alomone Labs online (2018) Information about Thapsigargin, Jerusalem, [Online] URL: <http://www.alomone.com/p/thapsigargin/t-650/20>, zuletzt eingesehen am 29.08.2018.
- [32] Applichem online (2014) EGTA (Produktinformation), Darmstadt, [Online] URL: <https://www.applichem.com/en/shop/product-detail/as/egta-fuer-die-molekularbiologie/>, zuletzt eingesehen am 29.08.2018.
- [33] Konduri G.G., Bakhutashvili I., Frenn R., Chandrasekhar I., Jacobs E.R, Khanna A.K. (2004) P2Y purine receptor responses and expression in the pulmonary circulation of juvenile rabbits. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 287: 157–164.
- [34] Müller C.E. (2011) Purinrezeptoren als Zielstrukturen in der Arzneimittelforschung. *BIOspektrum* 17(6): 645-648.
- [35] Rice WR, Dorn CC, Singleton FM (1990) P2-purinoreceptor regulation of surfactant phosphatidylcholine secretion. Relative roles of calcium and protein kinase C. *Biochemical Journal*. 266(2): 407-13.

- [36] Giannitsis E., Katus HA. (2012) Antiplatelet therapy – ticagrelor. *Hamostaseologie* 32(3):177-85.
- [37] Kakimoto S., Nagakura Y., Tamura S., Watabiki T., Shibasaki K., Tanaka S., Mori M., Sasamata M., Okada M. (2008) Minodronic acid, a third-generation bisphosphonate, antagonizes purinergic P2X<sub>(2/3)</sub> receptor function and exerts an analgesic effect in pain models. *European Journal of Pharmacology*. 589(1-3): 98-101.
- [38] Müller T., Idzko M. (2012) P2Y receptors in lung inflammation. *Wiley online library Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling* 1(6): 755–762.
- [39] Zemskov E., Lucas R., Umapathy N.S.(2011) P2Y receptors as regulators of lung endothelial barrier integrity. *Journal of cardiovascular disease* 2(1): 14–22.
- [40] Burnstock G., Ralevic V. (2014) Purinergic Signaling and Blood Vessels in Health and Disease. *Pharmacological Reviews* 66:102–192.
- [41] Surprenant A., Rassendren F., Kawashima E., North R.A., Buell G. (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X<sub>7</sub>). *Science* 3;272(5262):735-8.
- [42] Löffler G., Petrides P.E: (2007) *Biochemie & Pathobiochemie*, Springer Verlag, Berlin (Auflage 7), Kapitel 31.6.1, Seiten 949-995, Kapitel 21.1.2, Seiten 633-635.
- [43] Herzog E.L., Brody A.R., Colby TV., Mason R., Williams M.C. (2008) Knowns and Unknowns of the Alveolus. *Proceedings of the American Thoracic Society* (5): 778-782.
- [44] Ruskanen O., Lahti E., Jennings L.C., Murdoch D.R. (2011) Viral pneumonia. *Lancet* 367: 1264-75.
- [45] Siebenand S. (2014) *Onkologie: Die Karotte des Todes*. *Pharmazeutische Zeitung Online* (13/2014) [Online] URL: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index>. Zuletzt eingesehen am 01.08.2018.

- [46] Usmani S.M., Fois G., Albrecht S., von Aulock S., Dietl P., Wittekindt O.H. (2010) 2-APB and capsazepine-induced Ca<sup>2+</sup> influx stimulates clathrin-dependent endocytosis in alveolar epithelial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 25(1): 91-102.
- [47] Burkhardt H.C., Heinrich U.R., Brausch I., Xia N., Forstermann U., (2003) Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. *Circulation*, 107 (18): 2348-2354.
- [48] Gever J.R., Cockayne D.A., Dillon M.P., Burnstock G., Ford A.P. (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.*, 452(5): 513-37.
- [49] Miklavc P., Thompson K. E., Frick M. (2013) A new role for P2X<sub>4</sub> receptors as modulators of lung surfactant secretion. *Frontiers In Cellulear Neuroscience* 7: 171.
- [50] Olotu C., Lehmensiek F., Koch B., Hammerschmidt S., Goetz A.E., Kiefmann R. (2013) *Streptokokkus pneumoniae* begünstigt die vermehrte Internalisierung des Purinrezeptors P2Y<sub>2</sub> in Alveolarepithelzellen, *Anästhesiologie und Intensivmedizin* 2013;54: S235.

## 9. Abkürzungen

AEZ:	Aloveolarepithelzellen
$A_{\max}$ :	Maximale Amplitude
BP:	Basenpaare
CaM Kinase:	Calcium-Calmodulin-Kinase
$[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ :	intrazelluläre Calciumkonzentration
CAP:	Community-Acquired Pneumonia (ambulant erworbene Pneumonie)
cDNA:	Complementary DNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CFU:	Colony Forming Units (Koloniebildende Einheiten)
DAG:	Diacylglycerin
DD:	Doppelt destilliert
Denat.:	Denaturierung
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTPs:	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL:	enhanced chemiluminescent substrate (Western-Blot-Reagenz)
ENaC:	Epithelial Sodium Channel (Epithelialer Natriumkanal)
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
FBS:	Fetales Bovines Serum
Fura-2:	Fluoreszenzfarbstoff
HAP:	Hospital-Acquired Pneumonia (im Krankenhaus erworbene Pneumonie)
HBS	HEPES Buffered Saline (HEPES gepufferte Salzlösung)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin)-Ethansulfonsäure (Puffersubstanz)
IP3:	Inositoltriphosphat
LDS:	Lithiumdodecylsulfate (Lithiumdodecylsulfat)

MOPS:	3-Morpholinpropansulfonsäure
PBS:	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PPADS:	Pyridoxal-Phosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonische Säure
RIPA:	Radioimmunoprecipitation Assay (Radioimmunpräzipitationstestpuffer)
RT-PCR:	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion)
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
<i>S. pneumoniae</i> :	<i>Streptokokkus pneumoniae</i>
VAP:	Ventilator-Associated Pneumonia (durch maschinelle Beatmung erworbene Pneumonie)

## 10. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Rainer Kiefmann, für die Unterstützung bedanken. Ich schätze mich glücklich, in seine Forschungsgruppe aufgenommen worden zu sein. Seine Tür stand für Fragen immer offen. Über Erfolgserlebnisse während der Laborarbeit freute er sich mit mir, was mich motivierte. Außerdem danke ich Dr. rer. nat. Martina Kiefmann für ihre Freundlichkeit, Förderung und Hilfe im Labor.

Des Weiteren will ich meinen Dank Dr. med. Cynthia Olotu aussprechen, die meine Promotion betreut und mich stets begleitet hat. Sie hat sich Zeit genommen, mir unzählige Fragen beantwortet und mir beigestanden. Mit viel Witz schaffte sie es immer wieder, mich zu ermutigen. Ich bewundere ihr Engagement.

Außerdem gilt mein Dank dem Laborteam: Frau Monika Weber, die mich verständnisvoll in alle nötigen Labortechniken eingewiesen hat, mir bei den Vorbereitungen behilflich - und mit besonderem Charme und guter Laune immer bei der Sache war. Auch bei Claudia Lüchau und Andrea Pawelczyk möchte ich mich bedanken. Sie haben mir geholfen, die PCR und das Verfahren des Western Blot zu erlernen. Ich danke Anke Schuster und Kirsten Pfeiffer Drenkhahn für ihre freundliche Hilfe bei Multimediaproblemen bezüglich Meta Fluor und bei Versuchsfragen aller Art. Stefanie Klier, Julia Jira und meinen Mitdoktoranden danke ich für die hilfreichen Gespräche und das Gefühl, im Labor willkommen zu sein. Weiterer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt (Leiter der Abteilung Genetik der Mikroorganismen, Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald), Prof. Dr. med. Thea Koch (Direktorin der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universität Dresden) und Dr. Roland Koslowski (Gruppenleiter, Medizinisch-Theoretisches Zentrum, Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Fakultät, TU Dresden) für die Bereitstellung von Pneumokokken, L2- und R3/1-Zellen.

Ich danke meinen Freunden, insbesondere Jascha und Lena, für ihre Unterstützung bei Computerfragen und Lektorenhilfe, die vielen aufbauenden Gespräche - und das nötige Quäntchen Ironie. Ich danke Yigal für die Hilfe bei Multimediafragen. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die ich so sehr liebe: Meiner Mutter (†), die immer in meinem Herzen ist, meinem Vater und seiner Ehefrau, die mir bedingungslosen Rückhalt, Mut und Selbstvertrauen geben, meiner großen Schwester für ihre Motivation, Hilfe und Kraft.

## **11. Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## 12. 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: .....Cornelia Ronneburg.....