

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

Prof. Dr. med. Christian Zöllner

Modifikation des ATP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieges in Alveolarepithelzellen Typ II durch  
*Streptococcus pneumoniae*

## **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Felix Lehmensiek  
aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2020

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.08.2020**

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

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

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Holger Rohde**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Fragestellung .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>6</b>
2.1. Streptococcus pneumoniae – Verbreitung und Bedeutung.....	6
2.1.1. Virulenzfaktoren .....	8
2.2. Alveolarepithelzellen .....	10
2.2.1. Pathophysiologie .....	11
2.3. Verwendete Zelllinien .....	12
2.4. Calciumhomöostase .....	13
2.5. ATP.....	14
2.6. Purinrezeptoren .....	15
2.6.1. P1-Rezeptoren .....	15
2.6.2. P2X-Rezeptoren .....	16
2.6.3. P2Y-Rezeptoren .....	16
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
3.1. Materialien .....	18
3.1.1. Geräte .....	18
3.1.2. Reagenzien .....	21
3.1.3. Zellkultur.....	22
3.1.4. Zellen .....	23
3.1.5. Bakterien .....	23
3.1.6. Primer .....	23
3.1.7. Kits .....	24
3.1.8. Plasmide .....	24
3.1.9. Antikörper.....	24
3.1.10. Software .....	24
3.2. Methoden .....	25
3.2.1. Zellkultur.....	25
3.2.2. Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration am Fluoreszenzmikroskop .....	26
3.2.3. Nachweis spezifischer Purinrezeptoren in Alveolarepithelzellen mittels PCR .....	37
3.2.4. Nachweis spezifischer Purinrezeptoren in der Membranfraktion von Alveolarepithelzellen im Westernblot .....	40
3.2.5. Vervielfältigung eines ECFP-P2Y <sub>2</sub> -Rezeptorkonstrukts und anschließende Transfektion in Alveolarepithelzellen .....	41
3.2.6. Transfektion von P2Y <sub>2</sub> - und P2Y <sub>6</sub> -siRNA in A549- und R3/1-Zellen .....	44
3.2.7. Konfokalmikroskopische Bestimmung der P2Y <sub>2</sub> -Lokalisation in lebenden Alveolarepithelzellen unter Inkubation mit <i>S. pneumoniae</i> .....	45

<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
4.1. ATP-induzierter Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration von Alveolarepithelzellen Typ I und Typ II .....	50
4.2. <i>S. pneumoniae</i> inhibiert den ATP vermittelten Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration in Alveolarepithelzellen. ....	53
4.3. Charakterisierung des Purinrezeptorexpressionsprofils der verwendeten Zelllinien .....	57
4.3.1. Agonisten.....	57
4.3.2. Ursprung des $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstieges.....	59
4.3.3. Purinrezeptor-Expression in A549- und R3/1-Zellen .....	62
4.3.4. siRNA <i>knockdown</i> .....	64
4.3.5. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung an Alveolarepithelzellen nach siRNA- <i>knockdown</i> spezifischer Rezeptoren.....	65
4.4. Überprüfung des zytosolischen Signaltransduktionsweges mit Trypsin .....	71
4.5. Einfluss der Temperatur auf die Fähigkeit von <i>S. pneumoniae</i> die ATP abhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ zu beeinflussen.....	79
4.6. Konfokalmikroskopische Untersuchung von A549-Zellen .....	82
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>88</b>
5.1. Beeinflussung der zytosolischen Calciumkonzentration durch <i>S. pneumoniae</i> .....	88
5.1.1. Bestimmung der Purinrezeptorexpression von A549- und R3/1-Zellen.....	89
5.2. Überprüfung der Integrität der $IP_3$ -Signalkaskade .....	90
5.3. Temperaturabhängigkeit der Inhibition .....	91
5.4. Konfokalmikroskopische Untersuchung des $P2Y_2$ -Rezeptors und seiner Beeinflussung durch <i>S. pneumoniae</i> .....	92
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>103</b>
<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>104</b>
<b>10. Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>104</b>

# 1. Fragestellung

Im Verlauf einer Pneumonie entstehen Lungenödem und Atelektasen, Vorgänge, die in der gesunden Lunge durch ATP als parakrinen Mediator beeinflusst werden. Die Resorption und Sekretion von Flüssigkeit sowie die Produktion und Sekretion von Surfactant sind abhängig von der Funktionsfähigkeit purinerger Signaltransduktion. Bisher nimmt man an, dass es sich bei Ödembildung und Atelektasen ausschließlich um inflammatorische Reaktionen der Zelle handelt. Das Resultat von Ödembildung und Atelektasen bedeutet für Erreger der Pneumonie wie z.B. *S. pneumoniae* verbesserte Überlebensbedingungen in atelektatischen Bereichen der Lunge sowie eine geringere mukoziliäre „clearance“. Es ist bislang nicht bekannt, ob diese pathophysiologischen Veränderungen als Folge einer Zellschädigung im Rahmen des inflammatorischen Geschehens auftreten oder durch *S. pneumoniae* direkt vermittelt werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte daher untersucht werden, ob es durch *S. pneumoniae* zu einer direkten Beeinflussung purinerger Signaltransduktionswege in Alveolarepithelzellen kommt. Hierfür wird der für die Übermittlung des ATP-Signals verantwortliche Purinrezeptor sowie das Purinrezeptorexpressionsprofil der verwendeten Zelllinien untersucht. Der Nachweis von Purinrezeptoren erfolgt mittels PCR und Western Blot, die genaue Lokalisation von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren wird mit Hilfe konfokalmikroskopischer Untersuchungen bestimmt

## 2. Einleitung

### 2.1. *Streptococcus pneumoniae* – Verbreitung und Bedeutung

*S. pneumoniae* ist weltweit der häufigste Erreger der Pneumonie. In Deutschland ist er mit über 40% der häufigste nachgewiesene Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie (*community acquired pneumonia*, CAP). Es gelingt nur bei einem Drittel der Patienten ein Erregernachweis, man kann jedoch davon ausgehen, dass auch in den meisten Fällen ohne Erregernachweis in der Regel eine Pneumokokkenpneumonie vorliegt (Pletz *et al.* 2011).

Die Pneumonie ist eine weltweit verbreitete akute Infektion der Lunge. An einer Pneumonie sterben im Jahr mit 1,2 Millionen mehr Kinder unter fünf Jahren als an AIDS, Malaria und Tuberkulose zusammen (WHO 2013).

Die Gesamthäufigkeit der ambulant erworbenen Pneumonie wird in Deutschland auf 400.000 bis 600.000 Fälle pro Jahr geschätzt. 200.000 davon müssen stationär behandelt werden. Die Letalität von ambulant behandelten Patienten liegt bei weniger als 1%, die von stationär behandelten bei 13-14% (G. Höffken 2005).

Zusätzlich zu den 400.000 bis 600.000 Patienten mit einer ambulant erworbenen Pneumonie kommen noch ca. 40.000 Patienten mit einer nosokomial erworbenen Pneumonie (*hospital acquired pneumonia*, HAP) von denen 15.500 beatmungsassoziiert sind (*ventilator associated pneumonia*, VAP).

Die Sterblichkeit der Pneumonie konnte erstmals durch den Einsatz von Antibiotika um etwa die Hälfte gesenkt werden (Hippenstiel *et al.* 2007). Zusätzlich dazu fielen die Infektionszahlen durch ein besseres Verständnis der Erkrankung und einer Impfung gegen den häufigsten Erreger, *S. pneumoniae* (Weil-Olivier *et al.* 2012), (Grabenstein & Klugman 2012).

*Streptococcus pneumoniae* ist ein grampositives Bakterium, welches zur Familie der Streptokokken gehört. Das ovale bis lanzettenförmige Bakterium liegt morphologisch als Diplokokke vor. Es ist bei 50% der gesunden Bevölkerung im Rachenabstrich nachweisbar und wird durch Tröpfcheninfektion übertragen (Michael Grego *et al.* 2013). Es sind inzwischen über 90 verschiedene Serotypen bekannt, die sich in der Zusammensetzung der Kapsel unterscheiden. Die Infektion findet meist im Kindesalter, mit mehreren Stämmen gleichzeitig oder in zeitlichem Abstand zueinander, statt. Sie ist in diesem Alter am höchsten und nimmt im Laufe des Lebens auf unter 10% ab. Kinder stellen somit das größte Erregerreservoir für *S. pneumoniae* dar. Es hat sich gezeigt, dass durch eine Impfung von Kindern eine Herdenimmunität erzeugt werden kann und es dadurch auch in nicht geimpften Altersgruppen zu weniger Infektionen kommt (Grabenstein & Klugman 2012).

Der Nasopharynxbereich stellt für *S. pneumoniae* und viele andere Bakterien eine ökologische Nische dar. Alpha-hämolysierende Streptokokken konkurrieren mit *S. pneumoniae*, *H. Influenzae*, *S. aureus* und *M. catarrhalis*. Das hier herrschende Gleichgewicht kann beispielweise durch die Einnahme von Antibiotika beeinflusst werden (Bogaert *et al.* 2004).

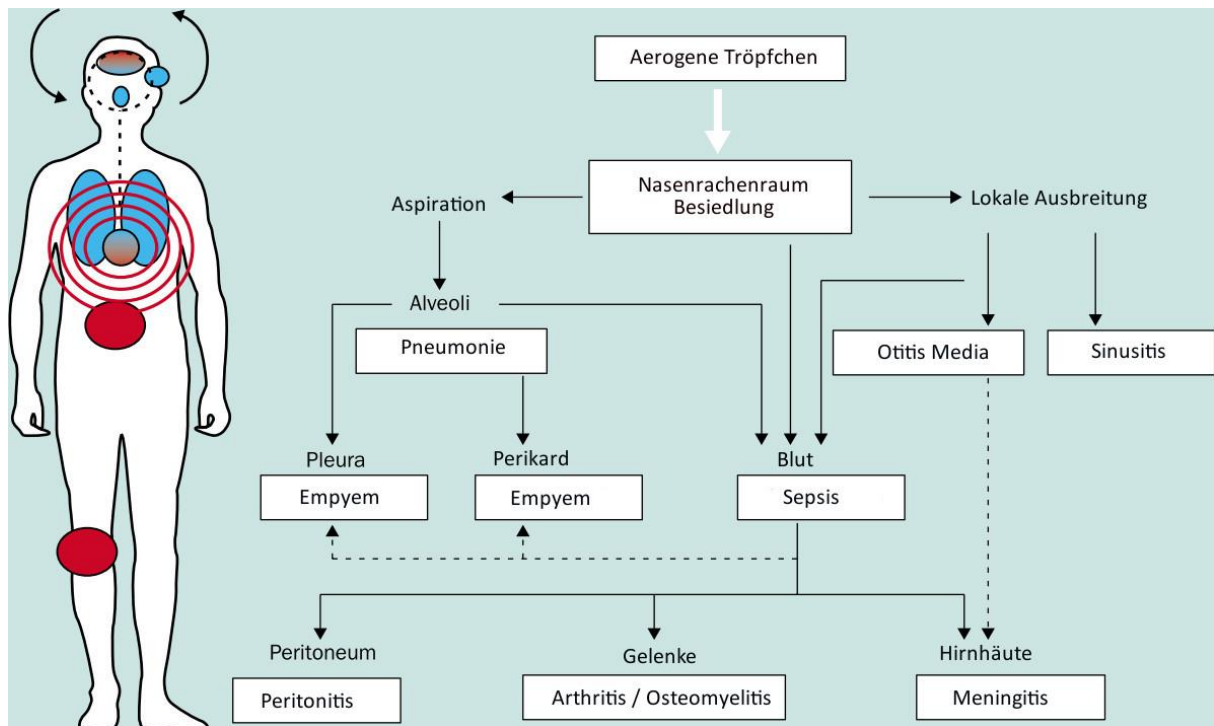
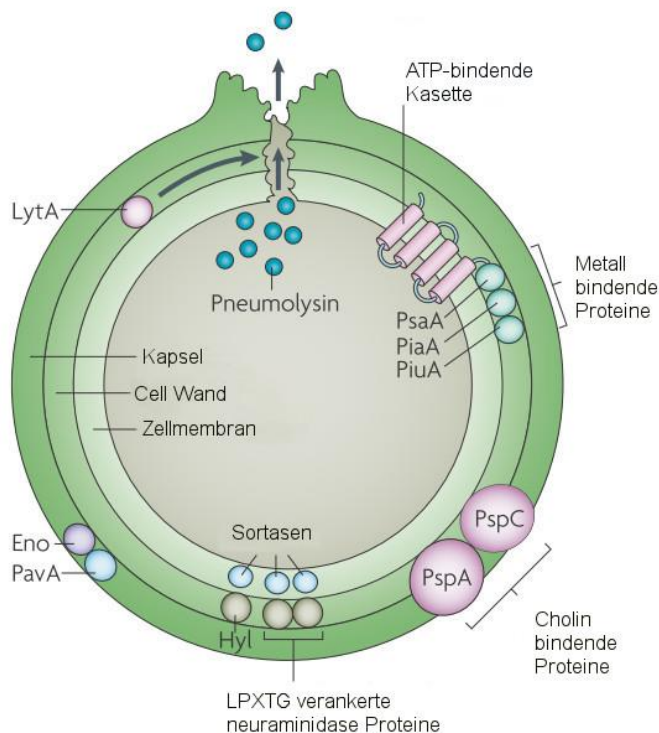


Abbildung 2-1: Übersicht über die möglichen Manifestationen einer *S. pneumoniae*-Infektion. Abbildung modifiziert aus Bogaert et al. 2004

Eine Erkrankung durch *S. pneumoniae* entsteht, wenn sich das Bakterium von seinem normalen Besiedlungsort aus weiter verbreitet. Bei einer Ausbreitung über die eustachische Röhre kann es zu einer Otitis Media kommen, eine Ausbreitung in den tieferen Bereich der Atemwege kann zur Sinusitis und Pneumonie führen. Wenn es *S. pneumoniae* gelingt, sich über das Blut zu verteilen, drohen Sepsis und Meningitis.

### 2.1.1. Virulenzfaktoren

Für die Besiedlung seiner ökologischen Nische und die weitere Dissemination in den menschlichen Organismus stehen *S. pneumoniae* mehrere Virulenzfaktoren zur Verfügung.



**Abbildung 2-2: Übersicht über einige Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*.** Zu den wichtigsten gehören die Kapsel und die Zellwand. Des weiteren Pneumolysin, Autolysin (LytA), die cholinbindenden Proteine (Psp A; Psp C), LPXTG verankerte neuraminidase Proteine, die hyaluronat Lyase (hyl), die beiden Oberflächenadhäsionsmoleküle (Pav A) und Enolase (Eno) sowie die Metall bindenden Proteine (PsaA), (PiaA) und (PiuA).

Modifiziert aus Kadioglu *et al.* 2008.

#### 2.1.1.1. Kapsel

Ein sehr wichtigster Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* ist die Polysaccharidkapsel. Mit einer Dicke von 200-400nm stellt sie die äußere Hülle dar. Es sind bislang über 90 verschiedene Serotypen bekannt, die sich in ihrer Struktur und Dicke unterscheiden. Die Kapsel hat eine starke negative Ladung und ermöglicht es *S. pneumoniae*, in der ersten kritischen Phase der Infektion nicht von muzinösem Schleim eingeschlossen zu werden. Kapseldefiziente Stämme zeigen in dieser ersten Phase der Besiedlung des Nasopharynx eine signifikant geringere Pathogenität (Magee & Yother 2001). Die Kapsel hat weiterhin einen antiphagozytären Effekt. Sie verhindert, dass Antikörper, die an die Zellwand von *S. pneumoniae* gebunden haben, in Kontakt mit den entsprechenden Rezeptoren auf phagozytären Zellen treten (Mitchell & Mitchell 2010).

Wenn *S. pneumoniae* die ersten Barrieren der körpereigenen Abwehr durchbrochen hat, trifft es auf eine weitere Hürde. Die eben noch essentielle Kapsel stellt nun ein Hindernis bei der Adhärenz an Epithelzellen dar. Nicht bekapselte *S. pneumoniae* zeigen eine größere Adhärenz an epitheliale Zellen. Adhäsive Moleküle, die Zell-Bakterienkontakte herstellen und festigen, werden von der dicken Polysaccharidkapsel verdeckt (Hammerschmidt *et al.* 2005), (Kadioglu *et al.* 2008).



Dieser Begebenheit begegnet *S. pneumoniae* mit einer Phasenvariation. Das Bakterium dünnt die eigene Kapsel aus und wird quasi kapsellos. (Tuomanen 1999), (Hammerschmidt *et al.* 2005).

### 2.1.1.2. Adhäsine

Für die erste kritische Phase der Kolonisation des Nasopharynx stehen *S. pneumoniae* mehrere Adhäsine zur Verfügung. Das Phosphorylcholin (ChoP) ist ein Adhäsion, welches auch von vielen anderen Mikroorganismen verwendet wird, die sich im Nasopharynxbereich aufhalten. Es bindet an den plättchenaktivierenden Faktor (rPAF), der von Epithelzellen des Nasopharynx exprimiert wird. *S. pneumoniae* exprimiert außerdem 10-15 verschiedene cholinbindende Proteine, die unterschiedliche Aufgaben im Bereich der Adhäsion und Abwehr des Immunsystems haben. Unter anderem Psp A, PSPc und LytA (Mitchell & Mitchell 2010), (Kadioglu *et al.* 2008).

Bei den Enzymen Neuraminidase (NanA),  $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase (BgaA) und  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase (StrH) handelt es sich um Exoglykosidasen, die Zuckermoleküle auf Zellen abbauen. Auf diese Art können Rezeptoren freigelegt werden. Die Aufspaltung größerer Zuckermoleküle sorgt außerdem für einen Nachschub an Energie (Kadioglu *et al.* 2008).

### 2.1.1.3. Weitere Faktoren und Enzyme

Ein wichtiger Virulenzfaktor ist Pneumolysin. Es wird von fast allen Pneumokokkenstämmen produziert. Pneumolysin gehört zur Familie der cholesterolahängigen Zytolysine, bei denen es sich um porenformende Toxine handelt.

Durch die Porenbildung kommt es zur Schädigung der Wirtszelle, zum Anschwellen der Mitochondrien und zur Abschnürung von Vesikeln (Membran-Blebbing).

Pneumolysin beeinflusst die Transkription und die Zell-Zellkommunikation. Es kommt zur transkriptionellen Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und abhängig vom Zelltyp zur Apoptose. Die ziliäre Funktion wird gehemmt, die alveoläre Permeabilität erhöht und *tight junctions* gelockert.

Der Mechanismus der Freisetzung von Pneumolysin ist noch nicht vollständig geklärt. Anfangs wurde angenommen, Pneumolysin könne nur aus sterbenden Bakterien freigesetzt werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch lebende Pneumokokken Pneumolysin ohne komplette Bakteriolyse freisetzen können (Marriott *et al.* 2008), (Rubins & Janoff 1998).

*S. pneumoniae* ist außerdem in der Lage, exogene Plasmid-DNA aufzunehmen. Auf diese Art können die nötigen Informationen für z.B. Antibiotikaresistenzen unter verschiedenen Arten und Stämmen von Bakterien geteilt werden (Kadioglu *et al.* 2008).

## 2.2. Alveolarepithelzellen

Alveolarepithelzellen haben multiple Funktionen. Sie sind unter anderem Bestandteil der ca. 1,3µm breiten Barriere zwischen dem Blut und der Luft, verantwortlich für die Sekretion von Surfactant, wichtig bei der Resorption von Flüssigkeit und haben eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Infektionen und Fremdstoffen (Macklin 1954). Für diese vielfältigen Aufgaben sind verschiedenste Stoffwechselvorgänge, Rezeptoren und *Second Messenger*-Systeme nötig. Eine zentrale Rolle nimmt hierbei zytosolisches Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ein.

Mehr als 99% der Lungenoberfläche liegt im Bereich der Alveolen. Auf einer Fläche von ca. 130 m<sup>2</sup> finden sich ca. 480 Millionen Alveoli (Dietl *et al.* 2012). Die äußerste Schicht bilden dabei die Alveolarepithelzellen. 98% der Lungenoberfläche wird von Alveolarepithelzellen Typ I (AT I) bedeckt und 2% von Alveolarepithelzellen Typ II (AT II) (Dobbs *et al.* 2009) gebildet.

Durch „*tight junctions*“ ist das Alveolarepithel größtenteils für Proteine und Flüssigkeiten undurchlässig. Der dünne, an der Alveolaroberfläche vorhandene Flüssigkeitsfilm wird durch aktiven Ionentransport aufrechterhalten (Bhattacharya & Matthay 2013). Die AT I-Zelle wurde in der Vergangenheit im Vergleich zur AT II-Zelle nur wenig erforscht. Der Grund hierfür ist die schwierige Isolation und Anzucht dieser Zellart. Die AT I-Zelle ist sehr groß, hat einen flachen Zellkörper und 50 - 100nm lange zytoplasmatische Ausläufer, die den größten Teil der Blut-Luft-Schranke ausmachen. AT I-Zellen haben auf molekularer Ebene alle Voraussetzungen für die Aufnahme von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$ . Mittels *Patch-Clamp*-Technik konnte nachgewiesen werden, dass die AT I-Zelle eine Fülle von hochselektiven  $\text{Na}^+$  Kanälen exprimiert (ENaC). Außerdem werden, wie bei den meisten anderen Zellen auch, die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, Aquaporine, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* Kanäle (CFTR) und andere Anionenkanäle exprimiert. Neben ihrer Aufgabe als Bestandteil der Blut-Luft-Schranke spielt die AT I-Zelle über die genannten Kanäle und Aquaporine eine wichtige Rolle beim Flüssigkeitstransport und somit auch bei der Resorption eines Lungenödems (Dobbs *et al.* 2009). Bisher wurde angenommen, dass die AT I-Zelle eine ausdifferenzierte nicht teilungsfähige Zelle ist. Neue Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass sich die AT I-Zelle *in vitro* teilen kann. Ob dies auch bei Verletzungen der Lunge *in vivo* eine signifikante Rolle spielt, ist noch nicht bekannt.

Die AT II-Zelle ist im Vergleich zur AT I-Zelle klein und kubisch. Sie wird auch Nischenzelle genannt und ist eher vereinzelt in den „Nischen“ des Alveolus zu finden. Ihre Aufgaben sind mannigfaltig. Eine sehr wichtige ist die Herstellung, Prozessierung und Sekretion von Surfactant, einer oberflächenaktiven Substanz, die aus Phospholipiden und vier verschiedenen Proteinen besteht. Die Hauptaufgabe des Surfactant ist es, die Oberflächenspannung der Alveoli so zu beeinflussen, dass ein optimaler Gasaustausch möglich ist. Ohne Surfactant kommt es zum endexpiratorischen Kollaps von Alveolen und zur Entstehung von Atelektasen. Surfactant verhindert die Adhäsion der Alveolaroberflächen aneinander. Es wird vermutet, dass das Surfactant auch gewisse antiödematöse Eigenschaften besitzt und den Flüssigkeitstransport über die Blut-Luft-Schranke erleichtert (Fehrenbach 2001).

Neben der Sekretion wichtiger Surfactantbestandteile sind AT II-Zellen dafür verantwortlich, einen dünnen Flüssigkeitsfilm an der Alveolaroberfläche aufrecht zu erhalten, die so genannte Hypophase. In der Hypophase findet sich ein anderer pH-Wert und eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als im zellulären Milieu. Die Aufrechterhaltung dieser Konzentration ist wichtig für

Die AT II-Zelle ist teilungsfähig und kann über einen intermediären Zelltyp in eine AT I-Zelle differenzieren. *In vitro* verlieren isolierte AT II-Zellen innerhalb von Tagen ihre spezifischen Eigenschaften und erlangen Charakteristika von AT I-Zellen (Fehrenbach 2001).

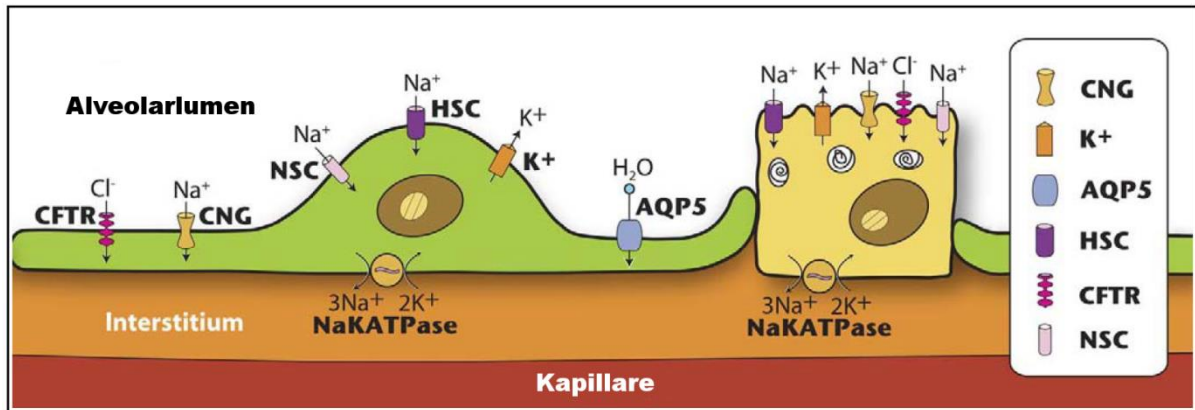


Abbildung 2-3: Ionen und Flüssigkeitstransportmechanismen von AT I-Zellen (grün) und AT II-Zellen (gelb)  $\text{Na}^+$  kann von der apikalen Oberfläche beider Zellarten über die beiden ENaC-Kanäle HSC und NSC und über CNG-Kanäle absorbiert werden.  $\text{Cl}^-$  kann über CFTR-Kanäle und wahrscheinlich andere Kanäle sowie *tight junctions* folgen. An der basalen Zelloberfläche kann  $\text{Na}^+$  über die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ATPase in das Interstitium transportiert werden. Wenn der Netto-Ionentransport von apikal nach basal erfolgt, entsteht ein osmotischer Gradient, dem Flüssigkeit durch Aquaporine folgt. (HSC: hochselektiver  $\text{Na}^+$  Kanal; NSC: nicht selektiver  $\text{Na}^+$  Kanal; CNG: zyklonukleotid regulierter Kationenkanal;  $\text{K}^+$ : Kaliumkanal; CFTR: *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*; AQP5: Aquaporin 5) Modifiziert nach Dobbs *et al.* 2009.

Im Rahmen von bakteriellen Infektionen setzen Lungenepithelzellen antimikrobielle Peptide frei, die die lokale Abwehr direkt stärken. Durch die Freisetzung von verschiedenen Chemo- und Zytokinen kommt es zur Aktivierung von klassischen Immunzellen wie Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten. Das nun entstehende entzündliche Mikromilieu ist nicht nur für Bakterien schädlich. Es kommt zur Hyperpermeabilität der alveolokapillären Barriere mit der Folge von Ödembildung, pulmonalarterieller Vasokonstriktion und Erhöhung des rechts-links-*shunts*. *S. pneumoniae* kann durch die Freisetzung von Pneumolysin die interzelluläre Lückenbildung, u.a. durch den Abbau von *Junktionproteinen*, noch weiter verstärken, was die bakterielle Translokation in andere Gewebe und das Blut begünstigt (Hippenstiel *et al.* 2007). In Summation kann es dadurch zu einer schwerwiegenden Beeinträchtigung des Gasaustausches kommen und im Extremfall zu Krankheitsbildern wie dem ARDS, Pleuraempyemen oder pneumogener Sepsis. Für den Patienten kann dies je nach Schweregrad zu Krankenhausaufenthalt, intensivmedizinischer Therapie, Beatmungstherapie oder sogar Tod führen (Lewandowski 2001).

### 2.3. Verwendete Zelllinien

Die A549-Zelle ist in ihren Eigenschaften und Oberflächenproteinen der AT II-Zelle sehr ähnlich. Die Zelllinie wurde 1972 von D.J. Giard und Kollegen aus humanem Lungenadenokarzinomgewebe isoliert. *In vivo*-Versuche zeigten, dass metabolische und Transporteigenschaften von A549-Zellen mit denen von AT II übereinstimmen. Die Morphologie von Lamellar-Körperchen sowie die Expression wichtiger Zytochrom P 450 Enzyme: CYP 1A1 und CYP 2B6 entspricht der von AT II-Zellen (Foster *et al.* 1998).

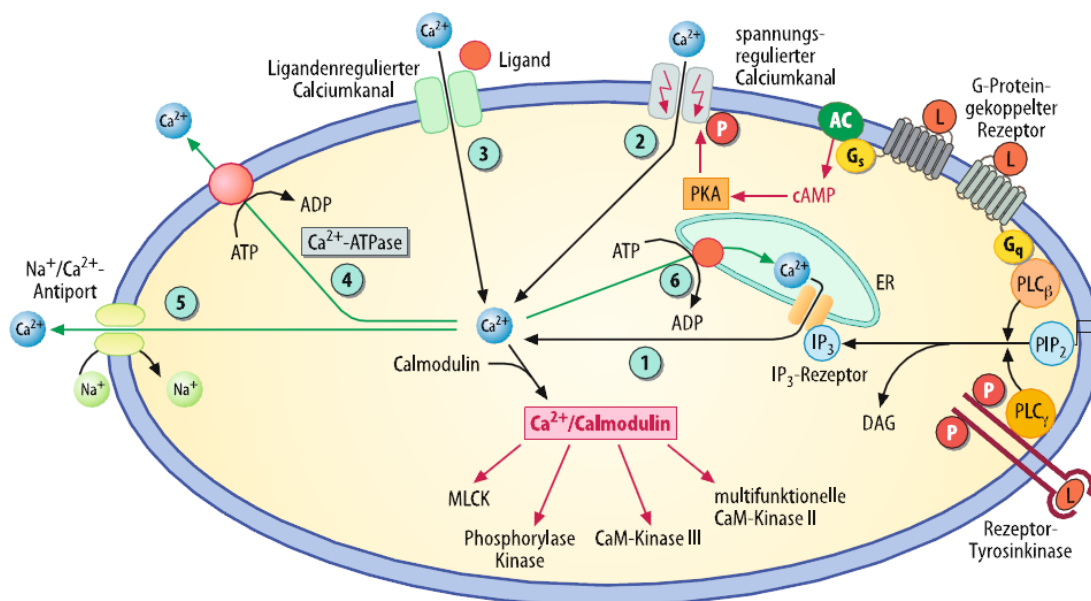
In der Vergangenheit wurde diese stabile Zelllinie häufig für repräsentative *in vitro*-Untersuchungen an Alveolarepithelzellen verwendet (Marcet *et al.* 2007), (Robson *et al.* 2006), (Tatur *et al.* 2007), (Witzenrath *et al.* 2006), (Talbot *et al.* 1996), (Ubl *et al.* 2002), (Pracht *et al.* 2005), (Tu *et al.* 2007).

R3/1-Zellen werden als AT I-ähnlich bezeichnet. Sie wurden aus pulmonalem Gewebe von fetalen Ratten am 20 Gestationstag gewonnen (Knebel *et al.* 1994). Die Zellen besitzen mehrere für AT I-Zellen typische Oberflächenproteine wie T1 $\alpha$ , ICAM-1, Cav-1 und Cav-2 und eignen sich für *in vitro*-Studien von AT I-Zellen (Koslowski *et al.* 2004).

## 2.4. Calciumhomöostase

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb des Zytosols ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ ) unterscheidet sich von der des Extrazellulärspaces und bestimmter Zellorganellen. Fast alle Kompartimente des menschlichen Körpers haben ihre eigenen speziell definierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Innerhalb des Zytosols herrscht eine Konzentration von ca. 100nM. Im Extrazellulärraum sind es ca. 1mM und im endoplasmatischen Retikulum (ER) können es bis 10mM sein (Pozzan *et al.* 1994). Um diese Konzentrationen aufrechtzuerhalten, gibt es in der Plasmamembran die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, die  $\text{Ca}^{2+}$  unter ATP-Verbrauch in den Extrazellulärraum pumpt. Der Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) nutzt den Natriumgradienten als Energiequelle. Er transportiert ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion aus der Zelle im Austausch gegen drei  $\text{Na}^+$ -Ionen. Der Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  in seinen wichtigsten zytosolischen Speicher, das ER erfolgt ebenfalls unter ATP-Hydrolyse.

Modifikationen der spezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen verursachen komplexe physiologische Veränderungen. Ligandenaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle öffnen sich bei Aktivierung und lassen  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol strömen. Membranständige spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle öffnen und schließen sich abhängig vom Membranpotential. An verschiedenen Zellorganellen finden sich weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die bei Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$  in das Zytosol strömen lassen. Am ER sind es z.B.  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren, die sich  $\text{IP}_3$ -abhängig öffnen und damit die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöhen (Laude & Simpson 2009).



**Abbildung 2-4: Regulation des zellulären Calciumstoffwechsels.** Die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird über multiple Rezeptoren und Kanäle beeinflusst. Von rechts nach links: Rezeptor-Tyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren spalten  $\text{PIP}_2$  zu  $\text{IP}_3$  und DAG. (1)  $\text{IP}_3$  aktiviert Ryanodinrezeptoren des ER und erhöht so die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ ;

(2) Spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle öffnen und schließen sich abhängig vom Membranpotential und können über Second-Messenger-Kaskaden beeinflusst werden; (3) ligandenregulierte  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle öffnen sich, wenn der entsprechende Ligand bindet. Das können unter anderem Hormone oder auch Nukleotide wie ATP sein; (4) Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pumpt  $\text{Ca}^{2+}$  unter ATP Verbrauch aus dem Zytosol; (5) Der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter verwendet den Konzentrationsgradienten von  $\text{Na}^+$  und transportiert im Austausch von 3  $\text{Na}^+$  ein  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol; (6) Unter ATP Verbrauch wird  $\text{Ca}^{2+}$  in das ER gepumpt. Über den  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplex beeinflusst die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  Proteinbiosynthese und enzymatische Systeme.

(AC: Adenylatcyclase; CaM: Calmodulin; ER: endoplasmatisches Retikulum; G: heterotrimeres G-Protein; L: Ligand; MLCK: Myosin-Leichtketten-Kinase; PKA: Proteinkinase A; PLC: Phospholipase C). Löffler *et al.* 2007

Im Epithel der Atemwege spielt die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  eine zentrale Rolle, unter anderem reguliert sie die ziliare Aktivität. Eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  bewirkt eine höhere Zilienschlag-Frequenz, wichtig für den Abtransport von Schleim und Fremdstoffen (Evans & Sanderson 1999). In Alveolarepithelzellen hat die Calciumkonzentration eine Schlüsselfunktion bei der Sekretion von Surfactant und bei Resorption und Sekretion von Flüssigkeiten. Sie beeinflusst also direkt alveoläre Stabilität, Bildung von Atelektasen, die Entstehung und Resorption von Lungenödem sowie die Abwehr pathogener Keime. (Bove *et al.* 2010)

Die Sekretion von Surfactant ist ein mehrschrittiger Prozess, der von der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  abhängig ist. Calcium wird bei der Exozytose von Vesikeln benötigt und eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  vergrößert die Sekretionsrate. (Fehrenbach 2001), (Dietl *et al.* 2012).

## 2.5. ATP

ATP ist ein Nukleotid und setzt sich zusammen aus der Purinbase Adenin und einer am C1-Atom verbundener Ribose, an dessen C5-Atom ein dreifacher Phosphatrest hängt. ATP wird unter anderem für Prozesse verwendet, bei denen Energie verbraucht wird, beispielsweise bei Muskelarbeit oder bei Pumpvorgängen von Ionen entgegen eines elektrischen Gradienten. Hierbei wird die benötigte Energie durch die Spaltung der energiereichen Phosphoanhydrid-Bindungen freigesetzt.

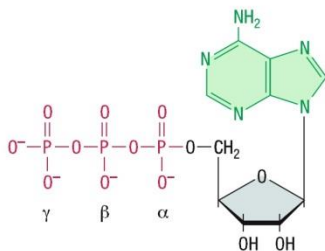


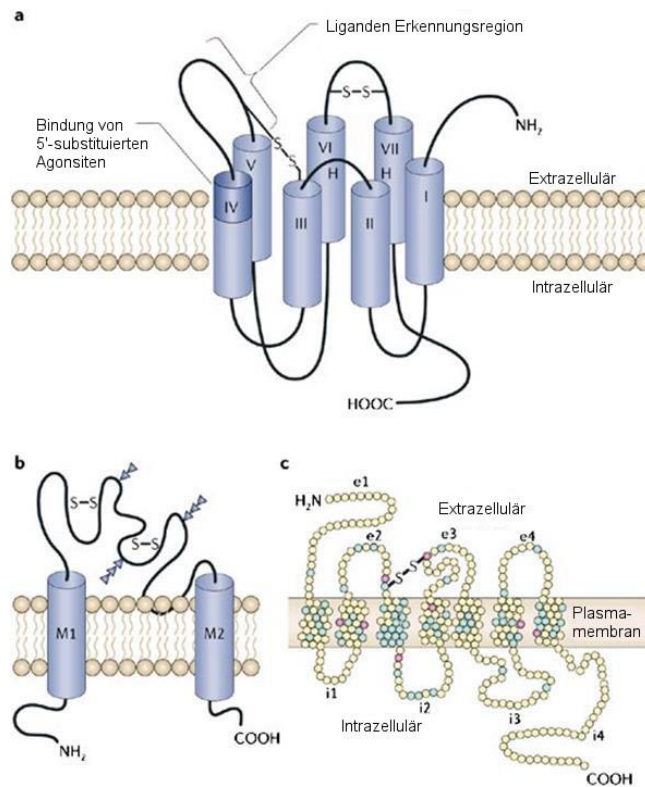
Abbildung 2-5: Struktureller Aufbau von ATP. (Löffler *et al.* 2007)

ATP hat, abgesehen von der zentralen Rolle als Energieträger, auch als intra- und extrazelluläres Signalmolekül eine wichtige Aufgabe. Extrazellulär ist ATP ein Agonist an verschiedenen Purin- und Pyrimidinrezeptoren. Die ATP-Konzentration beeinflusst die zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration, die mukoziliäre Clearance, die Zilienschlagfrequenz, Surfactantsekretion sowie Flüssigkeitssekretion und Absorption. Über eine Aktivierung des  $P2Y_2$ -Rezeptors am Alveolarepithel erhöht ATP u.a. die  $Cl^-$ -Sekretion und reduziert die  $Na^+$ -Absorption. Daraus resultiert eine gesteigerte Flüssigkeitssekretion, die zusammen mit der Zilienschlagfrequenz wichtig für den Abtransport pathogener Keime ist. Die Sekretion von Surfactant ist ein komplexer Vorgang, bei dem ATP in unterschiedlichen Phasen wichtige Teilschritte initiiert. (Okada *et al.* 2006), (Schmid *et al.* 2011), (Bhattacharya & Matthay 2013).

ATP wird u.a. von Lungenepithelzellen basal sezerniert und in zellulären Stresssituationen vermehrt freigesetzt. Es wirkt dabei als auto- und parakriner Mediator. (Schmid *et al.* 2011). Bei Hypoxie, Ischämie oder Scherkräften bewirkt ATP über  $P2$  Rezeptoren eine Vasodilatation von Blutgefäßen. ATP wird außerdem bei Kontakt von Alveolarepithel mit hypotonen Lösungen sezerniert und wirkt unter anderem dem Anschwellen der Zellen entgegen.

## 2.6. Purinrezeptoren

1976 wurden purinerge Rezeptoren erstmals beschrieben und kurz darauf in P1-Rezeptoren, die Adenosin binden und P2-Rezeptoren, die ATP und ADP binden eingruppiert. 1985 wurden P2-Rezeptoren anfangs aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften und später aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur weiter in die Untergruppen P2X und P2Y unterteilt (Burnstock 2006). Purinrezeptoren finden sich ubiquitär in eukaryoten Geweben, wo sie unterschiedlichste Prozesse vermitteln und steuern (Ralevic & Burnstock 1998).



**Abbildung 2-6: Purin- und Pyrimidinrezeptoren.** Extrazelluläre Agonisten sind u.a. ATP und seine Spaltprodukte. (a) P1-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für extrazelluläres Adenosin. (b) P2X-Rezeptoren sind ligandenaktivierte Ionenkanäle. (c) Der P2Y-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Modifiziert nach Burnstock 2007.

### 2.6.1. P1-Rezeptoren

Es gibt verschiedene Untergruppen von P1-Rezeptoren (Abbildung 2-6 a), von denen alle G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind. Physiologischer Agonist an P1-Rezeptoren ist Adenosin, ein Spaltprodukt des ATP. Intrazellulär sind sie meist (aktivierend oder inaktivierend) an die Adenylcyclase gekoppelt. Der menschliche P1A<sub>2B</sub>-Rezeptor kann über G<sub>q/11</sub> die Aktivität der Phospholipase C beeinflussen (Burnstock 2007).



## 2.6.2. P2X-Rezeptoren

P2X-Rezeptoren gehören zur Familie der ionotropen Rezeptoren. Sie bestehen aus zwei Transmembran-Regionen, einem extrazellulären Loop sowie intrazellulären COOH- und NH<sub>2</sub>-Gruppen (Abbildung 2-6 b). Physiologischer Agonist an P2X-Rezeptoren ist ATP.

Die Bindung von extrazellulären Signalmolekülen führt zur Bildung von Transmembranporen, die je nach Rezeptor selektive Ionenströme u.a. Na<sup>+</sup> oder Ca<sup>2+</sup> zulassen. Eine Aktivierung von P2X-Rezeptoren führt zu einer Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> durch einen Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum (Burnstock 2007).

## 2.6.3. P2Y-Rezeptoren

P2Y-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Physiologische Agonisten an P2Y-Rezeptoren sind ATP, ADP, UTP und UDP.

Sie besitzen sieben Transmembranregionen, ein extrazelluläres NH<sub>2</sub>-Ende und ein zytosolisches COOH-Ende (Abbildung 2-6 c). Über verschiedene Signalkaskaden führen sie zu einer Erhöhung der IP<sub>3</sub>-Konzentration und dadurch letztendlich zu einer Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum.

P2Y-Rezeptoren haben in verschiedenen Zellen auch noch weitere Funktionen. Einige P2Y-Rezeptoren stimulieren nach ihrer Aktivierung z.B. mitogen-aktivierte Proteinkinasen. Außerdem können von P2Y Rezeptoren aktivierte G-Proteine in einigen Zellen spannungsabhängige Ionenkanäle beeinflussen, z.B. K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Burnstock 2007).

### 2.6.3.1. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor

Die stärksten physiologischen Agonisten an P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren sind ATP und UTP. Schwächere Agonisten sind ADP und UDP. Nach ihrer Aktivierung können die Rezeptoren über das G-Protein G<sub>αq/11</sub> direkt an die Phospholipase Cβ<sub>1</sub> (PLCβ<sub>1</sub>) binden. Die weitere zytosolische *second messenger*-Kaskade beinhaltet eine Erhöhung von IP<sub>3</sub>, Diacylglycerol (DAG), eine Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus zytosolischen Speichern und die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren sind in vielen verschiedenen Geweben vorhanden und ihre Aktivierung hat unterschiedliche zellspezifische Resultate. In epithelialen Zellen kommt es nach der Aktivierung u.a. zu einer stärkeren Cl<sup>-</sup>-Sekretion und einer reduzierten Na<sup>+</sup>-Resorption (s.o.). Die P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorexpression wird durch verschiedene Mediatoren gesteuert (Burnstock 2007).

Nach Aktivierung durch seine physiologischen Agonisten ATP und UTP kommt es nach kurzer Zeit zu einer Desensibilisierung des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors. Dabei erfolgt in einem ersten Schritt die Phosphorylierung des Rezeptors, resultierend in einer geringeren Agonistenaffinität. In einem zweiten Schritt wird der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor dann internalisiert (Otero *et al.* 2000).

Die Internalisierung von Rezeptoren ist ein komplexer Vorgang, der abhängig von verschiedenen u.a. membranständigen Proteinen wie z.B. Arrestin, Clathrin und anderen Adaptorproteinkomplexen abläuft. Im Folgenden kommt es dann zur Reorganisation des



Zytoskeletts mit Translokation der Rezeptoren in frühe Endosomen und Lysosomen. Das weitere zytosolische *Trafficking* ist abhängig von der Dauer der Agonistenexposition. Eine 30-minütige Exposition bewirkt eine Co-Lokalisierung der Rezeptoren mit Endosomen und eine 60-minütige Exposition eine Co-Lokalisierung mit Lysosomen. Dies hat Auswirkungen auf die Resensitivierung des Rezeptors. Rezeptoren in Endosomen könnten recycelt und wieder zur Zellmembran transportiert werden. Im Gegensatz dazu werden Rezeptoren in Lysosomen abgebaut und eine Resensitivierung ist nur nach erneuter Rezeptorsynthese möglich. Die Agonisten-abhängige Internalisierung des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors verläuft temperaturabhängig. Bereits bei 28°C tritt die Rezeptorinternalisierung deutlich verlangsamt auf, bei 4 Grad Celsius ist die Internalisierung aufgehoben (Tulapurkar *et al.* 2005).

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Materialien

Name	Hersteller
Glasboden Zellkulturschale ( <i>Glass Bottom Culture Dishes</i> )	MatTek, Ashland, MA, USA
Zellkulturflaschen	Sarstedt Inc., Newton, USA
Objektträger BD Falcon Culture Slides	BD Biosciences Europe, Erembodegen, Belgien
Neubauer Zählkammer	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Eppendorf Reference Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tube	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrokatheter 0,28mm ID	Smith Medical International Ltd. Hythe, Kent, UK
Kanülen: BD Plastipak	Becton Dickinson S.A., S. Augustin del Guadalix, Madrid, Spanien

#### 3.1.1. Geräte

Name	Hersteller
Wasserbad GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Vortexer VF 2	Janke & Kunkel GmbH & Co KG IKA Labortechnik, Staufen i. Br., Deutschland
Waage Mettler P6N	Mettler Wagen GmbH, Gießen, Deutschland
Inkubatorschrank	Heraeus
Zentrifuge Hettich Hämatokrit Typ 201	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Biofuge 28 RS	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland

### 3.1.1.1. Epifluoreszenzmikroskopie

Name	Hersteller
Mikroskop Olympus BX40	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland
CCD-Kamera	CoolSnap HQ, Roper Scientific, USA
Lampe Olympus U-RFL-T	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland
Shutter Lambda 10-2	HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland
Objektiv Zeiss NA 0,8; Wasser Immersion	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

### 3.1.1.2. Konfokalmikroskopie

Name	Hersteller
PerkinElmer UltraVIEW VoX	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
Mikroskop: Nikon Eclipse TiE	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Objektive:  40x Plan Fluor Oil NA: 1.30 WD (mm): 0.2 DIC: H/N2  60x Apo TIRF (corr.) Oil NA: 1.49 WD (mm): 0.12 (CS: 0.13-0.21 @ 23 or 37 °C) DIC: N2  100x Plan Apo TIRF Oil NA: 1.45 WD (mm): 0.13 DIC: H/N2	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Laser lines (nm): 405 / 440 / 488 / 515 / 561 / 640; all solid-state lasers	Melles-Griot, Bensheim, Deutschland
Spinning Disk: Yokogawa CSU X-1 in dual-Kamera Konfiguration	Yokogawa Deutschland GmbH, Ratingen, Deutschland
Emissions Filter Spinning Disc: - cyan+far-red, 485(W60), 705 (W90) - blue+near-red, 445 (W60), 615 (W70) - green+red, 525 (W50), 640 (W120)	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
Dichroic in Spinning Disc Unit: - 405/488/561/640 (used with the respective channels) - 405/440/514/640 (used for 515 and 640 channels)	PerkinElmer, Rodgau, Deutschland

- 405/440/488 (not used) Dichroic	
2x Hamamatsu EM-CCD C9100-50, 1x Hamamatsu EM-CCD C9100-12	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH Herrsching am Ammersee, Deutschland
UV-Lampe: EXFO X-Cite 120 Series, 120W	Lumen Dynamics Group Inc., Ontario, Kanada
Fluoreszenz Filter: Filterset: (em.-Farbe; Färbung): Exzitation   Beamsplitter   Emission  DAPI (Blau; DAPI): BP 340-388   DM 400   BP 435-485  GFP-B (Grün; AF488, GFP): BP 460-500   DM 505   BP 510-560  TxRed (Rot; AF568, mCherry): BP 540-580   DM 595   BP 600-660	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Halogen Lampe: 100W, Standard Gehäuse	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Inkubations Kammer: Tokai Hit INU-F1	Tokai Hit CO., Ltd, Shizuoka-ken, Japan
Piezo Focus Drive: Prior Scientific NanoScanZ	Prior Scientific Inc., MA, USA
Motorisierte XY stage: Prior Scientific ProScan	Prior Scientific Inc., MA, USA
Auto-focus: Perfect Focus System	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland

### 3.1.2. Reagenzien

Name	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
ATP (Adenosin 5'-Triphosphat)	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Fura-2-AM	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
FuGENE 6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
$\alpha,\beta$ -meATP ( $\alpha,\beta$ -Methylen ATP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-MeSATP (2-Methylthio ATP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bz-ATP (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) ATP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PPADS (Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2,4-disulfonic Säure)	Pyridoxalphosphat
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isotone Kochsalzlösung	Baxter Healthcare SA, Zürich, Schweiz
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaCl	J. T. Backer, Deventer, Holland
Pluronic	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
TAE Puffer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ladepuffer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Roche, Mannheim, Deutschland
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
LB-Medium LB Broth Base, Powder (Lennox L Broth Base) <sup>®</sup> NaCl 5000mg/L; SELECT Peptone 140 10000 mg/L; SELECT Yeast Extract autolyzed low sodium 5000 mg/L;	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
LB-Agar	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Lipofectamine <sup>TM</sup> RNAiMAX	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Opti-MEM <sup>®</sup> I Reduced Serum Medium	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
RNase Zap <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Weitere Chemikalien wurden von folgenden Herstellern erworben: Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, Roche, Mannheim, Deutschland, Baxter Healthcare SA, Zürich, Schweiz.

### 3.1.3. Zellkultur

Name	Hersteller
Standardmedium für A549-Zellen  F-12 K Medium, ergänzt durch: 10% fetales Rinderserum (hitzeinaktiviert bei 56°C) 100µg/ml Streptomycin 100 U/ml Penicillin	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
Standardmedium für R3/1-Zellen  DMEM, ergänzt durch: 10% fetales Rinderserum (hitzeinaktiviert bei 56°C) 100µg/ml Streptomycin 100 U/ml Penicillin.	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
PBS pH 7,4  8000 mg/l NaCl 200 mg/l KCl 1150 mg/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HEPES-Puffer pH 7,4  20mM HEPES 1mM CaCl <sub>2</sub> 1mM MgCl <sub>2</sub> 5mM KCL 150mM NaCl 10mM Glucose	UKE, Hamburg, Deutschland
Trypsin in PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>  0,05% Trypsin 0,02% EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fetal bovine serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Thapsigargin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypanblau Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 10000IE/ml/10000µg/ml	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

### 3.1.4. Zellen

Name	Hersteller
A549	Humane Zelllinie aus dem Adenocarcinom der Lunge, Alveolarepithelzellen Typ II 1972 von D.J. Giard, <i>et al.</i> aus Lungen Karzinomgewebe entwickelt (Giard & Aaronson 1973). (Foster <i>et al.</i> 1998).
R3/1-Zellen	Sekundär immortalisierte Zellen aus fetaler Rattenlunge. Typ I -ähnliche Alveolarepithelzellen. Knebel <i>et al.</i> 1994

### 3.1.5. Bakterien

Bezeichnung	Mutation	Resistenz
<i>S. pneumoniae</i> Stamm D39	Wildtyp	-
<i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 Δ cps	kapseldefiziente Genvariante	Kanamycin
<i>S. pneumoniae</i> Stamm D39 Δ Ply	pneumolysindefiziente Genvariante	Erythromycin

Bakterien und Toxine wurden freundlicherweise von Prof. Sven Hammerschmidt, interfakultäres Institut für Genetik und funktionelle Genomforschung der Universität Greifswald, zur Verfügung gestellt.

Name	Hersteller
One Shot® INVαF' Chemically Competent E. coli	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.6. Primer

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
P2Y6_hu forward	CCCTGCTGGCCTGCTACTGTCTCCTG (26)
P2Y6_hu reverse	CTAATTCTCCGCATGGTTGGGGTTGG (27)
P2Y <sub>2</sub> _ra forward	CCTGGTCTGTTACGTGCTCA
P2Y <sub>2</sub> _ra reverse	GCTGGTGTGGAGCTCTGTCCT (21)
P2Y6_ra forward	ACGCTTCCTCTTCTATGCCA (20)
P2Y6_ra reverse	TAGCAGGCCAGTAAGGCTGT (20) u.
GAPDH-hu forward	ACCACAGTCCATGCCATC (20)
GAPDH-hu reverse	TCCACCACCTGTTGCTGTA (20)
Obligo p(dto.)15-Primer	Qiagen, Hilden, Deutschland

### 3.1.7. Kits

Plasmid Mini /Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
One Shot® INVαF Chemically Competent E. coli	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Pierce® <i>Cell Surface Protein Isolation Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL , USA
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden

### 3.1.8. Plasmide

Plasmid	Resistenz	Hersteller
pECFP-N1-P2Y <sub>2</sub>	Kanamycin	Zürich, Schweiz
mCherry	Kanamycin	clontech Laboratories

Das Plasmid: pECFP-N1-P2Y<sub>2</sub> wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. Kurt Baltensperger, Stab ETH-Rat, Zürich, Schweiz

### 3.1.9. Antikörper

Anti-P2Y <sub>2</sub> -Rezeptor	Alamone labs
Anti-P2Y <sub>4</sub> -Rezeptor	Alamone labs
Anti-P2Y <sub>6</sub> -Rezeptor	Alamone labs

### 3.1.10. Software

Volocity® 6.0.1	Perkin Elmer, Waltham, USA
MetaFluor®	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA
Microsoft Office Professional 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Sigma Plot 10/12	Systat Software, Chicago, USA
SPSS 18/21	IBM SPSS Statistics, Armonk, USA
Mendeley Desktop Version 1.8.4	Mendeley Ltd., London, UK



## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Zellkultur

In dieser Arbeit wurden Versuche mit A549- und R3/1-Zellen durchgeführt. Bei den A549-Zellen handelte es sich um humane AT II-Zellen aus pulmonalem Adenokarzinom. Bei den R3/1-Zellen handelt es sich um AT 1-ähnliche Zellen, die aus Lungengewebe von fetalen Han-Wistar Ratten gewonnen wurden.

Alle für die Versuche verwendeten Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem abgetrennten, für Zellkultur vorgesehenen Bereich des Labors aufbewahrt. Alle Arbeiten an den Zellen wurden in diesem Bereich unter sterilen Bedingungen mit autoklavierten Lösungen und Materialien durchgeführt. Das Standardmedium für A549-Zellen setzte sich wie folgt zusammen:

F-12 K Medium mit

Fetalem Rinderserum (hitzeinaktiviert)	10%
Streptomycin	100 µg/ml
Penicillin	100 U/ml

Das Standardmedium für R3/1-Zellen setzte sich wie folgt zusammen:

DMEM mit

Fetalem Rinderserum (hitzeinaktiviert)	10%
D-Glucose	1 g/l
HEPES	25mM
Streptomycin	100µg/ml
Penicillin	100 U/ml
L-Glutamin	580 mg/l

Die Passagierung der Zellen erfolgte bei 90% Konfluenz in 75cm<sup>2</sup>-Flaschen. Die Zellen wurden mit folgender Lösung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst:

Trypsin 0,05%

EDTA 0,02%

Die Zellen wurden bei 1000rpm für 5min zentrifugiert, mit 3ml Medium resuspendiert und passagiert.

### 3.2.2. Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration am Fluoreszenzmikroskop

Eine etablierte und akkurate Methode der Kalziummessung ist die Fura 2 AM-Ratio-Messung. Fura-2 ist ein Indikator für die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und bildet mit Calcium Chelatkomplexe.

Fura-2-acetoxymethyl Ester (Fura-2AM) erreicht durch die Kopplung des Esters an Fura 2 eine sehr gute Membranpermeabilität. Endogene Esterasen, die in fast allen Zellen vorhanden sind, spalten im Zytosol den Ester-Anteil ab und stellen den aktiven Kalziumindikator Fura 2 her. Hierdurch wird Fura 2-AM aus dem Diffusionsgleichgewicht entfernt und es kann eine hohe zytosolische Fura 2 Konzentration erreicht werden. Durch die hydrophoben Eigenschaften von Fura 2 wird ein Austreten aus der Zelle verhindert. Um den pH-Wert während der Messung möglichst konstant zu halten, wurde das spezifische Zell-Nährmedium durch HEPES-Puffer ersetzt.

Bei der Bindung zwischen Fura-2 und Calcium kommt es zu einer Konformationsänderung von Fura-2. Dies führt wiederum zu einer veränderten Wellenlänge, mit der eine maximale Anregung erreicht werden kann. Für die Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  wurde die maximale Emission bei 500nm gemessen. Die Anregung erfolgte bei 340nm und 380nm. Die Calciumkonzentration errechnet sich aus der 340/380 Ratio.

Eine Zunahme des zytosolischen Calciums stellt sich als Intensitätszunahme bei 340nm, und als Intensitätsabnahme bei 380nm dar. Dies wurde graphisch in Falschfarben als Farbumschlag von blau zu rot dargestellt. Durch die Ratio-Messung konnten Messfehler, die aufgrund von ungleichmäßigen Färbungen, Ausbleichen der Zellen oder anderen Artefakten entstanden wären, verhindert werden. Diese Effekte beeinflussen beide Wellenlängen gleichermaßen und bewirken somit keine Änderung der Ratio.

Mit Hilfe dieser Messungen konnten Veränderungen der Calciumkonzentration bei Zugabe verschiedener Agonisten untersucht werden.

### 3.2.2.1. Kalibration

Die Kalibration erfolgte nach der Grynkiewicz-Gleichung (Grynkiewicz *et al.* 1985).

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

Tabelle 1: Variablen in der Kalibration nach Grynkiewicz

K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante, die bei Fura bei 37°C 224nmol/l beträgt
λ <sub>1</sub>	340nm
λ <sub>2</sub>	380nm
F <sub>λ1</sub>	Fluoreszenzintensität bei 340nm Exzitation
F <sub>λ2</sub>	Fluoreszenzintensität bei 380nm Exzitation
R	aus der Fluoreszenzintensität, die sich aus F <sub>λ1</sub> /F <sub>λ2</sub> ergibt
S <sub>f2</sub>	Intensität λ <sub>2</sub> 380nm in Ca <sup>2+</sup> -freier Umgebung
S <sub>b2</sub>	Intensität bei λ <sub>2</sub> 380nm in Ca <sup>2+</sup> -haltiger Umgebung
Visc	Viskositätskoeffizienten mit dem Wert 1 für wässrige Lösungen: der je nach Versuchsprotokoll zwischen 0,7 und 0,85 liegt

Bei der Kalibration wurden bei identischer Belichtungszeit, Filtereinstellung und Grundlinien-Ratio durch Messungen bei λ 340nm sowie λ 380nm Werte für R<sub>max</sub>, S<sub>b2</sub>, R<sub>min</sub> und S<sub>f2</sub> ermittelt. Zu diesem Zweck erfolgten zwei getrennte Versuche mit Ca<sup>2+</sup>-freiem Puffer und Ca<sup>2+</sup>-haltigem Puffer.

### 3.2.2.2. Mikroskopie

Die epifluoreszenzmikroskopische Messung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> von Alveolarepithelzellen erfolgte am Olympus BX40 Mikroskop, die Beleuchtung über eine Quecksilberdampflampe. Das Licht fiel durch ein Terrad, welches mit einem Filterset für Fura 2 bestückt war (Exzitation: 340nm/360nm/380nm; Emission: 500nm) und durch eine Blende. Die Einstellung von Belichtungszeit und Exzitationswellenlänge erfolgte über die Software Metafluor. Bei einer Wellenlänge von 340nm wurde der Versuchsansatz für 40 ms belichtet, bei 380nm für 170 ms. Die Emission bei 500nm wurde von einer CCD-Kamera detektiert und an die Auswertungssoftware Metafluor übermittelt.

### 3.2.2.3. Software

Die Aufnahmeplanung sowie die graphische Darstellung und Berechnung der  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  aus der kalibrierten Grynkiewicz-Gleichung erfolgte mit Hilfe des Programmes MetaFluor. Das Programm wurde speziell für die Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen lebendiger Zellen entwickelt. Es können Messungen zweier Wellenlängen simultan durchgeführt werden, das System ermöglicht die Darstellung der Rohdaten, Ratiobilder, Intensitäten und Ionenkonzentrationen, sowie die graphische Ansicht gewünschter Parameter in Echtzeit. Hierdurch ist ein Verfolgen und Überprüfen des Versuchsablaufes jederzeit möglich.

### 3.2.2.4. Auswertung

Ausgewertet wurden alle vitalen Zellen des ausgewählten Gesichtsfeldes, die sich nicht im Zustand der Zellteilung befanden oder Atypien wie z.B. zwei Zellkerne aufwiesen. Für die Messung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration einer jeden auszuwertenden Zelle wurde im Bereich des Zytoplasmas eine *region of interest* (ROI) festgelegt. In diesen ROI wurde in definierten Zeitabständen (i.d.R. alle 4s) das Verhältnis der jeweiligen Emission nach Anregung mit 340 und 380nm bestimmt. Anhand dieser Werte konnte mit Hilfe der Gleichung nach Grynkiewicz die Calciumkonzentration errechnet werden.

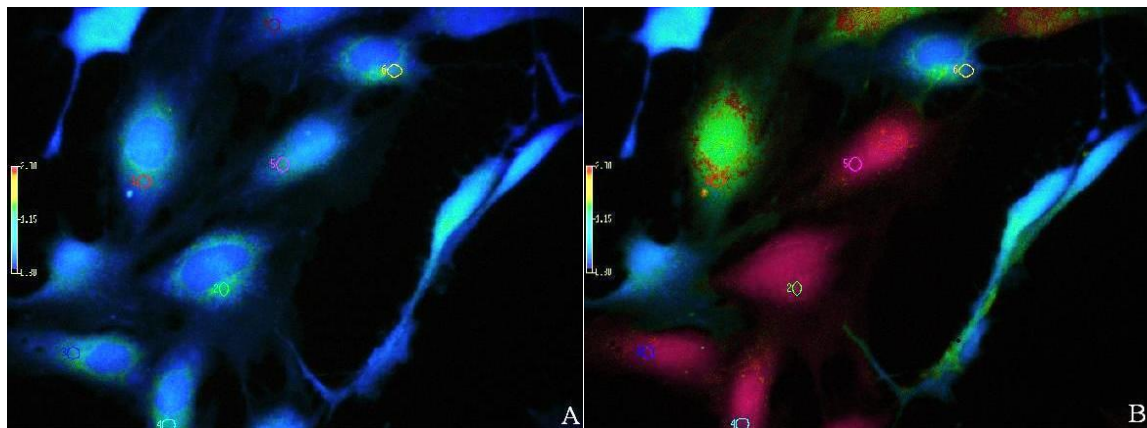


Abbildung 3-1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von R3/1-Zellen, die 30 Minuten mit Fura-2AM inkubiert wurden.

A) Vor der Zugabe von  $10\mu\text{M}$  ATP. B) Nach der Zugabe von  $10\mu\text{M}$  ATP. Für die  $Ca^{2+}$  Messung wurden bereits Messregionen (*regions of interest*, ROI) festgelegt.

Die mit Metafluor berechneten  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Werte wurden in Excel-Tabellen exportiert. Die graphische Darstellung erfolgte mit Sigma Plot 10.

### 3.2.2.5. Statistik

Die statistische Auswertung der mit Metafluor generierten Daten erfolgte mit Hilfe der Software SPSS 21. Die Untersuchung der Signifikanz wurde mit einer Analyse von gemischten Modellen durchgeführt. Folgende Variablen wurden hierfür als feste Effekte definiert: Versuchsgruppe und Ausgangsbedingungen. Als abhängige Variable wurde der Spitzenwert definiert. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert < 0,05 angesehen. Bei Durchführung mehrerer Vergleiche wurde anschließend eine Anpassung für Mehrfachvergleiche nach Bonferroni durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte in Form von Hoch-Tief Diagrammen mit Angabe des Mittelwertes  $\pm$  95%igem Konfidenzintervall, des maximalen Anstieges der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  aller Zellen der spezifischen Versuchsgruppe.

**Versuchsgruppe:** Definierte Zusammensetzung von Zellen, Agonisten, Antagonisten, Bakterien und Versuchsbedingungen.

**Ausgangsbedingungen:** Der Mittelwert der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  der 20 letzten Zeitpunkte vor Zugabe des entsprechenden Agonisten.

**Peak-Wert:** Der Peak-Wert ist als maximale zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration nach Zugabe eines Agonisten definiert.

### 3.2.2.6. Kultivierung

Die Messung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  wurde an A549- und R3/1-Zellen in 2-*well* Objektträgern und 35mm Zellkulturschalen durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen, mit einer Oberfläche von 75cm<sup>2</sup> wie im Abschnitt Zellkultur beschrieben, gezüchtet. Nach Ablösung der Zellen mittels Trypsin wurde die Menge der ausgesäten Zellen so gewählt, dass zum Messzeitpunkt eine Konfluenz von 60-80% vorlag.

### 3.2.2.7. Versuchsablauf

Das Anfärben der Alveolarepithelzellen erfolgte durch Inkubation mit Fura-2-AM (9µg/ml) in 500µl HEPES für 30-40 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Messung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  erfolgte im Rahmen verschiedener Versuchsanordnungen. Es erfolgten Messungen in  $Ca^{2+}$ -haltigen Medien, in  $Ca^{2+}$ -freier Umgebung, sowie nach Inkubation mit Thapsigargin. Thapsigargin bewirkt über eine nicht kompetitive Inhibition der endoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -ATPase eine  $Ca^{2+}$ -Depletion des ER.

Außerdem wurden Messungen nach siRNA-*knockdown* spezifischer P2Y-Rezeptoren (P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub>) durchgeführt sowie Messungen nach Vorinkubation mit Wildtyp-Pneumokokken (D39 WT) und der kapseldefizienten Genvariante (D39  $\Delta$  cps). Zu jeder Versuchsanordnung wurden entsprechende Kontrollgruppen gebildet, um veränderte Versuchsbedingungen in der Kontrollgruppe zu erfassen und Vergleichbarkeit zu ermöglichen.

### 3.2.2.8. Versuchsgruppen

#### 3.2.2.8.1. A549-Zellen

Tabelle 2: Versuchsgruppen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung an A549-Zellen

Gruppe	Anzahl der Versuche (n=)	Untersuchte Zellen insgesamt	Definition
Kontrolle (ATP)	16	257	Kontrollgruppe mit Adenosintriphosphat
Ca <sup>2+</sup> -frei	7	132	HEPES-Puffer ohne Ca <sup>2+</sup>
TG	5	97	Thapsigargin
α,β-Me ATP	4	49	α,β-Methyl -Adenosin 5'-triphosphat
Adenosin	2	35	Adenosin
UTP	3	34	Uridintriphosphat
2-MeSATP	2	22	2-Methylthioadenosin-5'-triphosphat
PPADS / ATP	4	63	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonat / Adenosintriphosphat
scr-siRNA	11	131	<i>scrambled</i> siRNA
P2Y <sub>6</sub> -siRNA	9	178	siRNA <i>knockdown</i> des P2Y <sub>6</sub> -Rezeptors
P2Y <sub>2</sub> -siRNA	13	197	siRNA <i>knockdown</i> des P2Y <sub>2</sub> -Rezeptors
WT	11	202	<i>S. pneumoniae</i> , Wildtyp
Δcps	20	311	<i>S. pneumoniae</i> , kapseldefizient
Tryp	10	179	Trypsin
Tryp Ø Ca <sup>2+</sup>	3	59	Trypsin Ca <sup>2+</sup> -frei
TG / Tryp	4	71	Thapsigargin / Trypsin
WT / Tryp	4	77	<i>S. pneumoniae</i> -Wildtyp / Trypsin
Kontrolle 20°C	4	63	Kontrolle zu Versuchen bei 20°C
Δc 20°C	6	112	<i>S. pneumoniae</i> , Kapseldefizient, Inkubation bei 20°C

Die Transfektion der A549-Zellen der Versuchsreihen scr-siRNA, P2Y<sub>6</sub>-siRNA und P2Y<sub>2</sub>-siRNA wurde entsprechend des Versuchsprotokolls „Transfektion von P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-siRNA in A549- und R3/1-Zellen“ durchgeführt.

Bei den Versuchsreihen: WT, ΔCPS und WT / Tryp wurde Inkubation mit *S. pneumoniae* entsprechend des Versuchsprotokolls „Inkubation von Alveolarepithelzellen mit *S. pneumoniae* im Brutschrank“ durchgeführt.

Bei der Versuchsreihe: ΔCPS 20°C wurde die Inkubation mit *S. pneumoniae* entsprechend des Versuchsprotokolls „Inkubation von Alveolarepithelzellen mit *S. pneumoniae* bei Raumtemperatur“ durchgeführt.

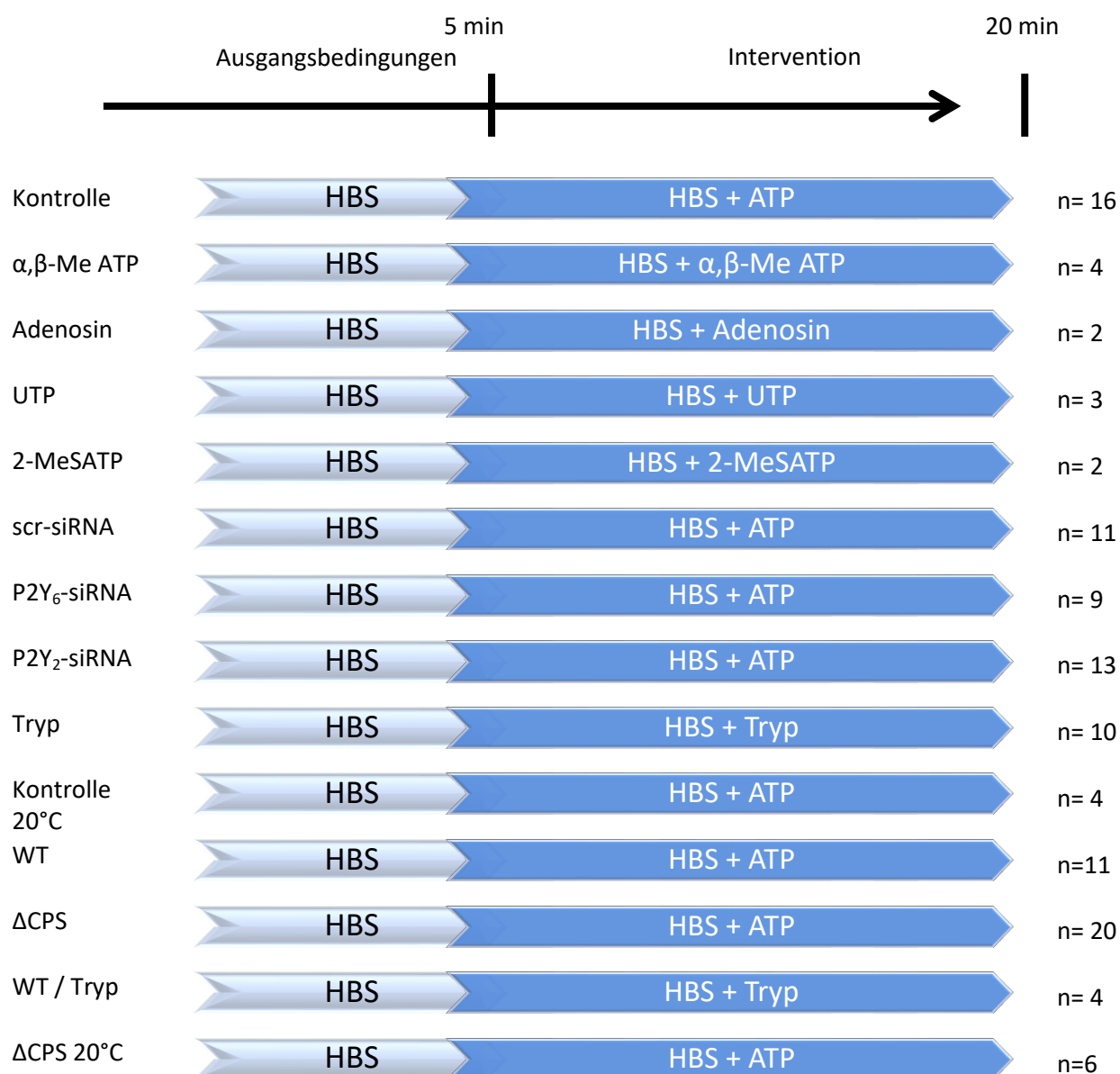


Abbildung 3-2: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  von A549-Zellen in  $Ca^{2+}$ -haltigem HEPES-Puffer. Dargestellt sind die Versuchsgruppen Kontrolle,  $\alpha, \beta$ -Me ATP, Adenosin, UTP, 2-MeSATP, scr-siRNA, P2Y<sub>6</sub>-siRNA, P2Y<sub>2</sub>-siRNA, Tryp, WT,  $\Delta$ CPS, WT / Tryp, Kontrolle 20°C und  $\Delta$ CPS 20°C. Nach fünfminütiger Messung unter Ausgangsbedingungen (hellblau) erfolgte die Zugabe des entsprechenden Agonisten (dunkelblau) mit der Endkonzentration von: 10 $\mu$ M ATP, 100 $\mu$ M  $\alpha, \beta$ -Me ATP, 100 $\mu$ M Adenosin, 100 $\mu$ M UTP, 100 $\mu$ M 2-MeSATP und 50nM Trypsin. Danach wurde die Aufnahme bis zu einer Gesamtaufnahmezeit von ca. 20 min fortgesetzt.

In den Versuchsgruppen  $\text{Ca}^{2+}$ -frei, und Tryp  $\emptyset\text{Ca}^{2+}$  wurden insgesamt 10 Versuche an 191 Einzelzellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem HEPES-Puffer durchgeführt.

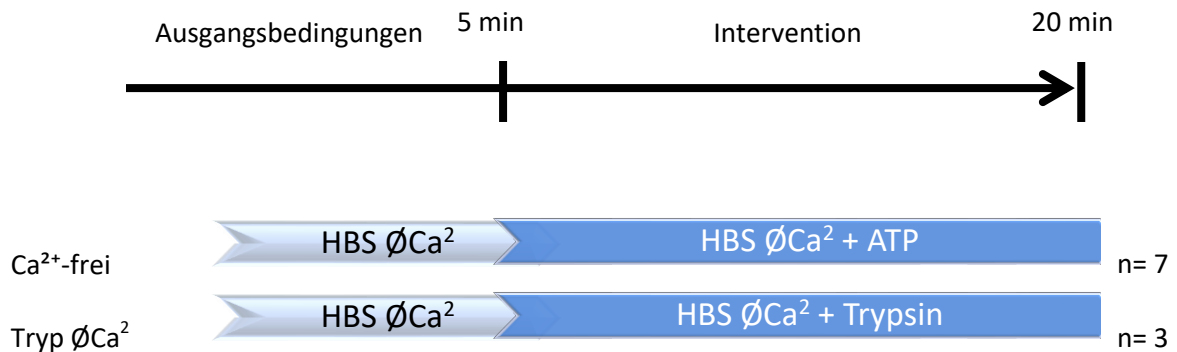


Abbildung 3-3: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  von A549-Zellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem HEPES-Puffer. Dargestellt sind die Versuchsgruppen  $\text{Ca}^{2+}$ -Frei, und Tryp  $\emptyset\text{Ca}^{2+}$ . Nach fünfminütiger Aufzeichnung der Ausgangsbedingungen (hellblau) erfolgte die Zugabe des entsprechenden Agonisten (dunkelblau) mit der Endkonzentration von:  $10\mu\text{M}$  ATP und  $50\text{nM}$  Trypsin. Danach wurde die Aufnahme bis zu einer Gesamtaufnahmezeit von ca. 20 min fortgesetzt.

In den Versuchsgruppen TG und TG/Tryp wurden insgesamt 9 Versuche an 168 Einzelzellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem HEPES-Puffer durchgeführt.

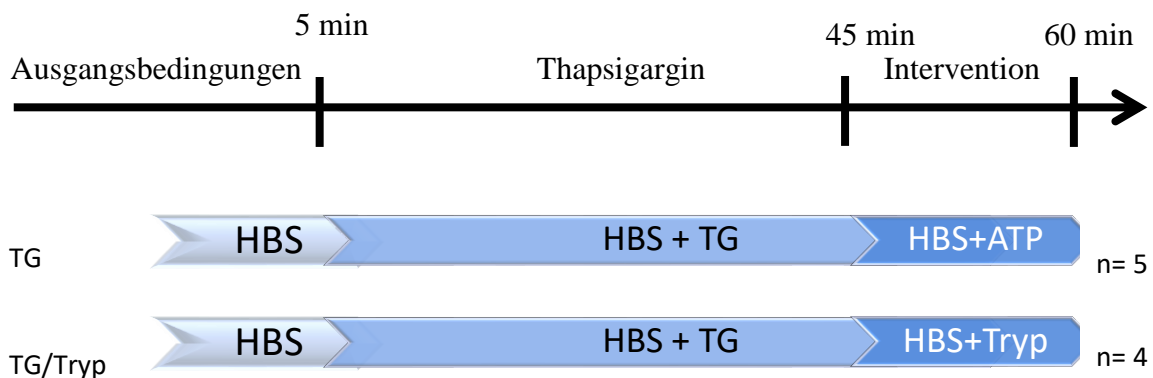
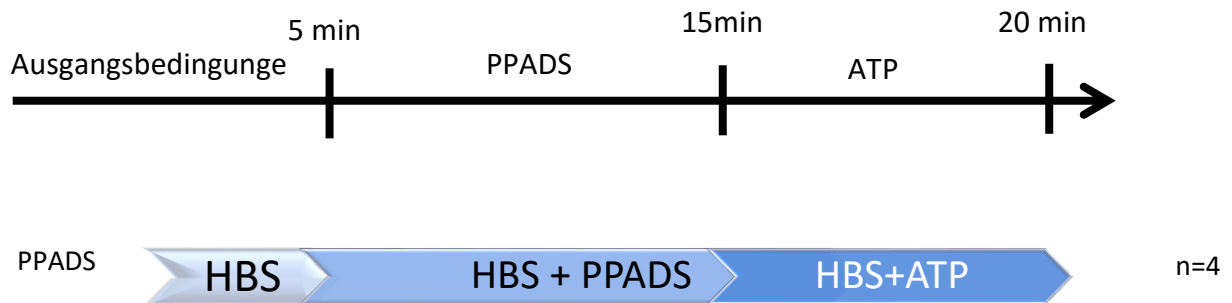


Abbildung 3-4: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  von A549-Zellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem HEPES-Puffer. Dargestellt sind die Versuchsgruppen TG und TG/Tryp. Nach fünfminütiger Aufzeichnung der Ausgangsbedingungen (hellblau) erfolgte die Zugabe von Thapsigargin ( $5\mu\text{M}$ , dunkleres Blau). Nachdem die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  Konzentration nach ca. 45 min. auf Höhe der Ausgangsbedingungen zurückgekehrt ist, wurde der entsprechende Agonist mit der Endkonzentration von  $10\mu\text{M}$  ATP oder  $50\text{nM}$  Trypsin zum Versuchsansatz gegeben (dunkelblau). Danach wurde die Aufnahme bis zu einer Gesamtaufnahmezeit von ca. 60 min fortgesetzt.



In der Versuchsgruppe PPADS wurden 4 Versuche an 63 Einzelzellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem HEPES-Puffer durchgeführt.



**Abbildung 3-5: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  von A549-Zellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem HEPES-Puffer.** Dargestellt ist die Versuchsgruppe PPADS. Nach fünfminütiger Aufzeichnung der Ausgangsbedingungen (hellblau) erfolgte die Zugabe von PPADS (100  $\mu\text{M}$  dunkleres Blau). Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit von PPADS wurde ATP in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  zum Versuchsansatz gegeben (dunkelblau). Danach wurde die Aufnahme bis zu einer Gesamtaufnahmezeit von ca. 20 min fortgesetzt.

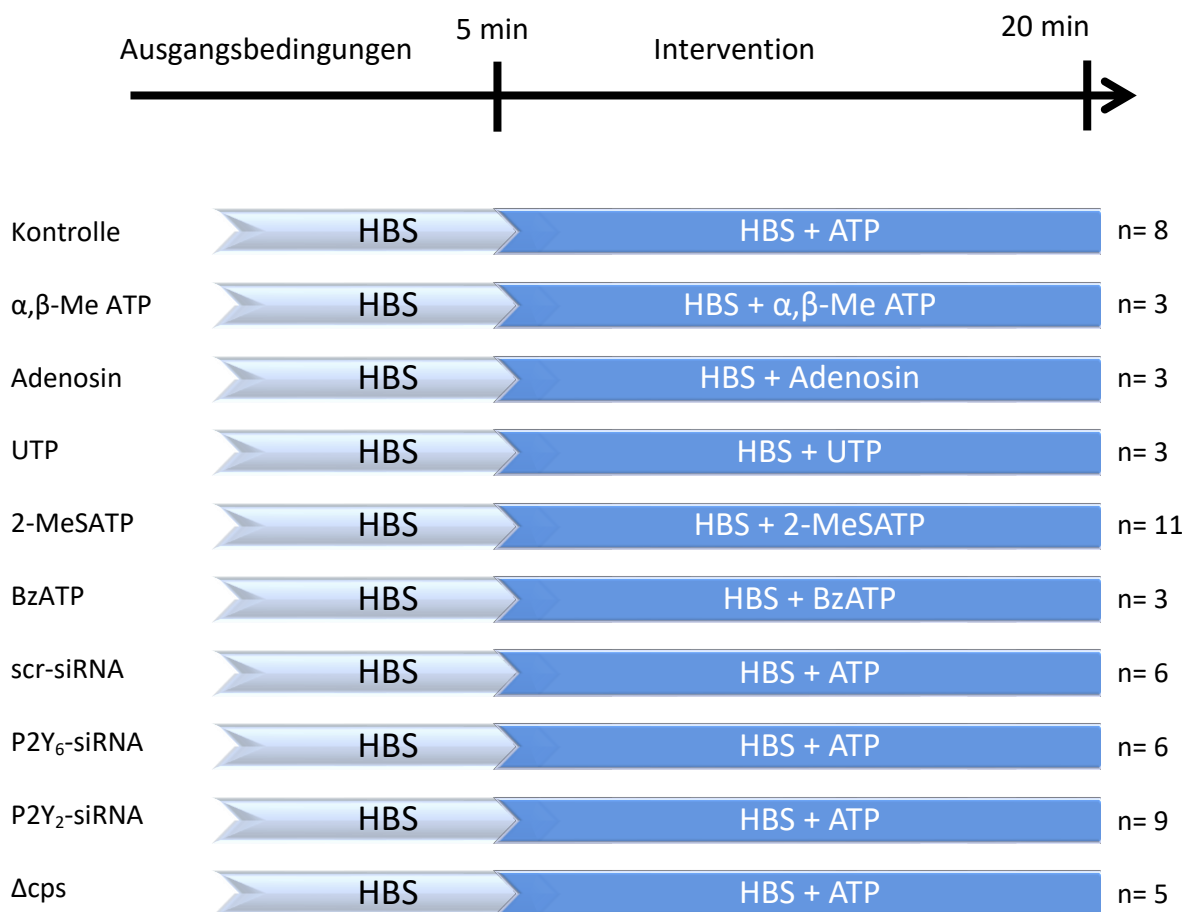
### 3.2.2.8.2. R3/1-Zellen

Gruppe	Anzahl der Versuche(n)	Anzahl der Einzelzellen	Definition
Kontrolle	8	169	Kontrollgruppe A549
$\text{Ca}^{2+}$ -frei	8	106	HEPES-Puffer ohne $\text{Ca}^{2+}$
TG	3	48	Thapsigargin
$\alpha, \beta$ -Me ATP	3	19	$\alpha, \beta$ -Methyladenosin 5'-triphosphat
Adenosin	3	31	Adenosin
UTP	3	47	Uridintriphosphat
2-MeSATP	11	177	2-Methylthioadenosin-5'-triphosphat
BzATP	3	35	3'-O-(4-benzoyl)benzoyladenosine 5'-triphosphat
PPADS + ATP	3	36	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfat + Adenosintriphosphat
scr-siRNA	6	85	<i>scrambled</i> siRNA
P2Y <sub>2</sub> -siRNA	9	118	siRNA <i>knockdown</i> des P2Y <sub>2</sub> -Rezeptors
P2Y <sub>6</sub> -siRNA	6	86	siRNA <i>knockdown</i> des P2Y <sub>6</sub> -Rezeptors
$\Delta\text{CPS}$	5	75	<i>S. pneumoniae</i> , Kapseldefizient

In den Versuchsgruppen: Kontrolle,  $\alpha,\beta$ -Me ATP, Adenosin, UTP, 2-MeSATP, BzATP, scr-siRNA, P2Y<sub>6</sub>-siRNA, P2Y<sub>2</sub>-siRNA,  $\Delta$ CPS, wurden insgesamt 60 Versuche an 842 Einzelzellen in Ca<sup>2+</sup>-haltigem HEPES-Puffer durchgeführt.

Die Transfektion der R3/1-Zellen der Versuchsreihen scr-siRNA, P2Y<sub>6</sub>-siRNA und P2Y<sub>2</sub>-siRNA erfolgte nach standardisierten Bedingungen entsprechend des Versuchsprotokolls „Transfektion von P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-siRNA in A549- und R3/1-Zellen“ durchgeführt.

Bei der Versuchsreihe:  $\Delta$ CPS wurde die Inkubation der Zellen mit *S. pneumoniae* entsprechend des Versuchsprotokolls „Inkubation von Alveolarepithelzellen mit *S. pneumoniae* im Brutschrank“ durchgeführt.



**Abbildung 3-6:** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> von R3/1-Zellen in Ca<sup>2+</sup>-haltigem HEPES-Puffer. Dargestellt sind die Versuchsgruppen Kontrolle,  $\alpha,\beta$ -Me ATP, Adenosin, UTP, 2-MeSATP, BzATP, scr-siRNA, P2Y<sub>6</sub>-siRNA, P2Y<sub>2</sub>-siRNA,  $\Delta$ cps. Nach fünfminütiger Aufzeichnung der Ausgangsbedingungen (hellblau) erfolgte die Zugabe des entsprechenden Agonisten (dunkelblau) mit der Endkonzentration von: 10 $\mu$ M ATP, 100 $\mu$ M  $\alpha,\beta$ -Me ATP, 100 $\mu$ M Adenosin, 100 $\mu$ M UTP, 100 $\mu$ M 2-MeSATP und 100 $\mu$ M BzATP. Danach wurde die Aufnahme bis zu einer Gesamtaufnahmezeit von ca. 20 min fortgesetzt.

In der Versuchsgruppe  $\text{Ca}^{2+}$ -frei wurden 8 Versuche an 106 Einzelzellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem HEPES-Puffer durchgeführt.

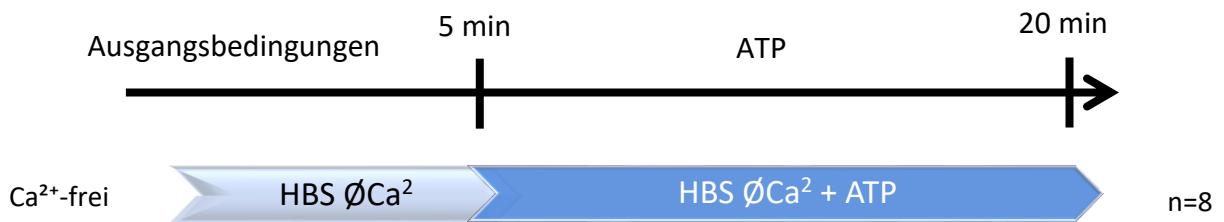


Abbildung 3-7: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  von R3/1-Zellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem HEPES-Puffer. Dargestellt ist die Versuchsgruppe  $\text{Ca}^{2+}$ -frei. Nach fünfminütiger Aufzeichnung der Ausgangsbedingungen (hellblau) erfolgte die Zugabe des entsprechenden Agonisten (dunkelblau) mit der Endkonzentration von  $10\mu\text{M}$ . Danach wurde die Aufnahme bis zu einer Gesamtaufnahmezeit ( $\Delta\text{TP}$ ) von ca. 20 min fortgesetzt.

In der Versuchsgruppe TG wurden 3 Versuche an 48 Einzelzellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem HEPES-Puffer durchgeführt.

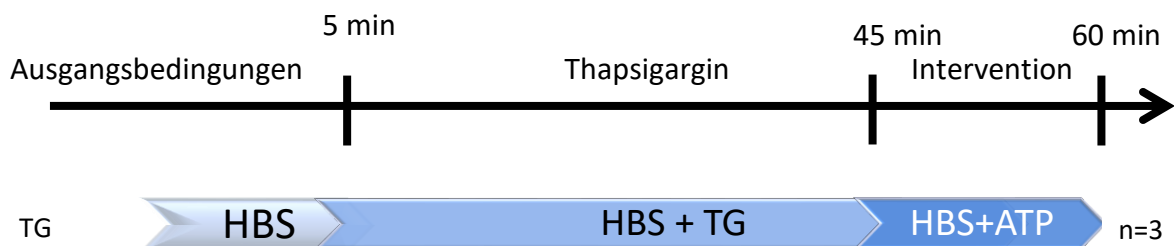


Abbildung 3-8: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  von R3/1-Zellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem HEPES-Puffer. Dargestellt ist die Versuchsgruppe TG. Nach fünfminütiger Aufzeichnung der Ausgangsbedingungen (hellblau) erfolgte die Zugabe von Thapsigargin ( $5\mu\text{M}$  dunkleres Blau). Nachdem die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  nach ca. 45 min. auf Ausgangsbedingungen zurückgekehrt ist, wurde ATP mit einer Endkonzentration von  $10\mu\text{M}$  zum Versuchsansatz gegeben (dunkelblau). Danach wurde die Aufnahme bis zu einer Gesamtaufnahmezeit von ca. 60 min fortgesetzt.

In der Versuchsgruppe PPADS wurden 3 Versuche an 36 Einzelzellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem HEPES-Puffer durchgeführt.

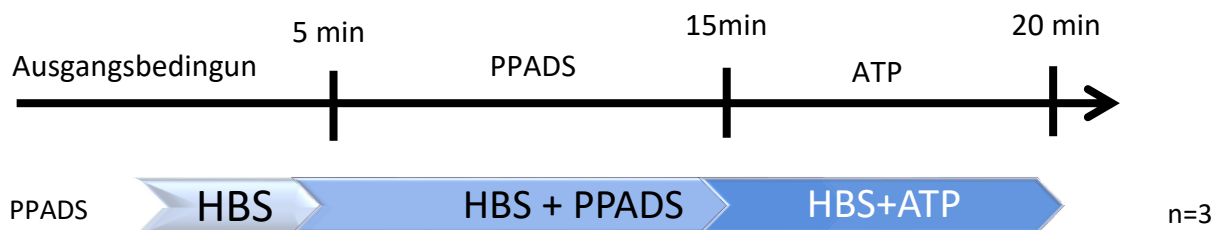


Abbildung 3-9: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  von R3/1-Zellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem HEPES-Puffer. Dargestellt ist die Versuchsgruppe PPADS. Nach fünfminütiger Aufzeichnung der Ausgangsbedingungen (hellblau) erfolgte die Zugabe von PPADS ( $100\mu\text{M}$  dunkleres Blau). Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit von PPADS wurde ATP in einer Endkonzentration von  $100\mu\text{M}$  zum Versuchsansatz gegeben (dunkelblau). Danach wurde die Aufnahme bis zu einer Gesamtaufnahmezeit von ca. 20 min fortgesetzt.

### **3.2.2.9. Inkubation von Alveolarepithelzellen mit *S. pneumoniae* im Brutschrank**

Die Inkubation von A549- und R3/1-Zellen mit Bakterien fand jeweils 2,5 Std. vor der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung statt.

A549- und R3/1-Zellen wurden für 48 Std. im Brutschrank inkubiert. Vor der Inkubation der Zellen mit *S. pneumoniae* wurde das antibiotikahaltige Medium von den Zellen abgewaschen und durch 750  $\mu\text{l}$  Medium ohne Antibiotika ersetzt. Im nächsten Schritt wurden  $10^7$  CFU/ml D39 WT oder D39  $\Delta\text{cps}$  à 100  $\mu\text{l}$  zu den Zellen gegeben und diese für 2 Std. im Brutschrank inkubiert. Freie Bakterien wurden vor der Anfärbung der Zellen mit Fura 2 AM durch dreimaliges Waschen mit HEPES-Puffer von den Zellen entfernt.

### **3.2.2.10. Inkubation von Alveolarepithelzellen mit *S. pneumoniae* bei Raumtemperatur**

Im Unterschied zur Inkubation von Alveolarepithelzellen mit *S. pneumoniae* im Brutschrank wurden bei diesem Versuchsaufbau alle zu den Zellen gegebenen Substanzen lediglich auf 20°C erwärmt. Die Inkubation mit *S. pneumoniae* erfolgte ebenfalls bei 20°C.

### **3.2.2.11. Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) Färbung**

Ethidium Homodimer-1 wurde benutzt, um tote oder sterbende Zellen zu markieren. Ethidium Homodimer-1 hat eine starke Affinität zu DNA und RNA, kann intakte Zellmembranen aber nicht passieren.

Bei der Bindung von Ethidium Homodimer-1 an DNA oder RNA kommt es zu einer über 40-fachen Zunahme der Fluoreszenz im Vergleich zu ungebundenem Ethidium Homodimer-1. Die Anregung erfolgt bei 488-528nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 617nm. Ethidium Homodimer-1 wurde in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  verwendet. Die Färbung mit Ethidium Homodimer-1 erfolgte simultan mit der Fura-2 AM Färbung direkt vor der Fluoreszenzmikroskopie für 30 min bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ .

Ethidium Homodimer-1 wurde für eine stichprobenartige Untersuchung der Zellvitalität in den unterschiedlichen Versuchsgruppen verwendet.

### 3.2.3. Nachweis spezifischer Purinrezeptoren in Alveolarepithelzellen mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur *in vitro*-Vervielfältigung von DNA. Es lassen sich spezifische Sequenzen vervielfältigen und dadurch auch kleinste DNA-Mengen nachweisen. Jeder Zyklus besteht aus den drei Schritten Denaturierung, *annealing* und Elongation. Bei der Denaturierung wird die DNA durch Erhitzen in Einzelstränge aufgespalten. Die *annealing*-Temperatur liegt primerspezifisch zwischen 40 und 95 Grad Celsius. Je höher der Gehalt von Guanin und Cytosin und die Länge des Primers sind, desto höher ist auch die *annealing*-Temperatur. Bei diesem Schritt lagern sich die Primer an den jeweils komplementären Bereich des entsprechenden DNA Einzelstranges an. Während der DNA-Synthese verlängert eine thermostabile DNA-Polymerase die Primer an ihrem 3'-OH-Ende, bis die Länge der DNA-Matrize erreicht ist. Nach diesem Schritt wurde die Menge der DNA-Doppelstränge verdoppelt und ein neuer Zyklus startet.

Die fertig amplifizierte DNA-Sequenzen können anschließend in einer Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Die PCR kam in verschiedenen Experimenten zur Anwendung. Zum einen um P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor DNA in Alveolarepithelzellen nachzuweisen und zum anderen für den Nachweis der Effektivität des siRNA *knockdowns* von P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>6</sub> Rezeptoren in Alveolarepithelzellen. Die PCR wurde außerdem für den Nachweis von ECFP-gekoppelten P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren in transfizierten A549-Zellen verwendet.

Die Anzucht der Zellen erfolgte wie im Kapitel „Zellkultur“ beschrieben in T75 Zellkulturflaschen. Für die Untersuchung der Transfektionseffektivität des siRNA-*knockdowns* wurden A549- und R3/1-Zellen vor der RNA-Isolierung entsprechend des Protokolls „Transfektion von P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-siRNA in A549- und R3/1-Zellen“ transfiziert.

#### 3.2.3.1. RNA-Isolierung aus Zellen

Um freie RNAsen zu entfernen, wurde der für die Isolation verwendete Arbeitsbereich vor Beginn gereinigt. Es wurde ausschließlich mit autoklavierten Materialien gearbeitet. Die RNA-Isolierung wurde mit Hilfe des „Qiagen RNeasy Plus Mini Kit“ nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierbei werden in Zellkultur gezüchtete Zellen lysiert. In mehreren Zentrifugierschritten werden alle nicht gewünschten Zellbestandteile entfernt und die RNA isoliert aufgefangen.

Nach der Isolation der RNA wurden Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt „Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren“) und die Proben bei -80°C eingefroren.

### 3.2.3.2. cDNA-Synthese

Zum Nachweis bestimmter RNA-Sequenzen erfolgte eine RT-PCR. Hierbei wird in einem ersten Schritt RNA durch reverse Transkriptasen in doppelsträngige cDNA umgewandelt. In einem zweiten Schritt erfolgt die Amplifikation der cDNA durch eine PCR.

Alle Arbeitsschritte der cDNA-Synthese wurden auf Eis durchgeführt, die verwendete Zentrifuge wurde auf 4°C gekühlt.

Der cDNA-Synthese-Mix setzte sich wie folgt zusammen:

RNAse freies Wasser	4µl
10x Puffer RT (Omniscript RT Kit)	3µl
dNTP-Mix (Omniscript RT Kit)	2µl
Omniscript RT (Omniscript RT Kit)	1µl
Protector RNase-Inhibitor	1µl
0,1 M DTT	3µl
45µm Oligo p(dT)15-Primer	1µl

Entsprechend der photometrischen Konzentrationsberechnung wurden 2 µg RNA in einen PCR-Probenstreifen gegeben, welcher mit RNAse freiem Wasser bis auf ein Volumen von 17µl aufgefüllt wurde. Die Inkubation erfolgte im Cyclor für 3 min bei 75°C mit anschließender Temperatursenkung auf 4°C. Hierbei wurden die Sekundärstrukturen der RNA zerstört.

Als nächstes wurde die RNA mit je 15µl des cDNA-Synthese-Mix versetzt und bei 4°C zentrifugiert. Darauf folgte die cDNA-Synthese im Cyclor für 1 Std. bei 37°C. Anschließend wurde die Reaktion durch eine 10 minütige Inkubation bei 95°C terminiert und danach auf 4°C runtergekühlt

Die fertig synthetisierte cDNA wurde entweder bei -80°C aufbewahrt oder direkt für die PCR verwendet.

### 3.2.3.3. PCR

Nach Durchführung der reversen Transkription wurde im nächsten Schritt die synthetisierte cDNA als Matritze in einer PCR eingesetzt.

Alle für die PCR nötigen Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Jeweils 3µl der cDNA wurden in einen PCR Probenstreifen gegeben, mit 47µl PCR-Reagenz versetzt und bei 4°C zentrifugiert.

Ansatz des PCR-Reagenz:

10x PCR-Puffer	5µl
5 x Q-Solution	5µl
dNTPs 10mM	1µl
Primer F	1µl
Primer R	1µl
dH2O	33,8µl
HotStarTaq DNA Polymerase (5U/µl)	0,2µl

Im nächsten Schritt wurden die Proben in den Cyclor gegeben.

Cyclor--Einstellungen

	30 x			
Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation
94°C 15 Min.	94° C 60 sec.	Temperatur Je nach Primer 45sec.	72° C 60 sec.	72° C 10 Min.

Primer	Annealing Temperatur
GAPDH-hu	54,0 °C
GAPDH-ra	50,0 °C
P2Y <sub>2</sub> human	54,0 °C
P2Y <sub>2</sub> Ratte	61,5 °C
P2Y <sub>6</sub> human	60,9 °C
P2Y <sub>6</sub> Ratte	54,3 °C

#### **3.2.3.4. Gel-Elektrophorese**

Die Analyse der PCR-Amplifikate erfolgte mittels eines 1%igen Ethidiumbromidgels, welches mit TAE-Puffer bedeckt wurde. Der Ansatz für jede Geltasche bestand aus 1µl Gel-Beladungspuffer + 5µl DNA Probe. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 120 V und einer Stromstärke von 70 mA für 50 min.

### **3.2.4. Nachweis spezifischer Purinrezeptoren in der Membranfraktion von Alveolarepithelzellen im Westernblot**

#### **3.2.4.1. Kultivierung**

Die Kultivierung der A549- und R3/1-Zellen wurde unter Standardbedingungen, wie im Kapitel „Zellkultur“ beschrieben, durchgeführt. Statt Zellkulturflaschen mit einer Oberfläche von 75cm<sup>2</sup> wurden welche mit 25cm<sup>2</sup> verwendet.

#### **3.2.4.2. Membran-Proteinisolation**

Der Nachweis von P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>- Rezeptorprotein in der Zellmembran von R3/1-Zellen erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Membranproteine von R3/1-Zellen isoliert und im zweiten Schritt mittels Westernblot nachgewiesen.

Die Isolation der Membranproteine erfolgte mit Hilfe des Pierce® *Cell Surface Protein Isolation Kit* unter Befolgung des Herstellerprotokolls.

Bei diesem Verfahren werden Membranproteine mit einem Biotin markiert und die Zellen danach durch einen Lyse-Puffer und wiederholtes Vortexen lysiert. Nach der Zell-Lyse können die so markierten Proteine über eine Säule mit Hilfe von Agarose isoliert werden. Die isolierten Membranproteine werden im nächsten Schritt von der Säule gelöst und für den Westernblott mit Bromophenol-blau versetzt. Im Westernblot kann die gesuchte Fraktion der isolierten Membranproteine mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert werden.

#### **3.2.4.3. Westernblot**

Die Detektion von P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>- Rezeptorproteinen aus R3/1-Zellen wurde mit Hilfe eines Western Blots durchgeführt. Hierbei werden Proteine mittels einer Gel-Elektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und per Elektrotransfer auf eine Membran übertragen. Danach erfolgt die Markierung der gesuchten Proteine mit spezifischen Antikörpern.

Es wurden je 20 Mikrogramm der aus der Membranproteinisolation gewonnenen Proben in die Geltaschen pipettiert und bei 200 Volt für 50 Minuten entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Übertragung auf den Blot erfolgte auf Kunststoffmembranen aus Polyvinylidenfluorid (PVDF).



Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden mit einer 7,5% Milchpulverlösung blockiert. Im nächsten Schritt wurde jede Membran mit 10ml der entsprechenden Antikörperlösung über Nacht bei 4° C unter Schütteln inkubiert.

### **3.2.5. Vervielfältigung eines ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorkonstrukts und anschließende Transfektion in Alveolarepithelzellen**

#### **3.2.5.1. Elution von ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Plasmid-DNA aus Filterpapier**

Das ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Kurt Baltensperger, Stab ETH-Rat, Zürich, Schweiz zur Verfügung gestellt. Zur Verwendung musste die DNA zunächst aus Filterpapier eluiert werden. Dazu wurde das Filterpapier in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, nur knapp mit nukleasefreiem Wasser bedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNA-Suspension bei 6000rpm für 10 min zentrifugiert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit erfolgte photometrisch bei 260 und 280nm.

#### **3.2.5.2. Transformation von ECFP-P2Y<sub>2</sub>-DNA in kompetente E. coli**

50µl kompetente E. coli wurden auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz (10µl DNA in Suspension) 30 Minuten inkubiert. Um die Aufnahme der DNA über Membranporen in die Bakterien zu ermöglichen, wurden diese 30 Sekunden lang einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Zur Förderung der Expression der transformierten DNA wurden die Bakterien mit 500µl LB-Medium versetzt und bei 37°C eine Stunde im Schüttler inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Bakteriensuspension 3 Minuten bei 3000rpm zentrifugiert und überschüssiges Medium entfernt. Die gesamte Bakteriensuspension wurde auf eine mit Selektionsantibiotikum beschichtete Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung einer ca. 16-stündigen Inkubationszeit wurden einzelne Bakterienkolonien (jeweils 1 Bakterienklon) mit einer sterilen Pippettenspitze von der Agar-Platte entnommen. Diese wurden mit der gesamten Pippettenspitze in ein Kulturröhrchen gegeben und mit LB-Medium suspendiert. Die so vorbereiteten Bakterienklone wurden bei 37°C für ca. 16 Stunden im Schüttler inkubiert.

#### **3.2.5.3. ECFP-P2Y<sub>2</sub>-DNA-Extraktion aus Bakterien per alkalischer Lyse**

Die Extraktion der DNA erfolgte mit Reagenzien aus dem „Qiagen Plasmid Mini Kit“ nach dem Verfahren der alkalischen Lyse. Bei der alkalischen Lyse werden die Bakterienklone abzentrifugiert und im alkalischen Milieu lysiert. Durch den Zusatz von RNase wird störende RNA abgebaut. Ein hoher Salzgehalt und andere Zusatzstoffe ermöglichen die Ausfällung von genomischer DNA mit Proteinen und zellulären Bestandteilen. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass die Plasmid-DNA nicht mit genomischer DNA verunreinigt wird.

#### 3.2.5.4. Restriktionsverdau der ECFP-P2Y<sub>2</sub>-DNA

Das Ergebnis der Klonierung wurde mit Hilfe eines Restriktionsverdaus mit anschließender Gel-Elektrophorese überprüft. Hierbei wurde die Größe von ECFP-P2Y<sub>2</sub>-DNA und dem Vektor bestimmt. Folgender Ansatz wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und MFC I hergestellt:

EcoR I	0,5µl
MFC I HF	0,5µl
Puffer 4	3µl
Plasmid-ECFP-P2Y <sub>2</sub> -DNA	2µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 30µl

Der Restriktionsverdau fand bei 37°C für 1 Std. statt. Die verdauten Ansätze wurden mittels Gel-Elektrophorese qualitativ analysiert.

#### 3.2.5.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wurde photometrisch bei 260nm gemessen, die Reinheit aus dem Quotienten 260/280nm errechnet. Dazu wurde die entsprechende Probe mit ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:50 auf 100µl verdünnt. Die Eichung des Gerätes wurde mit 200µl ddH<sub>2</sub>O (Leerprobe) durchgeführt. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte nach folgender Formel:

Berechnung der DNA/RNA Konzentration nach der Formel:

$$c(\mu g)/ml = (OD\ 260 \times V \times F)$$

OD 260 = Absorption bei 260nm

v = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA und 40 für RNA)

Die Bestimmung der Reinheit der DNA erfolgte aus der Berechnung des Verhältnis der gemessenen Absorption bei 260nm (OD<sub>260nm</sub>) zu der gemessenen Absorption bei 280nm (OD<sub>280nm</sub>).

### 3.2.5.6. Plasmid-Maxi-Präparation

Die weitere Vervielfachung der DNA erfolgte mit Hilfe des QIAGEN Plasmid-Maxi-Kits. Hierbei wurde wie bei der Mini Plasmid Präparation nach dem Verfahren der modifizierten alkalischen Lyse gearbeitet. Die Vervielfältigung der DNA erfolgte entsprechend des Protokolls "3.2.5.2 Transformation von ECFP-P2Y<sub>2</sub>-DNA in kompetente E. coli".

Da größere Plasmidmengen benötigt wurden, wurde statt des Kulturröhrchens zur Anzuchtung der Bakterien ein 200ml Erlenmeyerkolben verwendet.

Nach der Bakteriolyse wurde die Plasmid-DNA an Anionen-Austauscherharze gebunden. Alle anderen Bakterienbestandteile und Verunreinigungen wurden durch mehrere Zentrifugier und Waschschrte entfernt. Die so isolierte Plasmid-DNA konnte nun einfach mit 50µl Wasser von der Säule gelöst werden. Für die Amplifikation wurden die Proben mit der höchsten DNA-Reinheit ausgewählt.

### 3.2.5.7. Transfektion des ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorkonstruktes in A549-Zellen

Die Transfektion des ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorkonstruktes in A549-Zellen wurde mittels des Transfektionsreagenzes FuGENE®HD an adhärenenten Zellen durchgeführt.

A549-Zellen wurden in einer 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von 80-90% gezüchtet. Die Zellen wurden passagiert, 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in einer 35mm Zellkulturschale mit Glasboden ausgesät und 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Transfektion. Der Transfektionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

DNA	2µg
Opti-MEM I	100µl
FuGENE HD	5µl

Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach dem Prinzip der „forward“-Transfektion.

Das bedeutet, dass der Transfektionsansatz zu bereits adhärenenten Zellen gegeben wird. Bei der reversen Transfektion wird der Transfektionsansatz zuerst in den *wells* vorbereitet und die Zellen danach als Suspension hinzu gegeben.

Nach Herstellung des Transfektionsansatzes wurde dieser 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann zu den bereits adhärenenten Zellen gegeben. Zur optimalen Expression des ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors an der Zelloberfläche wurden die Zellen weitere 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.5.8. Transformation von mCherry-DNA in kompetente *E. coli* und Extraktion per alkalischer Lyse

Die Transformation erfolgte wie in Kapitel „3.2.5.2 Transformation von ECFP-P2Y<sub>2</sub>-DNA in kompetente *E. coli*“ beschrieben. Für die Transformation wurden 50 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die Extraktion der vervielfältigten Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse unter Zuhilfenahme einer Maxi-Präparation.

### 3.2.5.9. Co-Transfektion mit mCherry

Die Transfektion des zytosolischen Fluoreszenz Protein Vektors mCherry erfolgte als Ko-Transfektion, zusammen mit der Transfektion des ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorkonstruktes. Zu dem oben beschriebenen Transfektionsansatz wurde zusätzlich 1µg mCherry DNA hinzugefügt.

## 3.2.6. Transfektion von P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-siRNA in A549- und R3/1-Zellen

Für die Transfektion von R3/1- und A549-Zellen mit siRNA wurde Lipofectamine™ RNAiMAX verwendet. Lipofectamine™ RNAiMAX ist ein Transfektionsmittel, welches speziell für die Transfektion von siRNA in eukaryotische Zellen entwickelt wurde. Es wurde P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-siRNA transfiziert, als Kontrolle diente nicht funktionsfähige (*scrambled*, *scr*) siRNA.

Die Transfektion wurde nach dem Modell der „reversen Transfektion“ durchgeführt. Der Transfektionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

siRNA	15µl (10nm)
Opti-MEM I	500µl
Lipofectamine RNAiMAX	5µl

R3/1- und A549-Zellen wurden in 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bis zum Erreichen von Semi-Konfluenz gezüchtet. Direkt vor der Transfektion wurden die Zellen passagiert.

Nach 15 minütiger Inkubation des Transfektionsansatzes bei Raumtemperatur wurden ca. 20.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in jedes *well* des vorbereiteten 2-*well*-Objektträgers hinzugegeben. Dazu wurden noch 2,5ml des entsprechenden Zell-Mediums ohne Antibiotikum gegeben. Um einen ausreichenden *knockdown* der Rezeptoren zu erreichen, wurden die Zellen für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.7. Konfokalmikroskopische Bestimmung der P2Y<sub>2</sub>-Lokalisation in lebenden Alveolarepithelzellen unter Inkubation mit *S. pneumoniae*

Die konfokale *Spinning-Disc*-Mikroskopie ermöglicht eine hochauflösende, dreidimensionale Betrachtung von Zellen in Form von Schnittbildaufnahmen. Sie wurde verwendet, um die P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorverteilung in lebenden A549-Zellen unter Zellkulturbedingungen (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) zu untersuchen. Es wurden zwei Versuchsgruppen miteinander verglichen. In der ersten Versuchsgruppe wurden A549-Zellen unter Zellkulturbedingungen zweieinhalb Stunden beobachtet. In der zweiten Versuchsgruppe wurden unter laufenden Versuchsbedingungen Pneumokokken (10<sup>7</sup> CFU D39 Δcps) zu den Zellen gegeben. Zur besseren Unterscheidung von Zytosol und Membran wurde eine Co-Transfektion mit dem zytosolischen Farbstoff mCherry durchgeführt.

#### 3.2.7.1. Kultivierung

Die Kultivierung der A549-Zellen erfolgte wie im Kapitel „Zellkultur“ beschrieben. Für die Betrachtung am *Spinning Disc*-Mikroskop wurden die Zellen auf Glasbodenzellkulturschalen ausgesät. Die Transfektion mit ECFP-P2Y<sub>2</sub>- und mCherry DNA wurde wie in den Kapiteln „Transfektion des ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorkonstruktes in A549-Zellen“ und „Transformation von mCherry-DNA in kompetente *E. coli* und Extraktion per alkalischer Lyse“ beschrieben durchgeführt.

#### 3.2.7.2. Mikroskopie

Die P2Y<sub>2</sub>-Lokalisation in Zytosol und Membran von A549-Zellen wurde an einem *Spinning Disk*-Konfokalmikroskop durchgeführt. Alle Aufnahmen wurden mit Ölimmersionsobjektiven in 40-, 60- und 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

Für die Anregung der fluoreszierenden Proteine wurden Festkörperlaser mit 440 und 561nm verwendet. Die Anregung des ECFP gekoppelten P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors erfolgte bei 440nm, die Emission wurde bei 485nm gemessen. Die Anregung des zytosolischen mCherry Farbstoffes erfolgte bei 561nm, die Emission wurde bei 640nm gemessen. Dabei waren Aufnahmen an unterschiedlichen Positionen der Zelle möglich. Da bei Zugabe von Substanzen kleinste Temperaturänderungen eine Verschiebung des Fokus-Bereiches verursachen können, wurde für die Kompensation eine automatische Fokussierhilfe (*Perfect Focus System*) verwendet.

Laserintensität, Sensitivität und Belichtungszeit wurden den jeweiligen Bedingungen angepasst. Während des gesamten Versuches befanden sich die Zellen in der Inkubationskammer bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Applikation von *S. pneumoniae* erfolgte über einen kleinen Zugang in der Abdeckung der Messkammer, durch den ein Mikrokatheter (0,28mm) gelegt wurde.

### 3.2.7.3. Software

Die Aufnahmeplanung, Durchführung und Auswertung erfolgte mit dem Programm Velocity® 6.0.1. Velocity ist eine 3D-Bildanalysesoftware, mit der ein optimaler Versuchsablauf gewährleistet wird. Das System ermöglicht die vorprogrammierte Aufnahme hoch auflösender Bilder verschiedener Wellenlängen von definierten Schichten unterschiedlicher Zellen.

### 3.2.7.4. Auswertung

Ausgewertet wurden alle in der Versuchsplanung ausgewählten vitalen Zellen, die während des Versuches keine starken morphologischen Veränderungen aufwiesen. Es wurden bei allen Zellen zu jedem Zeitpunkt und in jeder Z-Ebene (räumliche Ebene, siehe Abbildung 3-11 und Abbildung 3-12 ) die Anzahl der zytosolischen ECFP-markierten P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorakkumulationen bestimmt. Diese wurden dann in Kontroll- und Interventionsgruppe miteinander verglichen.

Die Ergebnisse wurden in Excel-Tabellen übertragen und mit SPSS statistisch ausgewertet. Die graphische Darstellung erfolgte mit Excel und SPSS.

### 3.2.7.5. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes IBM SPSS Statistics 21. Die Untersuchung der Signifikanz wurde mit einem gemischten Modell analysiert. Als abhängige Variable wurde der Zuwachs zytosolischer *Spots* definiert (entsprechend zytosolischen Vesikeln). Die Zugabe von *S. pneumoniae* D39 Δcps wurde als fester Effekt und die Versuchs-ID (s.u.) als zufälliger Effekt definiert. Die Messung der Signifikanz in den Versuchsgruppen mit und ohne Bakterienzugabe wurde mit einem LSD (*least significant difference*) Posthoc-Test untersucht.

Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert unterhalb 0.05 angesehen.

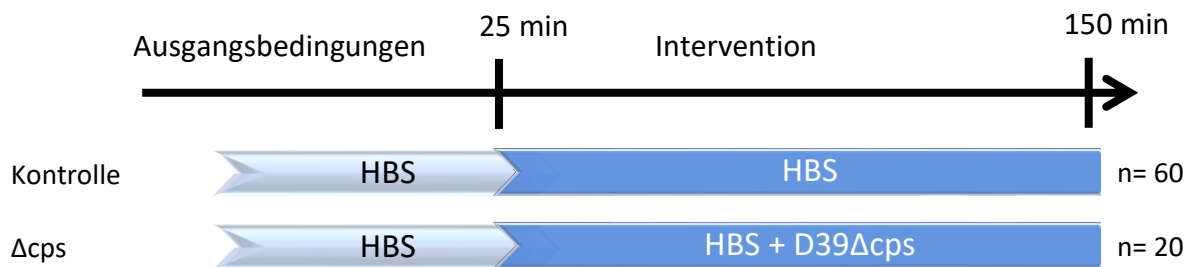
<b>Zytosolische <i>Spots</i>:</b>	ECFP markierte zytosolische P2Y <sub>2</sub> -Rezeptor Akkumulationen.
<b><i>Spots</i> max:</b>	Maximale Anzahl zytosolischer <i>Spots</i> während eines Mess-Zeitpunktes.
<b><i>Spots</i> Ausgangswert:</b>	Der Mittelwert aller zytosolischer <i>Spots</i> vor Bakterienzugabe. Bei der Kontrollgruppe wurde der Mittelwert der ersten beiden Mess-Zeitpunkte gewählt.
<b>Zuwachs zytosolischer <i>Spots</i>:</b>	= <i>Spots</i> max - <i>Spots</i> Ausgangswert.
<b>Versuchs-ID:</b>	Dateiname eines Versuches. Es handelt sich bei einer Versuchs-ID i.d.R. um mehrere Zellen, die im Rahmen eines Versuches untersucht wurden.

### 3.2.7.6. Versuchsablauf

Mit ECFP-P2Y<sub>2</sub>-DNA und mCherry transfizierte A549-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion am *Spinning Disc*-Mikroskop untersucht. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen dreimal mit 2ml calciumhaltigem HEPES-Puffer gespült. Für die Messung wurden 2ml HEPES-Puffer auf die Zellen gegeben. Die mikroskopische Untersuchung der Glasbodenzellkulturschalen fand in einer Inkubationskammer bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> statt. Folgende Versuchsgruppen wurden miteinander verglichen: A549-Zellen, bei denen keine Intervention durchgeführt wurde, und A549-Zellen, zu denen während der mikroskopischen Untersuchung 10<sup>7</sup> CFU *S. pneumoniae* D39 Δcps gegeben wurden.

**Tabelle 3: Versuchsgruppen der konfokalmikroskopischen Untersuchung der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorverteilung in A549-Zellen**

Gruppe	Anzahl der Versuche	Anzahl der Einzelzellen(n)	Definition
Kontrolle	4	20	Kontrollgruppe ohne Intervention
Δcps	7	60	<i>S. pneumoniae</i> , Kapseldefizient



**Abbildung 3-10: Konfokalmikroskopische Untersuchung der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorverteilung in A549-Zellen.** Dargestellt sind die Versuchsgruppen Kontrolle und Δcps. Nach Aufzeichnung von zwei bis drei Aufnahmen ohne Intervention wurde zur Kontrollgruppe HEPES-Puffer gegeben und zur Interventionsgruppe (Δcps) *S. pneumoniae* D 39 Δcps mit einer Endkonzentration von 10<sup>7</sup> CFU/ml. Weitere Aufnahmen wurden im Abstand von 15 Minuten, bis zu einer Gesamtaufnahmezeit von 2,5 Stunden oder 150 Minuten gemacht.

Bei der Versuchsplanung wurden A549-Zellen ausgewählt, die sich nicht gerade im Zustand der Zellteilung befanden, oder Atypien, wie z.B. zwei Zellkerne, aufwiesen. Außerdem wurden Zellen ausgewählt, die eine gleichmäßige P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorverteilung im Bereich der Zellmembran aufwiesen und eine klare Differenzierung zwischen Zytosol und Zellmembran ermöglichten.

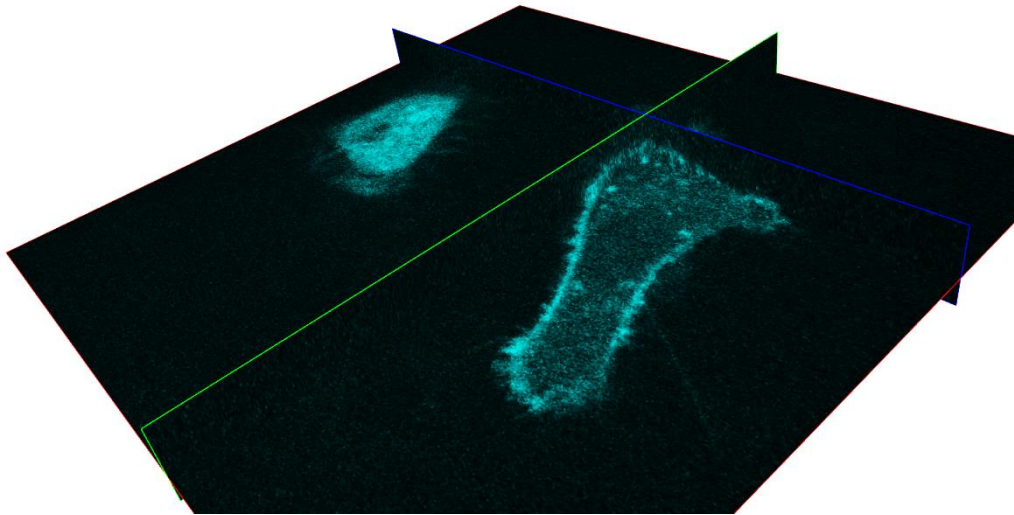


Abbildung 3-11: Konfokalmikroskopische Aufnahme einer repräsentativen mit ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorkonstrukt transfizierten A549-Zelle. Xyz-Ansicht mit der Software Volocity®

Mit Hilfe der Software Volocity® wurden die XYZ-Koordinaten der ausgewählten Zellen gespeichert. Die gespeicherten Koordinaten wurden dann während des Versuches automatisch angefahren.

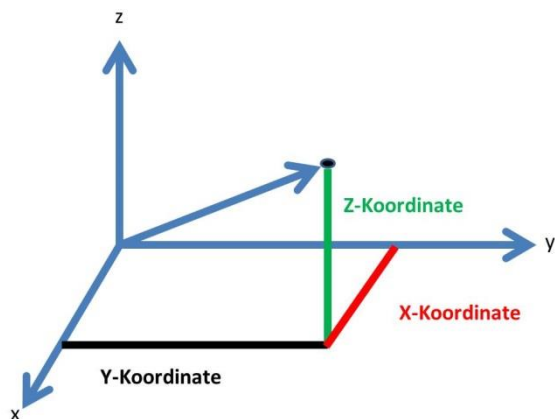
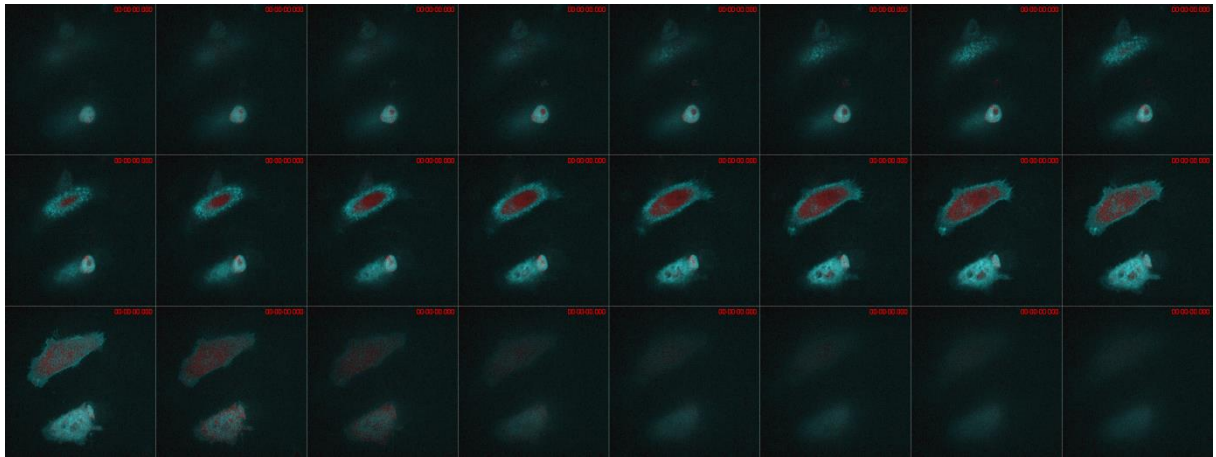


Abbildung 3-12: Räumliche Darstellung einer XYZ-Koordinate.

Auf diese Art konnten mehrere Zellen an unterschiedlichen Positionen der Glasbodenzellkulturschale während eines Versuches untersucht werden. Die Höhe der Z-Ebene wurde so definiert, dass Ober- und Untergrenze aller Zellen darin enthalten war (Abbildung 3-13).





**Abbildung 3-13: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von zwei repräsentativen mit ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorkonstrukt und mCherry-transfizierten A549-Zellen. Ansicht aller Z-Stacks zu Versuchsbeginn.**

Es wurden an sämtlichen festgelegten Koordinaten alle angefertigten Z-Ebenen untersucht und ausgewertet. Bei der Interventionsgruppe wurde nach zwei bis drei Aufnahmen *S. pneumoniae* D 39  $\Delta$ cps mit einer Endkonzentration von  $10^7$  CFU/ml zu den Zellen gegeben, bei der Kontrollgruppe 100 $\mu$ l HEPES-Puffer. Weitere Aufnahmen wurden im Abstand von 15 min bis zu einer Gesamtaufnahmezeit von 150 Minuten gemacht.

## 4. Ergebnisse

Für die Calciummessungen an Alveolarepithelzellen wurden zwei Zelllinien verwendet, A549-Zellen und R3/1-Zellen. Die A549-Zelllinie ist eine etablierte, gut untersuchte humane Tumorzelllinie und wird als Modell für die Alveolarepithelzelle Typ II (AT II) verwendet.

Da eine immortalisierte humane Typ I-Alveolarepithel Zelllinie bislang nicht verfügbar ist, wurde als bestmögliche Alternative für die Untersuchung des Verhaltens von AT I-Zellen die AT I-ähnliche Zelllinie R3/1 verwendet.

### 4.1. ATP-induzierter Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration von Alveolarepithelzellen Typ I und Typ II

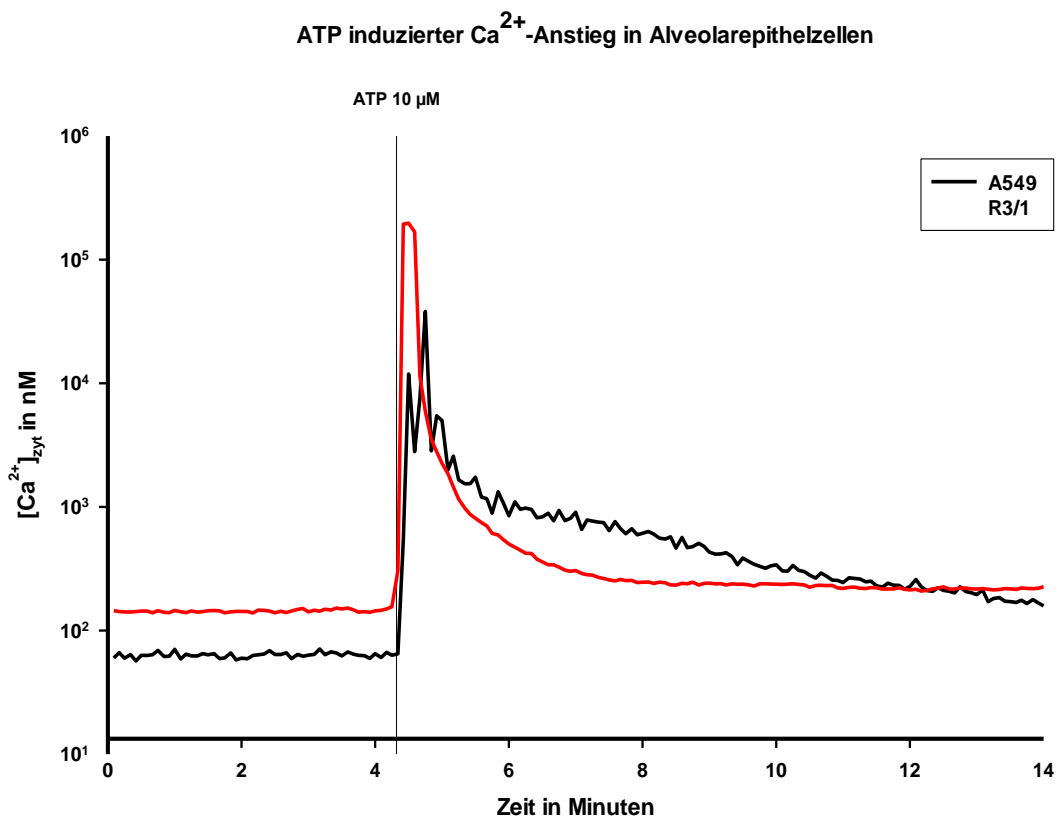
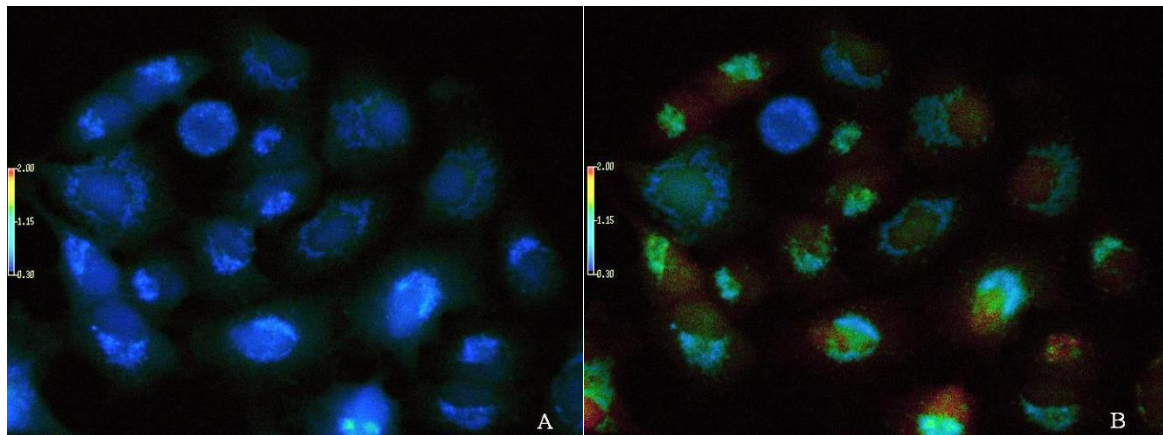


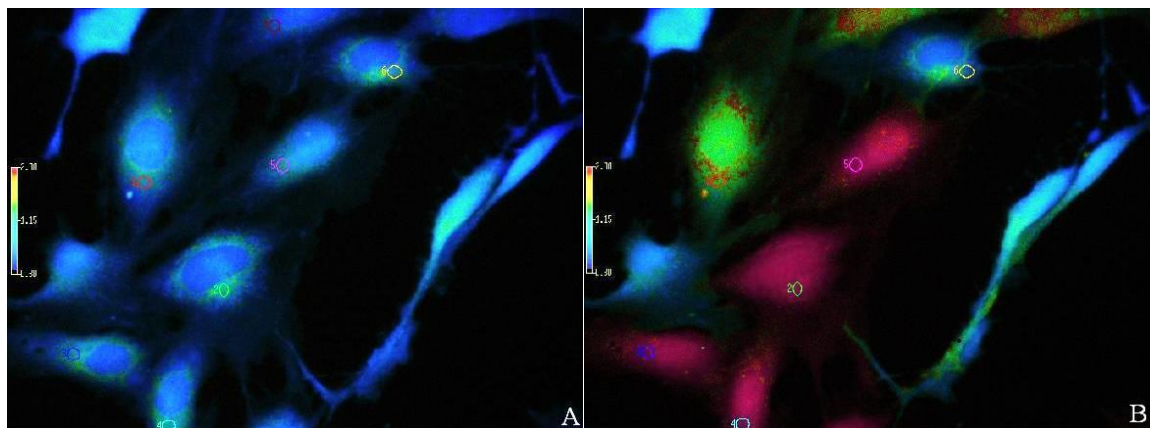
Abbildung 4-1: Änderung der zytosolischen Calciumkonzentration von A549- und R3/1-Zellen im Verlauf bei Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  ATP. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Zelle.

In Abbildung 4-1 sind zwei repräsentative Einzelzellen dargestellt (A549 sowie R3/1). Am Beginn des Versuches wurde ca. vier Minuten der basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel im Zytosol gemessen (Ausgangsbedingungen). Nach ATP-Gabe folgt eine sofortige steile Erhöhung (*peak*) der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ . Nach Erreichen der maximalen Calciumkonzentration kam es zu einer langsamen Abnahme dieser bis auf Ausgangsbedingungen. Diese Ergebnisse blieben reproduzierbar, die Höhe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort variierte jedoch stark.



**Abbildung 4-2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von A549-Zellen, die mit Fura-2 beladen sind.**  
**A) Vor der Zugabe von 10µM ATP (Ausgangsbedingungen). B) Nach der Zugabe von 10µM ATP.**

In Abbildung 4-2 ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von A549-Zellen farblich dargestellt. Vor Beginn aller Versuche wurde das Mikroskop mit Standardlösungen verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen kalibriert. Die Falschfarben (Farbskala des Mikroskops) werden so eingestellt, dass unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration unterschiedlichen Farben entsprechen. Somit stellt sich die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  unter Ausgangsbedingungen als bläuliche Färbung der Zellen dar. Nach Zugabe von 10µM ATP ist eine deutliche Zunahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  sichtbar, die sich als sofortiger Farbumschlag von blau über grün und gelb nach rot darstellt.



**Abbildung 4-3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von R3/1-Zellen, die mit Fura-2 beladen sind.**  
**A) Vor der Zugabe von 10µM ATP. B) Nach der Zugabe von 10µM ATP.**

Abbildung 4-3 Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung wurden im Bereich des Zytosols bereits so genannte *ROI* (Region of Interest) markiert. Auch hier ist nach Zugabe von ATP ein deutlicher Farbumschlag sichtbar.

Abbildung 4-4 zeigt unterschiedliche Reaktionsmuster von R3/1-Zellen bei Zugabe von 10 $\mu$ M ATP.

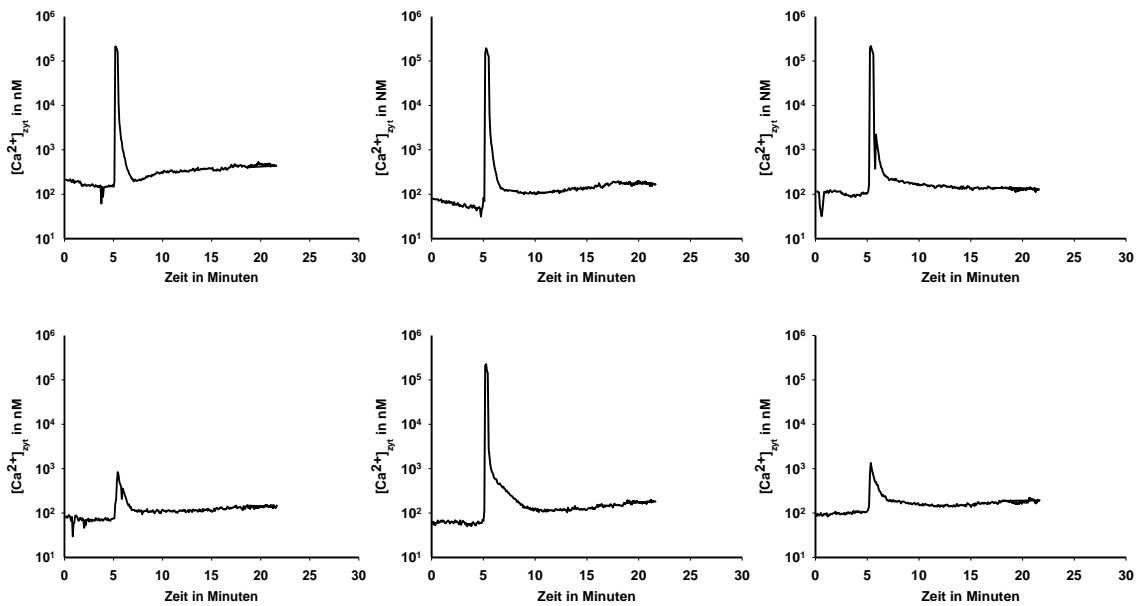


Abbildung 4-4: Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von R3/1-Zellen, Zugabe von 10 $\mu$ M ATP. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  im Verlauf. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

Der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  erfolgt in allen Zellen fast gleichzeitig, direkt nach Zugabe des Agonisten. Die individuellen Reaktionen aller Zellen unterscheiden sich sowohl in der Höhe des maximalen  $Ca^{2+}$ -Anstiegs als auch in der Zeit, die bis zur Rückkehr der  $Ca^{2+}$ -Konzentration auf Ausgangsbedingungen benötigt wird.

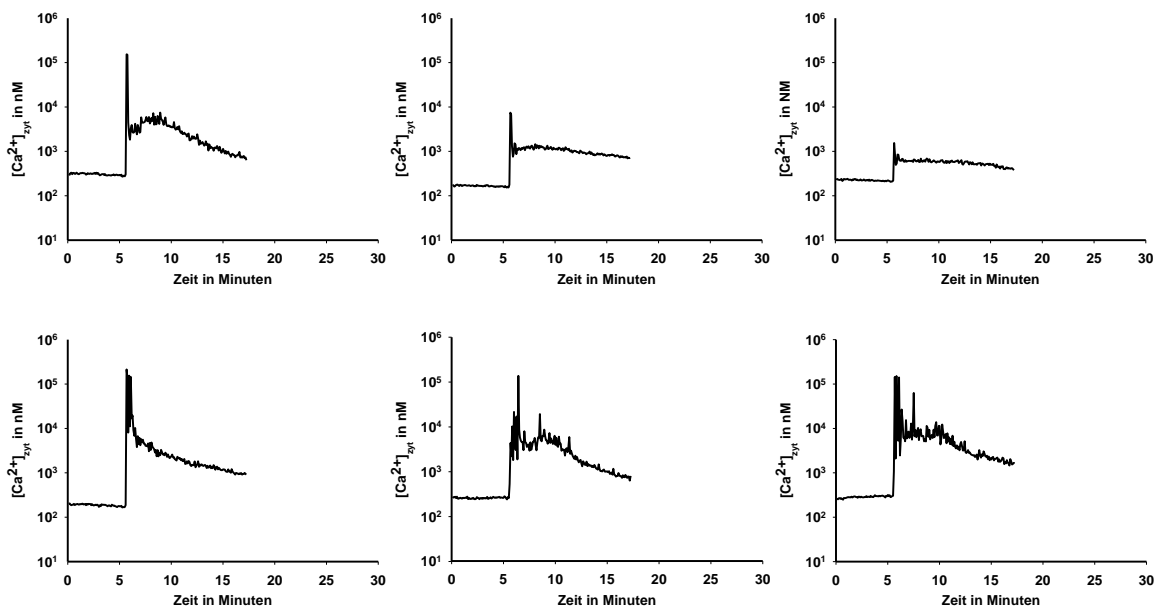


Abbildung 4-5: Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von A549-Zellen, Zugabe von 10 $\mu$ M ATP. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  im Verlauf. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

Auch bei A549-Zellen erfolgt nach Zugabe von 10 $\mu$ M ATP ein sofortiger Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ . Wie schon bei R3/1-Zellen sind auch hier die individuellen Reaktionen jeder Zelle hinsichtlich maximaler Höhe und Zeitdauer des zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Anstiegs sehr unterschiedlich.

#### 4.2. *S. pneumoniae* inhibiert den ATP vermittelten Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration in Alveolarepithelzellen.

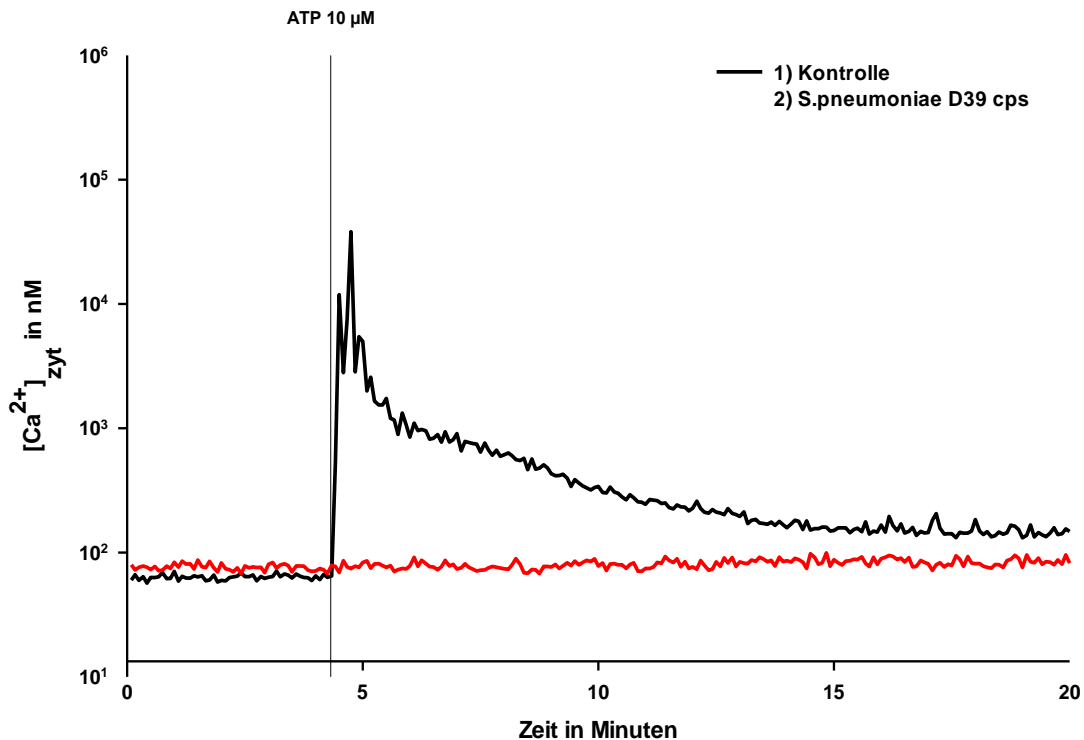


Abbildung 4-6: [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> von A549-Zellen vor und nach Zugabe von 10µM ATP. (1) Unbehandelte A549-Zellen (Kontrollgruppe). (2) A549-Zellen wurden vor der ATP-Gabe zwei Stunden mit *S. pneumoniae* D39 Δcps inkubiert. Gezeigt sind exemplarisch zwei repräsentative Einzelzellen.

Vor der epifluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurde ein Teil der Zellen zwei Stunden lang mit *S. pneumoniae* D 39 Δcps bei 37° C im Brutschrank inkubiert (2). Zu Beginn der Messungen wurden die Ausgangsbedingungen ca. vier Minuten aufgezeichnet. Nach Zugabe von 10µM ATP kommt es in unbehandelten A549-Zellen zur Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> (siehe Abbildung 4-6 (1)). Nach einer zweistündigen Inkubation mit *S. pneumoniae* D 39 Δcps kann jedoch durch die Zugabe von ATP bei den meisten Zellen kein Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> mehr ausgelöst werden (siehe Abbildung 4-6 (2)).

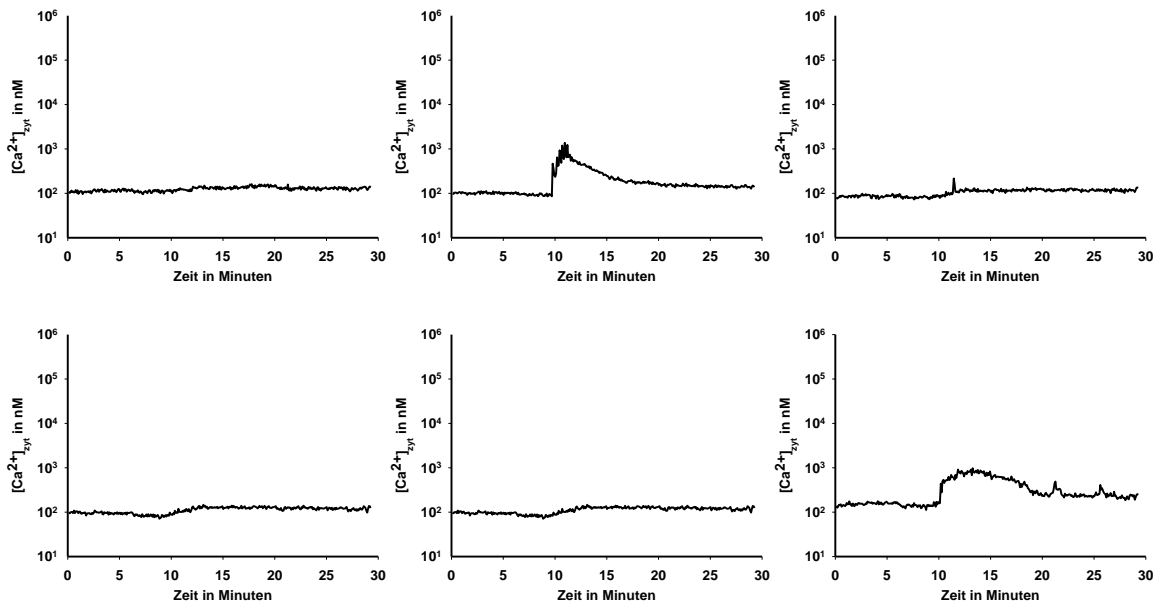


Abbildung 4-7: A549-Zellen, vor Messbeginn zweistündige Inkubation mit *S. pneumoniae* (D39 Δcps). Aufgezeichnet wurde die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  vor und nach Applikation von  $10\mu M$  ATP. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

Abbildung 4-7 Die meisten Zellen zeigen keinen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ . Einige Zellen reagieren mit einem kleinen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  und sehr wenige Zellen zeigen in ihrer Reaktion auf ATP einen Anstieg der Calciumkonzentration, ähnlich wie der von Zellen, die zuvor nicht mit *S. pneumoniae* inkubiert wurden.

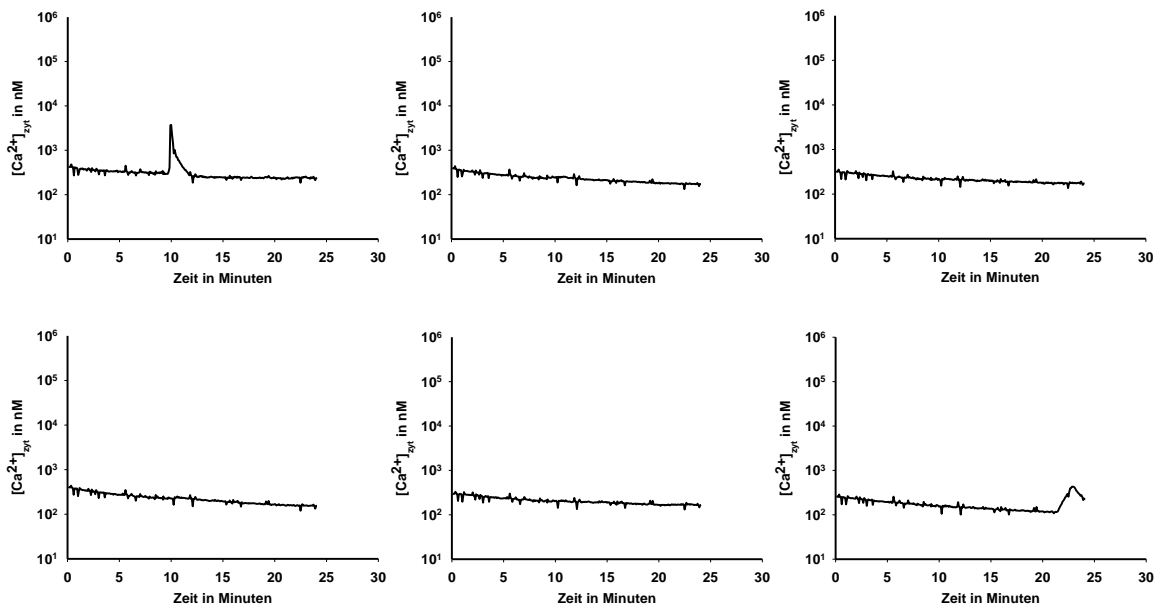


Abbildung 4-8: R3/1-Zellen, nach zweistündiger Präinkubation mit *S. pneumoniae* (D39 Δcps). Aufgezeichnet wurde die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  vor und nach Stimulation mit  $10\mu M$  ATP. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

Die ATP-induzierte Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von R3/1-Zellen, welche zuvor zwei Stunden mit *S. pneumoniae* D 39 Δcps inkubiert wurden, ist wie auch bei A549-Zellen sehr heterogen. Es kann bei den meisten R3/1-Zellen eine Suppression der  $Ca^{2+}$ -Antwort nach Bakterieninkubation festgestellt werden.

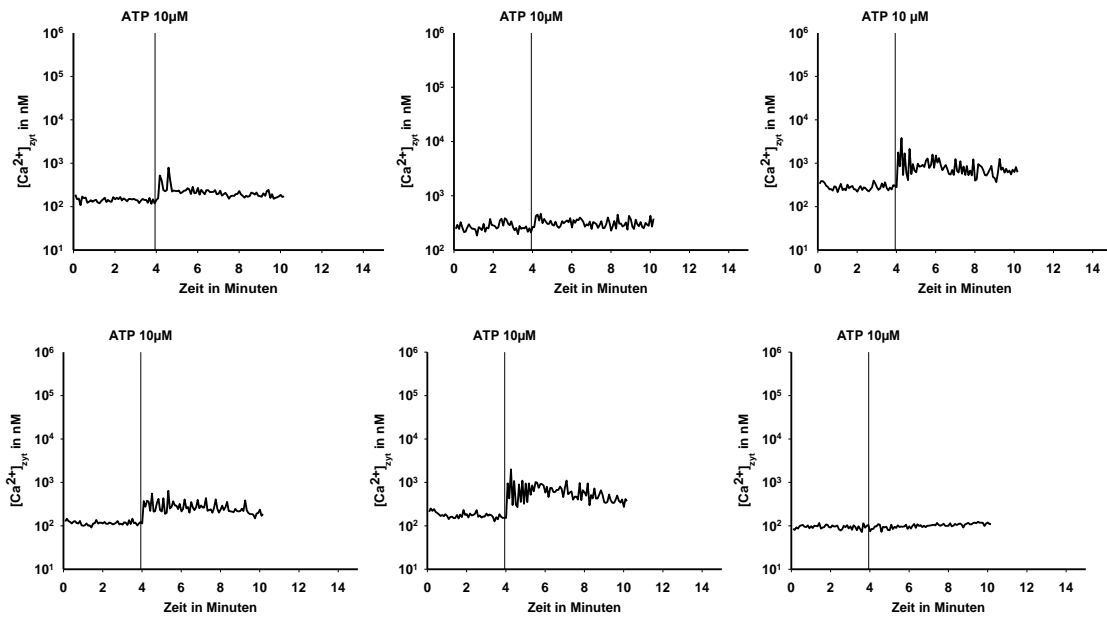


Abbildung 4-9: A549-Zellen, vor Messbeginn zweistündige Inkubation mit *S. pneumoniae* ( $10^7$  CFU D39). Aufgezeichnet wurde die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  vor und nach Applikation von  $10 \mu M$  ATP. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

Nach zweistündiger Inkubation mit dem bekapselten *S. pneumoniae* Wildtyp zeigen Alveolarepithelzellen des Typs A549 eine verminderte Reaktion auf ATP. Der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  ist bei fast allen Zellen supprimiert und bei einigen Zellen komplett inhibiert. Bei sehr wenigen Zellen kommt es zu keiner Beeinflussung des ATP abhängigen Anstiegs der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ .

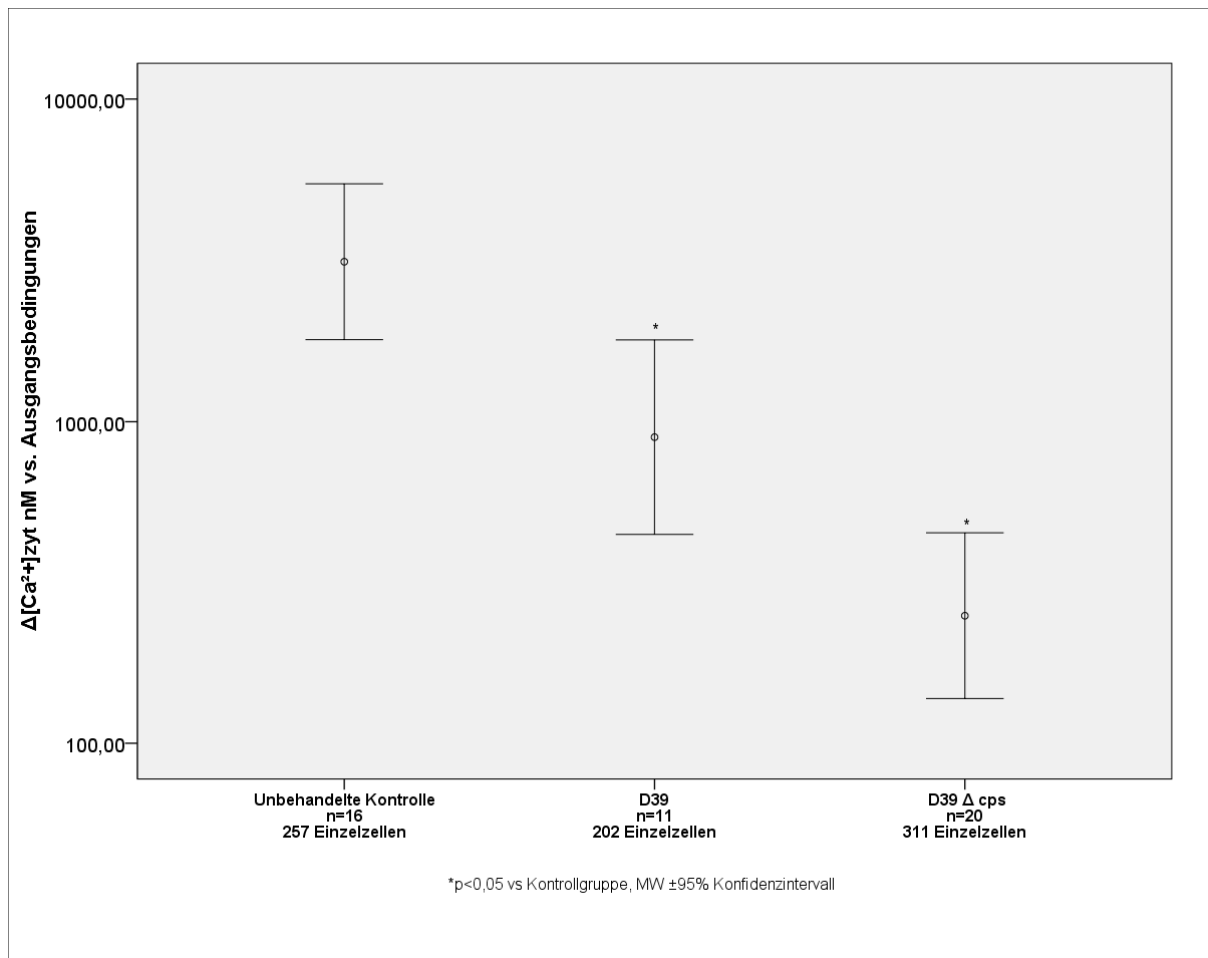


Abbildung 4-10: 1) Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration in A549-Zellen auf  $10\mu M$  ATP, welche nicht oder mit *S. pneumoniae* Wildtyp ( $10^7$  CFU D39) oder *S. pneumoniae*  $\Delta cps$  (D39  $\Delta cps$ ) zwei Stunden lang vorbehandelt wurden. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall des maximalen Anstiegs der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration aller Zellen.

Abbildung 4-10 Alle Versuchsgruppen zeigen den für Alveolarepithelzellen typischen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ , wenn sie mit ATP stimuliert werden. Bei der unbehandelten Kontrolle handelt es sich um eine Kontrollgruppe, in welcher die A549-Zellen vor der Aktivierung mit ATP nicht mit *S. pneumoniae* inkubiert wurden. In dieser Gruppe beträgt der Mittelwert der maximalen  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  ( $M_{Max}$ ) 3133nM.

In der Gruppe D39 und D 39  $\Delta cps$  wird der Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration von A549-Zellen, die zuvor mit *S. pneumoniae* inkubiert wurden, gezeigt. Der Wildtyp (D 39), sowie die kapseldefiziente Mutante (D 39  $\Delta cps$ ) sind in der Lage, den ATP-induzierten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  zu inhibieren. Dieser Effekt ist bei der kapseldefizienten Mutante ausgeprägter. Bei der Versuchsgruppe D39 beträgt der Mittelwert der maximalen  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  896nM und bei Gruppe D 39  $\Delta cps$  250nM. Versuchsgruppe D39 und D 39  $\Delta cps$  unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen den Gruppen D39 und D 39  $\Delta cps$  ist nicht signifikant.



### 4.3. Charakterisierung des Purinrezeptorexpressionsprofils der verwendeten Zelllinien

Da die spezifische Expression dieser Rezeptoren bei jeder Zellart unterschiedlich ist, wurde untersucht, welche Purin- und Pyrimidinrezeptoren von A549- und R3/1-Zellen exprimiert werden.

Es wurde untersucht, welcher Rezeptor, der für die ATP-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort verantwortlich ist, durch *S. pneumoniae* inhibiert wird. Weiterhin hat sich die Frage gestellt, ob es zu einer Interaktion der Bakterien mit diesem Rezeptor oder zur Beeinflussung der zytosolischen Signalkaskade kommt.

#### 4.3.1. Agonisten

Um die Anzahl der in Frage kommenden Rezeptoren weiter eingrenzen zu können, wurden Versuche mit Agonisten verschiedener Purin- und Pyrimidinrezeptoren durchgeführt (Abbildung 4-11).

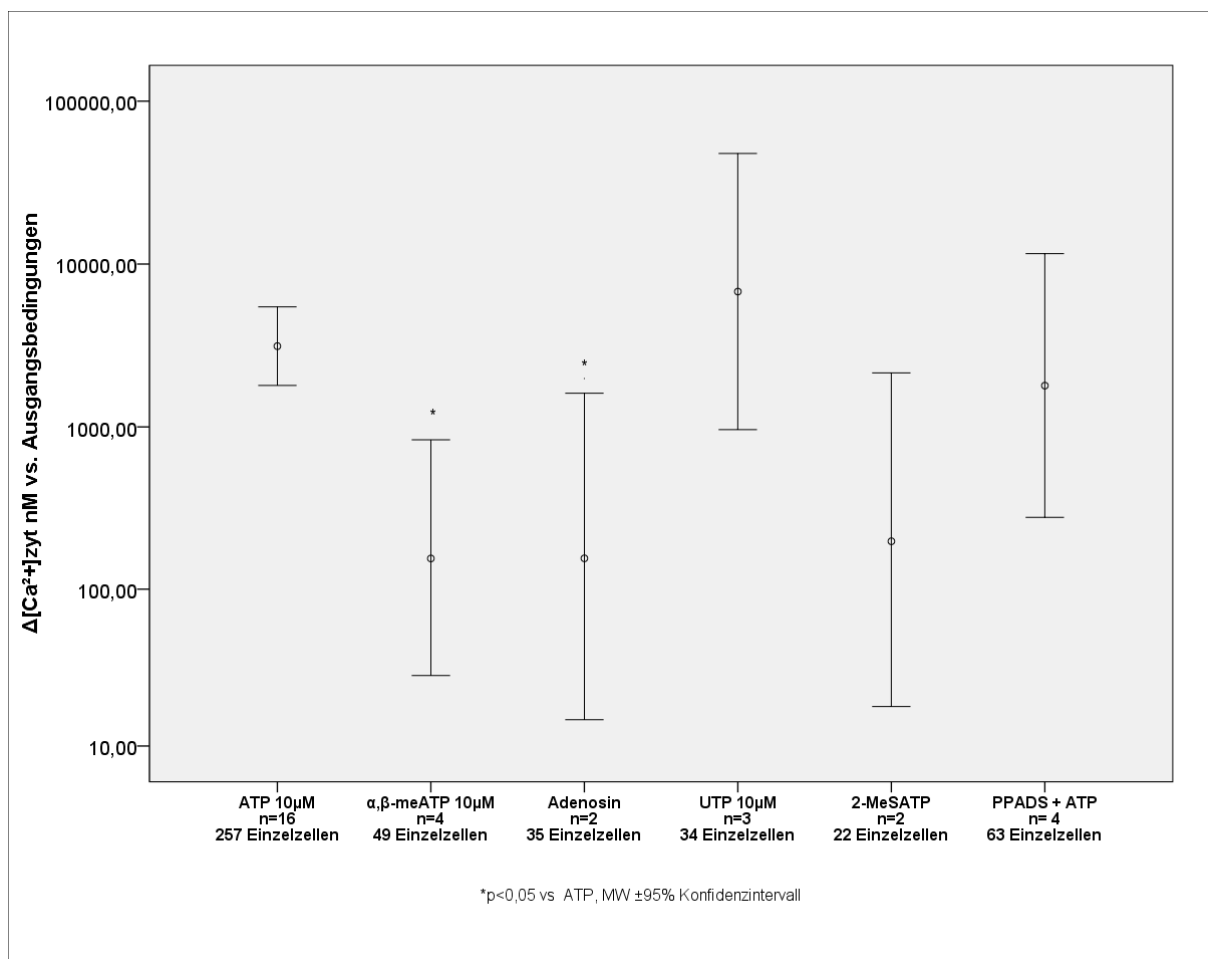
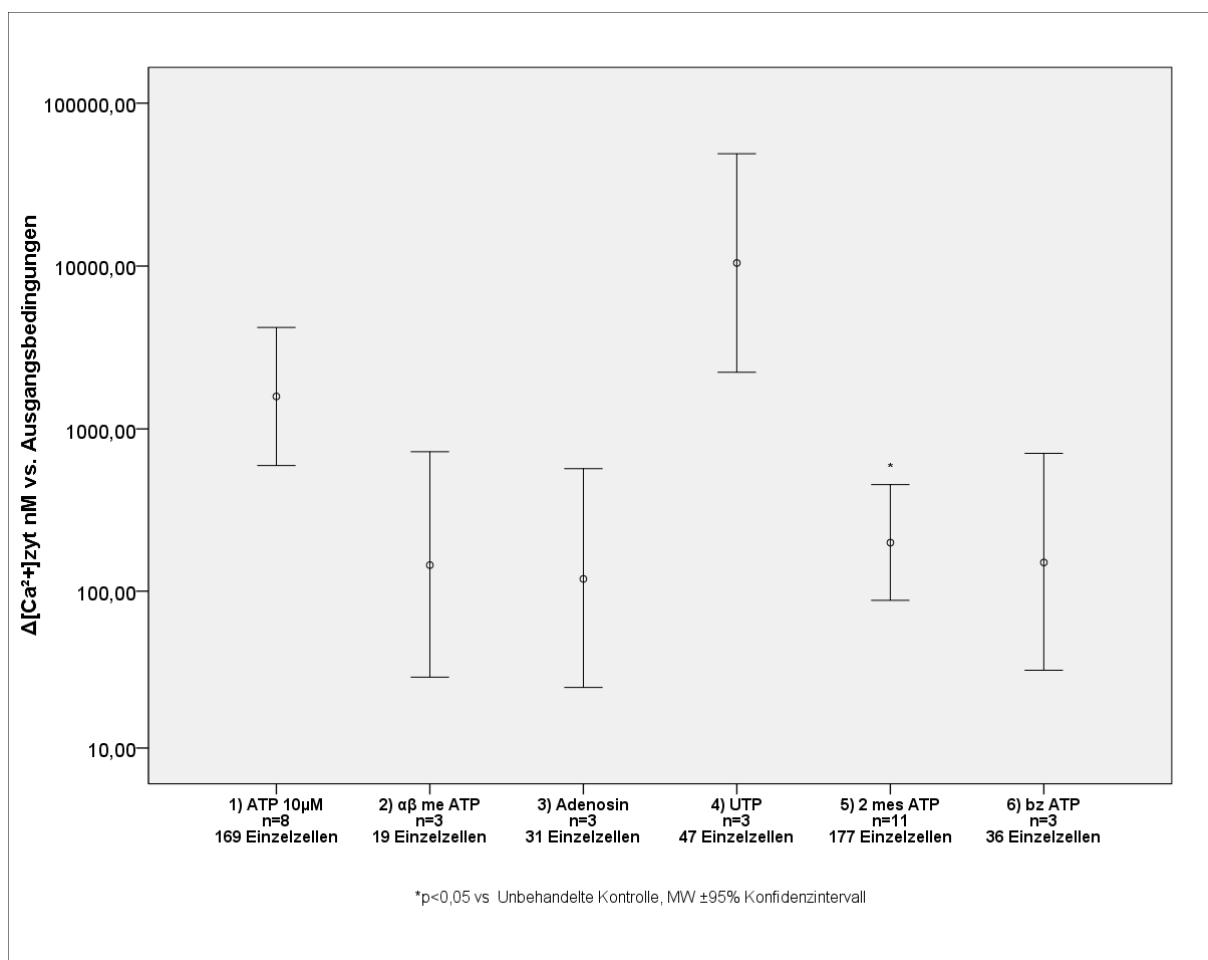


Abbildung 4-11: Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  in A549-Zellen durch verschiedene Purin- und Pyrimidinrezeptor-Agonisten. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall des maximalen Anstiegs der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aller Zellen.

Es unterscheiden sich die Werte der Versuchsgruppen, bzw. die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf die verschiedenen Agonisten (siehe Abbildung 4-11). Es zeigt sich, dass A549-Zellen den stärksten zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg bei Stimulation mit den Agonisten ATP ( $M_{\text{Max}}$  3133nM) und UTP ( $M_{\text{Max}}$  6777nM) aufweisen.

Signifikant von der Kontrollgruppe (ATP) unterscheiden sich die Versuchsgruppen der Agonisten  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP ( $M_{\text{Max}}$  150nM) und Adenosin ( $M_{\text{Max}}$  155nM). Die Versuchsgruppen der Agonisten UTP ( $M_{\text{Max}}$  6777nM) 2-MesATP ( $M_{\text{Max}}$  198nM) und des Antagonisten PPADS ( $M_{\text{Max}}$  1793nM) zeigen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Vergleichbare Versuche wurden auch mit R3/1-Zellen durchgeführt.



**Abbildung 4-12: Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  in R3/1-Zellen durch verschiedene Purin- und Pyrimidin-Rezeptor-Agonisten.** Dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall des maximalen Anstiegs der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aller Zellen.

Wie schon bei A549-Zellen beobachtet, wird auch bei R3/1-Zellen die stärkste Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  durch ATP ( $M_{\text{Max}}$  1583nM) und UTP ( $M_{\text{Max}}$  10447nM) ausgelöst. Signifikant von der Kontrollgruppe (ATP) unterscheidet sich hier die Versuchsgruppe 2mesATP ( $M_{\text{Max}}$  200nM). Die Versuchsgruppen  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP ( $M_{\text{Max}}$  145nM), Adenosin ( $M_{\text{Max}}$  119nM), UTP ( $M_{\text{Max}}$  10447nM) und bzATP ( $M_{\text{Max}}$  151nM) zeigen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe.

### 4.3.2. Ursprung des $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Anstieges

Nach den in Abbildung 4-11 und Abbildung 4-12 beschriebenen Versuchen scheint der P1-Rezeptor mit seinem Agonisten Adenosin nicht für den beobachteten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  verantwortlich zu sein. Es kommen für die Übertragung des ATP-Signals noch beide P2 Purin-Rezeptorklassen in Frage: P2X-Rezeptoren und P2Y-Rezeptoren.

P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle. P2Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über eine intrazelluläre Signalkaskade zu einer Calciumfreisetzung aus zytosolischen Speichern (hauptsächlich dem endoplasmatischen Retikulum) führen.

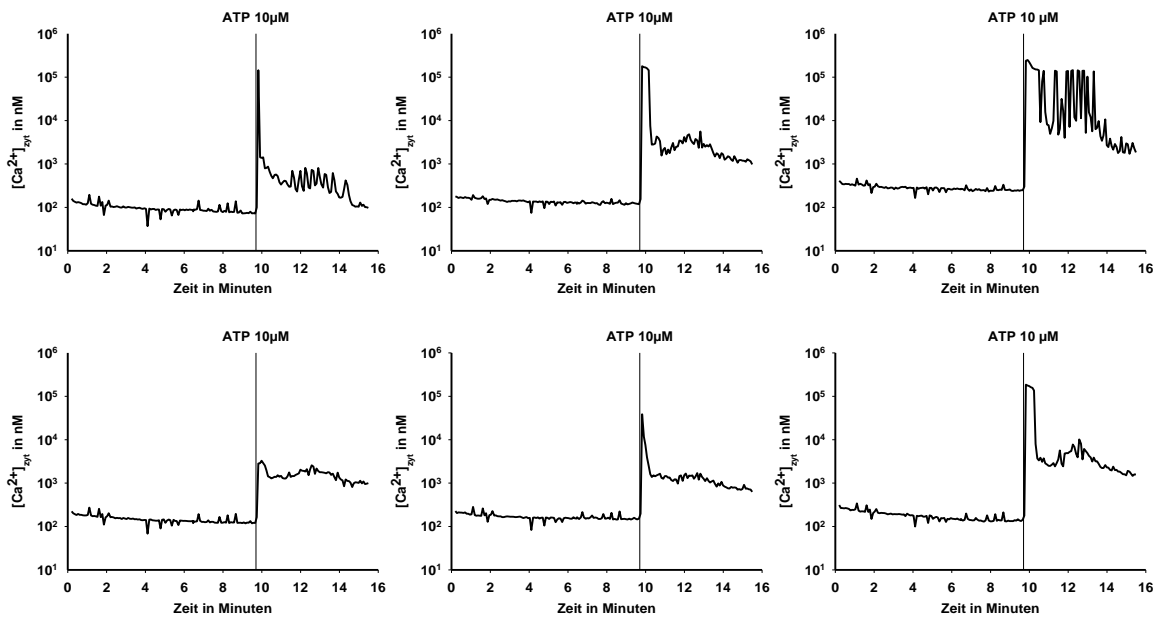


Abbildung 4-13: A549-Zellen in  $Ca^{2+}$ -freiem HEPES-Puffer. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  nach Stimulation mit  $10\mu M$  ATP. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

Um zu differenzieren, ob das ATP vermittelte  $Ca^{2+}$ -Signal durch einen extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Einstrom (P2X) oder durch eine  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichern (P2Y) hervorgerufen wird, wurden zum einen Versuche an A549-Zellen bei extrazellulär  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen durchgeführt sowie nach Entleerung des endoplasmatischen Retikulums mit Thapsigargin. Der Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration unter  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen ist mit dem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  unter Standardbedingungen (HEPES-Puffer mit  $Ca^{2+}$ ) vergleichbar. Es zeigen sich zwischen diesen beiden Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede.

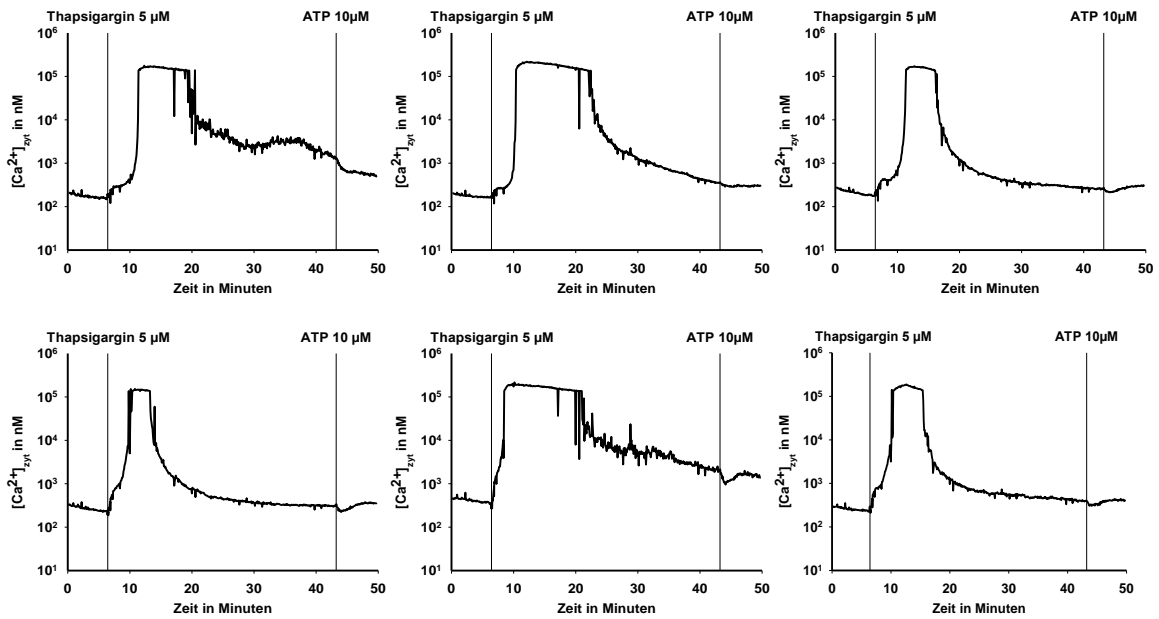


Abbildung 4-14: A549-Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mit 5µM Thapsigargin inkubiert. Bei Wiedererreichen des Ausgangs-Calciumspiegels erfolgte die Stimulation mit ATP 10µM. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  im zeitlichen Verlauf. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

Nach Applikation von Thapsigargin stieg die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  an, was durch Entleerung der  $Ca^{2+}$ -Speicher erklärt werden kann. Im zeitlichen Verlauf fiel die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  auf Ausgangsbedingungen ab. Bei der darauffolgenden ATP-Applikation blieb ein signifikanter Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  aus. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  im zeitlichen Verlauf. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

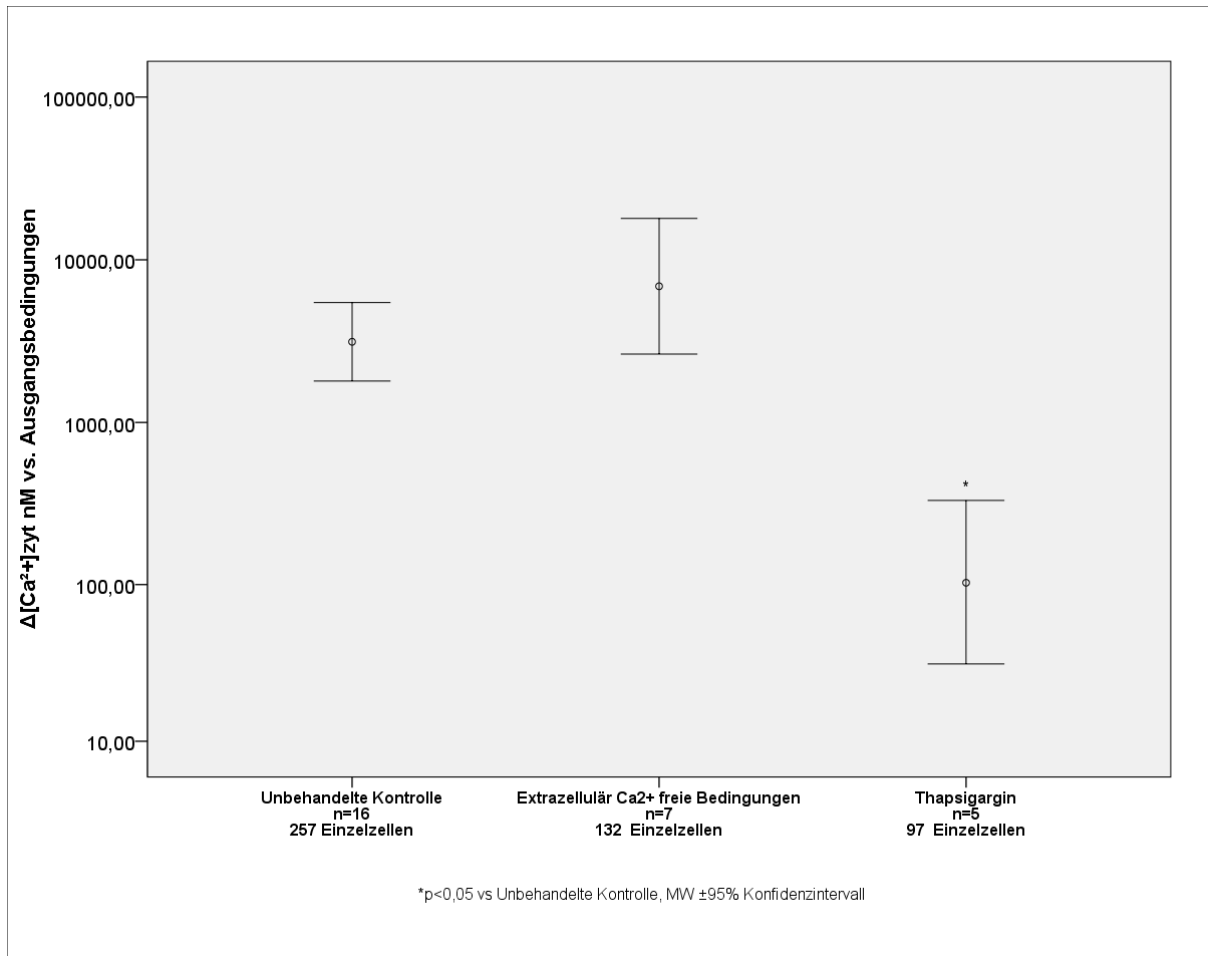


Abbildung 4-15: Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  in A549-Zellen auf  $10\mu M$  ATP, welche unter Standardbedingungen stattfanden, in extrazellulär  $Ca^{2+}$ -freier Umgebung oder nach Vorbehandlung der Zellen mit Thapsigargin. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall des maximalen Anstiegs der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration aller Zellen.

Abbildung 4-15: In calciumhaltigem HEPES-Puffer reagieren A549-Zellen auf  $10\mu M$  ATP mit einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  ( $M_{Max}$  3133nM). Eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  in A549-Zellen durch  $10\mu M$  ATP findet auch in calciumfreier Umgebung statt ( $M_{Max}$  6876nM). Wenn vor der Aktivierung mit ATP jedoch mit Thapsigargin inkubiert wurde, bleibt die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  bei Zugabe von ATP aus ( $M_{Max}$  103nM). Signifikant von der Kontrollgruppe ( $Ca^{2+}$ -haltige Bedingungen) unterscheidet sich die Versuchsgruppe, bei der Thapsigargin verwendet wurde.

Ein durch ATP-vermittelter Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ , der seinen Ursprung aus zytosolischen Speichern nimmt, wird über P2Y-Rezeptoren vermittelt.

### 4.3.3. Purinrezeptor-Expression in A549- und R3/1-Zellen

#### 4.3.3.1. Purinrezeptor-Expression in A549- und R3/1-Zellen auf mRNA-Ebene

In verschiedenen Ansätzen wurde eine RT-PCR der P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-RNA von A549-Zellen durchgeführt und das Ergebnis als Gelelektrophorese dargestellt. Wie in Abbildung 4-16 zu sehen ist, konnte P2Y<sub>2</sub>-und P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor-DNA nachgewiesen werden.

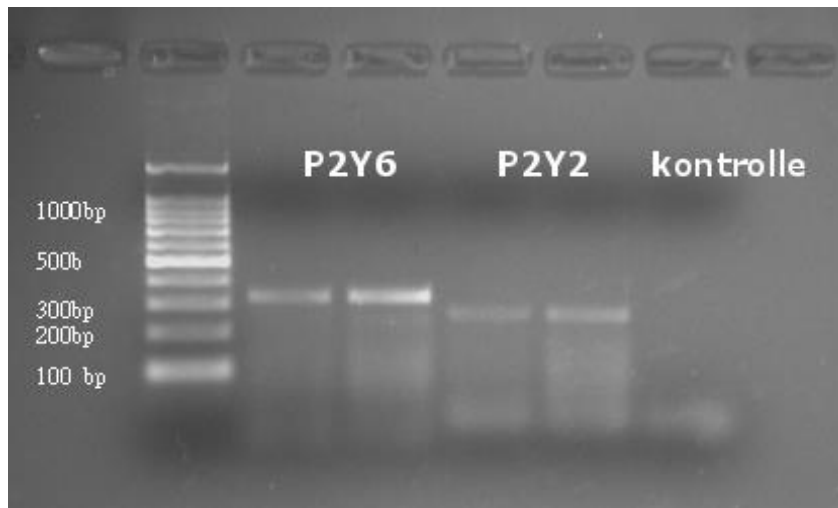


Abbildung 4-16: Gelelektrophorese verschiedener PCR-Amplifikate von A549-Zellen. Kontrolle: Negativkontrolle, (ddH<sub>2</sub>O); P2Y<sub>2</sub>: Nachweis von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-DNA; P2Y<sub>6</sub>: Nachweis von P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor-DNA.

Die amplifizierte P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor DNA wurde bei ca. 350 bp erwartet und die amplifizierte DNA des P2Y<sub>6</sub>-Rezeptors bei ca. 250 bp.

#### 4.3.3.2. Purinrezeptor-Expression in A549- und R3/1-Zellen auf Proteinebene

Nach Isolation der Membranfraktion von R3/1- und A549-Zellen konnte mit Hilfe eines Western Blots gezeigt werden, dass auf der Membran von R3/1-Zellen P2Y<sub>2</sub>- und P2Y<sub>6</sub>-Rezeptoren exprimiert werden. Bei A549-Zellen gelang der Nachweis von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorprotein. P2Y<sub>4</sub>-Rezeptoren konnten nicht nachgewiesen werden.

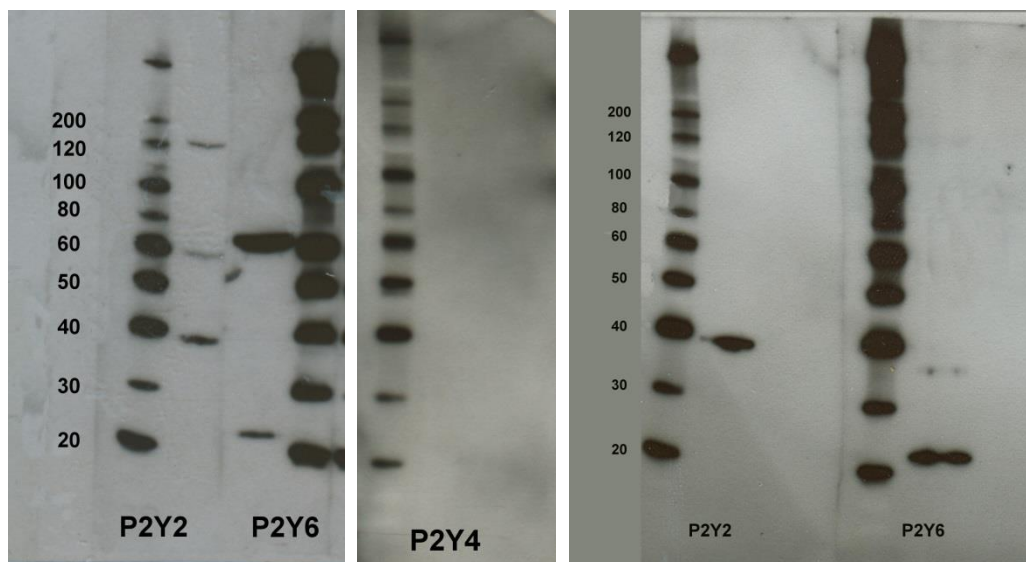


Abbildung 4-17: Western Blot aus der Membranfraktion von R3/1- und A549-Zellen. Links R3/1-Zellen: P2Y<sub>2</sub>: Nachweis von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein. P2Y<sub>6</sub>: Nachweis von P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor-Protein. Mitte R3/1-Zellen: kein Nachweis von P2Y<sub>4</sub> Rezeptor-Protein. Rechts A549-Zellen: P2Y<sub>2</sub>: Nachweis von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Protein. P2Y<sub>6</sub>: kein Nachweis von P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor-Protein.

#### 4.3.4. siRNA *knockdown*

Um den für die Vermittlung des ATP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals verantwortlichen Purinrezeptor eindeutig zu identifizieren, wurden funktionelle siRNA-*knockdowns* von  $\text{P2Y}_2$ - und  $\text{P2Y}_6$ -Rezeptoren in A549- und R3/1-Zellen durchgeführt. Der Erfolg des siRNA-*knockdowns* wurde mittels RT-PCR überprüft.

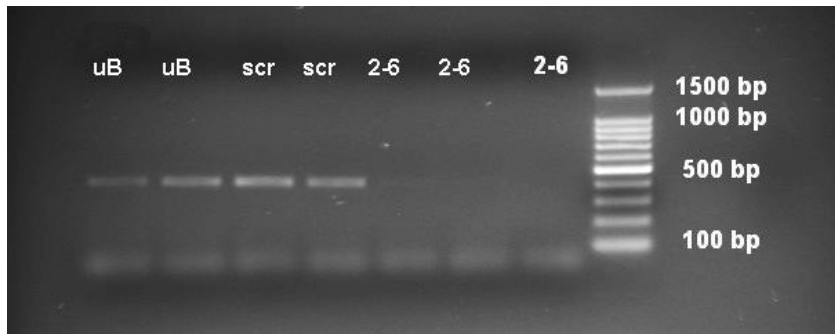


Abbildung 4-18: Gelelektrophorese verschiedener RT-PCR Ansätze. uB: unbehandelte A549-Zellen; SCR: A549-Zellen nach Transfektion mit nicht funktionaler (*scrambled*) siRNA;  $\text{P2Y}_{2-6}$ : A549-Zellen nach Transfektion mit  $\text{P2Y}_{2-6}$ -siRNA.

Es konnte gezeigt werden, dass in A549-Zellen nach einem  $\text{P2Y}_2$ -siRNA *knockdown* keine  $\text{P2Y}_2$ -RNA/DNA mehr nachzuweisen ist (siehe Abbildung 4-18).

Die gleichen Untersuchungen wurden auch mit R3/1-Zellen durchgeführt.

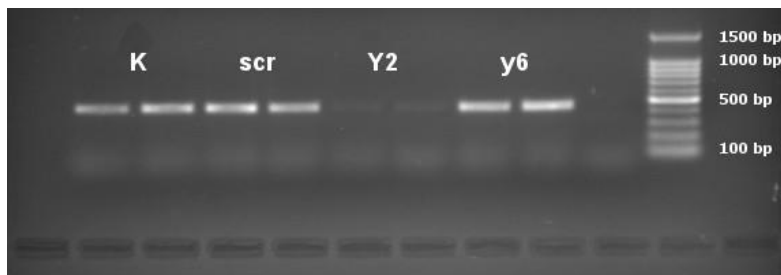


Abbildung 4-19: Gelelektrophorese verschiedener RT-PCR Ansätze von R3/1-Zellen. Amplifikation und Nachweis von  $\text{P2Y}_2$ -DNA. k: unbehandelte Zellen; SCR: mit nicht funktionaler (*scrambled*) siRNA transfiziert; Y2: mit  $\text{P2Y}_2$ -siRNA transfiziert; Y6: mit  $\text{P2Y}_6$ -siRNA transfiziert.

Wie bereits bei A549-Zellen gezeigt, ist auch in R3/1-Zellen nach siRNA *knockdown* mit  $\text{P2Y}_2$ -siRNA keine  $\text{P2Y}_2$ -DNA mehr nachzuweisen (siehe Abbildung 4-19).



#### 4.3.5. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung an Alveolarepithelzellen nach siRNA-knockdown spezifischer Rezeptoren.

Nach dem erfolgreichen Nachweis spezifischer Purinrezeptoren in Alveolarepithelzellen wurde mittels P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor knockdown untersucht, ob diese an der Übermittlung des extrazellulären ATP-Signals in einen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstieg beteiligt sind.

Um etwaige Einflüsse der siRNA oder des Transfektionsreagenzes auf das Ergebnis der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung ausschließen zu können, wurde eine Transfektion mit nicht funktionaler siRNA durchgeführt (*scrambled siRNA*, Abbildung 4-20). Die Ergebnisse beider Versuchsgruppen wurden mit den Standardversuchsbedingungen verglichen (Abbildung 4-26 und Abbildung 4-27).

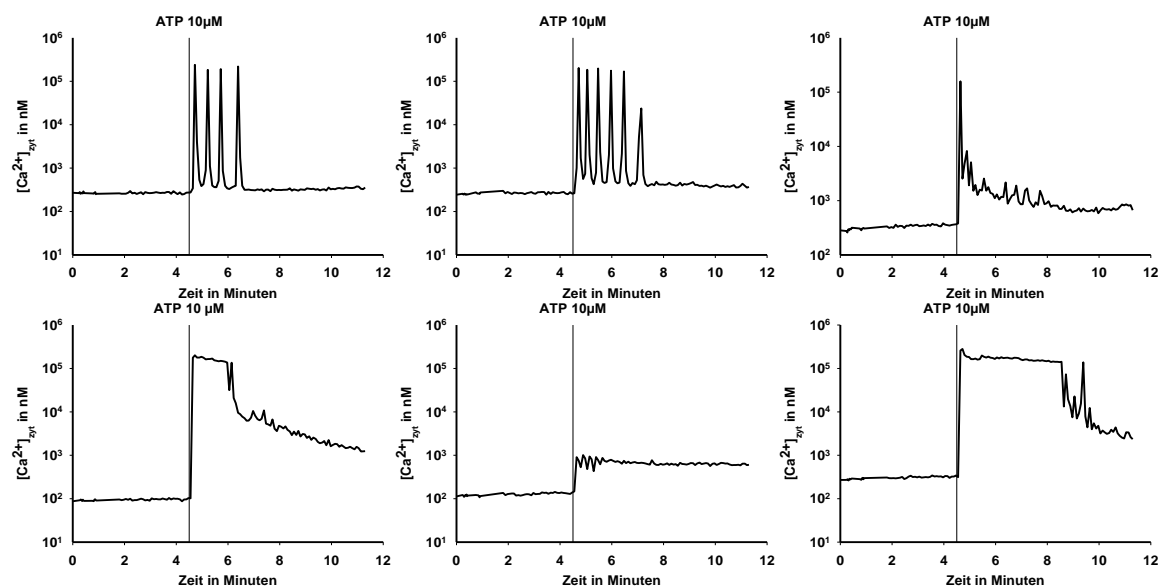


Abbildung 4-20: Transfektion von A549-Zellen mit nicht funktionaler siRNA, Zugabe von 10µM ATP. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  im Verlauf. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

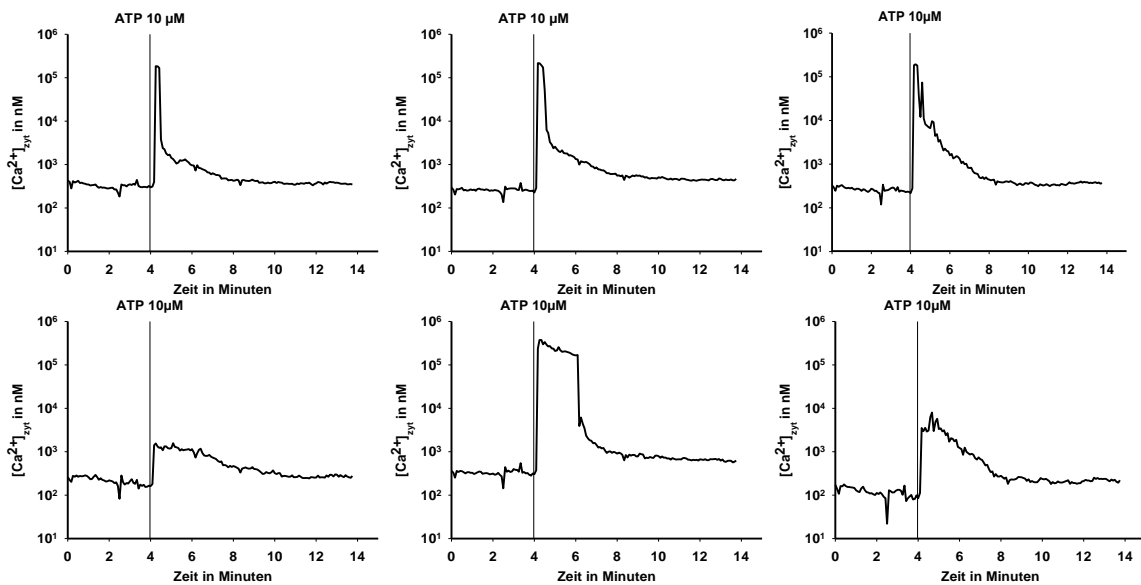


Abbildung 4-21: Transfektion von R3/1-Zellen mit nicht funktionaler siRNA, Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  ATP. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  im Verlauf. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

Die Abbildung 4-20 und Abbildung 4-21 zeigen die Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  von A549- und R3/1-Zellen nach Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  ATP. Die Zellen wurden vor der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit nicht funktionaler siRNA transfiziert. Nach Zugabe von ATP ist in beiden Zelltypen eine deutliche, *peakförmige* Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  zu erkennen.

Auch in mit P2Y<sub>6</sub>-siRNA behandelten A549 und R3/1-Zellen induziert ATP (10  $\mu\text{M}$ ) einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, welcher vergleichbar ist zu dem in unbehandelten oder mit scrambled si-RNA behandelten Zellen. Siehe Abbildung 4-22 und Abbildung 4-23.

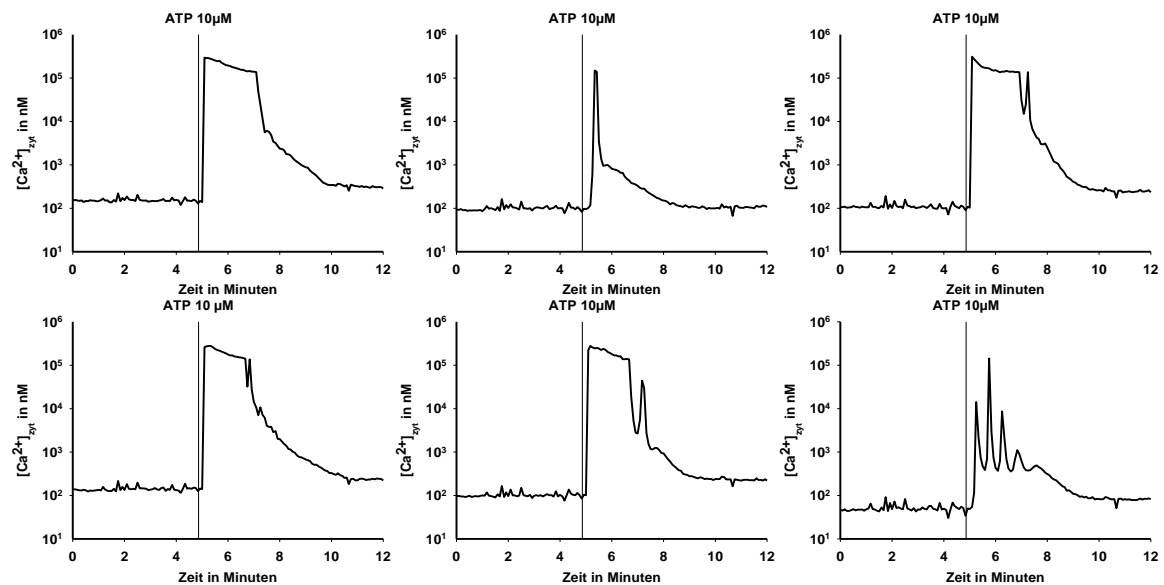


Abbildung 4-22: A549-Zellen, mit P2Y<sub>6</sub>-siRNA transfiziert, Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  ATP. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  im Verlauf. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

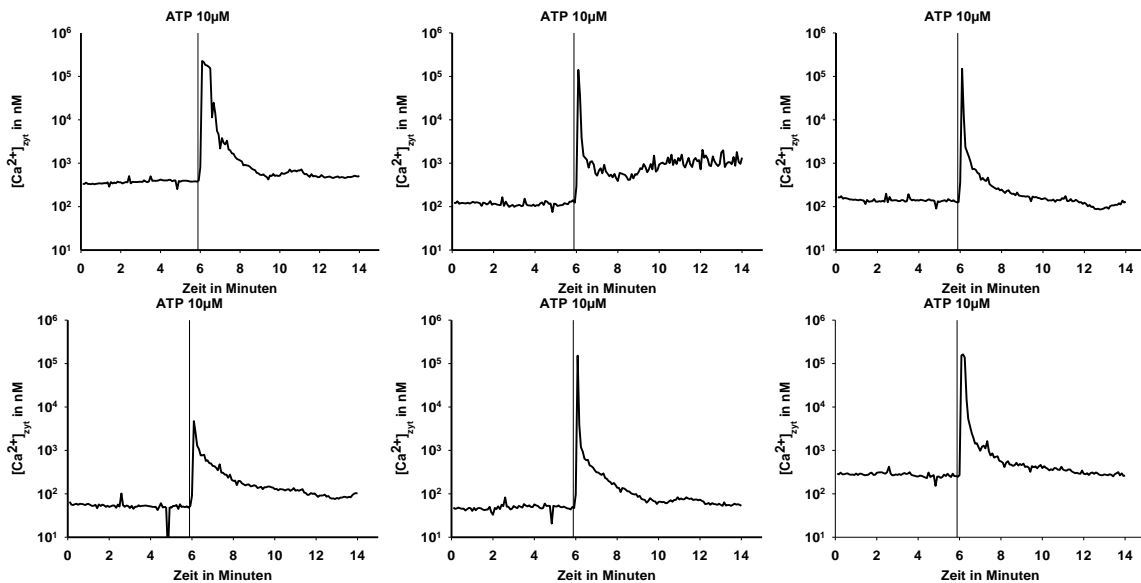


Abbildung 4-23: R3/1-Zellen, mit P2Y<sub>6</sub>-siRNA transfiziert, Zugabe von 10 μM ATP. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{i,n}$  im Verlauf. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

Diese Abbildungen zeigen die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_{i,n}$  von A549- und R3/1-Zellen nach P2Y<sub>6</sub>-siRNA-*knockdown*. Nach Erhöhung der extrazellulären ATP-Konzentration durch Zugabe von 10 μM ATP ist weiterhin ein *peakförmiger* Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{i,n}$  messbar. Es sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar.

Die Beteiligung des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors an der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{i,n}$  von Alveolarepithelzellen bei Veränderung der extrazellulären ATP Konzentration wurde durch eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von P2Y<sub>2</sub>-*knockdown*-Zellen untersucht.

In Abbildung 4-24 und Abbildung 4-25 sind die Ergebnisse dieser Versuche aufgezeigt. Der *knockdown* wurde durch eine Transfektion mit P2Y<sub>2</sub>-siRNA erreicht.

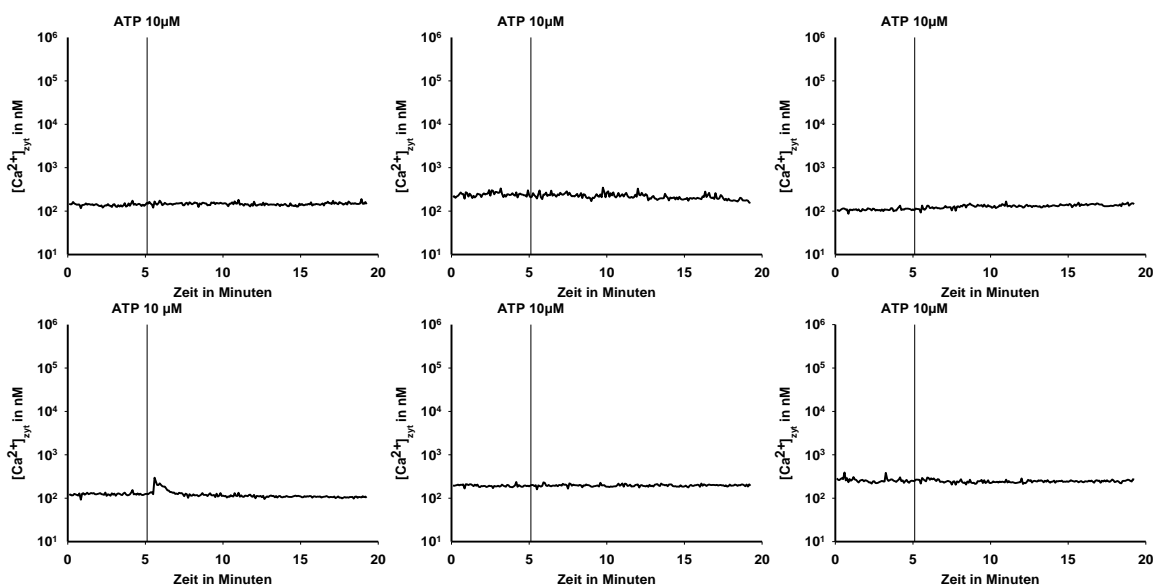


Abbildung 4-24: A549-Zellen, mit P2Y<sub>2</sub>-siRNA transfiziert, Zugabe von 10 μM ATP. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{i,n}$  im Verlauf. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

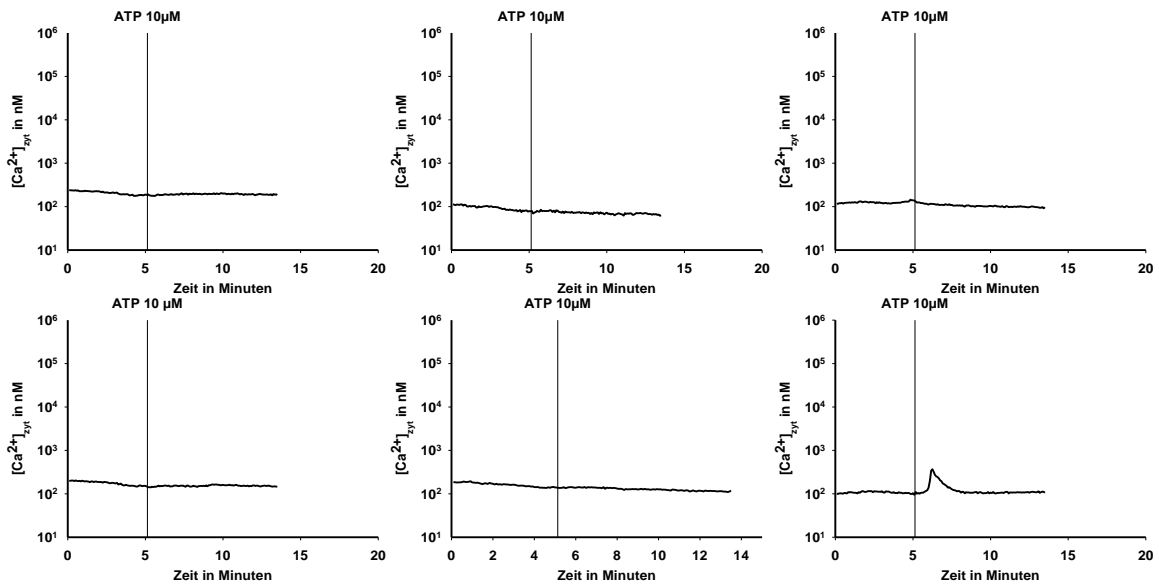


Abbildung 4-25: R3/1-Zellen, mit P2Y<sub>2</sub>-siRNA transfiziert, Zugabe von 10 μM ATP. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> im Verlauf. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

Im Gegensatz dazu blieb in den P2Y<sub>2</sub>-knockdown Zellen das Ca<sup>2+</sup>-Signal nach ATP Applikation aus. Siehe Abbildung 4-25 und Abbildung 4-26.

Es gab in dieser Versuchsreihe vereinzelt Zellen, die weiterhin auf 10 μM ATP in Form des bei unveränderten Zellen zu beobachtenden Anstiegs der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> reagieren oder eine abgeschwächte Reaktion zeigen. Hierbei muss beachtet werden, dass keine 100%ige Transfektionseffizienz erreicht wurde und auch nicht transfizierte Zellen untersucht wurden.

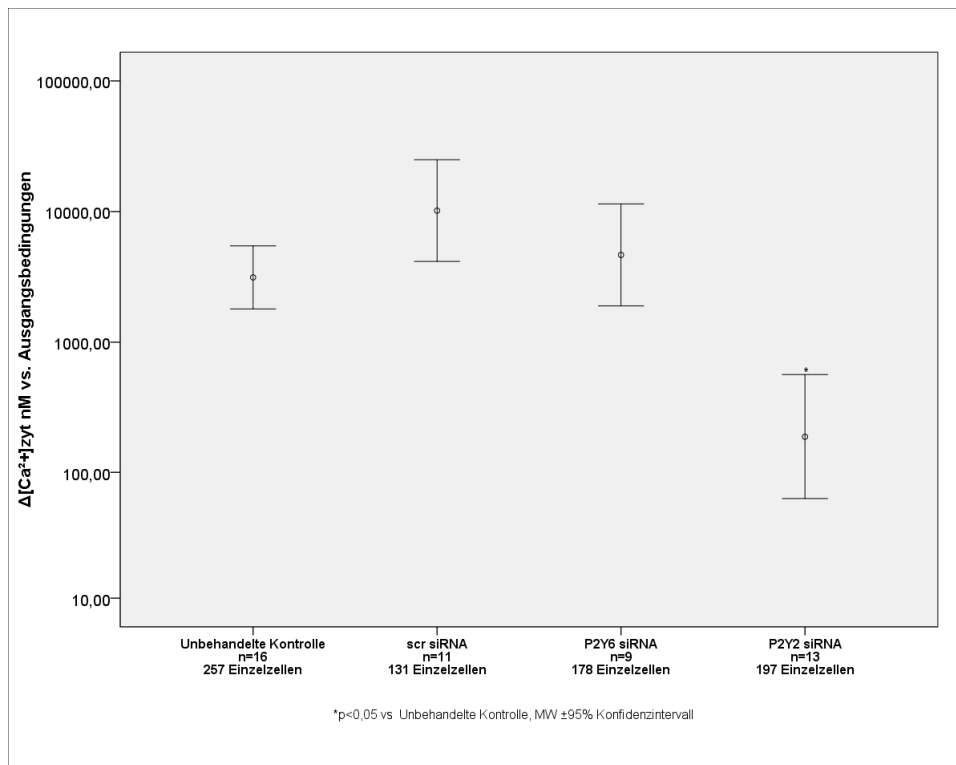


Abbildung 4-26: Anstieg der maximalen  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  in A549-Zellen nach Zugabe von ATP. bei unbehandelten A549-Zellen (Kontrollgruppe), mit nicht funktionaler siRNA transfiziert, nach siRNA *knockdown* des P2Y<sub>6</sub>-Purinrezeptors oder nach siRNA *knockdown* des P2Y<sub>2</sub>-Purinrezeptors. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall des maximalen Anstiegs der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration aller Zellen.

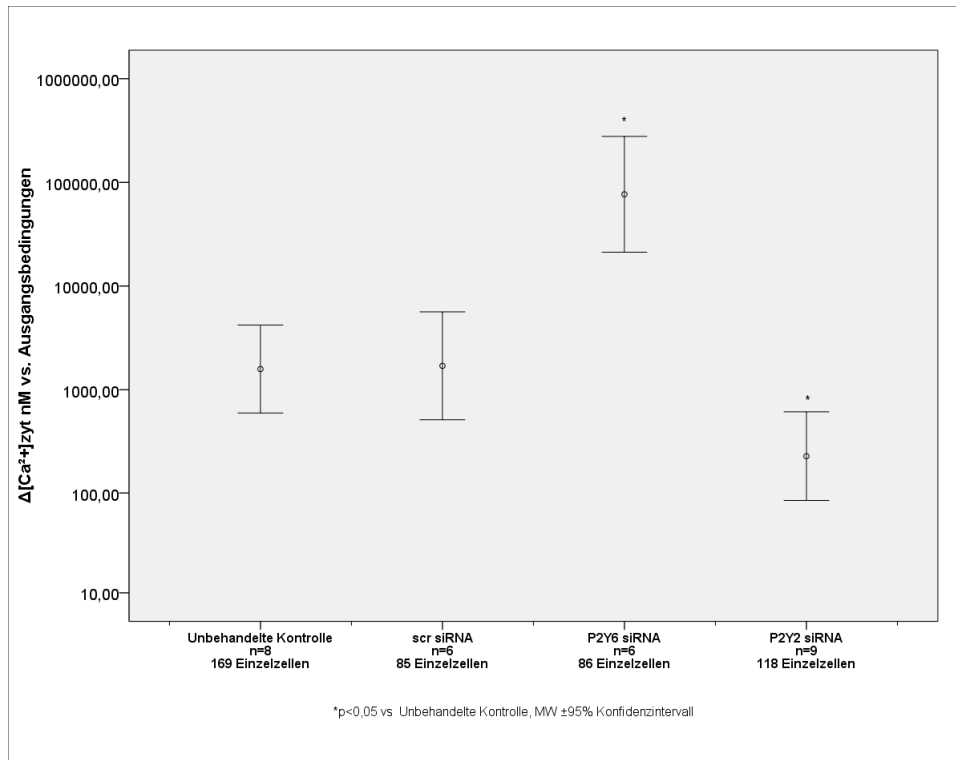


Abbildung 4-27: Anstieg der maximalen zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration von R3/1-Zellen nach Zugabe von 10  $\mu$ M ATP bei unbehandelten R3/1-Zellen (Kontrollgruppe), mit nicht funktionaler siRNA transfiziert, nach siRNA *knockdown* des P2Y<sub>6</sub> Purinrezeptors oder nach siRNA *knockdown* des P2Y<sub>2</sub> Purinrezeptors. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall des maximalen Anstiegs der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration aller Zellen.

Abbildung 4-26 und Abbildung 4-27 zeigen den Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von Alveolarepithelzellen nach Zugabe von ATP. Untersucht wurden Zellen nach siRNA-*knockdown* spezifischer Purinrezeptoren. Die Kontrollgruppen zeigt den Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von unbehandelten Alveolarepithelzellen ( $M_{Max}$  A549: 3133nM) ( $M_{Max}$  R3/1: 1583nM). Eine Transfektion mit nicht funktionaler siRNA bewirkt keine signifikante Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  ( $M_{Max}$  A549: 10169nM) ( $M_{Max}$  R3/1: 1700nM). Ein *knockdown* mit P2Y<sub>6</sub>-siRNA zeigte bei A549-Zellen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ( $M_{Max}$  4657nM). Bei R3/1 Zellen konnte ein signifikant höherer Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ . ( $M_{Max}$  R3/1: 76708nM) gemessen werden. Abbildung 4-26 und Abbildung 4-27 zeigen, dass nach einem siRNA-*knockdown* von P2Y<sub>2</sub>-RNA der zytosolische Calciumanstieg bei Erhöhung der extrazellulären ATP-Konzentration ausbleibt ( $M_{Max}$  A549: 188nM) ( $M_{Max}$  R3/1: 227nM).

#### 4.4. Überprüfung des zytosolischen Signaltransduktionsweges mit Trypsin

Die bisherigen Versuche zeigen, dass ATP über den P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  in A549- und R3/1-Zellen vermittelt.

Der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor ist mit einem G<sub>q</sub>-Protein gekoppelt. Die Aktivierung des Rezeptors führt zur Aktivierung der Phospholipase C  $\beta$ . PIP<sub>2</sub> wird durch die Phospholipase C  $\beta$  in DAG und IP<sub>3</sub> gespalten. IP<sub>3</sub> aktiviert IP<sub>3</sub>-Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums. Die IP<sub>3</sub>-Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums sind ligandenaktivierte Calciumkanäle. Bei Aktivierung öffnen sie sich und führen so zum Ausstrom von Calcium aus dem ER und zu einer Erhöhung der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration.

Die gleiche Signalkaskade wird auch nach proteolytischer Spaltung von extrazellulären Domänen des PAR-2-Rezeptors durch seinen Agonisten Trypsin aktiviert. Der PAR-2-Rezeptor ist mit multiplen, heterotrimeren G-Proteinen gekoppelt. Es kommt zur konsekutiven Aktivierung von Phospholipase C, IP-3 und zur Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  (Uhl *et al.* 2002).

Um zu untersuchen, ob *S. pneumoniae* den P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor direkt beeinflusst oder mit der zytosolischen Signalkaskade interagiert, wurden Alveolarepithelzellen nach Inkubation mit *S. pneumoniae* mit Trypsin stimuliert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen 50nM Trypsin exponiert und die zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration gemessen. In den ersten Versuchen, die mit Trypsin durchgeführt wurden, wurde die Wirkung von Trypsin auf A549-Zellen untersucht. Hierbei wurde weiterhin differenziert, ob der durch Trypsin hervorgerufene Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  aus zytosolischen oder extrazellulären Kompartimenten erfolgt.

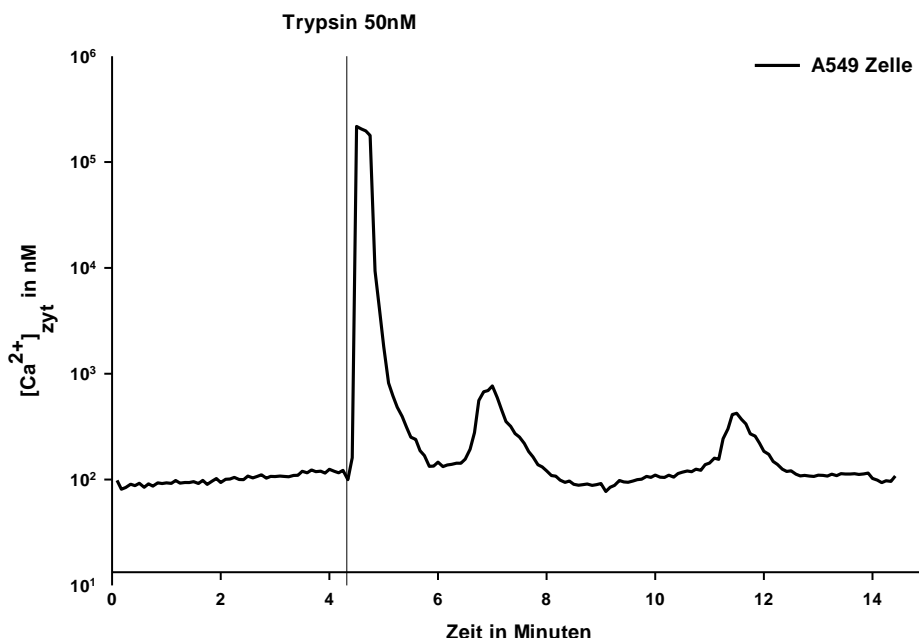


Abbildung 4-28: Änderung der  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  einer repräsentativen A549 Zelle bei Zugaben von 50nM Trypsin. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  im Verlauf.

Abbildung 4-28 zeigt den typischen *peakförmigen* Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  von A549-Zellen bei Zugabe von 50nM Trypsin. Nach dem Erreichen der maximalen zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration

innerhalb weniger Sekunden kommt es nach einer kurzen Plateauphase zu einem Abfall bis auf Ausgangsbedingungen. Im weiteren zeitlichen Verlauf sind oft mehrere kleine *peaks* zu beobachten, die jedoch nie die Höhe des Ausgangs*peaks* erreichen.

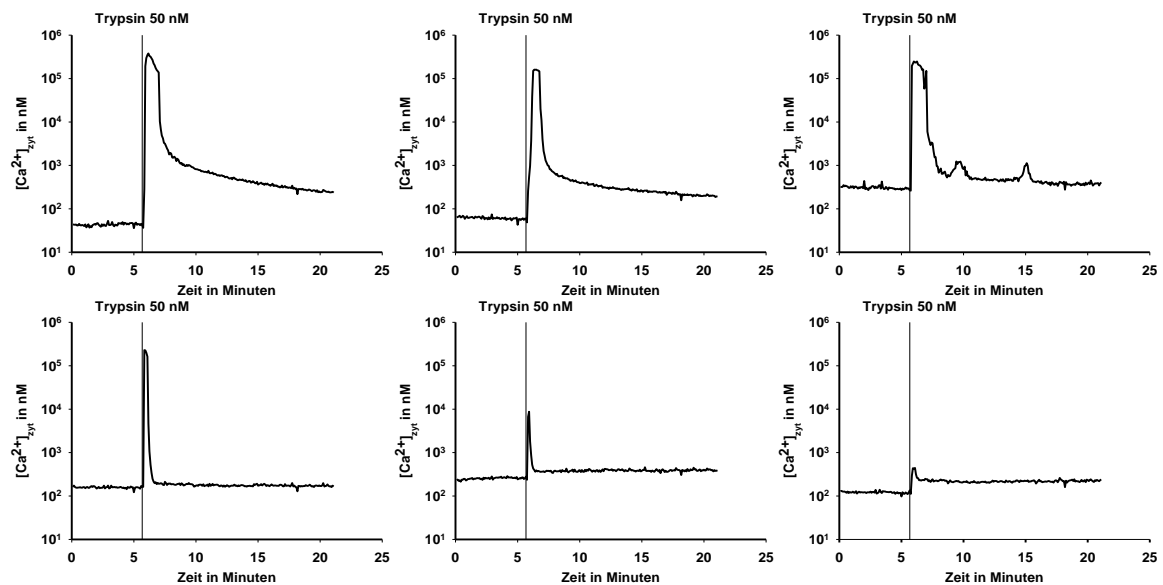


Abbildung 4-29: A549-Zellen bei Zugabe von 50nM Trypsin. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  im zeitlichen Verlauf. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

In Abbildung 4-29 ist die Zunahme der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von A549-Zellen nach Zugabe von Trypsin 50nM in Form eines Liniendiagrammes graphisch dargestellt. Die ersten sechs Minuten wurden die Ausgangsbedingungen aufgezeichnet ( $[Ca^{2+}]_{zyt}$  ohne Zugabe von Substanzen). Bei fast allen Zellen kommt es innerhalb weniger Sekunden nach Zugabe zu einer plötzlichen, *peakförmigen* Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ . Die Höhe (Ausmaß der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration) und Breite (Zeitdauer) der Amplitude variiert im Vergleich zwischen den Zellen stark. Innerhalb der nächsten 2 bis 20 Minuten kommt es in allen Zellen zu einem deutlichen Abfall der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ . Es pendelt sich eine  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  in Höhe des Ausgangsniveaus oder leicht erhöht davon ein. Einige Zellen zeigen im weiteren zeitlichen Verlauf noch mehrere kleine Amplituden.

Um differenzieren zu können, ob es sich bei dem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  in A549-Zellen um eine  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern handelt oder ob ein Einstrom von außerhalb der Zellen stattfindet, wurden Versuche in calciumfreier Umgebung sowie nach Behandlung der Zellen mit Thapsigargin durchgeführt.



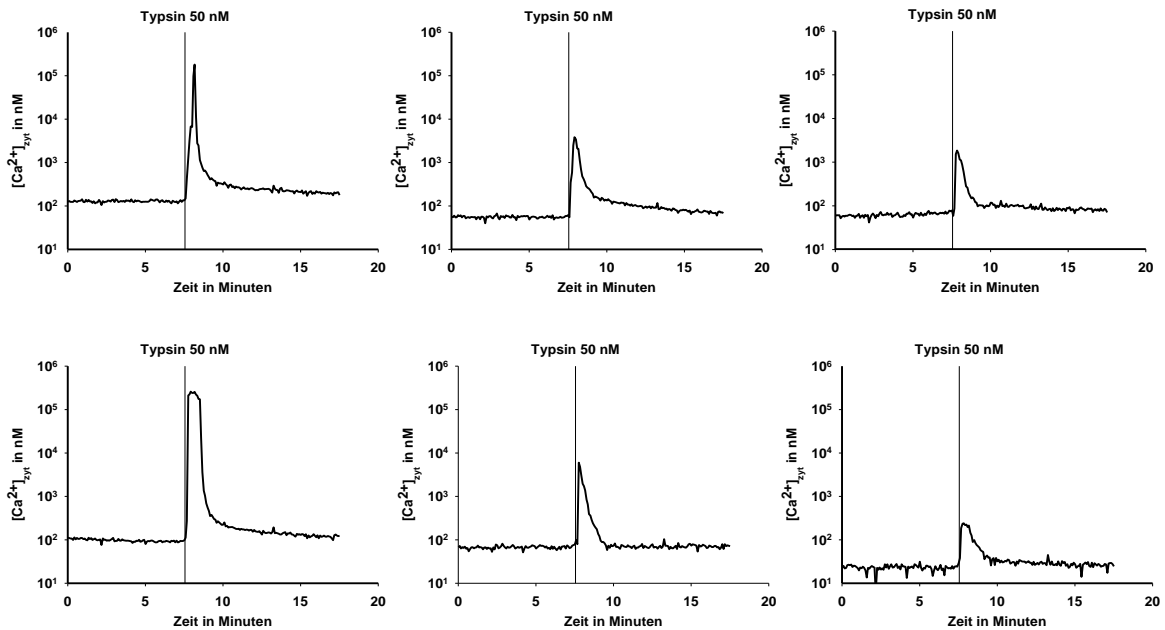


Abbildung 4-30: A549-Zellen in extrazellulär  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  bei Zugabe von 50nM Trypsin. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

In Abbildung 4-30 ist die Zunahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  von A549-Zellen nach Gabe von 50nM Trypsin in Form eines Liniendiagrammes graphisch dargestellt. Die Zellen befinden sich in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem HEPES-Puffer. Die ersten 7,5 Minuten wurden die Ausgangsbedingungen aufgezeichnet. Bei fast allen Zellen kommt es innerhalb weniger Sekunden nach Zugabe von Trypsin zu einer plötzlichen, *peakförmigen* Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ . Die Höhe (Ausmaß der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration) und Breite (Zeitdauer) der Amplitude variiert im Vergleich zwischen den Zellen stark. Innerhalb der nächsten Minuten kommt es in allen Zellen zu einem deutlichen Abfall der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ . Es pendelt sich eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Höhe des Ausgangsniveaus oder oberhalb davon ein. Die maximale  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  zeigt im Vergleich zu Standard-Versuchsbedingungen (in calciumhaltigem HEPES-Puffer) keine signifikanten Unterschiede.

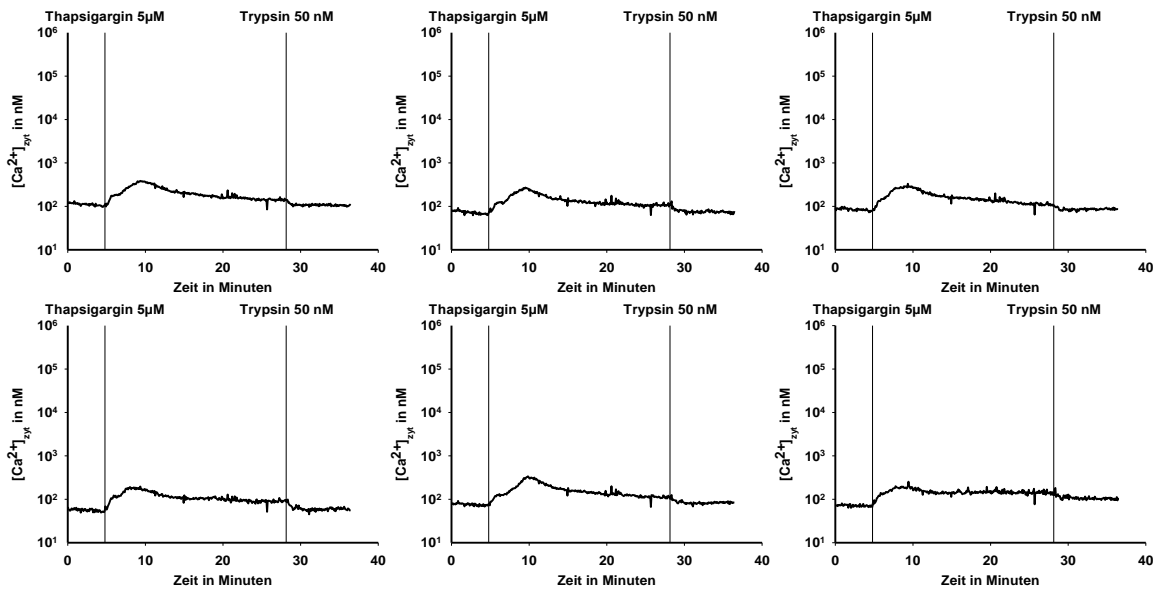
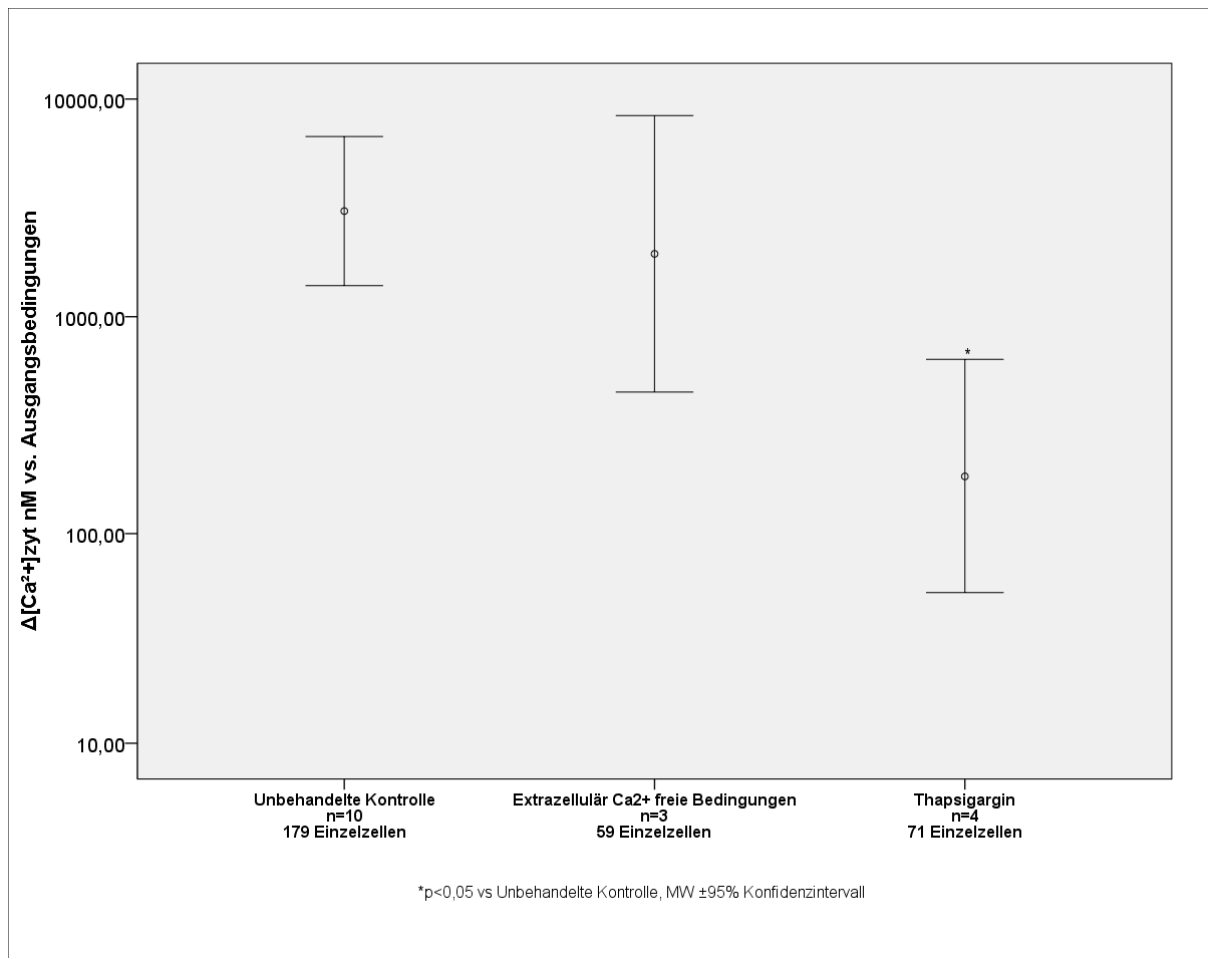


Abbildung 4-31: A549-Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mit 5  $\mu$ M Thapsigargin inkubiert. Bei Wiedererreichen stabiler Ausgangsbedingungen erfolgte die Gabe von 50 nM Trypsin. Aufgezeichnet wurde die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  im zeitlichen Verlauf. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

In Abbildung 4-31 ist ein Versuch dargestellt, bei dem nach kurzer Aufzeichnung der Ausgangsbedingungen die Zellen mit 5  $\mu$ M Thapsigargin behandelt wurden. Ein plötzlicher Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  kann als Entleerung der  $Ca^{2+}$ -Speicher des ER erklärt werden. Nach Wiedererlangen stabiler „neuer“ Ausgangsbedingungen wurde mit 50 nM Trypsin stimuliert, und die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  gemessen. Es kommt hier zu keinem signifikanten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ .



**Abbildung 4-32: Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  in A549-Zellen nach Zugabe von 50nM Trypsin. Die Versuche fanden unter Standardbedingungen statt, in extrazellulär  $Ca^{2+}$ -freier Umgebung oder nach Vorbehandlung der Zellen mit Thapsigargin. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall des maximalen Anstiegs der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen aller Zellen.**

Wie auch nach ATP Zugabe kommt es in A-549-Zellen nach Applikation von Trypsin 50nM zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  ( $M_{Max}$ : 3058nM). Eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  findet auch in calciumfreier Umgebung statt ( $M_{Max}$ : 1945nM). Eine Calcium-Depletion des endoplasmatischen Retikulums durch Thapsigargin bewirkt eine Inhibition des Trypsin vermittelten Anstiegs der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  ( $M_{Max}$ : 184nM). Diese Versuchsgruppe unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe.

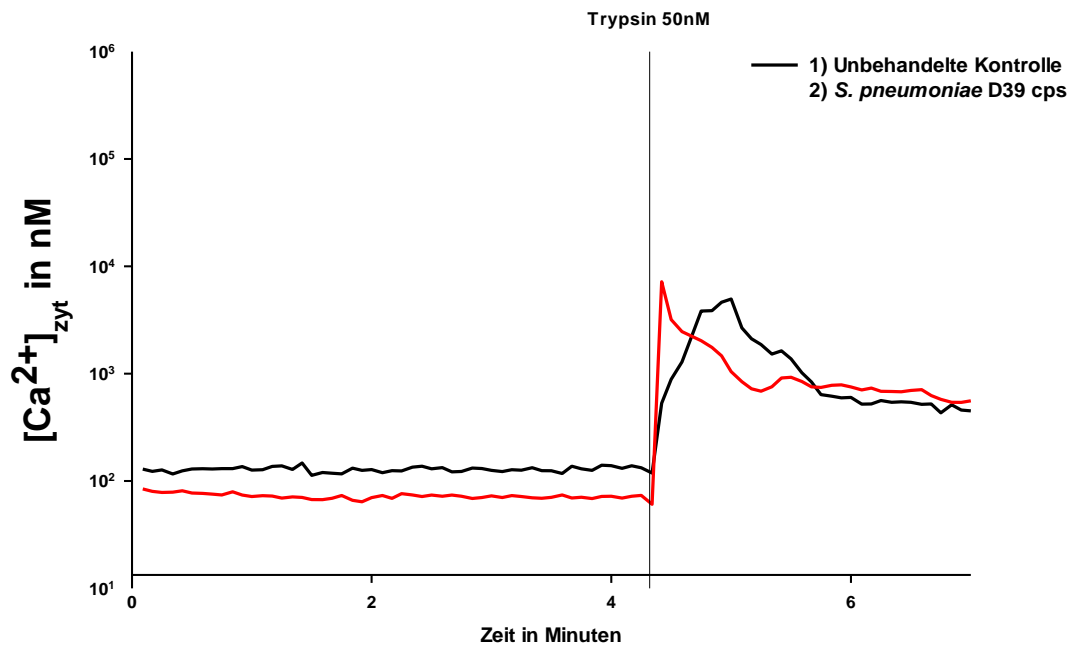


Abbildung 4-33: Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von A549-Zellen, nach Gabe von 50nM Trypsin 1) Kontrollgruppe. 2) Zweistündige Inkubation mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta$ cps vor Versuchsbeginn. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Zelle.

Abbildung 4-33 zeigt das Liniendiagramm zweier repräsentativer A549-Zellen. Dargestellt ist die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  im zeitlichen Verlauf. Die ersten vier Minuten wurden die Ausgangsbedingungen aufgezeichnet. Versuchsgruppe (1) in Abbildung 4-33 zeigt die für A549-Zellen typische, *peakförmige* Zunahme der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  bei Zugabe von 50nM Trypsin. In Versuchsgruppe (2) wurden die Zellen vor Zugabe des Agonisten Trypsin zwei Stunden mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta$ cps inkubiert. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen.

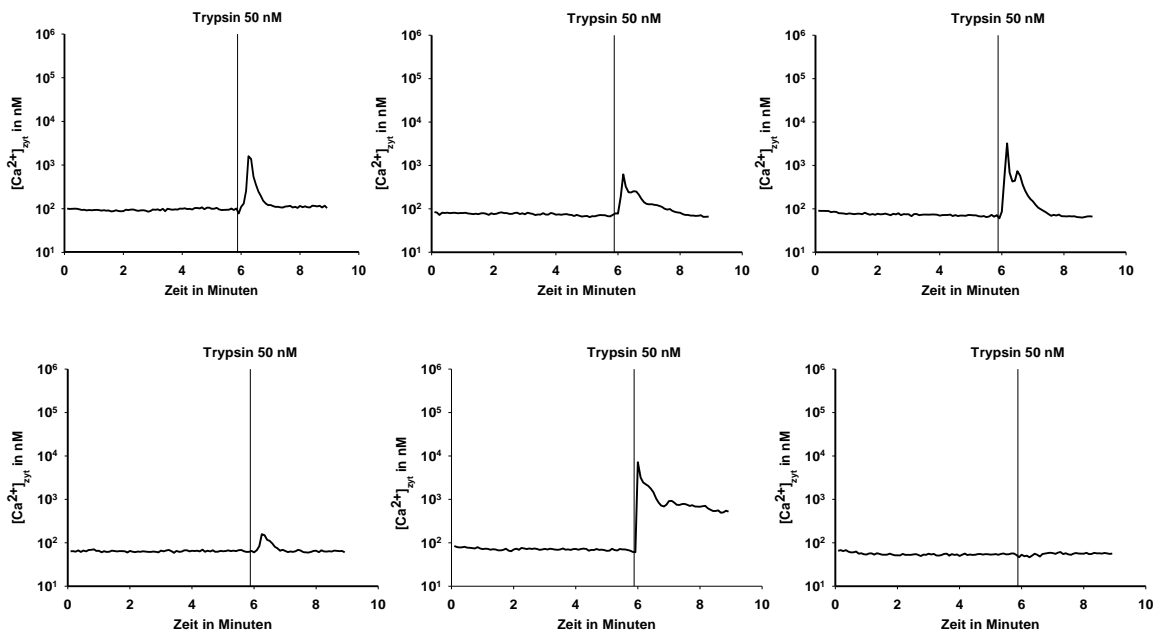
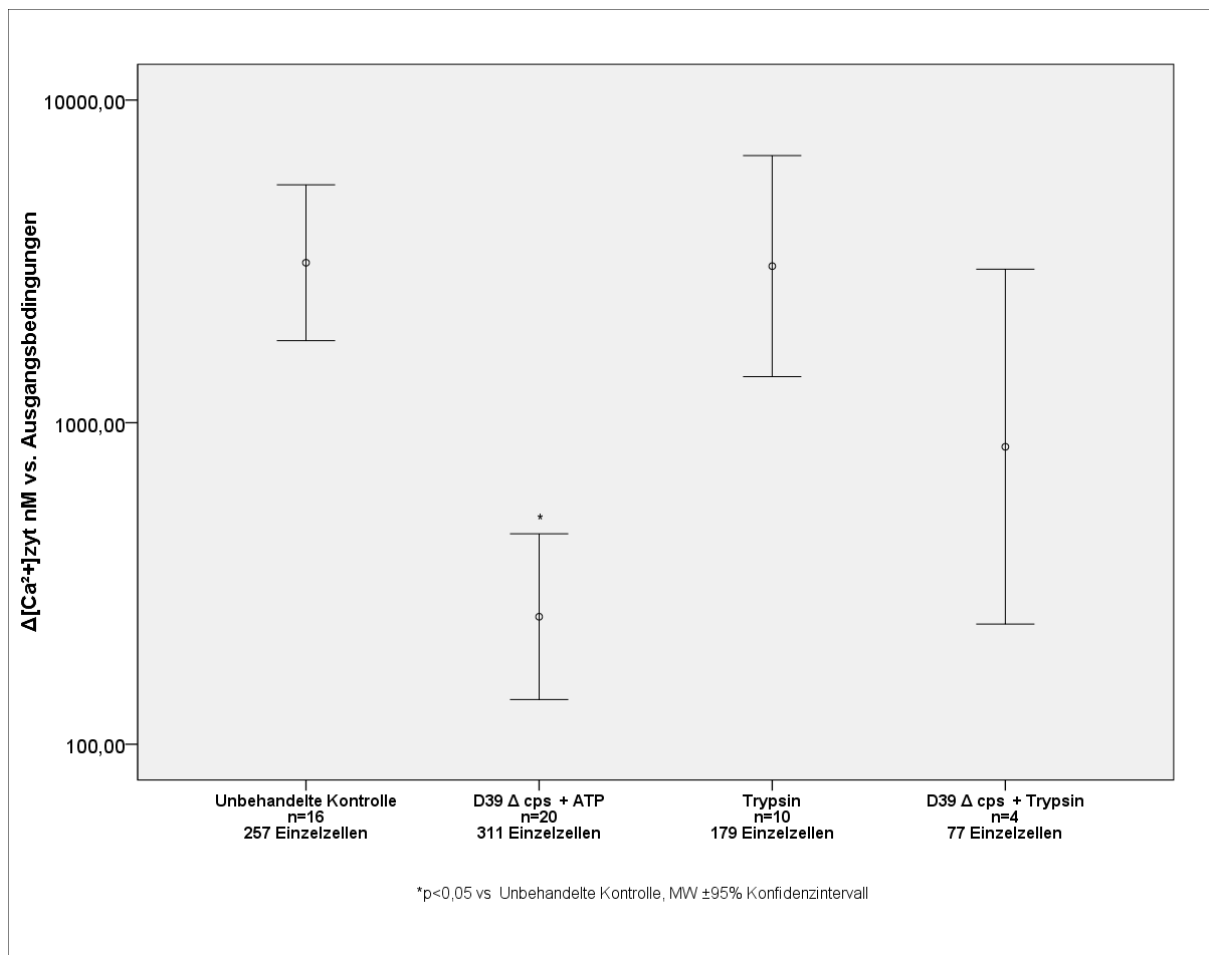


Abbildung 4-34: Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von A549-Zellen nach Zugabe von Trypsin. Die Zellen wurden vor Zugabe des Agonisten zwei Stunden mit *S. pneumoniae* (D39  $\Delta$ cps) inkubiert. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

In Abbildung 4-34 ist die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von A549-Zellen nach Gabe von 50nM Trypsin in Form eines Liniendiagrammes graphisch dargestellt. Die Zellen wurden vor Versuchsbeginn zwei Stunden mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta$ cps im Brutschrank inkubiert.

Nach sechsminütiger Aufzeichnung der Ausgangsbedingungen wurde Trypsin zu den Zellen gegeben. Bei fast allen Zellen kommt es innerhalb weniger Sekunden nach Zugabe zu einer plötzlichen, *peakförmigen* Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ . Die Höhe (Ausmaß der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration) und Breite (Zeitdauer) der Amplitude variiert im Vergleich zwischen den Zellen stark.

Innerhalb der nächsten Minuten kommt es in allen Zellen zu einem deutlichen Abfall der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ . Es pendelt sich ein stabiles  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Niveau, etwa auf Höhe der Ausgangswerte bzw. leicht darüber ein.



**Abbildung 4-35: Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  in A549-Zellen nach Zugabe von 10 $\mu$  ATP bei den ersten beiden Versuchsgruppen sowie 50nM Trypsin bei den anderen beiden Versuchsgruppen. Bei der unbehandelten Kontrolle handelt es sich um den Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von A549-Zellen nach Zugabe des Agonisten ATP. In der Versuchsgruppe D39  $\Delta$ cps wurden die Zellen vor Versuchsbeginn für zweistunden mit *S. pneumoniae* Inkubiert. In der Versuchsgruppe Trypsin wurde 50nM Trypsin zu unbehandelten A549-Zellen gegeben. In der Versuchsgruppe D39  $\Delta$ cps + Trypsin erfolgte eine zweistündige Inkubation mit *S. pneumoniae* vor Versuchsbeginn. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall des maximalen Anstiegs der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration aller Zellen.**

In der unbehandelten Kontrollgruppe sehen wir A-549-Zellen nach Applikation von ATP 10 $\mu$ M ( $M_{Max}$ : 3133nM). Wie schon gezeigt, kann eine vorherige Inkubation mit *S. pneumoniae* den Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  bei Zugabe von 10 $\mu$ M ATP signifikant inhibieren ( $M_{Max}$ : 249nM). Dies ist bei der Verwendung von Trypsin unter gleichen Versuchsbedingungen nicht der Fall. In der Kontrollgruppe messen wir nach Applikation von 50nM Trypsin einen deutlichen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  ( $M_{Max}$  3058nM). Eine Vorinkubation mit *S. pneumoniae* (D39  $\Delta$ cps + Trypsin) kann einen Trypsin vermittelten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  nicht signifikant beeinflussen ( $M_{Max}$  842nM). Es unterscheidet sich Versuchsgruppe zwei (D39  $\Delta$ cps + ATP 10 $\mu$ M) signifikant von der Kontrollgruppe für ATP und Trypsin. Versuchsgruppe vier (D39  $\Delta$ cps + Trypsin) zeigt keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Versuchsgruppen.

#### 4.5. Einfluss der Temperatur auf die Fähigkeit von *S. pneumoniae* die ATP abhängige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ zu beeinflussen

Die Temperatur spielt bei der Internalisierung von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren (Tulapurkar *et al.* 2005) eine wichtige Rolle. Eine Abnahme der Temperatur auf 20°C führt auch zu einer signifikanten Abnahme der Internalisierung von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren.

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, welchen Einfluss die Temperatur auf die Fähigkeit von *S. pneumoniae* hat, die ATP abhängige Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  zu beeinflussen.

Es wurde eine zweistündige Inkubation von Alveolarepithelzellen mit *S. pneumoniae* bei Raumtemperatur (20°C) durchgeführt. Im Anschluss wurde die ATP-abhängige Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  unter dem Fluoreszenzmikroskop gemessen. Es wurde außerdem eine Kontrollgruppe unter gleichen Bedingungen, ohne Zugabe von *S. pneumoniae* untersucht.

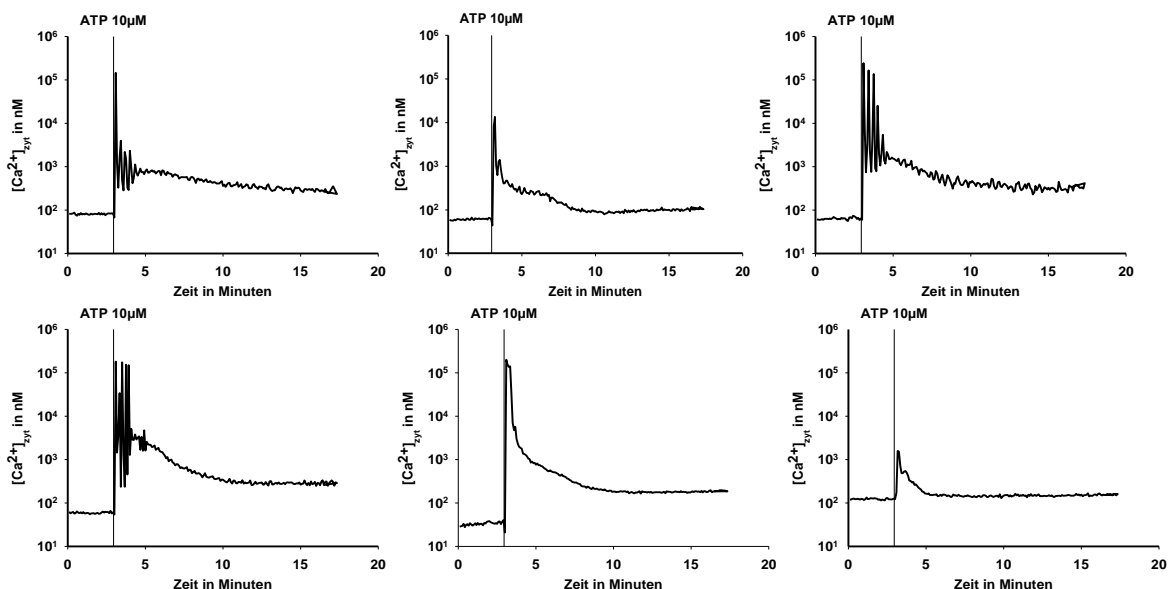


Abbildung 4-36: Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von A549-Zellen bei Zugabe von 10µM ATP. Die Zellen wurden 2.5 Std. vor Versuchsbeginn aus dem Brutschrank genommen und bei 20°C belassen. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

In Abbildung 4-36 ist die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von A549-Zellen, nach Applikation von ATP 10µM in Form eines Liniendiagrammes, graphisch dargestellt. Die Zellen wurden vor Versuchsbeginn zweieinhalb Stunden bei Raumtemperatur belassen.

Nach dreiminütiger Aufzeichnung der Ausgangsbedingungen wurde ATP zu den Zellen gegeben. Bei fast allen Zellen kommt es innerhalb weniger Sekunden nach Zugabe des Agonisten zu einer plötzlichen, *peakförmigen* Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ . Das Ausmaß und die Dauer der zytosolischen  $Ca^{2+}$  Erhöhung variiert im Vergleich zwischen den Zellen stark. Einige Zellen zeigen im weiteren zeitlichen Verlauf kleinere Oszillationen. Innerhalb der nächsten Minuten kommt es in allen Zellen zu einem deutlichen Abfall der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ . Es pendeln sich neue Ausgangsbedingungen in etwa auf Höhe des alten Niveaus ein.

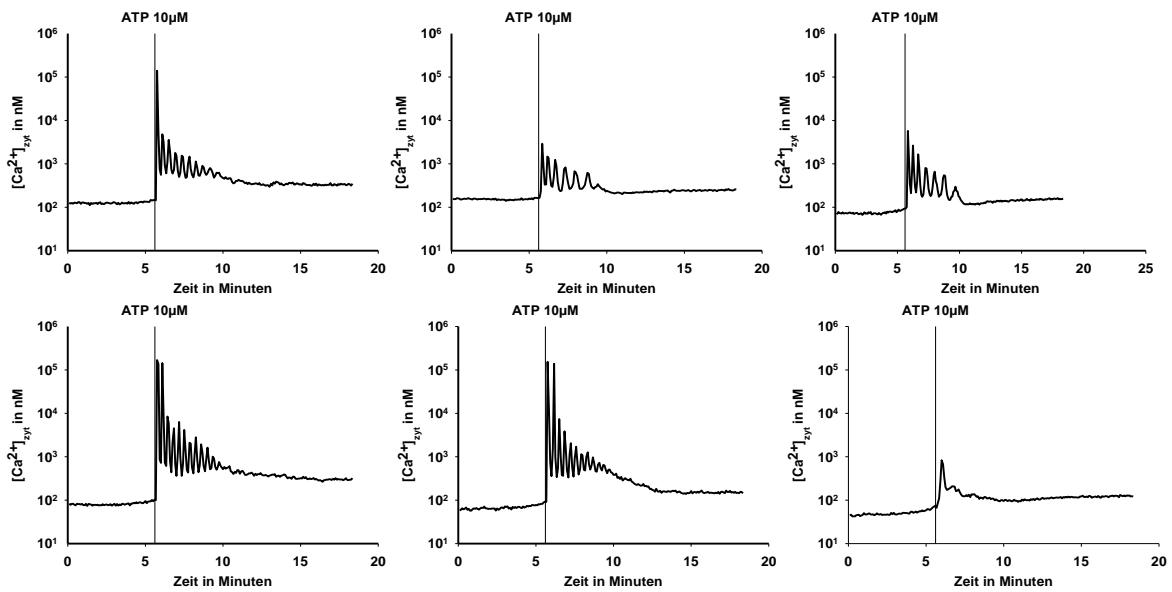


Abbildung 4-37: Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von A549-Zellen bei Zugabe von  $10\mu M$  ATP. Die Zellen wurden 2.5 Std. vor Versuchsbeginn aus dem Brutschrank genommen und bei  $20^{\circ}C$  für 2 Std. mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta cps$  inkubiert. Gezeigt sind exemplarisch sechs Einzelzellen eines Versuches.

Nach ca. fünfminütiger Aufzeichnung der Ausgangsbedingungen ist bei ATP Zugabe in fast allen Zellen ein plötzlicher Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  in Form eines Peaks messbar. Nach dem initialen Peak kommt es in allen Zellen zu einem deutlichen Abfall der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ . Einige Zellen zeigen im weiteren Verlauf multiple Oszillationen, deren Amplitude langsam kleiner wird.



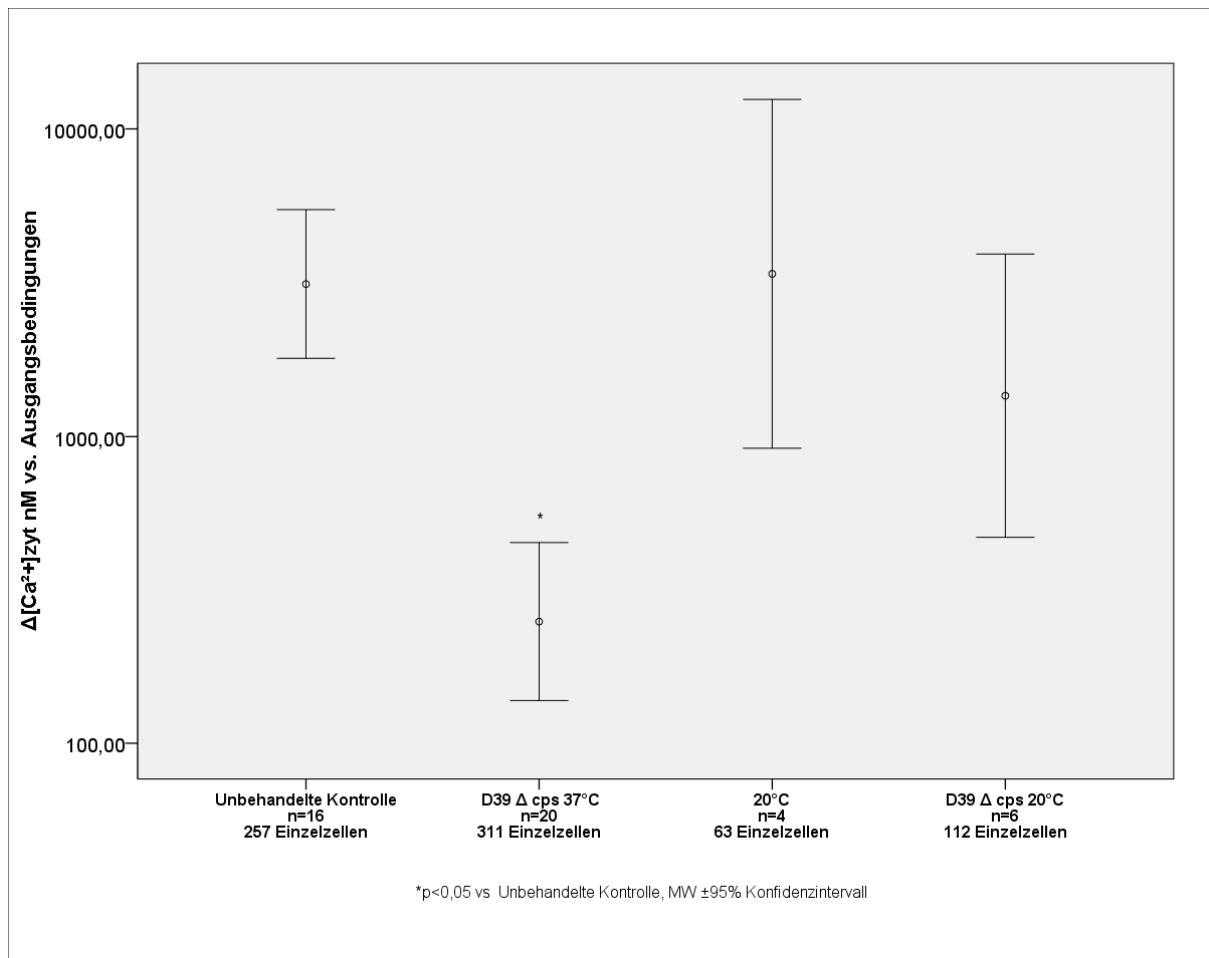


Abbildung 4-38: 1) A549-Zellen nach Stimulation mit 10 $\mu$ M ATP 2) A549-Zellen wurden vor Applikation von 10 $\mu$ M ATP zwei Stunden mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta$ cps bei 37° C inkubiert. 3) A549-Zellen wurden vor Stimulation mit 10 $\mu$ M ATP zwei Stunden bei 20° C belassen. 4) A549-Zellen wurden vor Stimulation mit 10 $\mu$ M ATP zwei Stunden mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta$ cps bei 20°C inkubiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall des maximalen Anstiegs der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aller Zellen.

Die unbehandelte Kontrolle in Abbildung 4-38 zeigt den Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von A549-Zellen auf ATP ( $M_{Max}$ : 3133nM). Eine vorrangegangene zweistündige Inkubation mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta$ cps bei 37°C kann den ATP abhängigen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  in Alveolarepithelzellen inhibieren ( $M_{Max}$ : 249,8nM). Diese Versuchsgruppe (D39  $\Delta$ cps 37°C) unterscheidet sich signifikant von der Kontrollgruppe bei 37°C und 20°C sowie von der Interventionsgruppe bei 20°C (D39  $\Delta$ cps 20°C). A549-Zellen, die 2 Stunden einer Temperatur von 20° C ausgesetzt sind, reagieren weiterhin auf 10 $\mu$ M ATP mit einem Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ( $M_{Max}$ : 3381nM). Findet die Inkubation mit *S. pneumoniae* D39  $\Delta$ cps bei 20°C statt, ist keine signifikante Inhibition des ATP abhängigen zytosolischen Calciumanstiegs messbar ( $M_{Max}$ : 1358nM). Die Versuchsgruppe D39  $\Delta$ cps 20°C zeigt keine signifikanten Unterschiede zur allgemeinen Kontrollgruppe bei 37°C und zur spezifischen Kontrollgruppe bei 20°C.

#### 4.6. Konfokalmikroskopische Untersuchung von A549-Zellen

Zur besseren Beurteilung der Interaktion zwischen *S. pneumoniae* und dem P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor von Alveolarepithelzellen wurden A549-Zellen mit einem *enhanced-cyano-fluorescent-protein* (ECFP) - P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorkonstrukt transfiziert. Verschiedene Schichtaufnahmen der transfizierten A549-Zellen wurden unter dem Konfokalmikroskop erstellt und die genaue Rezeptorlokalisierung festgestellt. Alle Versuche wurden unter physiologischen Bedingungen in einer Inkubationskammer durchgeführt (37° C, 5% CO<sub>2</sub>).

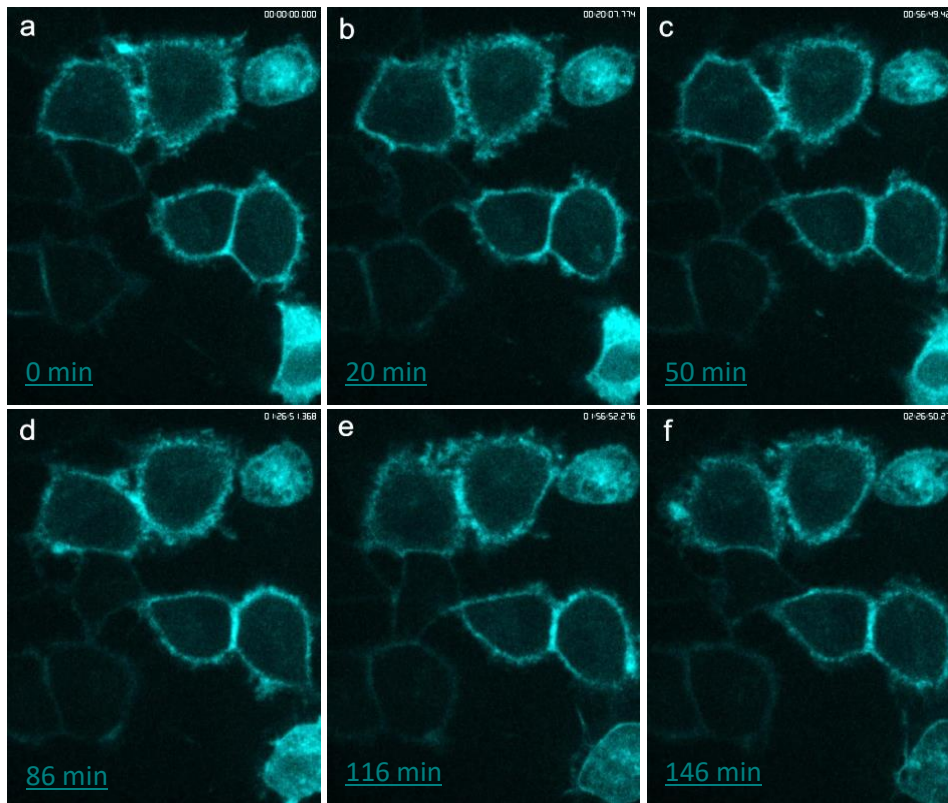
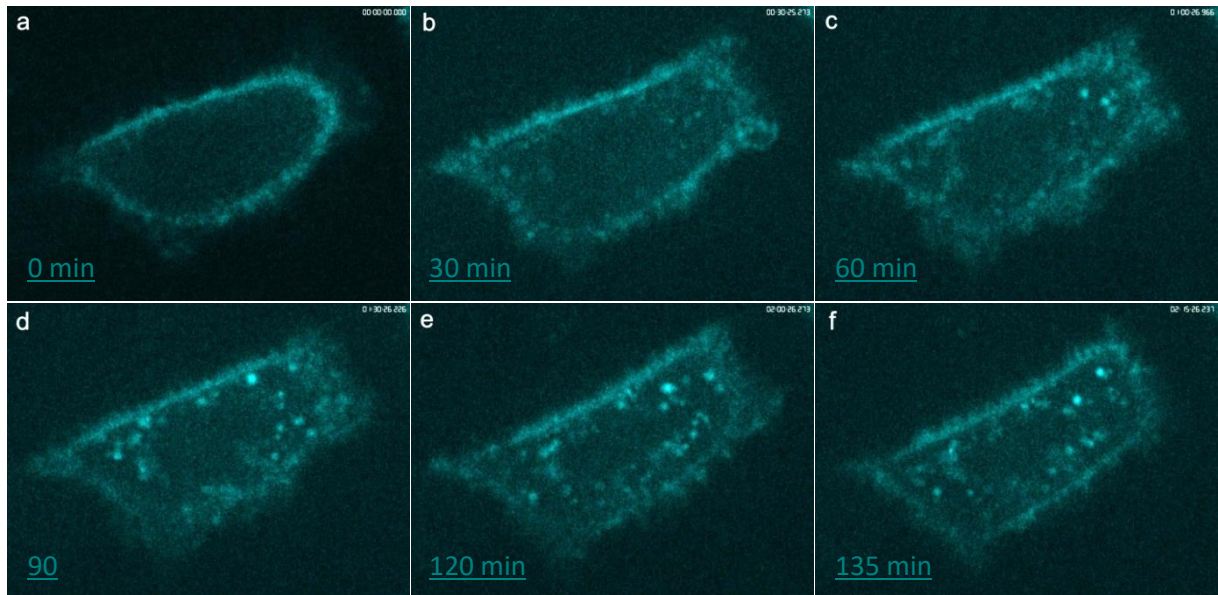


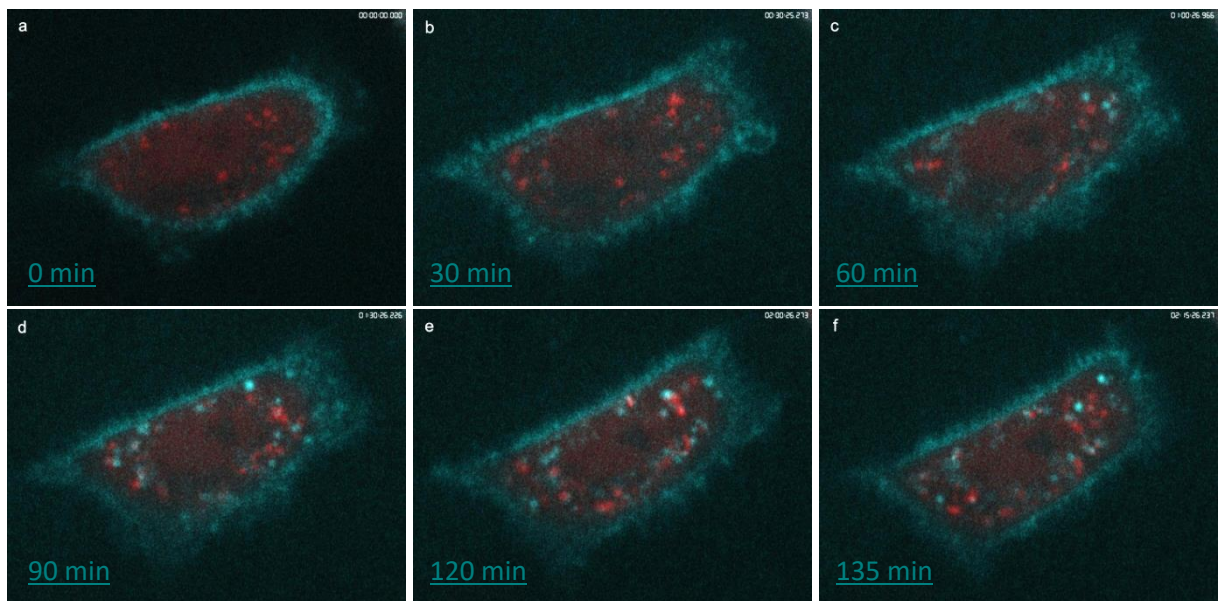
Abbildung 4-39: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von A549-Zellen im Verlauf von ca. 2 ½ Stunden. Die Aufnahmen wurden im Abstand von ca. 30 Minuten angefertigt. Die hier dargestellten Zellen wurden zuvor mit einem ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorkonstrukt transfiziert.

Die konfokalmikroskopischen Untersuchungen von A549-Zellen zeigen, dass der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor in Alveolarepithelzellen hauptsächlich randständig im Bereich der Zellmembran zu finden ist. Einzelne zytoplasmatische Akkumulationen von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren sind in fast allen A549-Zellen vorhanden. In Abbildung 4-39 ist die Lokalisation von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor in A549-Zellen im Verlauf von 2 ½ Stunden zu sehen. Eine Veränderung der P2Y<sub>2</sub>-Lokalisation ins Zytosol ist nicht feststellbar.



**Abbildung 4-40:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer A549-Zelle über ca. 2 ½ Stunden, transfiziert mit einem ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorkonstrukt. Aufnahmen im Abstand von ca. 30 Minuten. Zwischen der Aufnahme A und B erfolgte die Zugabe von *S. pneumoniae* D39 Δcps. Gezeigt ist eine repräsentative Einzelzelle.

Abbildung 4-40 zeigt eine A549-Zelle, die mit ECFP markiertem P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor- transfiziert wurde, im Verlauf von ca. 2 ½ Stunden. Die Lokalisation der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren ist in unbehandelten A549-Zellen (a) vorwiegend randständig. Nach Zugabe von kapseldefizienten *S. pneumoniae* (b) ist im weiteren zeitlichen Verlauf (b-f) eine Akkumulation von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren im Zytosol sichtbar.



**Abbildung 4-41:** zeigt die gleiche konfokalmikroskopische Aufnahme der repräsentativen A549-Zelle, die bereits in Abbildung 4-40 gezeigt wurde. Zusätzlich zu dem randständig lokalisierten ECFP markierten P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor wurde ein zytosolisches mCherry-Konstrukt transfiziert. Zwischen der Aufnahme A und B erfolgte die Zugabe von *S. pneumoniae* D39 Δcps.

Abbildung 4-41: zeigt eine Fokusebene (Aufnahme einer spezifischen Schicht) einer repräsentativen A549-Zelle im Verlauf von ca. 2 ½ Stunden. Die Zelle wurde mit einem ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor transfiziert, welcher initial zum größten Teil randständig lokalisiert ist. Zur besseren Unterscheidung von Zellmembran und Zytosol wurde außerdem ein zytosolisches mCherry-

Plasmid transfiziert. Dieses Plasmid bewirkt die Expression von rot fluoreszierenden, zytosolisch lokalisiertem Protein, einhergehend mit einer Rotfärbung des Zytosols. Damit stellt es einen guten Kontrast zu den cyangefärbten, membranständigen ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren dar. Nach Zugabe von *S. pneumoniae* (b) ist im weiteren zeitlichen Verlauf eine signifikante, progrediente Zunahme zytosolischer Akkumulation von ECFP-markiertem P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor messbar.

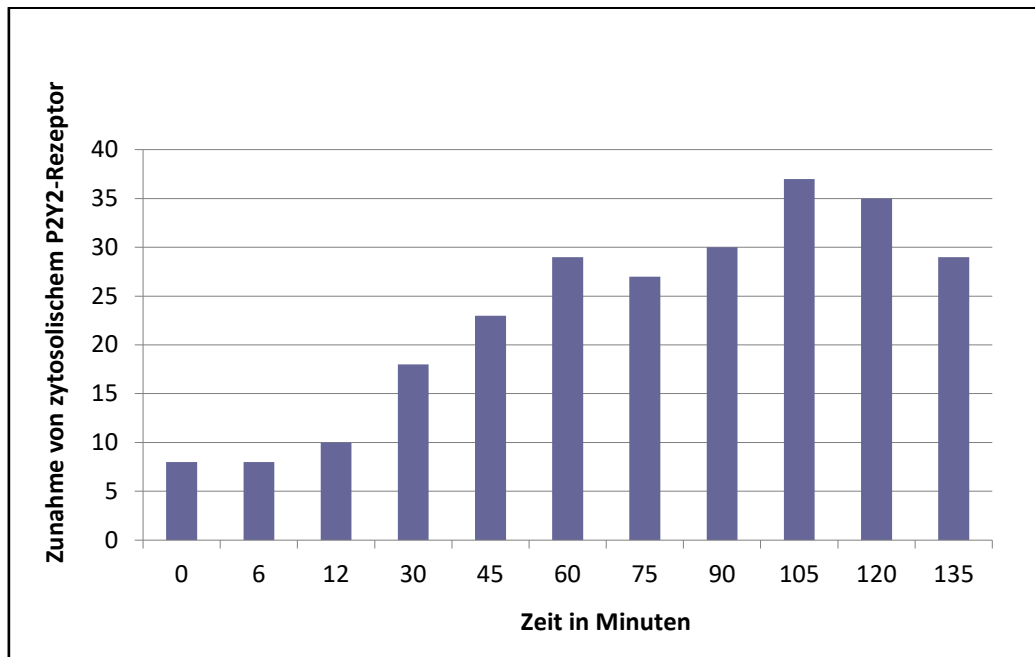


Abbildung 4-42: Zeitlicher Verlauf zytosolischer ECFP markierter P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Akkumulationen der in Abbildung 4-40 und Abbildung 4-41: gezeigten A549-Zelle. Die Zugabe von *S. pneumoniae* erfolgte bei Minute 18. Es handelt sich hierbei um eine repräsentative Einzelzelle.

In Abbildung 4-42: ist der zeitliche Verlauf zytosolischer P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Akkumulationen (*Spots*) in einer repräsentativen A549-Zelle als Balkendiagramm dargestellt. Nach Zugabe von *S. pneumoniae* D39 Δcps bei Minute 18 ist eine signifikante Zunahme zytosolischer *Spots* messbar.

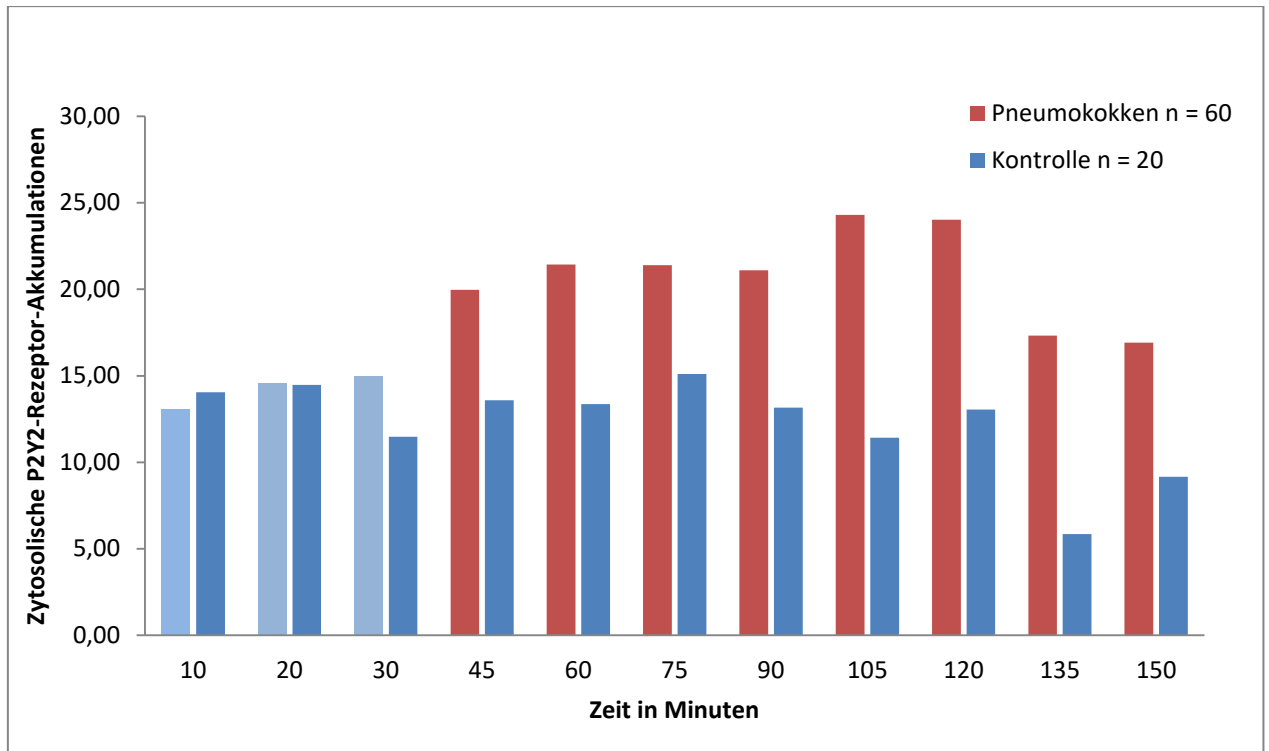


Abbildung 4-43: Die Fluoreszenzintensität von ECFP-markiertem P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor wurde in A549-Zellen unter dem *Spinning-Disc*-Mikroskop im Verlauf von ca. 2 ½ Std bestimmt. Die Zugabe von *S. pneumoniae* D39 Δcps erfolgte nach 20-30 min. Gezeigt sind Mittelwerte der absoluten Anzahl zytosolischer *Spots* aller Zellen.

In Abbildung 4-43 ist die Anzahl zytosolischer ECFP-markierter P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Akkumulationen in A549-Zellen im Verlauf von ca. 2 ½ Stunden aufgetragen. Die hierzu verwendeten Daten stammen aus konfokalmikroskopischen Messungen von 80 Einzelzellen. In jeder der beiden Versuchsgruppen wurden Mittelwerte aller Zellen gebildet. In der Kontrollgruppe kommt es im zeitlichen Verlauf zu keiner signifikanten Änderung zytosolischer P2Y<sub>2</sub> *Spots*.

Die ersten drei Messpunkte der Pneumokokken-Versuchsgruppe stellen Referenzpunkte vor Zugabe von *S. pneumoniae* dar. Nach Zugabe von *S. pneumoniae* kommt es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg von zytosolischen P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Akkumulationen.

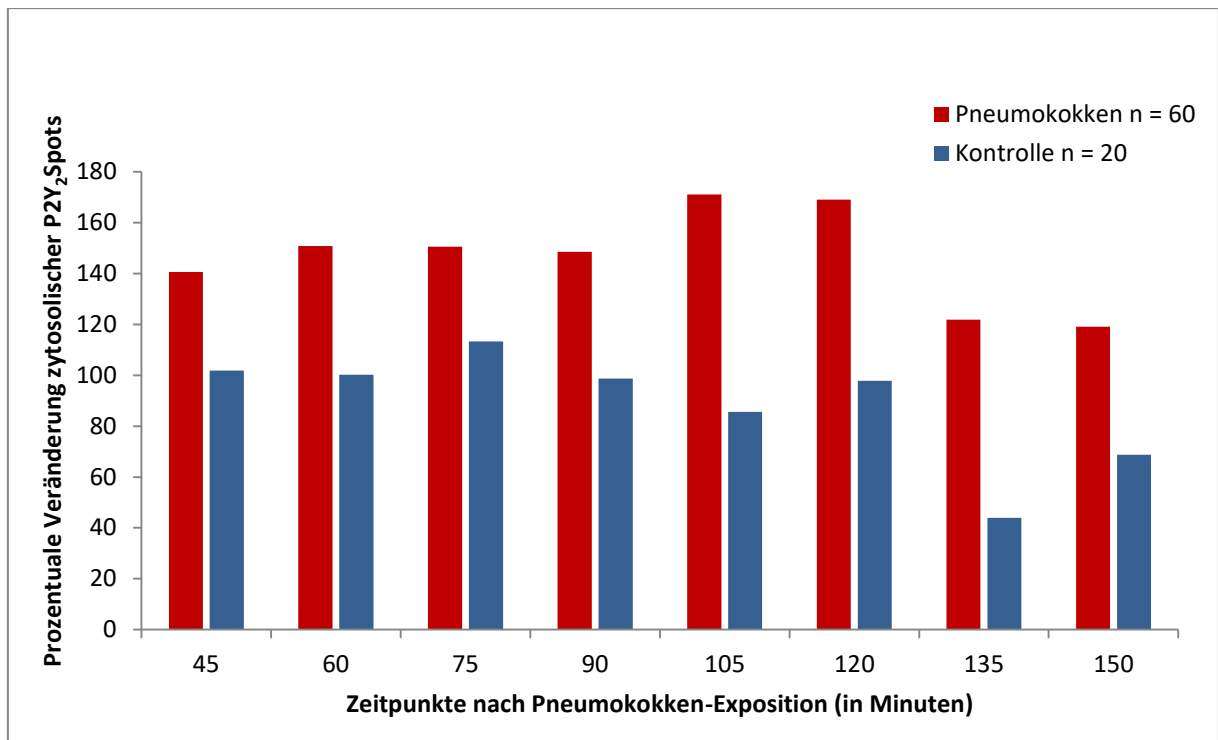
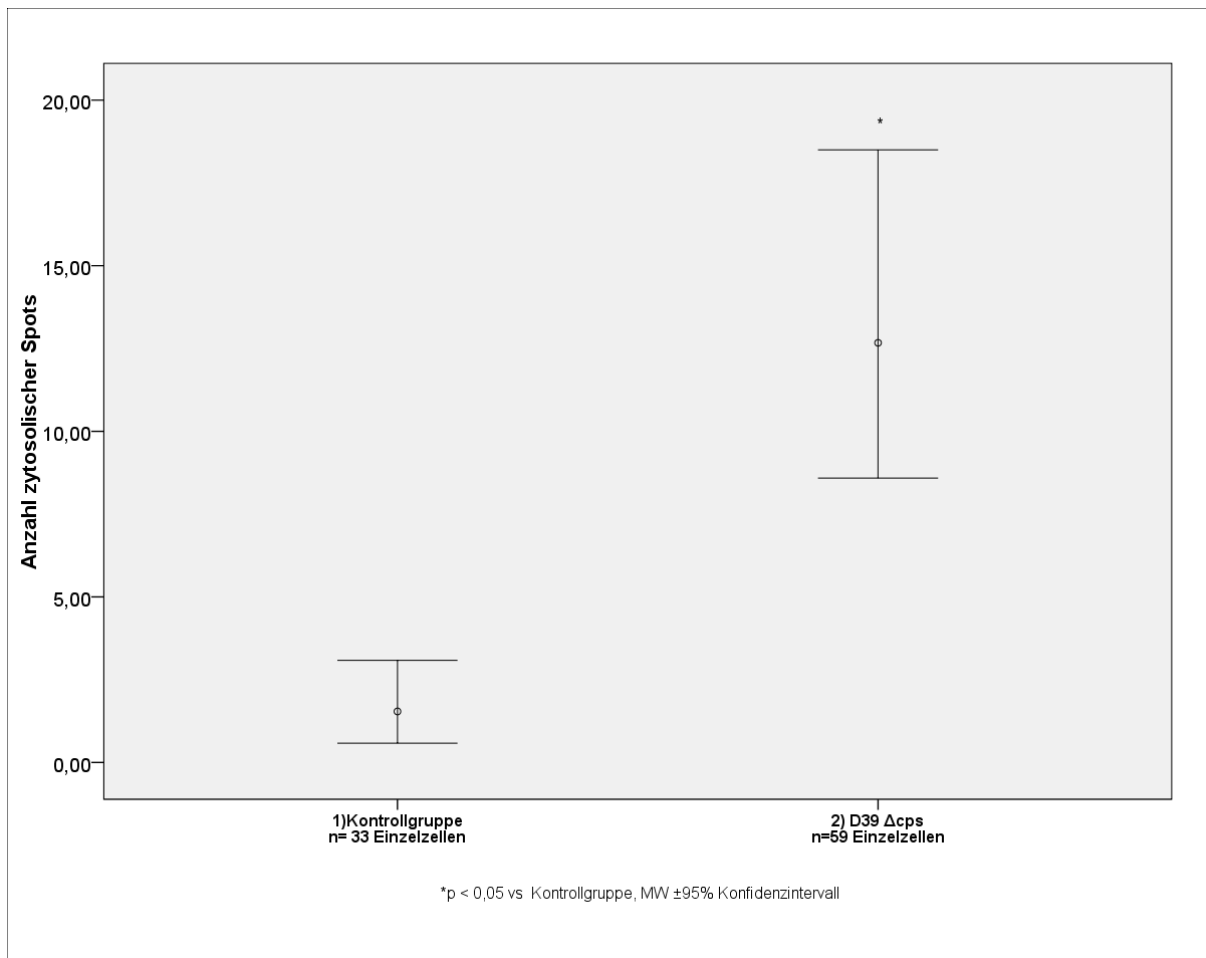


Abbildung 4-44: Prozentuale Veränderung zytosolischer P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Akkumulationen in A549-Zellen im Verlauf von 2 ½ Stunden. Die Zugabe von *S. pneumoniae* D39 Δcps erfolgte zwischen Minute 20 und 30 (hier nicht gezeigt).

In Abbildung 4-44 ist die Prozentuale Zunahme zytosolischer P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Akkumulationen zweier Versuchsgruppen von A549-Zellen dargestellt. Aus den Einzelwerten der ersten zwei bis drei Zeitpunkte vor Bakterienzugabe wurde der Mittelwert errechnet und als Referenz für die Berechnung der prozentualen Veränderung verwendet.

Die Kontrollgruppe (hier in blau dargestellt) zeigt im zeitlichen Verlauf keine signifikante Veränderung in der Anzahl zytosolischer P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren. In der Interventionsgruppe (hier in rot dargestellt) kommt es zu einer signifikanten Zunahme an zytosolischem P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor nach Zugabe von *S. pneumoniae*. Das Maximum ist nach ca. zwei Stunden erreicht.





**Abbildung 4-45: Zunahme zytosolischer ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Akkumulationen im Verlauf von 2 ½ Stunden. 1) unbehandelte A549-Zellen (Kontrollgruppe). 2) Inkubation von A549-Zellen mit *S. pneumoniae* D 39 Δcps. Angegeben sind Mittelwerte sowie das 95%-Konfidenzintervall der maximalen Zunahme zytosolischer ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Akkumulationen aller Zellen der jeweiligen Versuchsgruppe.**

Abbildung 4-45 zeigt die statistische Auswertung aller konfokalmikroskopisch untersuchten A549-Zellen. Die Zellen wurden mit ECFP-markierten P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren und dem Plasmid mCherry transfiziert. Es wurde die Veränderung zytosolischer P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor-Akkumulationen im zeitlichen Verlauf gemessen. Verglichen wurde die Kontrollgruppe (unbehandelte A549-Zellen) (1) mit der Interventionsgruppe (Zugabe von *S. pneumoniae* D39 Δcps) (2). Der Mittelwert der maximalen Zunahme zytosolischer *Spots* aller Zellen betrug für die Kontrollgruppe (1) 1,54 *Spots*; 95% KI; (0,58 - 3,08) und für die Interventionsgruppe (2) 12,67 *Spots*; 95% KI; (8,59 - 18,50). Die Zunahme zytosolischer *Spots* in der Interventionsgruppe war im zeitlichen Verlauf signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

## 5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht, ob und auf welche Art *S. pneumoniae* den ATP-abhängigen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  in Alveolarepithelzellen beeinflusst. Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  sind für viele zelluläre Vorgänge von Alveolarepithelzellen von zentraler Bedeutung. So sind unter anderem die Resorption von Flüssigkeit (Bove *et al.* 2010) sowie die Produktion, Sekretion und Prozessierung von Surfactant (Dietl *et al.* 2012) abhängig vom zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Haushalt. Eine wichtige Rolle spielt die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  auch auf verschiedenen Ebenen der Infektabwehr (Evans & Sanderson 1999). Die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  beeinflusst außerdem den Energiehaushalt, die Genexpression, die Proliferation von Zellen und deren Apoptose (Laude & Simpson 2009).

Als *in vivo*-Modell von Alveolarepithelzellen Typ I wurden R3/1-Zellen und von Alveolarepithelzellen Typ II A549-Zellen verwendet. Es wurden zwei verschiedene Bakterienstämme eingesetzt, der Wildtyp *S. pneumoniae* D39 und die kapseldefiziente Mutante D39  $\Delta cps$ . Zunächst wurde untersucht, über welchen Rezeptor extrazelluläres ATP zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  in Alveolarepithelzellen führt. Nachdem der entsprechende Rezeptor identifiziert wurde, konnte untersucht werden, wie *S. pneumoniae* die purinerge Signaltransduktion beeinflusst.

Die Relokalisation des Rezeptors wurde durch die konfokalmikroskopische Analyse vitaler ECFP-P2Y<sub>2</sub>-transfizierter A549-Zellen untersucht.

### 5.1. Beeinflussung der zytosolischen Calciumkonzentration durch *S. pneumoniae*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *S. pneumoniae* den ATP-abhängigen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von Alveolarepithelzellen inhibieren kann.

Um unterschiedliche Phasenvariationen zu berücksichtigen, wurde sowohl der Wildtyp D39 als auch die kapseldefiziente Mutante D39  $\Delta cps$  verwendet. Die Phasenvariation (Veränderung der Dicke der Polysaccharidkapsel) ist im Verlauf einer Infektion mit *S. pneumoniae* von zentraler Bedeutung. Eine dicke Polysaccharidkapsel schützt das Bakterium am Beginn der Kolonisation davor, vom mukösen Schleim der Atemwege eingeschlossen zu werden. Sobald das Bakterium epitheliale Zellen erreicht, stellt die Polysaccharidkapsel jedoch ein Hindernis für die Adhärenz und Interaktion dar. Hier hilft *S. pneumoniae* die Möglichkeit der Phasenvariation, da es in diesem Stadium der Kolonisation die Dicke der Kapsel verringern kann. In Untersuchungen hat sich gezeigt, dass in diesem Stadium *S. pneumoniae* mit einer dünnen Polysaccharidkapsel überwiegen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit für die meisten Versuche die kapseldefiziente Mutante D39  $\Delta cps$  verwendet (Kadioglu *et al.* 2008).

Die Ergebnisse zeigen, dass beide *S. pneumoniae*-Stämme in der Lage sind, den ATP-Abhängigen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von Alveolarepithelzellen signifikant zu inhibieren. Dieses Phänomen ist bei der kapseldefizienten Mutante stärker ausgeprägt.



Eine mögliche Erklärung für die stärkere Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals durch die kapseldefiziente Mutante ist eine ausgeprägtere Interaktion zwischen Bakterien und Zellen bei stärkerer Adhärenz (Robson *et al.* 2006). Das Fehlen einer Kapsel ermöglicht den Oberflächenantigenen und den adhäsiven Molekülen der Bakterien einen engeren Kontakt mit den Epithelzellen (Hammerschmidt *et al.* 2005).

### 5.1.1. Bestimmung der Purinrezeptorexpression von A549- und R3/1-Zellen

Die Auswertung dieser Versuche zeigte, dass A549- und R3/1-Zellen wahrscheinlich keine oder nur sehr wenige P1 und P2X-Rezeptoren an ihrer Oberfläche exprimieren. In Frage kommen P2Y-Rezeptoren der Untergruppen 2,3,4,6 und 11. Da der  $\text{P2Y}_3$  Rezeptor nicht beim Menschen vorkommt, sondern wahrscheinlich ein Ortholog des  $\text{P2Y}_6$  Rezeptors bei Hühnern ist, konnte dieser ausgeschlossen werden (Burnstock 2007).

Die stärksten zytosolischen Calciumanstiege zeigten A549- und R3/1-Zellen auf die Agonisten ATP und UTP. Ausschließlich  $\text{P2Y}_2$ - und  $\text{P2Y}_4$ -Rezeptoren zeigen eine gleichermaßen hohe Sensitivität auf ATP und UTP (Ralevic & Burnstock 1998), weswegen in weiteren Untersuchungen auf diese sowie auf den  $\text{P2Y}_6$  Rezeptor fokussiert wird. Das Vorkommen dieser drei Rezeptoren im Epithel der Atemwege wurde bereits 2001 von Lazarowski & Boucher beschrieben.

Einen weiteren Hinweis, welche Rezeptoren für die Übertragung des ATP-Signals in Alveolarepithelzellen verantwortlich sind, liefern die Versuche in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Umgebung sowie die Versuche mit Thapsigargin. Mit Hilfe dieser Versuche wurde differenziert, ob der ATP-abhängige Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  aus intrazellulären Speichern erfolgt oder ob es sich um einen Einstrom von außerhalb der Zellen handelt.

$\text{P2Y}$ -Rezeptoren führen alle über die  $\text{IP}_3$ -Kaskade zu einer Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  aus intrazellulären Speichern. In  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Umgebung wurde deswegen nach wie vor eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf ATP erwartet, was auch gezeigt werden konnte. Es kommt also nicht zu einem signifikanten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von außerhalb der Zellen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -porenbildenden  $\text{P2X}$ -Rezeptoren konnten somit ausgeschlossen werden.

Thapsigargin, ein nichtkompetitiver Inhibitor der SERCA (*sarcoplasmic/endoplasmic-calcium-ATPase*, Calciumpumpe des Sarko/Endoplasmatischen Retikulums), führt zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion des endoplasmatischen Retikulums. Wenn A549-Zellen mit Thapsigargin vor-inkubiert wurden, blieb eine ATP-induzierte Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  aus. Für R3/1 Zellen konnte dies nicht gezeigt werden. Nach Depletion des endoplasmatischen Retikulums reagierten R3/1 Zellen weiterhin auf ATP, wenn auch in geringerem Ausmaß. Hierfür sind verschiedene Ursachen möglich. Es kann beispielsweise ein Rezeptormosaik vorhanden sein, was zu einer Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus unterschiedlichen zytosolischen Speichern führt. Es ist außerdem möglich, dass das verwendete Thapsigargin in seiner Wirkung eingeschränkt war. Eine andere Möglichkeit ist, dass bei einer größeren Anzahl von Versuchen in dieser Versuchsgruppe auch eine statistische Signifikanz erreicht werden würde. Aus der Zusammenschau der bisherigen Versuche ist es dennoch wahrscheinlich, dass die durch ATP hervorgerufenen Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  zum großen Teil aus dem endoplasmatischen Retikulum resultierte. Die bisherige Hypothese, dass einer oder

mehrerer der P2Y-Rezeptoren 2, 4, 6, oder 11 in A549-Zellen exprimiert werden, wurde demnach bestärkt.

Im nächsten Schritt wurden die in Frage kommenden P2Y-Rezeptoren auf DNA- und Proteinebene untersucht. In einer RT-PCR konnte die RNA von P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>6</sub> Rezeptoren für A549 Zellen nachgewiesen werden. A549 Zellen sind also in der Lage P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>6</sub> Rezeptoren zu exprimieren. Für R3/1 Zellen gelang dieser Nachweis nicht. Da der Rezeptor jedoch, wie im Folgenden beschrieben, im Western Blot nachgewiesen werden konnte, handelte es sich hierbei am wahrscheinlichsten um technische Probleme, Anwenderfehler oder eine sehr geringe Transkriptionsrate.

Auf Proteinebene ließen sich im Western Blot als einzige P2Y-Rezeptoren in der aufgereinigten Membranfraktion von den untersuchten Alveolarepithelzellen die Subtypen 2 und 6 nachweisen. Der P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor scheint dabei zwar exprimiert, jedoch nicht funktional zu sein, denn im P2Y<sub>2</sub>-siRNA-*knockdown* ruft ATP keine Ca<sup>2+</sup>-Antwort mehr hervor, auch wenn der P2Y<sub>6</sub>-Rezeptor unverändert bleibt. Ein isolierter P2Y<sub>6</sub>-siRNA *knockdown* hingegen inhibiert den ATP-induzierten Anstieg von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> nicht. In einer Versuchsreihe konnte nach P2Y<sub>6</sub>-siRNA *knockdown* ein gesteigerter Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> nach Aktivierung mit ATP beobachtet werden.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass ausschließlich der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor für den ATP-abhängigen Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> in A549- und R 3/1 Zellen verantwortlich ist. Ohne diesen Rezeptor ist keine Reaktion auf ATP messbar.

## 5.2. Überprüfung der Integrität der IP<sub>3</sub>-Signalkaskade

Die von *S. pneumoniae* verursachte Beeinflussung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> von Alveolarepithelzellen kann auf unterschiedlichen Ebenen der Signaltransduktion erfolgen. Es könnte sich unter anderem um eine direkte Interaktion von *S. pneumoniae* mit dem P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor handeln oder um eine Interaktion von *S. pneumoniae* mit der purinergen Signalkaskade.

Um die Funktionsfähigkeit der purinergen IP<sub>3</sub>-Kaskade nach Kontakt mit *S. pneumoniae* zu untersuchen, wurde nach einem anderen Rezeptor gesucht, der ebenso einen IP<sub>3</sub>-gekoppelten Signalweg aktiviert. Diese Bedingungen erfüllt der Protease-aktivierte-Rezeptor (PAR), der ebenso wie Purinrezeptoren G-Protein-gekoppelt ist und eine Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum vermittelt. 2002 haben Ubl *et al.* das Vorhandensein von PAR-2 in A549-Zellen beschrieben und Trypsin als einen Agonisten identifiziert. Die in diesem Bereich durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass die PAR-2 vermittelte Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> in A549-Zellen durch *S. pneumoniae* nicht inhibiert wird. Diese Erkenntnis ist ein Hinweis darauf, dass die zytosolische Signalkaskade von *S. pneumoniae* nicht beeinflusst wird. Eine direkte Interaktion von *S. pneumoniae* mit dem P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor rückt dadurch stärker in den Fokus der Überlegungen.

### 5.3. Temperaturabhängigkeit der Inhibition

Ein mögliches Resultat der Interaktion von *S. pneumoniae* mit dem P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor ist die Internalisierung des Purinrezeptors (Tulapurkar *et al.* 2004; Flores *et al.* 2005; Otero *et al.* 2000; Sromek & Harden 1998; Tulapurkar *et al.* 2005).

Physiologischerweise wird nach Aktivierung des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors dieser durch den entsprechenden Agonisten desensitiviert. Die Desensitivierung verläuft in zwei Schritten. Anfangs kommt es zu einer Phosphorylierung des Rezeptors mit dem Ergebnis einer geringeren Agonistensensitivität. Im zweiten Schritt wird der Rezeptor internalisiert (Flores *et al.* 2005). Dieser Schritt erfolgt temperaturabhängig, wobei das Optimum bei 37°C liegt. Bereits ein Abfall von 10°C hat eine starke Abschwächung des Vorganges zur Folge (Tulapurkar *et al.* 2005).

Wie beschrieben bewirkt eine Inkubation mit *S. pneumoniae* bei 37°C eine Inhibition des ATP-abhängigen Anstiegs der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Findet die Inkubation mit *S. pneumoniae* bei 20°C statt, ist diese Inhibition nicht mehr zu beobachten. Der ATP-abhängige Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> wird in diesem Fall nicht signifikant beeinflusst. Die Ergebnisse zeigen, dass auch die Inhibition des ATP-abhängigen Anstiegs der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> durch *S. pneumoniae* temperaturabhängig ist.

Dieses Phänomen kann verschiedene Ursachen haben. Eine mögliche Erklärung ist, dass es auch bei der Interaktion von *S. pneumoniae* mit dem P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor zu einer Desensitivierung und/oder Internalisierung des Rezeptors kommt, welche durch die niedrigere Temperatur verhindert wird. Was bei dieser Interpretation der Ergebnisse aber berücksichtigt werden muss, ist die Möglichkeit, dass sich die Adhärenz von Bakterien an Zellen temperaturabhängig verändern kann.

Zawaneh *et al.* untersuchten die Adhärenz von *S. pneumoniae* an Vaginalepithel. Die maximale Adhärenz wurde bei 37°C beobachtet, jedoch konnte auch bei 4°C noch eine signifikante Adhärenz nachgewiesen werden. Weitere in-vitro-Studien haben gezeigt, dass die Adhärenz von Gruppe B Streptokokken an A549-Zellen bei 4°C sich nicht signifikant von der Adhärenz bei 37°C unterscheidet. (Tamura *et al.* 1994). Diese Ergebnisse deuten also darauf hin, dass sich eine Verringerung der Temperatur auf 20°C nicht signifikant auf die Adhärenz auswirkt.

Eine weitere Möglichkeit, warum *S. pneumoniae* bei 20°C einen geringeren inhibitorischen Effekt hat, wäre eine eingeschränkte Vitalität von Bakterien bei Raumtemperatur. Das Überleben von *S. pneumoniae* bei Temperaturen unterhalb von 37°C wurde unter anderem 1998 von Wasas *et al.* untersucht. Er konnte jedoch zeigen, dass eine auf Raumtemperatur verminderte Temperatur keinen großen Einfluss auf das Überleben von Bakterien hat. In seinen Versuchen zeigten die Bakterien nach 7 Tagen noch 90% Vitalität. In dem Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit waren die Bakterien jedoch nur 2,5 Stunden Raumtemperatur ausgesetzt. Ein geringeres Überleben ist somit noch unwahrscheinlicher.

Eine andere Überlegung ist, ob die hier verwendete kapseldefiziente Mutante eventuell empfindlicher gegenüber Temperaturunterschieden ist. Da *S. pneumoniae* jedoch bei einer geringeren Temperatur im Nasopharynxbereich die Kapselproduktion reduziert, ist auch dies unwahrscheinlich (Marks *et al.* 2012).

Eine geringere Temperatur und eine niedrigere CO<sub>2</sub>-Konzentration mit entsprechender Absenkung des pH-Wertes wirken sich negativ auf Metabolismus und Wachstum von unkapselten *S. pneumoniae* aus (Carvalho *et al.* 2013). Es ist also nicht auszuschließen, dass besagte temperaturabhängige Inhibition des Calciumsignals auf eine geringere Aktivität von *S. pneumoniae* zurückzuführen ist.

#### 5.4. Konfokalmikroskopische Untersuchung des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors und seiner Beeinflussung durch *S. pneumoniae*

Einen zentralen Teil dieser Arbeit stellt die Transfektion mit fluoreszenzmarkiertem P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor dar sowie der konfokalmikroskopische Nachweis seiner zytosolischen Translokation in lebenden A549-Zellen.

Die zelluläre Lokalisation des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors gelang mit Hilfe von konfokalmikroskopischen Aufnahmen lebender A549-Zellen, die zuvor mit einem ECFP-markierten P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor transfiziert wurden. Vor Zugabe von *S. pneumoniae* war der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor in diesen Zellen hauptsächlich membranständig zu finden. Nach Zugabe von *S. pneumoniae* konnte im Verlauf von zwei Stunden eine signifikante Anhäufung von ECFP-haltigen Strukturen im Zytosol festgestellt werden, die am ehesten ECFP-P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren entsprachen. In der Kontrollgruppe konnte eine zytosolische Akkumulation von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren nicht nachgewiesen werden, die Rezeptoren waren hier im zeitlichen Verlauf membranständig.

Ob es sich hierbei um eine Schutzreaktion der Zelle handelt oder ob *S. pneumoniae* einen Überlebensvorteil bei gestörter purinerger Kommunikation hat, ist dabei ungeklärt.

Eine zytosolische Akkumulation von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren kann z.B. auch bei der Agonisten-abhängigen Internalisierung beobachtet werden. Hierbei wurde gezeigt, dass der Internalisierung häufig eine Phosphorylierung des Rezeptors vorausgeht. Eine Beobachtung, die auch in weiteren Versuchen mit *S. pneumoniae* untersucht werden könnte. Wichtig für die Phosphorylierung, Desensitivierung und Internalisierung des Rezeptors ist nach Untersuchungen von Flores *et al.* der C-Terminus des Rezeptors. Entfernung des C-Terminus oder Mutationen an dieser Stelle resultierten in einer starken Reduzierung von Phosphorylierung, Desensitivierung und Internalisierung (Flores *et al* 2005, Sromek *et al* 1998, Tulapurkar *et al* 2004).

Eine mögliche Erklärung für die zelluläre Translokation des Rezeptors wäre, dass *S. pneumoniae* normale zelluläre Vorgänge aktivieren kann, die eine Internalisierung des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors bewirken.

In der Arbeit von Tulapurkar *et al.* konnte außerdem gezeigt werden, dass die Dauer der Stimulation des Agonisten UTP das zytosolische *trafficking* und den Abbau des Rezeptors in Lysosomen beeinflusst. Eine 30-minütige Inkubationszeit bewirkte hier eine Co-Lokalisierung mit Endosomen und eine 60-minütige Inkubationszeit eine Co-Lokalisierung mit Lysosomen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass je nach Inkubationszeit unterschiedliche Internalisierungswege aktiviert wurden und auch das zytosolische „*trafficking*“ variierte.

Ob es sich bei der hier beschriebenen Beobachtung um eine Internalisierung handelt, könnte im weiteren mit der Inhibition hierfür wichtiger Schritte untersucht werden. In Frage kommt die chemische Hemmung verschiedener Kinasen sowie die Beeinflussung von Clathrin und Aktin. Diese werden bei der Internalisierung von Purinrezeptoren in den Bereich der Membran verschoben und sind wichtig für Endozytose und zytosolisches *Trafficking*. In weiteren Versuchen könnte auch die Co-Lokalisierung des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors mit Endosomen und Lysosomen untersucht werden.

Die in Kapitel 5.3 beschriebene Temperaturabhängigkeit der von *S. pneumoniae* hervorgerufenen Inhibition des ATP-abhängigen Anstiegs der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bedarf im Zusammenhang mit den konfokalmikroskopischen Untersuchungen weiterer Aufmerksamkeit. Ein zusätzliches Indiz dafür, dass es sich um die Internalisierung von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren handelt, wäre eine geringere zytosolische Translokation von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren bei Raumtemperatur.

Um zu verstehen, wie *S. pneumoniae* den P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor beeinflusst, muss überlegt werden, welche „Werkzeuge“ das Bakterium hierfür zu Verfügung hat. Ein wichtiger Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* ist beispielsweise Pneumolysin. Direkte zytotoxische Effekte von Pneumolysin auf Zellen des Respirationstraktes, wie die Abschnürung von zytoplasmatischen Vesikeln, sind teilweise unter dem Konfokalmikroskop zu beobachten. Interessanter sind jedoch die in sublytischen Konzentrationen auftretenden Interaktionen mit eukaryotischen Rezeptoren und weiteren Zell-Signaltransduktionswegen (Marriott *et al.* 2008). Um zu prüfen, ob Pneumolysin auf die Internalisierung des Purinrezeptors einen Einfluss hat, könnte untersucht werden, ob eine Pneumolysin-defiziente Mutante von *S. pneumoniae* eine Internalisierung des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors bewirken kann oder ob Pneumolysin isoliert dazu in der Lage ist.

In der Zusammenschau der verschiedenen Ergebnisse aus den Versuchen mit Trypsin, den Versuchen bei unterschiedlichen Temperaturen und den konfokalmikroskopischen Untersuchungen ist eine Internalisierung von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren die wahrscheinlichste Erklärung des beschriebenen Phänomens.

In einem nächsten Schritt sollte man sich Gedanken machen, welche Auswirkung eine gestörte purinerge Kommunikation auf die Zelle im Einzelnen und den Respirationstrakt im Ganzen hat.

AT2-Zellen regulieren z.B. über Nucleotidrezeptoren Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Transport. Eine P2Y<sub>2</sub>-Stimulation erhöht die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> und führt über zytosolische Signalkaskaden zur Inhibition von Epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanälen (ENaC) und zur Aktivierung von Calcium-aktivierten-Chloridkanälen (CaCC). Dies bewirkt insgesamt eine Cl<sup>-</sup>- und Flüssigkeitssekretion. Der dünne Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche von Alveolarepithelzellen ist wichtig für die Aufrechterhaltung eines effektiven Gasaustausches, für die Surfactant Homöostase und für die Abwehr gegen Pathogene und Toxine. (Bove *et al.* 2010)

Die Sekretion von Surfactant ist ein komplexer Vorgang, der in drei Schritte eingeteilt werden kann. Die „pre-fusion“, „hemi-fusion“ und „post-fusion“ Phase. Die „pre-fusion“ Phase wird stark von purinerger Stimulation kontrolliert. Wie in vielen anderen Zellen bestimmt auch in der AT II-Zelle die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> die Exozytose. Surfactant gefüllte Lamellarkörperchen fusionieren bei erhöhter [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> mit der Zellmembran.

In der „post-fusion“ Phase ist für die endgültige Sekretion von Surfactant eine Actinhülle um das Lamellarkörperchen nötig. Diese Hülle wird abhängig von purinerger Stimulation und erhöhter

$[Ca^{2+}]_{zyt}$  gebildet. Die Inhibierung der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  verhindert die Exozytose. (Schmid *et al.* 2011) (Dietl *et al.* 2012)

Der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor scheint außerdem der wichtigste Rezeptor zu sein, der die Schleimsekretion aktiviert. Über P2Y<sub>2</sub>- und Ryanodinrezeptoren kommt es zur Erhöhung von Phospholipase C, IP<sub>3</sub>,  $[Ca^{2+}]_{zyt}$ , DAG und Proteinkinase C. Diese Signalkaskade bewirkt die Exozytose von Schleimgranula (Schmid *et al.* 2011).

Mit der von *S. pneumoniae* hervorgerufenen Internalisierung von Purinrezeptoren kann das Bakterium Einfluss auf die Hydrierung des Alveolarepithels, die Sekretion von Surfactant und die Schleimsekretion nehmen. Eine Beeinflussung dieser zellulären Vorgänge kann es dem Bakterium ermöglichen, günstigere Lebensbedingungen zu schaffen. Eine Verminderung von Surfactant und ein gestörter Flüssigkeitshaushalt können zum Kollaps einzelner Alveolen und damit zu atelektatischen Bereichen in der Lunge führen. Die Hemmung der Schleimsekretion kann ein Einschließen von Bakterien in Schleim und ihren effektiven Abtransport verhindern.

Diese für das Bakterium günstigen Umgebungsbedingungen sind für die Funktion der Lunge von Nachteil. Ein effektiver Gasaustausch setzt eine gute Entfaltung der Lunge voraus. Hierfür sind wiederum genügend Surfactant und eine ausreichende Hydrierung der Alveolaroberfläche nötig. Eine geringere Surfactant-Produktion schafft für das Bakterium außerdem günstigere Bedingungen, da verschiedene Surfactantproteine direkt an mikrobielle Strukturen binden können und die Chemotaxis von immunkompetenten Zellen sowie die Aktivität von Leukozyten beeinflussen (Hippenstiel *et al.* 2007).

Auch auf andere Zellen des Respirationstraktes haben purinerge Signale und zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration einen wichtigen Einfluss. Die Zilienschlagfrequenz des respiratorischen Epithels ist abhängig von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelter Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  aus intrazellulären Speichern (Schmid *et al.* 2011)(Evans & Sanderson 1999). Falls *S. pneumoniae* auch bei diesen Zellen eine Internalisierung der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren bewirken kann, beeinflusst es damit auch die mukoziliäre „clearance“.

Abgesehen vom respiratorischen Epithel sind auch die pulmonalen Blutgefäße für die Funktion der Lunge und den Gasaustausch von Bedeutung. ATP bewirkt an Lungenendothelzellen eine Purinrezeptor gesteuerte Stabilisierung der Endothelzellbarriere und verhindert so die Entstehung von Lungenödemen (Kolosova *et al.* 2005) (Lucas *et al.* 2009).

## 6. Zusammenfassung

Die Pneumonie bleibt weiterhin im ambulanten wie auch im klinischen Bereich eine häufige Erkrankung. *S. pneumoniae* ist weltweit ihr häufigster Erreger. In dieser Arbeit wurde die Interaktion von *S. pneumoniae* mit Alveolarepithelzellen untersucht. ATP ist in diesem Zusammenhang, z.B. bei Zell-Stress und Apoptose ein wichtiger auto- und parakriner Mediator, der Agonist an Purinrezeptoren ist. Um diesen Signaltransduktionsweg und die mögliche Beeinflussung durch *S. pneumoniae* zu untersuchen, wurden fluoreszenzmikroskopische Messungen der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von A549- und R3/1- Zellen durchgeführt.

Die Charakterisierung der am  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal beteiligten Purinrezeptoren erfolgte unter anderem durch Verwendung verschiedener Agonisten. Purinrezeptor DNA wurde in der PCR bestimmt und Rezeptorproteine im Westernblot. Die zelluläre Lokalisation des Rezeptors gelang mit Hilfe konfokalmikroskopischer Aufnahmen lebender A549-Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass bei der purinergen Signaltransduktion von Alveolarepithelzellen  $\text{P2Y}_2$ -Rezeptoren eine zentrale Rolle spielen. Die Erhöhung der extrazellulären ATP- bzw. UTP-Konzentration aktiviert  $\text{P2Y}_2$ -abhängige Signalkaskaden, die zu einer Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass dieser Vorgang durch *S. pneumoniae* inhibiert werden kann. In einem weiteren Schritt gelang mit Hilfe konfokalmikroskopischer Aufnahmen der Nachweis der zytosolischen  $\text{P2Y}_2$ -Rezeptor-Relokalisation während der Inkubation der Zellen mit Pneumokokken. Die physiologisch eher membranständig zu findenden  $\text{P2Y}_2$ -Rezeptoren konnten nach Inkubation mit *S. pneumoniae* vermehrt im Zytosol nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass *S. pneumoniae* in der Lage ist, die für Alveolarepithelzellen wichtige purinerge Signaltransduktion und damit auch die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ ) zu beeinflussen. Dies geschieht höchstwahrscheinlich durch eine Inaktivierung und/ oder Internalisierung von  $\text{P2Y}_2$ -Rezeptoren.

Die Balance zwischen Flüssigkeitssekretion und Resorption wird stark von der extrazellulären ATP-Konzentration beeinflusst. ATP und zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  sind auch für die Exkretion von Surfactant von zentraler Bedeutung (Dietl *et al.* 2012). Sowohl die Exozytose als auch die extrazelluläre Prozessierung von Surfactant sind abhängig von der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  (Schmid *et al.* 2011)(Okada *et al.* 2006)(Bove *et al.* 2010)(Bhattacharya & Matthay 2013).

Um die klinische Relevanz der in dieser Arbeit dargestellten Zusammenhänge richtig einordnen zu können, müssen noch weitere Versuche durchgeführt werden, die den Einfluss von *S. pneumoniae* auf andere biochemische Vorgänge, z.B. die Sekretion von Surfactant oder die Zilien Motilität untersucht. In einem nächsten Schritt wäre es auch denkbar, die Versuche an isolierten humanen Alveolarepithelzellen zu wiederholen.

Die Kontrolle über die alveoläre Flüssigkeits-Homöostase ist für viele Funktionen der Lunge genauso wichtig wie die Kontrolle über Surfactantproduktion, -exkretion und -prozessierung (Dietl *et al.* 2012). *S. pneumoniae* ist in der Lage, eine hierfür wichtige Signaltransduktion zu beeinflussen. Eine geringere Surfactantproduktion und eine veränderte Flüssigkeitsresorption und Sekretion behindern eine effektive Bekämpfung von Bakterien und geben *S. pneumoniae* einen Überlebensvorteil (Mason 2006), (Fehrenbach 2001). Das Bakterium kann auf diese Weise atelektatische Bereiche in der Lunge bilden und die mukoziliäre „clearance“ behindern.

Pneumonia remains a common disease in both the outpatient and clinical settings. *S. pneumoniae* is its most common pathogen worldwide. In this thesis the interaction of *S. pneumoniae* with alveolar epithelial cells was investigated. ATP is an important auto- and paracrine mediator in this context, e.g. in cell stress and apoptosis, and is an agonist at purine receptors. To investigate this signal transduction pathway and the possible influence of *S. pneumoniae*, fluorescence microscopic measurements of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of A549 and R3/1 cells were performed.

The characterization of the purine receptors involved in calcium signalling was performed by using different agonists. Purine receptor DNA was determined in PCR and receptor proteins in Western blot. The cellular localization of the receptor was achieved by confocal microscopy of living A549 cells.

It could be shown that P2Y2 receptors play a central role in the purinergic signal transduction of alveolar epithelial cells. The increase of the extracellular ATP or UTP concentration activates P2Y2-dependent signalling cascades that lead to an increase of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. It has also been shown that this process can be inhibited by *S. pneumoniae*. In a further step, confocal microscopic images were used to detect cytosolic P2Y2 receptor relocalization during incubation of the cells with pneumococci. After incubation with *S. pneumoniae*, the physiologically more membrane-bound P2Y2 receptors could be detected in the cytosol. These results show that *S. pneumoniae* is able to influence the purinergic signal transduction, which is important for alveolar epithelial cells, and thus also the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ). This most likely occurs through inactivation and/or internalization of P2Y2 receptors.

The balance between fluid secretion and absorption is strongly influenced by the extracellular ATP concentration. ATP and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  are also of central importance for the excretion of surfactant (Dietl et al. 2012). Both exocytosis and extracellular processing of surfactant are dependent on the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  (Schmid et al. 2011)(Okada et al. 2006)(Bove et al. 2010)(Bhattacharya & Matthay 2013).

In order to correctly classify the clinical relevance of the correlations presented in this work, further experiments have to be conducted to investigate the influence of *S. pneumoniae* on other biochemical processes, e.g. the secretion of surfactant or ciliary motility. In a next step it should also be considered to repeat the experiments on isolated human alveolar epithelial cells.

Control of alveolar fluid homeostasis is as important for many lung functions as control of surfactant production, excretion and processing (Dietl et al. 2012). *S. pneumoniae* is able to influence the specific signal transduction pathway, which is important for this purpose. Reduced surfactant production and altered fluid absorption and secretion hinder effective bacterial control and gives *S. pneumoniae* a survival advantage (Mason 2006), (Fehrenbach 2001). The bacterium can thus form atelectatic areas in the lung and impede mucociliary clearance



## 7. Literaturverzeichnis

- Bhattacharya, J. & Matthay, M. a, 2013. Regulation and repair of the alveolar-capillary barrier in acute lung injury. *Annual review of physiology*, 75, pp.593–615. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23398155> [Accessed September 25, 2013].
- Bogaert, D., De Groot, R. & Hermans, P., 2004. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet infectious diseases*, 4(3), pp.144–154. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309904009387> [Accessed December 14, 2011].
- Bove, P.F. *et al.*, 2010. Human alveolar type II cells secrete and absorb liquid in response to local nucleotide signaling. *The Journal of biological chemistry*, 285(45), pp.34939–49. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2966108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 28, 2013].
- Burnstock, G., 2007. Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 64(12), pp.1471–1483. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17375261>.
- Burnstock, G., 2006. Purinergic signalling. *British journal of pharmacology*, 147(S1), pp.S172–S181. Available at: <http://www.ingentaconnect.com/content/klu/nere/2001/00000026/F0020008/00361328> [Accessed January 3, 2012].
- Carvalho, S.M., Kuipers, O.P. & Neves, A.R., 2013. Environmental and nutritional factors that affect growth and metabolism of the pneumococcal serotype 2 strain D39 and its nonencapsulated derivative strain R6. *PloS one*, 8(3), p.e58492. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3591343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 4, 2013].
- Dietl, P., Haller, T. & Frick, M., 2012. Spatio-temporal aspects, pathways and actions of Ca(2+) in surfactant secreting pulmonary alveolar type II pneumocytes. *Cell calcium*, 52(3–4), pp.296–302. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22591642> [Accessed September 25, 2013].
- Dobbs, L. *et al.*, 2009. The great big alveolar TI cell: evolving concepts and paradigms. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 25, pp.55–62. Available at: <http://www.karger.com/Article/Abstract/272063> [Accessed September 25, 2013].
- Evans, J.H. & Sanderson, M.J., 1999. Intracellular calcium oscillations regulate ciliary beat frequency of airway epithelial cells. *Cell calcium*, 26(3–4), pp.103–110. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10598274>.
- Fehrenbach, H., 2001. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory research*, 2(1), pp.33–46. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=59567&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Flores, R.R. V *et al.*, 2005. Agonist-induced Phosphorylation and Desensitization of the P2Y2 Nucleotide Receptor. *Molecular and cellular Biochemistry*, 280(1–2), pp.35–45.

Available at: <http://www.springerlink.com/index/75P5K04317K50860.pdf> [Accessed December 14, 2011].

- Foster, K. a *et al.*, 1998. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research*, 243(2), pp.359–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743595>.
- G. Höffken, 2005. *S3-Leitlinie: Tiefe Atemwegsinfektionen / Pneumonie*,
- Giard, D. & Aaronson, S., 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), pp.1417–1423. Available at: <http://jnci.oxfordjournals.org/content/51/5/1417.short> [Accessed December 12, 2013].
- Grabenstein, J.D. & Klugman, K.P., 2012. A century of pneumococcal vaccination research in humans. *Clinical microbiology and infection*, 18(5), pp.15–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22882735>.
- Gryniewicz, 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*, 260(6), pp.3440–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3838314>.
- Hammerschmidt, S. *et al.*, 2005. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infection and immunity*, 73(8), pp.4653–4667. Available at: <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/73/8/4653> [Accessed February 14, 2012].
- Hippenstiel, S. *et al.*, 2007. [New aspects of the pathophysiology of pneumonia]. *Der Internist*, 48(5), pp.459–60, 462–4, 466–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429589> [Accessed September 20, 2013].
- Kadioglu, A. *et al.*, 2008. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature reviews. Microbiology*, 6(4), pp.288–301. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18340341> [Accessed September 18, 2013].
- Knebel, J.W., Aufderheide, M. & Emura, M., 1994. Comparison of biological effects of different polycyclic aromatic hydrocarbons in lung cells of hamster and rat in vitro. *Toxicology Letters*, 72(1–3), pp.65–72. Available at: <http://emedien.sub.uni-hamburg.de/han/3867/www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378427494900116>.
- Kolosova, I. a *et al.*, 2005. Signaling pathways involved in adenosine triphosphate-induced endothelial cell barrier enhancement. *Circulation research*, 97(2), pp.115–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994434> [Accessed March 9, 2011].
- Koslowski, R. *et al.*, 2004. Comparison of biological effects of different polycyclic aromatic hydrocarbons in lung cells of hamster and rat in vitro. *Histochemistry and Cell Biology*, 121(6), pp.509–519. Available at: <http://www.springerlink.com/content/mrjph061u6v00c vd/>.
- Laude, A.J. & Simpson, A.W.M., 2009. Compartmentalized signalling: Ca<sup>2+</sup> compartments, microdomains and the many facets of Ca<sup>2+</sup> signalling. *The FEBS journal*, 276(7), pp.1800–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19243429>

[Accessed September 6, 2011].

- Lazarowski, E. & Boucher, R., 2001. UTP as an extracellular signaling molecule. *News in Physiological Sciences*, 16, pp.1–5. Available at: <http://physiologyonline.physiology.org/content/16/1/1.short> [Accessed September 25, 2013].
- Lewandowski, K., 2001. Epidemiologie und Pathophysiologie des akuten Lungenversagens. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 38(5), pp.426–436.
- Löffler, G., Petrides, P.E. & Heinrich, P.C., 2007. *Biochemie und Pathobiochemie* G. Löffler, P. E. Petrides, & P. C. Heinrich, eds., Springer. Available at: <http://www.gbv.de/dms/bs/toc/516260383.pdf>.
- Lucas, R. et al., 2009. Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung injury. *Biochemical Pharmacology*, 77, pp.1763–1772.
- Macklin, C.C., 1954. The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumonocytes. *The Lancet*, 263(6822), pp.1099–1104.
- Magee, A. & Yother, J., 2001. Requirement for Capsule in Colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and immunity*, 69(6), pp.3755–3761. Available at: <http://iai.asm.org/content/69/6/3755.short> [Accessed August 27, 2013].
- Marcet, B. et al., 2007. Extracellular nucleotides induce COX-2 up-regulation and prostaglandin E<sub>2</sub> production in human A549 alveolar type II epithelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 566, pp.167–171.
- Marks, L., Reddinger, R. & Hakansson, A., 2012. High levels of genetic recombination during nasopharyngeal carriage and biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *MBio*, 3(5), pp.1–13. Available at: <http://mbio.asm.org/content/3/5/e00200-12.short> [Accessed March 16, 2014].
- Marriott, H., Mitchell, T. & Dockrell, D.H., 2008. Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Current molecular medicine*, 8(6), pp.497–509. Available at: <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmm/2008/00000008/00000006/art00006> [Accessed December 16, 2011].
- Mason, R.J., 2006. Biology of alveolar type II cells. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 11 Suppl, pp.S12–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423262>.
- Michael Grego et al., 2013. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch online *Streptococcus pneumoniae*. *Klinisches Wörterbuch*, pp.9–10. Available at: [http://emedien.sub.uni-hamburg.de/han/Pschyrembel/www.degruyter.com/view/kw/4405848?rskey=mhExu3&result=5&dbq\\_0=pneumokokken&dbf\\_0=psy-fulltext&dbt\\_0=fulltext&o\\_0=AND&searchwithindbid\\_1=PSCHYKW&searchwithindbid\\_2=natur-online&searchwithindbid\\_3=sozmed-online&searchwithindbid\\_4=tw-online&searchwithindbid\\_5=hunnius-online&searchwithindbid\\_6=pflge-online&searchwithindbid\\_7=ppp-online](http://emedien.sub.uni-hamburg.de/han/Pschyrembel/www.degruyter.com/view/kw/4405848?rskey=mhExu3&result=5&dbq_0=pneumokokken&dbf_0=psy-fulltext&dbt_0=fulltext&o_0=AND&searchwithindbid_1=PSCHYKW&searchwithindbid_2=natur-online&searchwithindbid_3=sozmed-online&searchwithindbid_4=tw-online&searchwithindbid_5=hunnius-online&searchwithindbid_6=pflge-online&searchwithindbid_7=ppp-online).
- Mitchell, a M. & Mitchell, T.J., 2010. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(5), pp.411–418. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132250>.

- Okada, S.S.F. *et al.*, 2006. Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. *Journal of Biological Chemistry*, 281(32), pp.22992–23002. Available at: <http://www.jbc.org/content/281/32/22992.short> [Accessed December 14, 2011].
- Otero, M. *et al.*, 2000. Mechanisms of agonist-dependent and -independent desensitization of a recombinant P2Y2 nucleotide receptor. *Molecular and cellular biochemistry*, 205(1–2), pp.115–123. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10821429>.
- Pletz, M.W. *et al.*, 2011. Epidemiology and Aetiology of Community-acquired Pneumonia (CAP). *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 136(15), pp.775–780. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21469047> [Accessed September 22, 2013].
- Pozzan, T. *et al.*, 1994. Molecular and Cellular Physiology of Intracellular Calcium Stores. *Physiological Reviews*, 74(3), pp.595–623.
- Pracht, D. *et al.*, 2005. PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infection and immunity*, 73(5), pp.2680–2689. Available at: <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/73/5/2680> [Accessed December 14, 2011].
- Ralevic, V. & Burnstock, G., 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews*, 50(3), pp.413–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3083132&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Robson, R.L., Reed, N. a & Horvat, R.T., 2006. Differential activation of inflammatory pathways in A549 type II pneumocytes by *Streptococcus pneumoniae* strains with different adherence properties. *BMC infectious diseases*, 6(6), p.71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1481607&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 13, 2012].
- Rubins, J.B. & Janoff, E.N., 1998. Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 131(1), pp.21–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21210915>.
- Schmid, A. *et al.*, 2011. Nucleotide-Mediated Airway Clearance. In M. Picher & R. C. Boucher, eds. *Purinergic regulation of respiratory diseases*. Subcellular Biochemistry. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 95–138. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-1217-1> [Accessed October 1, 2013].
- Sromek, S. & Harden, T., 1998. Agonist-induced internalization of the P2Y2 receptor. *Molecular pharmacology*, 494(3), pp.485–494. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/54/3/485.short> [Accessed September 10, 2013].
- Talbot, U.M.M., Paton, A.W.W. & Paton, J.C.C., 1996. Uptake of *Streptococcus pneumoniae* by respiratory epithelial cells. *Infection and immunity*, 64(9), pp.3772–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=174292&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tamura, G.S. *et al.*, 1994. Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infection and*

- immunity*, 62(6), pp.2450–2458. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=186531&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tatur, S. *et al.*, 2007. Ca<sup>2+</sup>-dependent ATP release from A549 cells involves synergistic autocrine stimulation by coreleased uridine nucleotides. *The Journal of physiology*, 584(Pt 2), pp.419–35. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2277166&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 14, 2010].
- Tu, L.N. *et al.*, 2007. Modulation of adherence, invasion, and tumor necrosis factor alpha secretion during the early stages of infection by *Streptococcus pneumoniae* ClpL. *Infection and immunity*, 75(6), pp.2996–3005. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1932908&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 6, 2012].
- Tulapurkar, M.E. *et al.*, 2005. Endocytosis mechanism of P2Y2 nucleotide receptor tagged with green fluorescent protein: clathrin and actin cytoskeleton dependence. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 62(12), pp.1388–1399. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15924261> [Accessed March 17, 2011].
- Tulapurkar, M.E. *et al.*, 2004. Subtype specific internalization of P2Y1 and P2Y2 receptors induced by novel adenosine 5'-O-(1-boranotriphosphate) derivatives. *British journal of pharmacology*, 142(5), pp.869–878. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1575069&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 21, 2011].
- Tuomanen, E., 1999. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Current opinion in microbiology*, 2(1), pp.35–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10047549>.
- Ubl, J.J. *et al.*, 2002. Human bronchial epithelial cells express PAR-2 with different sensitivity to thermolysin. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 282(6), pp.L1339–1348. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12003791> [Accessed February 7, 2011].
- Wasas, a D. *et al.*, 1998. Long-term survival of *Streptococcus pneumoniae* at room temperature on Dorset egg medium. *Journal of clinical microbiology*, 36(4), pp.1139–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=104708&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Weil-Olivier, C. *et al.*, 2012. Prevention of pneumococcal diseases in the post-seven valent vaccine era: a European perspective. *BMC infectious diseases*, 12(1), p.207. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3462147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 20, 2013].
- WHO, 2013. Pneumonia. *World Health Organization*, p.3. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/index.html>.
- Witzenrath, M., Gutbier, B. & Hocke, A., 2006. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Critical Care Medicine*, 34(7), pp.1947–1954. Available at:

[http://journals.lww.com/ccmjournal/Abstract/2006/07000/Role\\_of\\_pneumolysin\\_for\\_the\\_development\\_of\\_acute.13.aspx](http://journals.lww.com/ccmjournal/Abstract/2006/07000/Role_of_pneumolysin_for_the_development_of_acute.13.aspx) [Accessed December 14, 2011].

Zawaneh, S., Ayoub, E. & Baer, H., 1979. Factors influencing adherence of group B streptococci to human vaginal epithelial cells. *INFECTION AND IMMUNITY*, 26(2), pp.441–447. Available at: <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/26/2/441> [Accessed February 9, 2012].

## 8. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all den Menschen bedanken, die es mir mit ihrer Hilfe ermöglicht haben diese Doktorarbeit anzufertigen. Mein ganz besonderer Dank gilt den im Folgenden aufgeführten.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Rainer Kiefmann bedanken ohne den diese Promotionsschrift nie zustande gekommen wäre. Er hat mich in sein Forschungsteam aufgenommen und es mir ermöglicht auf alle Ressourcen des Hauses zuzugreifen. Ohne seinen Überblick über das Gesamtprojekt und sein fundiertes Wissen wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Bei der Betreuerin meiner Doktorarbeit Dr. med. Cynthia Olotu möchte ich mich für die zahllosen Gespräche in freundschaftlicher Atmosphäre bedanken. Sie hat mir viele Anregungen gegeben und mir geholfen alle Ideen umzusetzen. Sie hat mich bei der Einarbeitung in die Materie unterstützt und war stets für mich erreichbar. Ich danke ihr außerdem für die Einarbeitung in die verschiedensten experimentellen Methoden sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Lungenforschung des UKE's. Sie haben mir kontinuierlich mit Rat und Tat zur Seite gestanden und waren mir stets eine Hilfe.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern der Microscopy Imaging Facility. Insbesondere Dr. rer. nat. Bernd Zobiak und Dr. rer. nat. Antonio Virgilio Failla. Sie haben mich in die Konfokalmikroskopie eingeführt und mir neue Möglichkeiten aufgezeigt.

Bei all denen, die mich außerhalb des Labors unterstützt haben möchte ich mich ganz besonders bedanken. Bei meiner Familie, die mir dieses Studium durch finanzielle Unterstützung ermöglicht hat. Bei meiner Mutter die mir durch wiederholtes Korrekturlesen sehr geholfen hat. Mein Dank gilt meiner Freundin Yvonne, die mich zeitweise nur sehr wenig gesehen hat und mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit stets unterstützt und ermuntert hat.

Ich danke euch allen dass ihr dies ermöglicht habt. Ohne all eure Unterstützung wäre diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen.

## 9. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## 10. Eidesstattliche Erklärung

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: .....  .....