

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik und Poliklinik für Anesthesiologie

Direktor: Prof. Dr. Christian Zöllner

## **ADP induziert ein mitochondrial reguliertes, nukleäres Calcium Signal in AEZ Typ II**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von

Annelie Cuvenhaus

aus Neuenkirchen

Hamburg 2020

---

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.03.2021

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der /die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Andreas Guse

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Rainer Kiefmann

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Arbeitshypothese und Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>2</b>
2.1	Purinerges <i>Signalling</i> im Alveolarepithel und die Rolle des ATP .....	2
2.2	Purinerges <i>Signalling</i> durch ADP.....	3
2.3	Calcium.....	4
2.4	Purinerge Signaltransduktion .....	6
2.5	Endoplasmatisches Retikulum und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP <sub>3</sub> ) .....	9
2.6	Mitochondrium .....	10
2.7	Nukleus.....	15
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
3.1	Material.....	17
3.1.1	Geräte.....	17
3.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	19
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien .....	20
3.1.4	Puffer und Lösungen .....	22
3.1.5	Verwendete Zelllinien .....	23
3.1.5.1	Humane Adenokarzinomzelllinie A549 .....	23
3.1.5.2	Zellen anderen Ursprungs.....	23
3.2	Methoden .....	24
3.2.1	Zellkultivierung .....	24
3.2.2	Live-cell Ca <sup>2+</sup> -Imaging .....	25
3.2.2.1	Versuchsablauf .....	25
3.2.2.2	Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Messung mittels Epifluoreszenzmikroskopie .....	26
3.2.2.3	Spinning Disc Live Cell Imaging Konfokalmikroskopie .....	30
3.2.2.4	Förster Resonanz Energie Transfer Mikroskopie .....	31
3.2.3	Zellbiologische und molekularbiologische Methoden .....	34
3.2.3.1	Nachweis der Purinrezeptoren mittels rtPCR und Western Blot .....	34
3.2.3.2	Transfektion von A549-Zellen mit Plasmid-DNA für die Expression von GECIs .....	42

3.2.4	Versuchsgruppen .....	43
3.2.5	Auswertung.....	45
3.3	Statistik .....	45
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
4.1	Standardversuch.....	46
4.1.1.1	Zellregionen.....	46
4.1.2	Ca <sup>2+</sup> -Reaktionsprofile .....	47
4.1.3	Mittlerer maximaler Ca <sup>2+</sup> -Anstieg .....	48
4.2	Konfokalmikroskopie .....	49
4.3	Herkunft des Ca <sup>2+</sup> -Signals .....	50
4.3.1	Versuche mit Ca <sup>2+</sup> -freiem HBSS-Puffer .....	50
4.3.2	Thapsigargin .....	56
4.4	Förster Resonanz Energie Transfer-Mikroskopie.....	57
4.4.1	Mitochondrium .....	58
4.4.2	ER .....	62
4.5	Purinerge Signaltransduktion .....	65
4.5.1	PCR.....	66
4.5.2	Western Blot .....	66
4.5.3	P2Y-Rezeptor- <i>Knockdown</i> .....	67
4.5.3.1	P2Y <sub>2</sub> -Rezeptor .....	67
4.5.3.2	P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor .....	69
4.6	Die Beteiligung der Mitochondrien am Ca <sup>2+</sup> - <i>Signalling</i> nach ADP- bzw. ATP-Stimulation.....	70
4.6.1.1	DMSO Vehikelkontrolle.....	70
4.6.1.1	Rotenone.....	71
4.6.1.1	Myxothiazol.....	74
4.6.1.1	Antimycin A .....	76
4.7	Epithelzellen anderen Ursprungs.....	78
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>82</b>
5.1	ADP generiert ein Ca <sup>2+</sup> -Signal in AEZ Typ II. ....	82
5.2	In A549-Zellen unterscheiden sich die durch ADP und ATP generierten Ca <sup>2+</sup> -Signale.....	82

5.2.1	Amplitude .....	83
5.2.2	Lokalisation des Ca <sup>2+</sup> -Signals in der Zelle .....	86
5.2.3	Profil .....	94
5.2.4	Latenz und Dauer.....	96
5.3	Wie wird das Ca <sup>2+</sup> -Signal durch ADP generiert? .....	97
5.3.1	Purinrezeptoren.....	97
5.3.2	Quellen für das Ca <sup>2+</sup> - <i>Signalling</i> .....	99
5.3.2.1	Extrazellularraum .....	99
5.3.2.2	ER.....	102
5.3.2.3	Mitochondrium & ROS .....	103
5.4	Welche Auswirkungen könnte das Ca <sup>2+</sup> - <i>Signalling</i> durch ADP auf die Alveolarepithelzelle und den Organismus haben? .....	109
5.5	Gibt es Epithel- oder Karzinomzellen anderen Ursprungs, die auf eine ADP-Stimulation dasselbe Ca <sup>2+</sup> - <i>Signalling</i> zeigen wie A549-Zellen?.....	112
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>114</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>115</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>119</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>132</b>
<b>11.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>133</b>
<b>12.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>135</b>

# 1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Purinerges *Signalling* via dem aus zelleigenen Speichern freigesetzten *second messenger*  $\text{Ca}^{2+}$  beeinflusst sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Konditionen verschiedene Zellfunktionen des Alveolarepithels. Dazu gehören zum Beispiel die Sekretion von *surfactant* zur Vermeidung eines Kollapses der Lungenalveolen aber auch die Proliferation des Epithels zu dessen Regeneration nach Schädigung oder im Rahmen der malignen Entartung (Rice & Singleton, 1987; Schafer, Sedehizade, Welte, & Reiser, 2003). Diese und weitere Effekte werden durch den purinergen Agonisten ATP vermittelt. Beim Abbau von ATP entsteht als erstes Abbauprodukt ADP, welches ebenfalls als Agonist an Purinrezeptoren wirkt und dessen purinerge Wirkung an AEZ Typ II bisher nur sehr marginal untersucht worden ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher folgende Fragen untersucht werden:

1. Bewirkt ADP eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in AEZ Typ II?
2. Unterscheidet sich eine mögliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch ADP von einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch ATP und wenn ja, wie?
3. Wie wird das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal durch ADP ausgelöst?
  - a. Aus welchen Quellen (Extrazellularraum/intrazelluläre Speicher) stammt das  $\text{Ca}^{2+}$ ?
  - b. Welche Purinrezeptoren vermitteln das durch ADP generierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in AEZ Typ II?
  - c. Beeinflussen ROS das durch ADP generierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal und wenn ja, wie?
4. Gibt es andere Zelltypen, die auf eine Stimulation mit ADP dieselbe bzw. eine vergleichbare Reaktion zeigen, wie die untersuchten A549-Zellen?

## 2. Einleitung

### 2.1 Purinerges *Signalling* im Alveolarepithel und die Rolle des ATP

Adenosintriphosphat (ATP), ein Purinnukleotid, ist bereits seit den 1920er Jahren als Cofaktor für verschiedene Zellfunktionen und seit den 1940er Jahren auch als die Energiequelle für den Zellmetabolismus bekannt (Novak, 2011). Es fungiert als die universelle Energiequelle für Energie-abhängige Prozesse innerhalb aller Körperzellen (Eukaryoten) und seine Entstehung ist die gemeinsame Endstrecke aller Stoffwechselwege (Kohlenhydrat-, Fett-, und Proteinstoffwechsel). Es besteht aus einem Adeninrest (Purinrest), Ribose, und drei über Ester- bzw. Anhydridbindungen gebundene Phosphate. Diese Anhydridbindungen werden als „Hochenergie-Bindungen“ bezeichnet, weil ihre Hydrolyse Energie freisetzt. Dabei entstehen sukzessive Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) und Adenosin. Geoffrey Burnstock etablierte die Purinnukleotide in den 1970er Jahren als extrazelluläre Signalmoleküle (Burnstock, 1972, 1976). Dabei regulieren Adenosinnukleotide im Rahmen des sogenannten purinergen *Signallings* als auto- und parakrine Mediatoren verschiedene physiologische und pathologische Prozesse in den unterschiedlichsten Geweben. Für das ATP als purinergem Signalmolekül sind in der Lungenforschung bereits zahlreiche Signalwege und Effekte beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass Epithelien bereits auf Scher-Stress, z.B. Bewegung von Flüssigkeit und mechanische Reizung, mit der Ausschüttung von ATP reagieren (Yamamoto, Korenaga, Kamiya, & Ando, 2000). ATP ist für AEZ Typ II einer der potentesten exogenen Stimuli. Es regt sie dazu an, *surfactant* zu sezernieren (Rice & Singleton, 1986). *Surfactant* ist ein Lipid-Protein-Gemisch, das in den Alveolen der Reduktion der Oberflächenspannung dient und dem Kollaps der Alveolen entgegenwirkt. Empfangen wird das Signal über G-Protein gekoppelte Purinrezeptoren, genauer P2Y-Rezeptoren (Rice & Singleton, 1987). Schließlich kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]$ ), zur Fusion der Lamellarkörperchen mit der Plasmamembran der AEZ Typ II und zur Exozytose des *surfactants* (Rice & Singleton, 1987). Des Weiteren vermittelt ATP, das bei forcierter Lungenbeatmung von AEZ freigesetzt wird, eine alveoläre

Entzündungsreaktion und die Entwicklung eines Lungenödems (Rich, Douillet, Mahler, Husain, & Boucher, 2003). Dabei wirkt das ATP ebenfalls über die P2Y-Rezeptoren und die Freisetzung von Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aus intrazellulären Speichern, wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER), den Mitochondrien, dem Nukleus und dem Golgi-Apparat. Nicht zuletzt konnten Schäfer et al. zeigen, dass extrazelluläre Nukleotide, wie vor allem auch ATP, via Purinrezeptoren und  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* die Proliferation humaner Lungenepithelkarzinomzellen steigern (Schafer et al., 2003).

## 2.2 Purinerges *Signalling* durch ADP

Adenosindiphosphat (ADP) entsteht nach Hydrolyse der äußersten Anhydridbindung des ATPs unter Freisetzung von Orthophosphat. Der Abbau bzw. die Hydrolyse des ATP findet Enzym-vermittelt außerhalb der Zellen in Konkurrenz zur Aktivierung der Purinrezeptoren statt. Die verantwortlichen Enzyme sind die sogenannten Ectonukleotidasen, die extrazelluläre Nukleotide zu ihren Nucleosiden abbauen und somit direkten Einfluss auf das purinerge *Signalling* nehmen (Robson, Seigny, & Zimmermann, 2006). ADP ist als wichtigster purinerges Agonist zum Beispiel im Rahmen der zellulären Hämostase bzw. der Thrombozytenaggregation ausgesprochen gut untersucht (Hollopeter et al., 2001). Beide Rezeptoren (P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor), über die es dabei wirkt, und die zugrundeliegenden Signalwege sind klar benannt. Am P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor der Thrombozyten bewirkt aus beschädigtem Endothel und den Thrombozyten selbst freigesetztes ADP eine Aktivierung eines G<sub>q</sub>-Proteins. Über den folgenden Anstieg intrazellulären Calciums kommt es zur Form-Änderung der Thrombozyten. Die folgende Thrombozytenaggregation wird über den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor, das über diesen aktivierte G<sub>i</sub>-Protein und die Inhibition der Adenylylcyclase in den Thrombozyten vermittelt (Hollopeter et al., 2001). Durch die Aktivierung zahlreicher Thrombozyten entsteht ein Thrombozytentrombus, der das verletzte Blutgefäß verschließt.

Weniger gut untersucht ist, wie ADP in AEZ purinerges  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* auslöst, welche Rezeptoren und Signalwege dem zugrunde liegen und welche  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher beteiligt sind. Bekannt ist, dass im Alveolarepithel auch eine ADP-Stimulation die Sekretion von *surfactant* und die Zellproliferation anregt (Rice & Singleton, 1986; Schafer et al., 2003), ADP wird dabei im Vergleich zu ATP jedoch stets als schwächerer Agonist an

den in AEZ vorkommenden P2Y-Rezeptoren beschrieben. Ein spezifischer Rezeptor, über den das ADP seine Wirkung ausübt, konnte für das Alveolarepithel bisher nicht benannt werden.

In vorangehenden Untersuchungen zu dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass ADP in AEZ Typ II  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale hervorruft, die sich in vielerlei Hinsicht von den durch ATP hervorgerufenen Signalen unterscheiden und deren Intensität im Nukleus der Zellen am höchsten zu sein scheint (M. Kiefmann, 2012). Dies wirft die Frage auf, ob ADP an AEZ tatsächlich nur als schwächere Version des ATP wirkt, oder ob für dieses Nukleotid an AEZ eine besondere Rolle die Zellfunktionen betreffend existiert.

### 2.3 Calcium

$\text{Ca}^{2+}$  ist ein lebenswichtiges Kation und Elektrolyt, hat ein Molekulargewicht von 40 kDa und ist in Eukaryoten unter anderem ubiquitär als sogenannter *second messenger* an der Signaltransduktion beteiligt. Liganden der Plasmamembranrezeptoren, sogenannte *first messenger*, wie zum Beispiel Hormone, Neurotransmitter und im Besonderen auch Nukleotide, überwinden die Plasmamembran nicht. Um ihr Signal innerhalb der Zelle zu verbreiten und zu verstärken, aktivieren sie Rezeptoren in den Membranen, die ihrerseits wieder intrazelluläre Signalmoleküle, die sogenannten *second messenger*, aktivieren.  $\text{Ca}^{2+}$  ist einer der wichtigsten und weit verbreitetsten *second messenger*, da es zahlreiche Zellfunktionen, wie zum Beispiel die Exozytose, die Kontraktion von Muskelzellen, die Gentranskription und die Apoptose beeinflusst (M J Berridge, 1997; Clapham, 1995).

Während die zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ ) im Ruhezustand einer Zelle etwa 0,05 bis 0,1  $\mu\text{M}$  beträgt, beträgt sie im Extrazellulärraum etwa das 10.000-fache (ca. 1000  $\mu\text{M}$ ) ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ex}}$ ). Dauerhaft hohe  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  können zu einer irreversiblen Schädigung der Zelle und nicht selten zur Apoptose führen (M J Berridge, 1997; Szalai, Krishnamurthy, & Hajnoczky, 1999). Damit  $\text{Ca}^{2+}$  als *second messenger* fungieren kann, ist von essentieller Bedeutung für die Zelle, dass die Konzentrationsanstiege im Zytosol zeitlich und räumlich stark begrenzt werden, also transient und lokalisiert sind. Anstatt, dass die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  also dauerhaft erhöht bleibt, um Stoffwechselwege in Gang zu halten, finden sich eher  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes und/oder oszillierende Konzentrationsverläufe mit

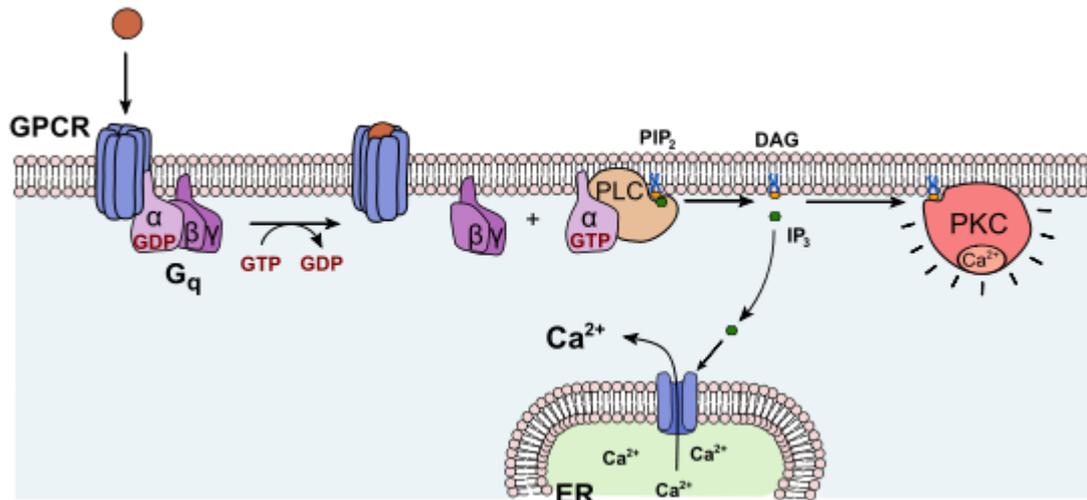
Konzentrationsspitzen und -tälern, bei denen das  $\text{Ca}^{2+}$  durch zelluläre Proteine gepuffert, oder zwischen den einzelnen intrazellulären Zellkompartimenten und dem Extrazellularraum verschoben wird (Clapham, 2007; Zhang, Fritz, Ibarra, & Uhlen, 2011). Der Antrieb für eine Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]$  in den Kompartimenten ergibt sich aus dem osmotischen Druck (Konzentrationsgradienten an den Membranen der einzelnen Kompartimente) und den diversen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Transportern in den Membranen. Zu letzteren gehören unter anderem die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen der Plasmamembran (Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, PMCA), des sarkoplasmatischen oder endoplasmatischen Retikulums (SR bzw. ER; Sarkoplasmatisches/Endoplasmatisches Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase, SERCA), die  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) der Plasmamembran und der Membran des ER/SR und die Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) in der Plasma- und der inneren Mitochondrienmembran (Putney & McKay, 1999).

Auch in den einzelnen Zellorganellen unterscheidet sich die  $[\text{Ca}^{2+}]$  zum Teil deutlich von der im Zytosol und der im Extrazellularraum (EZR). Im ER, dem wichtigsten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, beträgt sie je nach Zelltyp zwischen 500 und 3000  $\mu\text{M}$  (Alonso, Villalobos, Chamero, Alvarez, & Garcia-Sancho, 2006; Palmer, Jin, Reed, & Tsien, 2004). Auch die Mitochondrien, der Zellkern (Nukleus) und der Golgi-Apparat einer Zelle sind für ihre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase von wichtiger Bedeutung, da sie z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen speichern und an der Signaltransduktion via  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen teilnehmen. Des Weiteren benötigen alle diese Zellorganellen  $\text{Ca}^{2+}$  um ihre Funktionen ausüben zu können (Brini, Cali, Ottolini, & Carafoli, 2013). Im Falle einer Stimulation der Zelle, kann sich die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  in Teilen der Zelle oder dem gesamten Zytosol durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär und/oder durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus den  $\text{Ca}^{2+}$ -speichernden Zellorganellen um ein Vielfaches erhöhen. Dabei kommt es zunächst meist zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER über  $\text{IP}_3\text{R}$ , die sich gehäuft den *voltage dependent anion channels* (VDAC) und  *$\text{Ca}^{2+}$ -gated  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporters* (MCU) der Mitochondrien „gegenüberliegend“ befinden. Die Kanäle sind physisch über das Zytoskelett gekoppelt und liegen sehr nah (nm) beieinander. Mitochondrien sind in der Lage, lokalisierte hohe  $[\text{Ca}^{2+}]$ , sogenannte  *$\text{Ca}^{2+}$ -Microdomains*, zu registrieren und  $\text{Ca}^{2+}$  aufzunehmen und zu sequestrieren. Sie fungieren als  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer, benötigen aber für ihre Stoffwechselprozesse ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ . Sinkt die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ , geben Mitochondrien  $\text{Ca}^{2+}$  wieder ab. Das ER setzt sich als *nuclear envelope* (NE) um den Zellkern fort. Der NE

weist dieselben Kanäle und Transporter auf wie das ER. Im Zellkern spielt  $\text{Ca}^{2+}$  eine bedeutende Rolle bei der Gentranskription, indem es z.B. an Transkriptionsfaktoren und andere Proteine bindet, ihre Konformation ändert und sie dadurch (in-)aktiviert oder (un-)zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie macht. Der Zellkern fungiert also ebenfalls als „ $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer“. Kleinere  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher einer Zelle sind der Golgi-Apparat, der  $\text{Ca}^{2+}$  für die posttranslationale Modifikation und Zuordnung von Proteinen benötigt und ebenfalls am  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* einer Zelle teilnimmt, die Endo- und Lysosomen und die sekretorischen Vesikel (Brini et al., 2013; Pizzo, Lissandron, Capitanio, & Pozzan, 2011).

## 2.4 Purinerge Signaltransduktion

Purinerge Signaltransduktion spielt im menschlichen Körper ubiquitär eine bedeutende Rolle, unter anderem auch in der Gen-Expression (Chorna et al., 2004). Extrazelluläre Nukleoside, Nukleotide und ihre Metabolite fungieren dabei als parakrine Mediatoren, die ihre Wirkungen auf die Zielzelle über Purinrezeptoren ausüben. Purin- und Pyrimidinnukleoside sind Adenin, Guanosin, Thymidin, Cytosin und Uridin. Ihre Nukleotide, d.h. Mono-, Di- und Triphosphate, sind nicht nur als Bausteine der DNA und als Energieträger sondern auch als intra- bzw. extrazelluläre Signalmoleküle anerkannt. Man unterscheidet zwei Typen von Purinrezeptoren: P1- und P2-Rezeptoren (Burnstock, 2007). G-Protein gekoppelte, Adenosin-selektive P1-Rezeptoren werden in vier Subgruppen ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  und  $A_3$ ) unterteilt. P2-Rezeptoren hingegen teilen sich in zwei Subgruppen, P2X-Rezeptoren (P2XR, 1-7), die auf ihre Aktivierung hin als Ionenkanal dienen (ionotrope Rezeptoren) und den Einstrom von Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ) erlauben, und G-Protein-gekoppelte (GPCR; metabotrope Rezeptoren) P2Y-Rezeptoren (P2YR; 8 bekannte humane Rezeptoren: 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) (Burnstock, 2007). Bei Aktivierung üben letztere ihre Wirkung über G-Proteine (u.a.  $G_{q/11}$ ) aus und aktivieren unter anderem die  $\text{IP}_3$ -Kaskade (von Kugelgen & Hoffmann, 2016). Dies führt wie oben beschrieben zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER und anderen  $\text{IP}_3$ -sensitiven intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern und zu einer Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  (M. J. Berridge, Bootman, & Roderick, 2003).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des IP<sub>3</sub>-Signalweges.** Ein Ligand, z.B. ADP, aktiviert einen G-Protein gekoppelten Transmembranrezeptor, die aktivierte Untereinheit des G-Proteins aktiviert wiederum eine PLC, die PIP<sub>2</sub> aus den Plasmamembranen in DAG und IP<sub>3</sub> spaltet. IP<sub>3</sub> aktiviert dann IP<sub>3</sub>R, z.B. am ER (Horton, A, Scrimgeour, Perry, & Rawn, 2008).

Die unterschiedlichen in einer Zelle vorkommenden P2YRs können zu Homomeren, Heteromeren oder mit Ecto-Nucleosid Triphosphat Diphosphohydrolasen (NTDPasen, hydrolisieren ATP zu ADP) assoziieren, sodass eine hohe Anzahl verschiedener zellulärer Antworten und Effekte durch die Stimulation mit Adeninnukleotiden und -nucleosiden möglich ist (Schicker et al., 2009).

Eine pharmakologische Charakterisierung der P2YR hat dazu geführt, dass für jeden der Rezeptoren die spezifischen und hoch potentesten natürlichen und synthetischen Agonisten und Antagonisten bestimmt werden konnten (Burnstock, 2007; von Kugelgen & Hoffmann, 2016). ATP ist dabei ein mehr oder weniger potenter natürlicher Agonist an fast allen bekannten Purinrezeptoren außer am P2Y<sub>14</sub>R.

Für die meisten Spezies gilt, dass ADP der potenteste endogene bzw. natürliche Agonist am P2Y<sub>1</sub>R ist (Burnstock, 2007; Ralevic & Burnstock, 1998). P2Y<sub>1</sub>R kommt in vielen Geweben vor und spielt beispielsweise in der Plättchenaggregation eine bedeutende Rolle.

Für P2Y<sub>2</sub>R sind die hoch potentesten endogenen/natürlichen Agonisten UTP und ATP, während ihre Abbauprodukte UDP und ADP weitaus weniger potent sind. P2Y<sub>2</sub>R kommt eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Immunantworten zu. Die

Rezeptoren werden im Gewebe durch Entzündungsmediatoren hochreguliert. Ihre Aktivierung führt zu einer Hochregulation von Cyclooxygenasen (COX) und eine erhöhte Synthese und/oder Freisetzung von Arachidonsäure, Prostaglandinen und Stickstoffmonoxid (NO). In Epithelien beeinflusst die Aktivierung von P2Y<sub>2</sub>R die Ionensekretion und die Permeabilität des Epithels für Ionen, z.B. Chlorid (Cl<sup>-</sup>) (Communi, Paindavoine, Place, Parmentier, & Boeynaems, 1999).

Der humane P2Y<sub>6</sub>R wird vor allem durch UDP aktiviert, wohingegen Adeninnukleotide nahezu keine Wirkung auf den Rezeptor haben (von Kugelgen & Hoffmann, 2016). Er kommt in vielen Geweben vor und seine Aktivierung hat je nach Gewebetyp spezifische Auswirkungen (Vasokonstriktion, Modulation von Immunantworten, Sekretion, Stoffwechselregulation).

Der natürliche Agonist des P2Y<sub>11</sub>R ist ATP, während ADP der des P2Y<sub>12</sub>R und P2Y<sub>13</sub>R ist. P2Y<sub>11</sub>R-Aktivierung wirkt sich u.a. auf das Immunsystem und das Schmerzempfinden aus. P2Y<sub>12</sub>R koppelt an inhibitorische G-Proteine und wirkt über eine Herunterregulation von zyklischem AMP (cAMP). P2Y<sub>12</sub> wird insbesondere in Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert und ist das molekulare Target der verschiedenen Thrombozytenaggregationshemmer, wie z.B. Clopidogrel. P2Y<sub>13</sub>R scheint unter anderem neuroprotektive Effekte zu vermitteln.

Eine Sonderstellung nimmt der P2Y<sub>14</sub>R ein. Natürliche Agonisten an diesem Rezeptor sind nicht die Purin-Nukleotide selbst sondern ihre Zucker (z.B. UDP-Glukose/-Galaktose) (Burnstock, 2007). P2Y<sub>14</sub>R koppelt wie P2Y<sub>12</sub>R und P2Y<sub>13</sub>R an inhibitorische G-Proteine. Seine Aktivierung hat Auswirkungen auf das Immunsystem und den Glukosestoffwechsel (von Kugelgen & Hoffmann, 2016).

Purin- und Pyrimidinderivate (Nukleotide/Nukleoside; u.a. ATP, ADP und UTP) werden als auto- oder parakrine Mediatoren von den Epithelzellen ausgeschüttet und wirken somit nur lokal, da sie schnell von ubiquitär vorkommenden Ektonukleotidasen zu ihren Metaboliten ADP, AMP und Adenosin abgebaut werden (Robson et al., 2006). Ihre Ausschüttung geschieht abhängig vom Zelltyp, zum Beispiel als Antwort auf physiologische Stimuli wie Hormone und Neurotransmitter oder auf pathologische Stimuli wie außergewöhnliche mechanische Belastungen (Watt, Lazarowski, & Boucher, 1998), Zellyse oder exogene Pathogene (Novak, 2011).

Auch das Epithel der Atemwege bzw. das Alveolarepithel nutzt die purinerge Signaltransduktion. Dabei werden die Wirkungen der Nukleotide/Nukleoside über membranständige P2-Rezeptoren vermittelt. Im Alveolarepithel ist der G-Protein-gekoppelte P2Y-Rezeptor der vorherrschende Rezeptor-Typ (Donaldson, Picher, & Boucher, 2002). Unter anderem werden über die purinerge Signaltransduktion in Atemwegen und Lunge kurzfristige Funktionen, wie die Ionensekretion, die mukoziliäre Clearance und die Exozytose z.B. von *surfactant* (Novak, 2011), aber auch langfristige Funktionen, wie die Transkription von Genen und die Zellproliferation, gesteuert. Ersteres macht Nukleotide/Nukleoside zu pharmakologischen Targets im Rahmen von Störungen der Atemwegs- und Lungenphysiologie, letzteres zu potenziellen Mediatoren neoplastischer Transformation und Tumorzellproliferation. Je nach vorherrschendem Rezeptor-Subtyp auf den Tumorzellen können sie dabei fördernd oder inhibitorisch auf das Tumorwachstum wirken.

## **2.5 Endoplasmatisches Retikulum und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>)**

Das Zellorganell ER ist ein Netzwerk aus Membranen und steht über diese in enger Verbindung zum Zellkern. Es erstreckt sich über das gesamte Zytoplasma und kommt daher mit jedem Ca<sup>2+</sup>-Signal und jedem Ca<sup>2+</sup>-freisetzenden Faktor unmittelbar in Kontakt (Tran, Ohashi, & Watanabe, 2000). Mit membranständigen Ribosomen spielt es als raues ER eine große Rolle in der Proteinsynthese und posttranslationalen Modifikation von sekretorischen und Membran-Proteinen. Darüber hinaus ist es mit etwa 75% des intrazellulären Gesamt-Ca<sup>2+</sup> der wichtigste Ca<sup>2+</sup>-Speicher einer Zelle, in dem Gesamt-Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen von über 1000µM (freies (100-700µM) und gebundenes Ca<sup>2+</sup>) erreicht werden können (Foskett, White, Cheung, & Mak, 2007; Tran et al., 2000). ATP-betriebene Pumpen (SERCA) sorgen dafür, dass Ca<sup>2+</sup> entgegen seines Konzentrationsgefälles in das ER gelangt.

Der Ca<sup>2+</sup>-Ausstrom aus dem ER in das Zytoplasma erfolgt über IP<sub>3</sub>R. IP<sub>3</sub>R sind (tetramerische) intrazelluläre IP<sub>3</sub>-gesteuerte Ca<sup>2+</sup>-(Freisetzungs)-Kanäle. Der größte Teil der IP<sub>3</sub>R einer Zelle ist in der Membran des ER lokalisiert, besonders dicht im perinukleär gelegenen ER (Bourguignon, Iida, Sobrin, & Bourguignon, 1994; Tran et al., 2000; Zhang et al., 2011). Bis heute sind drei IP<sub>3</sub>R-Subtypen (IP<sub>3</sub>R1, IP<sub>3</sub>R2 und

IP<sub>3</sub>R3) und einige Splicing-Varianten bekannt (Mikoshiya, 2007). IP<sub>3</sub>R2 reagiert am sensibelsten auf IP<sub>3</sub> und generiert nach Stimulation langanhaltende, regelmäßige Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen, während IP<sub>3</sub>R1 weniger regelmäßige Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen und IP<sub>3</sub>R3 lediglich monophasische Ca<sup>2+</sup>-Amplituden erzeugt. Typ 2 und weniger deutlich auch Typ 1 sind also pro-oszillatorische Rezeptoren. Im Gegensatz dazu hat der Typ 3 Rezeptor in vielen Zellen einen anti-oszillatorischen Einfluss (Miyakawa et al., 1999; Zhang et al., 2011). Eine Aktivierung der IP<sub>3</sub>-Kaskade durch verschiedene Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und die anschließende Aktivierung der intrazellulären Phospholipase C (PLC) durch deren Untereinheiten führt zu einer (teilweisen) Ca<sup>2+</sup>-Entleerung des ER in das Zytosol. Die PLC spaltet dabei Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) aus der Plasmamembran in Diacylglycerol (DAG) und IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> bindet an die IP<sub>3</sub>R und löst die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER aus. Die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung-Aktivität der IP<sub>3</sub>R wird durch verschiedene intrazelluläre Modulatoren, wie Proteinkinasen (PK) (wie z.B. Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC), Ca<sup>2+</sup>/CaM abhängige Protein Kinase II (CamKII)), IP<sub>3</sub>-bindende Proteine, IP<sub>3</sub>, ATP, Calmodulin (CaM), Cytochrom C und Ca<sup>2+</sup> selbst reguliert (Zhang et al., 2011). Eine geringe, aber ansteigende [Ca<sup>2+</sup>] aktiviert IP<sub>3</sub>R (Ca<sup>2+</sup>-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung bzw. *Calcium induced calcium release*, CICR), eine hohe [Ca<sup>2+</sup>] inhibiert sie.

## 2.6 Mitochondrium

Als weitere wichtige Zellorganellen der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase gelten die Mitochondrien mit einem etwa 25%igen Anteil am intrazellulären Gesamt-Ca<sup>2+</sup> (Tran et al., 2000). Die Mitochondrien werden durch zwei Membranen begrenzt, eine innere (*inner mitochondrial membrane*, IMM) und eine äußere (*outer mitochondrial membrane*, OMM), zwischen denen sich der sogenannte Intermembranraum befindet. Das Innere des Mitochondriums wird als Matrixraum bezeichnet. Mitochondrien sind an vielen Stoffwechselprozessen der Zelle maßgeblich beteiligt (Pyruvat-Oxidation,  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, Zitratzyklus). Sie werden als ‚Kraftwerke der Zelle‘ bezeichnet, da an ihren IMM die Atmungskette bzw. die oxydative Phosphorylierung (OXPHOS) abläuft, deren Endprodukt die universell nutzbare energiereiche Verbindung ATP ist.

Die in der IMM lokalisierte ATP-Synthase (Komplex V der Atmungskette) wird über einen Protonengradienten zwischen Intermembran- und Matrixraum betrieben. Dieser

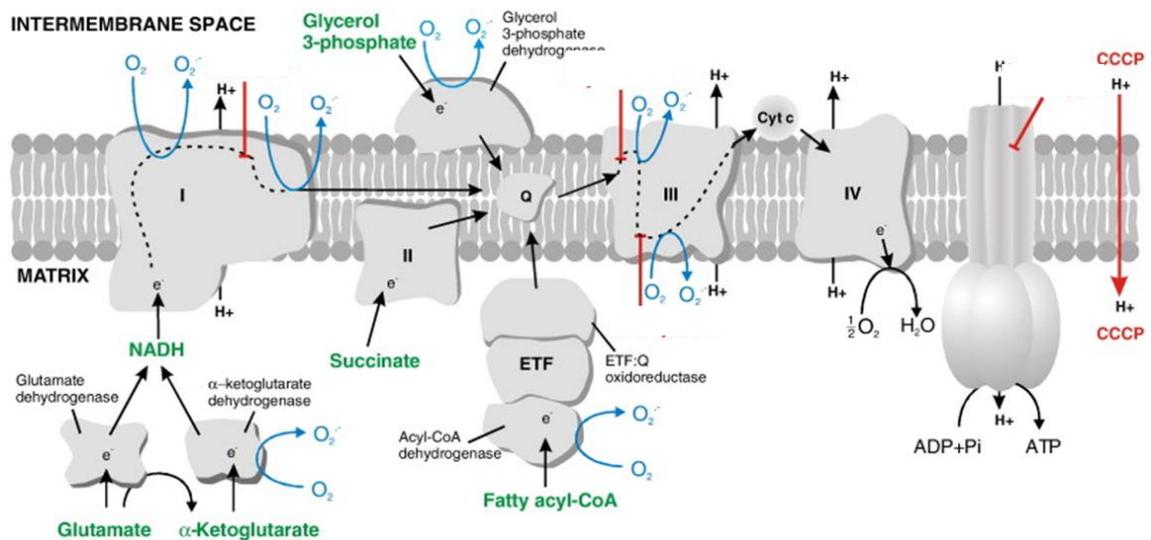
wird von den Komplexen eins bis vier der Atmungskette aufgebaut, die ebenfalls in der IMM lokalisiert sind und Protonen/H<sup>+</sup>-Ionen aus dem Matrix- in den Intermembranraum transportieren. Aufgrund dieses Prozesses wird ein hohes Ruhe-Transmembranpotential bzw. ein hoher elektrochemischer Gradient von bis zu -220mV ( $\Delta\psi_m$ ; ~150-190mV elektrischer und 30-60mV pH/chemischer Gradient, bzw. eine pH-Differenz zwischen den Räumen von etwa 0,75 (Bonora et al., 2012)) zwischen den beiden mitochondrialen Kompartimenten mit einem relativ zum Intermembranraum negativ geladenen Matrixraum erschaffen (Nicholls, 1974). Diese negative Ladung führt dazu, dass Kationen, wie Ca<sup>2+</sup>, eine in den Matrixraum gerichtete elektrische Kraft erfahren. Die IMM ist der Bakterienmembran äußerst ähnlich und enthält, anders als die OMM und die Plasmamembran einer Zelle, das Phospholipid Cardiolipin. Cardiolipin verhindert den Zusammenbruch des aufgebauten Membranpotentials, indem es die IMM *per se* impermeabel für Ionen macht. Ein Ionen-Ein- und Ausstrom kann also ausschließlich über Ionenkanäle, Ionen-Austauscher oder aktive Ionentransporter realisiert werden. Die IMM ist mit solchen Transportern ausgestattet. Für den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über die IMM in den Matrixraum sorgt der mitochondriale, hoch-selektive MCU. Für den (elektroneutralen und somit das Membranpotenzial erhaltenden) Ausstrom sorgen ein 3Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX) und ein H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (Drago, Pizzo, & Pozzan, 2011; D. Jiang, Zhao, & Clapham, 2009; Palty et al., 2010; Poburko & Demaurex, 2012). Nur sehr hohe [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> über 0,5µM, also über dem Fünf- bis Zehnfachen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> zu Ruhebedingungen, verursachen einen Netto-Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, also einen Einstrom, der größer ist als der gleichzeitige Ausstrom über die NCX und den H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher. Das liegt daran, dass der MCU unter physiologischen Konditionen eine relativ geringe Affinität zu Ca<sup>2+</sup> (Kd 20-30µM) hat. Daher wird eine substantielle Influx-Rate erst ab einer extramitochondrialen [Ca<sup>2+</sup>] von 5-10µM erreicht. Eine derart hohe [Ca<sup>2+</sup>] wird im gesamten Zytosol gesunder Zellen selten bzw. nie erreicht, wohl aber direkt an den IP<sub>3</sub>R des ER und den Ca<sup>2+</sup>-Kanälen der Plasmamembran (hier bis zu 10-100µM) (Csordas & Hajnoczky, 2009; Drago et al., 2011; Rizzuto et al., 1998). Die Öffnungs-Wahrscheinlichkeit des MCU ist stark abhängig von  $\Delta\psi_m$  bzw. der Hyperpolarisation der Mitochondrien, der Magnesiumkonzentration ([Mg<sup>2+</sup>]) und der [Ca<sup>2+</sup>] selbst. Dabei hat Ca<sup>2+</sup> eine biphasische Wirkung auf den MCU ähnlich wie auch auf die IP<sub>3</sub>R (Moreau, Nelson, & Parekh, 2006).

Die äußere Membran der Mitochondrien (OMM) enthält als wichtigste Transportkanäle die VDAC, die spannungs- bzw. Transmembranpotential-abhängig Moleküle von bis zu 5000kDa zwischen Zytosol und Intermembranraum des Mitochondriums passieren lassen und so den Stoffaustausch zwischen beiden gewährleisten (Anionen, Kationen, ATP,  $\text{Ca}^{2+}$ , (meist anionische) Metabolite) (Shoshan-Barmatz, Israelson, Brdiczka, & Sheu, 2006). Bei niedrigen Transmembranpotentialen haben die VDAC ihr höchstes Leitvermögen. Hohe positive oder negative Potentiale führen zu einem geringeren Leitvermögen, einer wachsenden Selektivität für kleine Kationen und abnehmenden Permeabilität für ADP und ATP. Des Weiteren spielen oligomerisierte VDACs womöglich eine Rolle bei der Formung der sog. Permeability Transition Pore (PTP) und somit bei der Apoptose (Shi, Jiang, Chen, & Tang, 2003; Shoshan-Barmatz et al., 2006; Zalk, Israelson, Garty, Azoulay-Zohar, & Shoshan-Barmatz, 2005). Proteine von einer Größe über 5000kDa werden, nur wenn sie eine Signalsequenz enthalten, die sie als mitochondriale Proteine ausweist, mittels einer Translokase (*translocase of the outer membrane*) in den Intermembranraum transportiert.

Die VDACs der Mitochondrien stehen in engem (10-25nm), sich dynamisch veränderndem Kontakt zu den  $\text{IP}_3\text{Rs}$  der ER-Membran, die an den Berührungsflächen beider Organellen besonders dicht gelegen sind (Csordas, Thomas, & Hajnoczky, 1999). Dabei formen  $\text{IP}_3\text{Rs}$  und VDACs multimolekulare Komplexe. Beide Organellen sind physisch durch das Zytoskelett und über Protein-Protein Verbindungen gekoppelt (z.B. grp75 (glucose regulated protein 75) (Rizzuto et al., 2009) und Mitofusin (MFN2) (Bakowski, Nelson, & Parekh, 2012; de Brito & Scorrano, 2008)). Grp75 formt Komplexe mit VDAC Typ 1,  $\text{IP}_3\text{R}$  Typ 1 und Typ 3 und MFN2 (Csordas & Hajnoczky, 2009). Die Nähe ermöglicht es, dass es kurz nach der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER zu einer Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]$  in der mitochondrialen Matrix ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ ) kommen kann (Giacomello et al., 2010), weil die nahe Positionierung der Mitochondrien am Ort der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung bei jeder Öffnung der  $\text{IP}_3\text{R}$  eine schnelle und sichere  $\text{Ca}^{2+}$ -Exposition und eine genaue Stimulus-Resonanz-Kopplung ermöglicht (Bakowski et al., 2012; Parekh, 2011; Rizzuto, Brini, Murgia, & Pozzan, 1993). Die physischen Verbindungen zwischen Mitochondrien und ER werden auch als „intrazelluläre Synapsen“ bezeichnet (Csordas et al., 1999). Ein Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  beschleunigt den oxidativen Metabolismus durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von Matrixdehydrogenasen (Csordas

& Hajnoczky, 2009). Die Beteiligung der Mitochondrien am zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling*, d.h. das Sequestrieren von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  durch die Mitochondrien, kann also die Aktivität mitochondrialer Stoffwechsellzyme und damit die Produktion von Redoxäquivalenten (NADH,  $\text{FADH}_2$ ), ATP und nicht zuletzt von ROS steigern (Griffiths & Rutter, 2009). Die vermehrte Produktion von Redoxäquivalenten und ATP ermöglicht es der durch extrazelluläre Liganden (Hormone, Nukleotide o.a.) stimulierten Zelle einem gesteigerten Energiebedarf gerecht zu werden. ROS, wie Hydroxyl-Radikale (HO), Superoxidanionen ( $\text{O}_2^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), entstehen im Zellinneren vor allem in den Mitochondrien als Produkte der Atmungskette, die vor allem an den Komplexen I und III entstehen (Csordas & Hajnoczky, 2009). ROS galten lange einzig als schädliche Nebenprodukte der Atmungskette, die die Zellalterung und den Zelltod durch oxidativen Stress vorantreiben (Sohal & Weindruch, 1996). Mittlerweile sind sie jedoch auch als intrazelluläre Botenstoffe angesehen.  $\text{O}_2^-$  kann aufgrund seiner negativen Ladung und hohen Reaktivität die mitochondrialen Membranen nur über Membrankanäle wie den *inner membrane anion channel* (IMAC) und VDAC verlassen.  $\text{H}_2\text{O}_2$  dagegen soll biologische Membranen frei passieren können (Csordas & Hajnoczky, 2009). ROS als Signalmoleküle können also sowohl lokale als auch weiter entfernte Targets in der Zelle beeinflussen. Unter anderem modulieren sie redox-sensitive Targets mit reaktiven Schwefelgruppen (Cystein-Reste, Disulfidbrücken), wie z.B. Enzyme des Zitratzyklus (Aconitase,  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase), um die weitere ROS-Produktion einzudämmen oder Ionenkanäle, wie  $\text{IP}_3\text{R}$ , SERCA, VDAC und die PTP (Csordas & Hajnoczky, 2009; Waring, 2005).  $\text{IP}_3\text{R}$  wird durch Oxidation für eine  $\text{IP}_3$ -Stimulation sensibilisiert, was das  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* erleichtert bzw. sogar Oszillationen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  hervorrufen kann. Die SERCA-Aktivität wiederum kann durch milde oxidative Konditionen erhöht und durch ein stark oxidatives Milieu gehemmt werden. Des Weiteren inhibieren ROS den  $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust nach extrazellulär über die PMCA und die Wiederaufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in das ER via SERCA (Camello-Almaraz, Gomez-Pinilla, Pozo, & Camello, 2006). Zusammengefasst können ROS einen multimodalen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  verursachen. Unter physiologischen Bedingungen wird die ROS-Konzentration ( $[\text{ROS}]$ ) daher durch intrazelluläre Radikalfänger, wie der Glutathionreduktase/-peroxidase (SOD), der Thioredoxinreduktase und der Katalase

(vorwiegend in Peroxisomen), in subtoxischen Grenzen gehalten (Csordas & Hajnoczky, 2009). Unter pathologischen Bedingungen erzeugt eine hohe [ROS] oxidativen Stress und gilt dann als ein Trigger der Apoptose. Obwohl die Mitochondrien in der Lage sind, persistierend hohe  $Ca^{2+}$ -Level zu puffern, kommt es ab einem gewissen Schwellenwert oder, wenn  $[Ca^{2+}]_{mt}$  zu schnell steigt und zusätzlich proapoptotische Bedingungen, wie oxidativer Stress, erhöhte Phosphat- und erniedrigte Adeninnukleotidkonzentrationen herrschen, zur Öffnung der PTP, zum Zusammenbruch des  $\Delta\psi_m$  und zur Apoptose (Halestrap, 2009). Es wird deutlich, dass das  $Ca^{2+}$ -*Signalling* einer Zelle, je nachdem in welcher Situation sie sich befindet, von einer Vielzahl fördernder und inhibierender Feedbackmechanismen abhängig ist. Unter anderem laufen diese Mechanismen innerhalb der Atmungskette der Mitochondrien ab. Um den Einfluss der einzelnen Komplexe der Atmungskette untersuchen zu können, können sie u.a. pharmakologisch beeinflusst werden.



**Abbildung 2: Mitochondrialer Substrat-Metabolismus, Organisation der mitochondrialen Atmungskette, Orte von Elektronenverlust, und die Effekte von Modulatoren der Atmungskette (Tahara, Navarete, & Kowaltowski, 2009).**

Die Mitochondrien als erregbare Zellorganellen können  $Ca^{2+}$  sequestrieren,  $Ca^{2+}$ -Signale modulieren und selbst elektrische und  $Ca^{2+}$ -Signale generieren und weiterleiten. Sie beeinflussen somit auf vielerlei Weisen das  $Ca^{2+}$ -*Signalling* einer Zelle (Falcke, Hudson, Camacho, & Lechleiter, 1999; Ichas, Jouaville, & Mazat, 1997).

## 2.7 Nukleus

Der Zellkern (Nukleus) einer eukaryotischen Zelle ist ein meist sphärisch geformtes Zellorganell, das in seinem Inneren unter anderem die Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Transkriptionenzyme enthält. Der Nukleus ist nach Außen durch einen Ausläufer bzw. eine Erweiterung des ERs, den *Nuclear Envelope* (NE), vom Zytoplasma getrennt. Der NE besteht aus zwei Membranen mit einem Intermembranraum, der unter anderem als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher dient und in dem Liganden-Bindungsstellen verschiedener Hormonrezeptoren lokalisiert sind (Jong, Kumar, Kingston, Romano, & O'Malley, 2005). Beide Membranen des NE enthalten neben Hormon- und anderen Rezeptoren (z.B. für Angiotensin, Endothelin, Prostaglandin)  $\text{IP}_3\text{Rs}$  und werden von *Nuclear Pore Complexes* (NPC) durchspannt (Bkaily et al., 2006). NPCs sind Membrankanäle, die für Moleküle von bis zu 20-40kDa, wie beispielsweise verschiedene Ionen, durch Diffusion passierbar sind (Bootman, Thomas, Tovey, Berridge, & Lipp, 2000). Verschiedene Zellen exprimieren unterschiedlich viele NPCs in ihren nukleären Membranen; unter anderem davon abhängig ist die Geschwindigkeit des Stoffaustausches und damit der Konzentrationsausgleich von Stoffen zwischen den Zellkompartimenten (Wang & Clapham, 1999). Unter anderem werden auch die *messenger*-Ribonukleinsäuren (mRNA) durch die NPCs in das Zytosol der Zelle geschleust. Große Moleküle benötigen eine Signalsequenz, um die nukleären Membranen überwinden zu können. Viele Studien zur Leitfähigkeit der NPCs kommen zu dem Ergebnis, dass sie allosterisch unter anderem durch  $\text{Ca}^{2+}$  oder ATP hoch- bzw. herunterreguliert werden kann (Bootman, Fearnley, Smyrniak, MacDonald, & Roderick, 2009). Der NE setzt sich in das Innere des Zellkerns im Sinne eines nukleoplasmatischen Retikulums fort. Dies besteht aus sich dynamisch verändernden tubulären Einstülpungen in das Nukleoplasma mit doppelten Membranen. Diese exprimieren zum Teil  $\text{IP}_3\text{R}$ , können Mitochondrien beherbergen und stehen oftmals mit dem Nukleolus in Kontakt (Lui, Chan, Suen, Kwok, & Kong, 2003). Der Nukleolus, oder das Kernkörperchen, ist ein im Mikroskop besonders dicht erscheinender Teil der DNA mit den Genen für die rRNAs. Diese Gene werden permanent transkribiert. Als weitere Speicher nukleären Calciums gelten  $\text{IP}_3$ -sensitive nukleoplasmatische Chromogranin-enthaltende Vesikel im Hetero- und Euchromatin (Yoo, Chu, Kim, & Huh, 2007). Untersuchungen haben gezeigt, dass die  $\text{IP}_3\text{Rs}$  einer Zelle, bzw. ihres endoplasmatischen Retikulums, besonders konzentriert um

den Nukleus zu finden sind.  $\text{Ca}^{2+}$ , welches aus diesen Kanälen freigesetzt wird, diffundiert schnell über die NPCs in das Nukleoplasma (Chamero, Villalobos, Alonso, & Garcia-Sancho, 2002; Lipp, Thomas, Berridge, & Bootman, 1997). Dennoch besitzt auch der Nukleus selbst bzw. der NE die Maschinerie zur Generierung eigener  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (PIP<sub>2</sub>, PLC Isoformen, IP<sub>3</sub>Rs, RyRs, ADP-Ribosyl Cyclase u.a.). Ob und wann diese Maschinerie zum Einsatz kommt, ist bisher unklar. Nukleäres  $\text{Ca}^{2+}$ -*signalling*, ob fortgeleitet aus dem Zytosol oder aus dem Zellkern selbst entspringend, ist für die Transkription von Genen und die Zellproliferation essenziell, indem es zur (In-)Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beiträgt (Bootman et al., 2009). Dabei scheint insbesondere das durch IP<sub>3</sub> hervorgerufene  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* im perinukleären Zytosol die Proliferation der Zellen zu begünstigen (Higazi et al., 2009). Darüber hinaus können zytosolische Transkriptionsfaktoren durch zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* aktiviert werden und translozieren daraufhin in den Nukleus.

In der unmittelbaren Umgebung zum Zellkern, d.h. in der „perinukleären Region“, befindet sich auch ein Großteil der Mitochondrien einer jeden Zelle, da sie mittels Aktinfilamenten, Microtubuli und Motorproteinen aktiv zu Orten in der Zelle gebracht werden, an denen der Bedarf an Energie bzw. ATP besonders hoch ist (z.B. Nukleolus) (Hollenbeck, 1996; Lui et al., 2003). Die Mitochondrien innerhalb der tubulären Einstülpungen des NE und in der perinukleären Region liefern nicht nur ATP als Energiequelle, sondern sind auch in der Lage,  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Umgebung aufzunehmen. Sie modulieren auf diese Weise besonders die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in direkter Umgebung zum Nukleus und Nukleolus in Amplitude, Dauer und Frequenz und nehmen auf diese Weise Einfluss auf deren Effekte (Echevarria, Leite, Guerra, Zipfel, & Nathanson, 2003; Lui et al., 2003; Lui, Kong, Kwok, & Lee, 1998).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

**Tabelle 1: Geräte.**

Accu-jet Pipette Controller	BrandTech Scientific, Essex, CT, USA
Biosphere Filter Tips 2-200µl, 20µl, 0,5-20µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Brutschrank Heraeus Thermo Scientific Typ BB 6220	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
Burner U-ULS 100HG	Olympus Optical CO. Ltd, Tokyo, Japan
CCD-Kamera CoolSnap HQ	Roper Industries, Sarasota, FL, USA; Visitron Systems GmbH
Eppendorf Reference 20, 500, 2500µl Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research 10, 100, 1000µl Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Filterset 09 BP 450-490 FT 510, LP 515	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Filterset für Fura-2 F71-000	AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland
Lampe Cool Snap HQ	Roper Industries, Sarasota, FL, USA; Visitron Systems GmbH
Lampe Olympus U-RFL-T	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland
LCD Monitor	Fujitsu Ltd., Tokyo, Japan
LCD Monitor Imaging Microscopy	Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland

Mikroskop Axiotech Vario 451032 (FRET)	Carl Zeiss Werk Göttingen, Göttingen, Deutschland
Mikroskop Olympus BX40	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland Olympus optical CO. Ltd , Tokyo, Japan
Mikroskop Olympus CK30-F200	Olympus Optical CO. Ltd, Tokyo, Japan
Optical insights dual view	Photometrics, Tucson, AZ, USA
Reflektorschieber 3 FL	Carl Zeiss Werk Göttingen, Göttingen, Deutschland
Safe Seal Reagiergefäße 1,5 ml, blau, rot, braun, gelb, grün	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sanyo CO2 Incubator MCO-20AIC	Sanyo Electric CO. Ltd,
Sarstedt Serologische Pipette 1, 5, 10, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Shutter Lambda 10-2	HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland. Visitron Systems GmbH, Sutter Instrument CO. USA
Spinning Disc Confocal Microscope System	UKE Microscopy Imaging Facility (umif), Hamburg, Deutschland
Vortexer VF 2	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG IKA Labortechnik, Staufen i. Br., Deutschland
Kaltlichtlampe VSG HBO 100 <i>Illuminating System</i>	Leistungselektronik Jena GmbH, Jena, Deutschland
VWR Pipet Tips 1-200µl	VWR International, West Chester, PA, USA
Wasserbad GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Wasserbad Medingen WB 6 P-D	Industriegesellschaft mbH, Dresden, Deutschland
Wasserbad Typ 1002	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland

WSB PIEZO DRIVE 05	Johnson Matthey Piezo Products GmbH, Redwitz, Deutschland
Zentrifuge Hettich Hämatokrit Typ 201, Typ 1605	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 32	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.**

Falcon 50 ml Polypropylene Conical Tube (Konisches Röhrchen)	BD Becton Dickinson Labware Europe, Becton Dickinson France S.A., Le Pont De Claix, France
Falcon 75 cm <sup>2</sup> Tissue Culture Flask	BD Becton Dickinson Labware Europe, Becton Dickinson France S.A., Le Pont De Claix, France
Glass Botom Culture Dishes; 35mm petri dish, 14 mm Microwell No. 0 coverglass (0,085-0,13 mm) Poly-d-lysine coated	MatTek Corporation, Ashland, MA, USA
25 cm <sup>2</sup> Tissue Culture Flask	Sarstedt inc., Newton, NC, USA
2-well Zellkulturkammern auf Glas Objektträger	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.**

Accutase	Sigma / PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria?
Adenosine	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ADP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
AMP	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Antimycin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Aqua, Spüllösung, destilliert	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
ATP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calcium-Chlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dextran	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DMSO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethylene Glycol Tetraacetic Acid (EGTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fluo-4 AM	Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FuGENE® Transfection Reagent	Roche Life Science, Penzberg, Bayern, Deutschland
Fura-2 AM	Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Glucose, D(+)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hepes	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Histamin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Kalium-Chlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent	Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Magnesium-Chlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
Myxothiazol von Mykobakterien	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natrium-Chlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 10000U/10000µg/ml	Biochrom AG Biotechnologie, Berlin, Deutschland
Pluronic® F127	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Rotenone	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
RNase-freies Wasser siRNA P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>6</sub> scr Allstars Neg. siRNA	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Thapsigargin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypan Blue Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Trypsin from Bovine Pancreas	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
UDP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
UTP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

**Tabelle 4: Puffer und Lösungen.**

DermaLife K Medium Complete Kit (+ Penicillin 10.000U/ml, Streptomycin 10.000µg/ml und Amphotericin B 25µg/ml)	CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf, Deutschland
DMEM Medium	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
EMEM (EARLE'S BALANCED SALTS (EBSS) + 2mM Glutamine + 1% NEAA + 10% FBS + 10.000 U/ml Penicillin und 10.000 U/ml Streptomycin)	(TCC, Manassas, VA, USA
Endothelial Cell Growth Medium MV (+ SupplementMix + 100IE/ml Penicillin + 100µg/ml Streptomycin)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
F-12 K Medium (Kaighn's Modification of Ham's F-12 with L-glutamine)	ATCC, Manassas, VA, USA
Fetales Rinderserum (Fetal Bovine Serum, FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HEPES Buffered Saline Solution-Puffer (HBSS-Puffer)	20mM HEPES, 1mM CaCl <sub>2</sub> , 1mM MgCl <sub>2</sub> , 5mM KCl, 150mM NaCl, 10mM Glucose, ad 1L ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4, 295mOsm
HBSS-Puffer Ca <sup>2+</sup> -frei	20mM HEPES, 1mM MgCl <sub>2</sub> , 5mM KCl, 150mM NaCl, 10mM Glucose, ad 1L ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4, 295mOsm, EGTA 500µM
L-15 Leibovitz Medium (+ 2mM Glutamine + 15% FBS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Opti-MEM® 1x I	Gibco by Lifetechnologies Paisley, PA49RF, UK

### 3.1.5 Verwendete Zelllinien

#### 3.1.5.1 Humane Adenokarzinomzelllinie A549

A549-Zellen, Zellen eines humanen pulmonalen Adenokarzinoms (DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland) stellen in der experimentellen Forschung ein sehr häufiges und gängiges Modell für AEZ Typ II dar. Das Epithel der Lungenalveolen besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen. Während die flachen und langgestreckten AEZ Typ I die Alveolen vollständig einschichtig auskleiden und wesentlich am Gasaustausch beteiligt sind, finden sich die isoprismatischen, kubischen AEZ Typ II teils vereinzelt, teils in Gruppen angeordnet im Alveolarepithel. Ihre mitunter wichtigsten Aufgaben sind die Regeneration der AEZ Typ I durch mitotische Teilung, die Sekretion von immunwirksamen Substanzen wie zum Beispiel *Lysozym* (Mason, 2006), und die Produktion von *surfactant* zur Reduktion der Oberflächenspannung der Alveolen. *Surfactant* wird von den AEZ Typ II in sogenannten Lamellarkörperchen gespeichert und durch Exozytose in die Alveolen sezerniert. Die Lamellarkörperchen sind charakteristisch für AEZ Typ II, im Elektronenmikroskop sichtbar und u.a. durch Tannine anfärbbar (Mason et al., 1982). A549-Zellen bilden in vitro polarisiertes einschichtiges Epithel aus kubischen und polygonalen Zellen (Foster, Oster, Mayer, Avery, & Audus, 1998) und weisen auf eine purinerge Stimulation mit ATP ein  $Ca^{2+}$ -*Signalling* auf. Die Isolation primärer AEZ aus Säugetier-Lungen ist ein hoch komplexer, sehr aufwändiger Prozess, bei dem viele Versuchstiere geopfert werden müssen. Daher gibt es eine Reihe gut kultivierbarer immortalisierter AEZ aus Ratten Mäusen und Menschen.

#### 3.1.5.2 Zellen anderen Ursprungs

Versuche zur purinergen Signaltransduktion wurden zusätzlichen an weitere Zelllinien anderen Ursprungs durchgeführt. Dazu zählen sowohl Karzinomzellen als auch nicht maligne entartete Zellen. L2- und R3-1-Zellen sind Epithelzellen aus Rattenlungen die nicht maligne verändert sind und beide freundlich zur Verfügung gestellt wurden vom Forschungslabor für Anästhesiologie und Intensivtherapie des Universitätsklinikums Dresden. Weitere verwendete nicht maligne veränderte Epithelzellen sind MDCK-Nierenepithelzellen (Nierenepithel, Hund) und humane Keratinozyten (Hautepithel),

beide freundlich überlassen vom Labor für Zell- und Molekularbiologie der Dermatologie am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf. Zu den verwendeten maligne entarteten Zellen gehören die MCF-7-Zellen (humane Adenokarzinomzellen der Mamma) und MD-AMB 231-Zellen (humane Adenokarzinomzellen einer pleuralen Mammakarzinom-Metastase), beide freundlich zur Verfügung gestellt vom Gynäkologischen Forschungslabor im Campus Forschung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Außerdem wurden Versuche an humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HPMEC; PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultivierung**

Die im Mittelpunkt der Untersuchung stehenden A549-Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in F-12 K Medium kultiviert. Dem Medium wurden 10% FBS, 10.000 U/ml Penicillin und 10.000 U/ml Streptomycin zugesetzt. Bei einer Konfluenz von 70 bis 90%, wurden die adhärenenten Zellen mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflaschen (T75) gelöst. Dabei wurde die Wirkung des Trypsins nach drei Minuten durch die Zugabe von FBS unterbrochen. Nach Resuspension mit F-12 K Medium konnten die Zellen dann auf Objektträger mit Zellkulturkammern ausgesät werden. Daraufhin wurden sie erneut über 48 Stunden unter oben genannten Bedingungen kultiviert, bis sich ein einschichtiger Zellrasen mit etwa 80%iger Konfluenz gebildet hatte. Die maximale Passagenzahl betrug 15.

Unter gleichen physikalischen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wurden die L2 und R3-1 Zellen in DMEM Medium, die MDA-MB 231 Zellen in L-15 Leibovitz Medium, die MCF-7 Zellen und MDCK Zellen in EMEM Medium, die Keratinozyten in DermaLife K Medium und die HPMEC in Endothelial Cell Growth Medium MV kultiviert. Auch die Passagierung erfolgte nach demselben Prinzip. Nur die Endothelzellen wurden statt mittels der Trypsin/EDTA-Lösung mittels Accutase vom Boden ihrer Kulturflaschen gelöst. Nach Zentrifugation konnte das gewonnene Zellpellet in Endothelial Cell Growth Medium MV resuspendiert werden.

### **3.2.2 Live-cell Ca<sup>2+</sup>-Imaging**

#### **3.2.2.1 Versuchsablauf**

Um die Zellen für den jeweiligen Versuch mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM anfärben zu können, wurde zunächst das Kulturmedium aus den Kulturkammern abgezogen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 500µl 5µM Fura-2 AM/HBS Lösung je Kulturkammer. Nach Inkubation der Zellen mit dem Farbstoff über 30 Minuten in Dunkelheit und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die von den Zellen nicht aufgenommenen Farbstoffreste mittels HBSS Puffer von den Objektträgern abgewaschen. Zuletzt wurde je nach Versuchstyp je Kulturkammer 1,5ml bis 2ml HBSS (Ca<sup>2+</sup>-haltig/-frei) belassen. Es wurde ein geeignetes Gesichtsfeld mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX40 eingestellt und das Programm Metaflour gestartet. Die Aufnahmen erfolgten im Fünfsekundentakt bei Raumtemperatur.



**Abbildung 3: Versuchsablauf der Auflichtmikroskopie-Versuche. Die Balken des Diagramms zeigen die durchschnittliche Dauer des jeweiligen Versuches in Minuten.**

■ Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM.

■ durchschnittliche Aufnahmezeit der Messbasis innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe.

■ durchschnittliche Präinkubationszeit der Zellen mit Thapsigargin, DMSO, Antimycin, Myxothiazol oder Rotenone.

■ durchschnittliche Aufnahmezeit nach Applikation von entweder ATP oder ADP.

### 3.2.2.2 Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Messung mittels Epifluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Form der Lichtmikroskopie, bei der fluoreszierende Stoffe (Fluorophore) mit Licht einer oder mehrerer Wellenlängen

angeregt (Exzitation) werden und ihre Fluoreszenz, also das von diesen Stoffen emittierte Licht (Emission) einer anderen Wellenlänge, detektiert und quantifiziert wird. Um das vergleichsweise schwache Licht der Fluoreszenz sichtbar zu machen, ist es notwendig, dass Licht aller anderen Wellenlängen mittels geeigneter Filter daran zu hindern, das Auge, beziehungsweise den Detektor (Kamera) zu erreichen. Als Exzitations-Lichtquelle des Epifluoreszenzmikroskops diene eine Quecksilber-Lampe, die weißes Licht emittiert. Zunächst läuft dieses Licht durch Exzitationsfilter (Interferenz-Filter, Semrock, Rochester, NY, USA), die alles Licht mit Ausnahme der Exzitationswellenlängen von Fura-2 (340 und 380nm) absorbieren. Dann läuft es rechtwinklig auf die optische Achse zu und wird darin durch einen um 45° gekippten dichromatischen, Strahl-teilenden Spiegel (*dichroic mirror*) um 90° durch das Objektiv auf das Objekt abgelenkt. Die Dauer der Licht-Exposition des Fluoreszenzfarbstoffes wird mit Hilfe eines Filter-Rades (Shutter Lambda 10-C, Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) kontrolliert. Das auf die Exzitation hin vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht kann aufgrund seiner längeren Wellenlänge (510nm) den dichromatischen Spiegel ungehindert in Richtung Fluoreszenzfilter (*barrier filter*), Objektiv (40x, Wasser Immersion, Numerische Apertur 0,8; Zeiss, Göttingen, Deutschland) und Detektor (Kamera Coolsnap HQ2, Photometrics, Tucson, AZ, USA) passieren (Spring).

#### **3.2.2.2.1 Fura-2 AM**

Fura-2 AM (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland), eine Aminopolycarboxylsäure, ist ein Fluoreszenzfarbstoff und dient als  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator der Darstellung der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) und deren Änderungen. Als Fura-2 Acetoxymethylester kann es Plasmamembranen durch freie Diffusion überwinden. Nach Abspaltung des Acetoxymethylesters durch zelleigene Esterasen verbleibt das aktivierte Fura-2 innerhalb der Zelle, bindet freies  $\text{Ca}^{2+}$  und ändert im Zuge dessen seine Konformation. Fura-2 ist ein radiometrischer Fluoreszenzfarbstoff, das bedeutet, dass sich dessen Exzitationsspektrum verändert, wenn es  $\text{Ca}^{2+}$  bindet.  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenes Fura-2 hat sein Emissionsmaximum bei einer Exzitationswellenlänge von 340nm, freies Fura-2 dagegen bei UV-Licht der Wellenlänge 380nm. Die Emissionsmaxima liegen für beide Exzitationswellenlängen bei Werten um 505-512nm. Das bedeutet, dass die

Konzentration an freiem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  proportional zur Ratio der Fluoreszenzen bei 340/380nm ist (Hirst, Harrison, Hirota, & Lambert, 2005). Während der Messungen mit dem Fluoreszenzmikroskop wird der Farbstoff in den damit beladenen Zellen also mit UV-Licht der Wellenlänge 340nm und 380nm angeregt. Aus der Ratio der Emissionen (Fluoreszenzintensitäten) bei 340nm und 380nm kann bei einem  $K_d$ -Wert von 224 nmol/l (in Puffer ähnlich dem Zytoplasma der Zellen von Säugetieren) und entsprechender Kalibrierung unabhängig von der absoluten Fluoreszenzintensität die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Ruhezustand der Zelle und jener Änderung nach Stimulation berechnet werden. Fura-2 ist demnach ein sogenannter *dual-wavelength indicator*, der durch zwei unterschiedliche Licht-Wellenlängen (340 und 380nm) angeregt wird. Aus den Emissionen eines *dual-wavelength indicators* kann eine Ratio und damit eine absolute  $[\text{Ca}^{2+}]$  berechnet werden. Fluo-4 und sein Vorgänger Fluo-3 sind dagegen *single-wavelength indicators* und werden nur durch eine Licht-Wellenlänge angeregt (Fluo-4: 488nm). Aus der emittierten Wellenlänge sind keine absoluten Werte für eine  $[\text{Ca}^{2+}]$  zu berechnen. Es können stattdessen ausschließlich qualitative Aussagen zu  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Veränderungen gemacht werden. (Perez-Terzic, Stehno-Bittel, & Clapham, 1997).

### 3.2.2.2 Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgte nach der Gleichung von Grynkiewicz (Grynkiewicz, Poenie, & Tsien, 1985).

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

Variablen in der Gleichung nach Grynkiewicz:

$K_d$	Dissoziationskonstante 224nmol/l, für an Fura-2 bindendes $\text{Ca}^{2+}$ bei 37°C
$\lambda_1$	Exzitationswellenlänge 1: 340 nm
$\lambda_2$	Exzitationswellenlänge 2: 380 nm
$F_{\lambda_1}$	Fluoreszenzintensität bei 340 nm Exzitationwellenlänge
$F_{\lambda_2}$	Fluoreszenzintensität bei 380 nm Exzitationwellenlänge
R	Ratio der Fluoreszenzintensitäten $F_{\lambda_1}/F_{\lambda_2}$

$R_{\max}$	Ratio der Fluoreszenzintensitäten $F_{\lambda 1}/F_{\lambda 2}$ bei maximaler $[Ca^{2+}]$
$R_{\min}$	Ratio der Fluoreszenzintensitäten $F_{\lambda 1}/F_{\lambda 2}$ bei minimaler $[Ca^{2+}]$
Sf2	Intensität $\lambda 2$ 380 nm in $Ca^{2+}$ -freier Umgebung
Sb2	Intensität bei $\lambda 2$ 380 nm in $Ca^{2+}$ -haltiger Umgebung
Visc	Viskositätskoeffizient (Wert 1 für wässrige Lösungen, je nach Versuchsprotokoll zwischen 0,7 und 0,85)

Bei der Kalibration werden bei identischer Belichtungszeit, Filtereinstellung und Grundlinien-Ratio durch Messungen bei  $\lambda$  340 nm sowie  $\lambda$  380 nm Werte für  $R_{\max}$ , Sb2,  $R_{\min}$  und Sf2 ermittelt. Zur Ermittlung von  $R_{\max}$  wurde durch die Zugabe von Ionomycin das gesamte  $Ca^{2+}$  nach intrazellulär transportiert. EGTA sorgt für einen maximalen  $Ca^{2+}$ -Ausstrom aus den Zellen, sodass dessen Zugabe zur Ermittlung von  $R_{\min}$  diene. Zum Zwecke der Kalibration erfolgten zwei getrennte Versuche mit  $Ca^{2+}$ -freiem Puffer und  $Ca^{2+}$ -haltigem Puffer. Die Kalibrierung wurde als Protocol-Datei in der Software MetaFluor gespeichert.

### 3.2.2.2.3 Software

Das Computerprogramm Metaflour® (Molecular Devices, Sunnyvale, Californien, USA) ermöglicht es, intrazelluläre Ionenkonzentrationen und deren Änderungen, die bei der Epifluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen durch bestimmte emittierte Fluoreszenzintensitäten zur Darstellung kommen, in Echtzeit zu quantifizieren. Das Programm stellt parallel zwei Wellenlängen, die daraus berechnete Ratio und deren Umrechnung in einen Absolut-Wert der Ionenkonzentration dar. Darüber hinaus kann eine fortlaufende Messung unmittelbar als Graph aufgezeichnet werden. Dies erlaubt eine optimale Beurteilung der zellulären Reaktion auf eine Stimulation über einen definierten Zeitraum. Sowohl die gemessenen Werte für die emittierten Licht-Wellenlängen, als auch die Werte der daraus gebildeten Ratio und die daraus berechneten Absolut-Werte der Ionenkonzentrationen können zur weiteren Bearbeitung in das Rechenprogramm Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) und von dort in andere Statistikprogramme exportiert werden. Dabei wird parallel angegeben, zu welchem Zeitpunkt des Versuchs der jeweilige Wert ermittelt wurde.

### 3.2.2.3 Spinning Disc Live Cell Imaging Konfokalmikroskopie

Konfokalmikroskopie-Versuche wurden ausschließlich mit A549-Zellen durchgeführt. Mittels Licht- und Epifluoreszenzmikroskopie sind ausschließlich zweidimensionale Abbildungen von dreidimensionalen Objekten möglich. Um zu beweisen, dass ein mittels Epifluoreszenzmikroskopie beobachteter  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in einem bestimmten Zellorganell, wie beispielsweise dem Zellkern, auch tatsächlich im Zellkern lokalisiert ist und nicht nur der Eindruck eines nukleären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals durch die Überlagerung des Zellkerns mit Komponenten des Zytoplasmas entsteht, braucht es ein System, das die Zellen auf der Ebene ihres Kerns überlagerungsfrei abzubilden vermag. Gleichzeitig muss gewährleistet sein, dass das *Photobleaching* und die Phototoxizität gering gehalten werden, sodass die Zellen während der Messung am Leben erhalten werden können. Die Spinning-Disc Fluoreszenz-Konfokal-Mikroskopie erfüllt diese Kriterien. Das Licht einer Lichtquelle (Laser) wird dabei zunächst durch die spiralförmigen Lochblenden (Pinholes) zweier Nipkow-Scheiben geleitet. Die Lochblenden der ersten Nipkow-Scheibe sind zur Bündelung des Lichts und somit zur Erhöhung der Effizienz mit Mikrolinsen ausgestattet. Die Lochblenden erzeugen gleichzeitig viele Fokuspunkte auf dem Präparat. Zusätzlich rotieren die Scheiben, sodass das Licht das zu mikroskopierende Objekt in konzentrischen Bögen beleuchtet und so innerhalb einer sehr kurzen Belichtungszeit ein vollständiges Bild des Gesichtsfeldes entsteht. Ein zwischen den beiden Nipkow-Scheiben gelegener dichroitischer Strahlteiler leitet die vom Objekt emittierte Fluoreszenz seitlich Richtung hochsensitiver *charge coupled device* Kamera ab (Elmer). Insgesamt können so mit einer maximalen Geschwindigkeit bei minimaler Laserlicht-Dosis hochauflösende Bilder aufgenommen werden (Cox, 2012).

#### 3.2.2.3.1 Fluo-4 AM

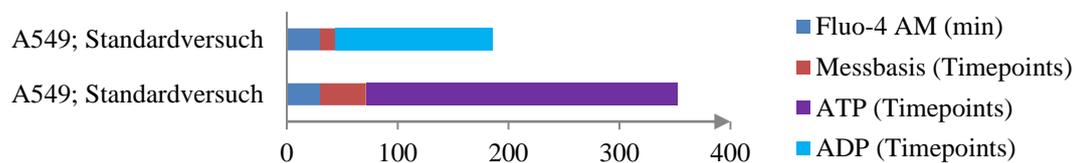
Auch der Fluoreszenzfarbstoff und  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fluo-4 (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) überwindet als AM Zellmembranen nach intrazellulär, wo unspezifische endogene Esterasen die AM abspalten. Dies bewirkt ebenfalls eine Aktivierung des Farbstoffes und verhindert, dass Fluo-4 die Zielzelle wieder verlässt. Fluo-4 wird mittels Argon-Ionen-Laser angeregt, wobei das Absorptionsmaximum bei 488nm liegt. Angeregtes Fluo-4 emittiert Licht der Wellenlänge 520nm. Fluo-4 eignet

sich zur Messung von intrazellulären  $[Ca^{2+}]$  im Bereich von 100nM bis  $1\mu M$  im Rahmen von konfokalmikroskopischen Versuchen (Gee et al., 2000).

### 3.2.2.3.2 Software

Volocity® *3D Image Analysis Software* von PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA) ermöglicht es, mittels *Spinning Disc* Konfokalmikroskopie aufgenommene Bilddateien zu bearbeiten und dreidimensional darzustellen. Darüber hinaus können Veränderungen an den Zellen, zum Beispiel Fluoreszenzintensitätsänderungen, im Verhältnis zur Zeit aufgetragen und analysiert werden.

### 3.2.2.3.3 Versuchsablauf



**Abbildung 4: Versuchsablauf der Konfokalmikroskopie-Versuche. Balken des Diagramms zeigen die durchschnittliche Dauer des jeweiligen Versuches. Die Inkubation mit Fluo-4 wird in Minuten angezeigt, die Aufnahmedauer in „Timepoints“.**

- Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM (min)
- durchschnittliche Aufnahmezeit der Messbasis innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe.
- durchschnittliche Aufnahmezeit nach Applikation von entweder ATP oder ADP.

### 3.2.2.4 Förster Resonanz Energie Transfer Mikroskopie

FRET-Mikroskopie-Versuche wurden ausschließlich mit A549-Zellen durchgeführt. Eine Methode Veränderungen der  $[Ca^{2+}]$  innerhalb der Zellorganellen einer Zelle zu bestimmen ist die Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) Mikroskopie. Dabei wird das von T. Förster 1948 beschriebene Prinzip des strahlungsfreien Übergangs von Elektronenanregungsenergie (Förster-Resonanzenergietransfer) zwischen gleichartigen Molekülen in Lösung genutzt (Förster, 1948). Die Energie eines angeregten Donorfarbstoffes (Fluorophor) wird, unter Verlust von Strahlungsintensität und Fluoreszenzlebensdauer, strahlungsfrei über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen Akzeptorfarbstoff übertragen. Die Strahlungsintensität des Akzeptorfarbstoffes kann dabei zunehmen, sofern dieser sich in unmittelbarer Nähe zum Donor befindet (1-10nm)

und zur Strahlung befähigt ist (Marullo & Bouvier, 2007). FRET hängt von der spektralen Überschneidung der beiden Fluorophore (die Donor Emissions- und die Akzeptor Exzitationsspektren müssen sich überschneiden), von der Distanz zwischen den beiden Fluorophoren (unter 10nm) und der relativen Orientierung ihrer Dipolmomente zueinander ab. Sind beide Fluorophore an dasselbe  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Protein gekoppelt (intramolekularer FRET), können durch seine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Konformationsänderung Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dargestellt werden. Je nach Lokalisation des Proteins innerhalb eines Zellkompartiments lässt sich die Darstellung räumlich auflösen (Lohse, Nuber, & Hoffmann, 2012).

A549-Zellen wurden mit Cameleon Plasmiden transfiziert, die für  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren kodieren. Cameleon  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren sind genetisch kodierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren (*Genetically Encoded Calcium Indicators, GECIs*, oder *Fluorescent Calcium Indicator Proteins*). Sie bestehen aus einem auf  $\text{Ca}^{2+}$  reagierenden Element (*calcium responsive element*), zumeist ein zelluläres Protein (z.B. Calmodulin (CaM)), an dessen C- und N-terminalen Enden sich je ein Cyan Fluorescent Protein (CFP) oder ein Yellow Fluorescent Protein (Citrine, Venus (verbesserte YFP-Versionen)) (beides Varianten eines *green fluorescent protein* (GFP)) befindet (Miyawaki et al., 1997). Bindet das auf  $\text{Ca}^{2+}$  reagierende Element  $\text{Ca}^{2+}$ , verändert es seine Konformation und seine optischen Eigenschaften und damit die räumliche Nähe zwischen den beiden Fluoreszenzproteinen, was wiederum zu einer Veränderung der Effizienz des FRET führt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren bestehen allein aus natürlichen Proteinen, oder Peptiden, die die Zelle anhand der transfizierten Plasmid-DNA selbst herstellt. Das bedeutet, dass der Zelle keine zusätzlichen Farbstoffe und Chemikalien, wie bei den *small molecular calcium indicators* (SMCI, z.B. FLUO-4), die zu einer Belastung und Veränderung der Zelle selbst und ihrer Umgebung führen können, von außen zugeführt werden müssen (McCombs & Palmer, 2008).

GECIs haben einige Vorteile gegenüber den SMCI. Dazu gehört, dass sie von den Zellen, je nach Art der Transfektion, tage- bis wochenlang exprimiert werden und ihre Expression zusätzlich über das Vorschalten von induzierbaren Promotern quantitativ beeinflusst werden kann. Die Konzentration von SMCI hingegen ist abhängig von deren Aufnahme durch die Zelle, der Esteraseaktivität innerhalb der Zelle und von Pumpen der Zellmembran, die die SMCI wieder nach extrazellulär schleusen. Der bedeutsamste

Vorteil der GECIs ist, dass ihre Lokalisation innerhalb der Zelle und ihre Nähe zu bestimmten Proteinen durch eine Signalsequenz beziehungsweise durch genetische Kopplung exakt bestimmt werden können (McCombs & Palmer, 2008).

#### **3.2.2.4.1 FRET-Proben**

Die verwendeten FRET-Proben wurden freundlicherweise von Herrn Michiyuki Matsuda aus Kyoto, Japan, vom Institute for Integrated Cell-Material Sciences der Universität von Kyoto zur Verfügung gestellt.

##### **3.2.2.4.1.1 D1ER**

D1ER ist ein ratiometrischer enhanced CFP und Citrine enthaltender Plasmid DNA (pcDNA) GECI mit einer C-terminalen KDEL-Signalsequenz, die dafür sorgt, dass D1ER im Endoplasmatischen Retikulum der transfizierten Zellen exprimiert und retiniert wird. Dort bindet es an Calmodulin (Palmer & Tsien, 2006).

##### **3.2.2.4.1.2 4mtD3cpv**

4mtD3cpv ist ein genetisch codierter, ratiometrischer, *enhanced CFP* und *circularly permuted Venus 173* enthaltender pcDNA GECI mit einer N-terminalen *First 29 aa of human COX subunit 8a* Signalsequenz, die es für die Expression in Mitochondrien bestimmt, wo es ebenfalls an Calmodulin bindet.

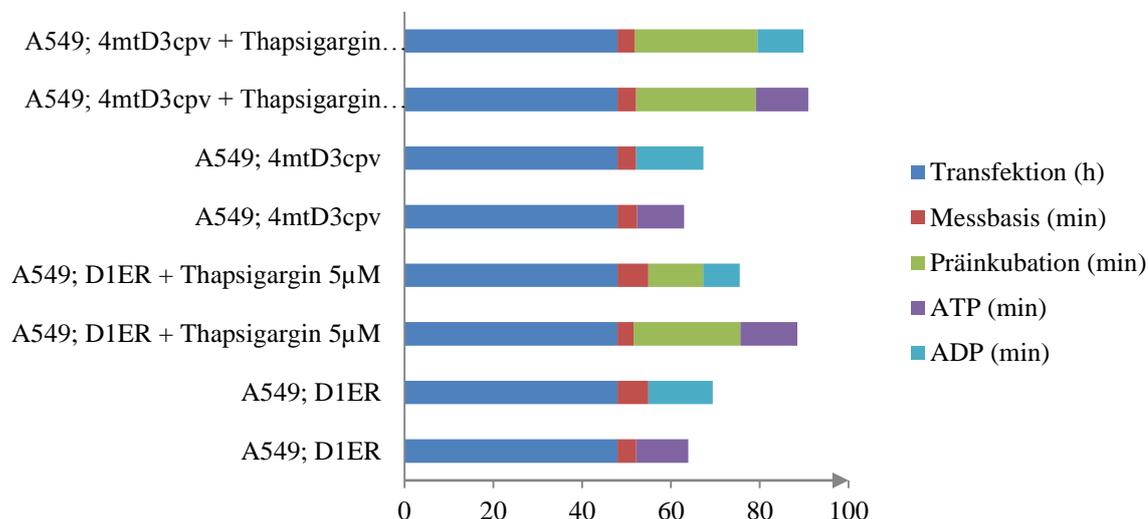
#### **3.2.2.4.2 Software**

Die Versuche zur Förster Resonanz Energie Transfer Mikroskopie wurden ebenfalls mit Hilfe des Programms Metaflour® durchgeführt und ausgewertet.

#### **3.2.2.4.3 Versuchsablauf**

Für die Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer-Versuche wurden die Zellen, wie für die Epifluoreszenzmikroskopie-Versuche, auf objektträgerbasierten Zellkulturkammern ausgesät. Vor Versuchsbeginn wurde das Nährmedium abgezogen und durch HBSS Puffer ersetzt. Da eine zu hohe Expression der Indikatorproteine  $\text{Ca}^{2+}$  puffern und eine zu geringe Expression der Indikatorproteine ein zu schwaches Signal abgeben könnte, wurde für die Aufnahmen ein Gesichtsfeld gewählt, in dem die Expression der GECIs

in den Zellen weder besonders hoch, noch besonders niedrig war (McCombs & Palmer, 2008).



**Abbildung 5: Versuchsablauf der FRET-Versuche. Die Balken des Diagramms zeigen die durchschnittliche Dauer des jeweiligen Versuches. Dabei wird die Inkubationszeit mit dem Transfektionsgemisch in Stunden und die Aufnahmedauer in Minuten aufgetragen.**

- Inkubation mit dem Transfektionsgemisch (h).
- durchschnittliche Aufnahmezeit der Messbasis innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe.
- durchschnittliche Präinkubationszeit der Zellen mit Thapsigargin.
- durchschnittliche Aufnahmezeit nach Applikation von entweder ATP oder ADP.

### 3.2.3 Zellbiologische und molekularbiologische Methoden

#### 3.2.3.1 Nachweis der Purinrezeptoren mittels rtPCR und Western Blot

**Tabelle 5: Geräte, Materialien und Reagenzien für RNA-Isolation und rtPCR.**

Qiagen RNeasy Plus Mini Kit: <i>gDNA Eliminator Mini Spin Columns, RNeasy Mini Spin Columns, Collection Tubes 1,5 und 2ml, Buffer RLT Plus, Buffer RW1, Buffer RPE, RNase-Free Water, Handbuch.</i>	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
14,3M $\beta$ -Mercaptoethanol, RNase-freie	

Pipetenspitzen, Mikrozentrifuge, 96-100% Ethanol, 70% Ethanol in Wasser, <i>QIAshredder homogenizer</i> , <i>TissueRuptor® homogenizer</i>	
Mini-Spin-Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Thermo Electron Corporation PX2 Thermal Cycler	Milford, MA, USA
Thermo Spectronic Genesys 6 PCR-Cycler	Rochester, NY, USA
Qiagen Omniscript Reverse Transcription Kit: <i>Omniscript Reverse Transcriptase</i> , <i>Buffer RT 10x</i> , <i>dNTP Mix</i> , <i>RNase-Free Water</i> , Handbuch	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Primer p(dT) für cDNA Synthese (8 nmol)	Roche, Mannheim, Deutschland
RNase Inhibitor	

**Tabelle 6: Primer für die rtPCR**

Name	Primer Forward	Primer Reverse	Basenpaare	Annealing Temperatur
GAPDH	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	413	57°C
P2Y <sub>1</sub>	CTT TTC CGA TGC TTG CTG	GTA TA GAA GAT CAG GGC	422	50°C
P2Y <sub>2</sub>	TTG GAG GTT CCA GGT CCA	TTG AGG CGG CAC AAG	270	56°C

	GA	AAG AT		
P2Y <sub>4</sub>	CCA CCT GGC ATT GTC AGA CAC C	GAG TGA CCA GGC AGG GCA CGC	424	60°C
P2Y <sub>6</sub>	CCC TGC TGG CCT GCT ACT GTC TCC TG	CTA ATT CTC CGC ATG GTT TGG GGT TGG	455	61°C
P2Y <sub>11</sub>	CCC CCG CTG GCC GCC TAC CTC TAT CC	CGC AGC CCA ACC CCG CCA GCA CCA G	350	68°C
P2Y <sub>12</sub>	GGA GCT GCA GAA CAG AAC ACT	TGG TCC TGT TCC CAG TTT GG	500	57°C
P2Y <sub>13</sub>	ATG TGG GCA TCG TGC TGT TA	AGA AGA CAG CCA CGA CAA CA	411	55°C

### 3.2.3.1.1 RNA Isolation

Für die rtPCR wurde zunächst eine RNA-Isolation durchgeführt. Dazu wurde das RNeasy® Plus Mini Kit verwandt und das Herstellerprotokoll befolgt. Ein Zellpellet wurde mit dem im Kit enthaltenen RLT Plus Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) lysiert, dann homogenisiert und der Überstand mit 70% Ethanol versetzt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Zentrifugat mit dem im Kit

enthaltenen, mit Ethanol gemischten RPE Puffer lysiert, erneut zentrifugiert und schließlich in RNase freiem Wasser gelöst.

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde UV-spektralphotometrisch bestimmt, indem die optische Dichte bei  $\lambda=260$  nm ( $OD_{260}$ ), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren und bei  $\lambda=280$  nm ( $OD_{280}$ ), dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen wurde. Nach der folgenden Formel wurde die Konzentration berechnet:

$$[RNA] (\mu g/\mu L) = A_{260} \times 44 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Aus dem Quotienten  $OD_{260}$  durch  $OD_{280}$  konnten Verunreinigungen der isolierten RNA ermittelt werden. Reine RNA weist einen Quotienten von etwa 2 auf. RNA-Proben mit stark abweichendem Quotienten wurden nicht weiterverwendet.

### 3.2.3.1.2 cDNA Synthese

Die cDNA wurde mit Hilfe des „Omniscript RT Kit“ der Firma Qiagen ausgehend von den gewonnenen RNA-Proben mit einem Template-Volumen von 2  $\mu$ g RNA und einem Mastermix bestehend aus Puffer, dNTPs, Primern, RNase Inhibitoren und Omniscript Reverse Transkriptase synthetisiert. Synthetisierte cDNAs wurden bei 4 °C gelagert.

Ansatz für eine Probe:

[2 $\mu$ g RNA]	[ $\mu$ L]
10x Buffer-RT	3
dNTP Mix (5 mM/dNTP)	2
Oligo-dT Primer [1 $\mu$ M]	1
RNase Inhibitor [10 U/ $\mu$ l]	1
Omniscript RT [4 U/20 $\mu$ l]	1
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	ad 22
RNA Template	x
Endvolumen	30

### 3.2.3.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die eigentliche PCR erfolgte in einem zweiten Schritt mittels HotStarTaq PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dabei wurde die cDNA zusammen mit einem Mastermix aus Puffer, Q-Solution, dNTPs, *forward* und *reverse* Primern und Taq-Polymerase in einem PCR-Cycler inkubiert und amplifiziert.

#### PCR Mastermix für eine Probe:

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

Für jede Probe wurde 3  $\mu$ L cDNA bei 2  $\mu$ g umgeschriebener RNA in 0,2 ml-PCR-*tubes* pipettiert, 47  $\mu$ L Mastermix dazugegeben, gevortext und kurz zentrifugiert. Das PCR-Gefäß wurde an die gewünschte Position im PCR Cycler gesetzt und das jeweilige PCR-Programm abhängig vom Zielgen ausgewählt.

#### PCR-Programm abhängig vom Zielgen:

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95 °C	15 min
Denaturierung	94 °C	45 sec
Hybridisierung	GAPDH: 57 °C P2Y1: 50 °C P2Y2: 56 °C P2Y4: 60 °C P2Y6: 61 °C P2Y11: 68 °C P2Y12: 57 °C	35 Zyklen

	P2Y13: 55 °C	
Elongation	72 °C	1 min
Abschließende Elongation	72 °C	10 min
Abkühlung und Lagerung	4 °C	∞

Zum Schluss wurde die gewonnene DNA mittels Ethidiumbromid auf einem 2% Agarose-Gel angefärbt.

### 3.2.3.1.4 Membran Membranfraktionierung und Western Blot

**Tabelle 7: Geräte, Materialien und Reagenzien für Westernblot.**

Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Blocking Buffer TBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Consort Electrophoresis Power-Supply EV231	CONSORT nv, Turnhout, Belgien
Detektionsreagenz ECL Plus	
Enhanced Chemiluminescent Substrate (ECL) Reagenz (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents)	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Novex® Mini-Cell Gel Kammer	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Laufpuffer NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20X	Novex life technologies, Carlsbad, CA, USA
Milchpulver Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk	BIO RAD Laboratories, Hercules, CA, USA
Methanol	Avantor, Center Valley, PA, USA

Molekulargewichtsmarker Bench Mark und MagicMark XP Western Standard	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich 0,45µm Pore Size	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Novex® Mini-Cell II Blot Module	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel 1,0mm X 12 well	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE LDS Sample Buffer	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE Sample Reducing Agent 10X	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE Transfer Buffer 20X	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
cOmplete Tablets, Mini EDTA-free, <i>EASYpack</i> , Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim, Deutschland
Roto-Shake	Scientific Industries INC., Bohemia, NY, USA
Sample Reducing Agent 10X	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Thermo Electron Corporation Heaeus Pico 17 Centrifuge	ThermoFisher Scientific PICO17, Osterode, Deutschland
Tween 20 (0,1%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland/St. Louis, MO, USA

Waschpuffer TBS: Trizma Base, NaCl, HCl, Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Antikörper gegen das jeweilige Rezeptorprotein (P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub> , P2Y <sub>11</sub> , P2Y <sub>12</sub> , P2Y <sub>13</sub> )	Alomone Labs, Jerusalem, Israel; Genway, San Diego, CA, USA; Abcam, Cambridge, UK

Für den Nachweis der P2YR auf Proteinebene wurden Western Blots nach Standardprotokoll und wenn notwendig Membranfraktionierungen durchgeführt. Zur Vorbereitung auf die Gel-Elektrophorese des Western Blots wurden die Zell-Lysate mittels NuPAGE LDS Sample Buffer 4X denaturiert und mittels NuPAGE Sample Reducing Agent 10X reduziert. Daraufhin wurden die Taschen eines NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gels 1,0mm X 12 well mit den Proben (2µg Protein/20µl) und Molekulargewichtsmarkern (Bench Mark und MagicMark XP Western Standard) befüllt und die Gel-Elektrophorese gestartet. Nach 50 Minuten bei 200V erfolgte das Elektroblothing auf eine Nitrocellulose Membran für zwei Gele bei 60V für 75 Minuten. Daraufhin erfolgten das Blocken freier Bindungsstellen auf der Membran mittels Blocking Buffer plus 0,1% Tween 20 und 5% Milchpulver und die Inkubation bei 4°C über Nacht mit dem primären Antikörper gegen das jeweilige Rezeptorprotein. Am zweiten Tag konnten gebundene primäre Antikörper anhand eines Meerrettich-Peroxidase-konjugierten zweiten Antikörpers, der sich gegen den primären Antikörper richtet, und Enhanced Chemiluminescent Substrate (ECL) Reagenz gemäß Herstellerangaben detektiert werden.

#### 3.2.3.1.5 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration wurde Bicinchoninsäure bzw. das BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet

#### 3.2.3.1.6 P2Y-Rezeptor *Knockdown* mittels siRNA

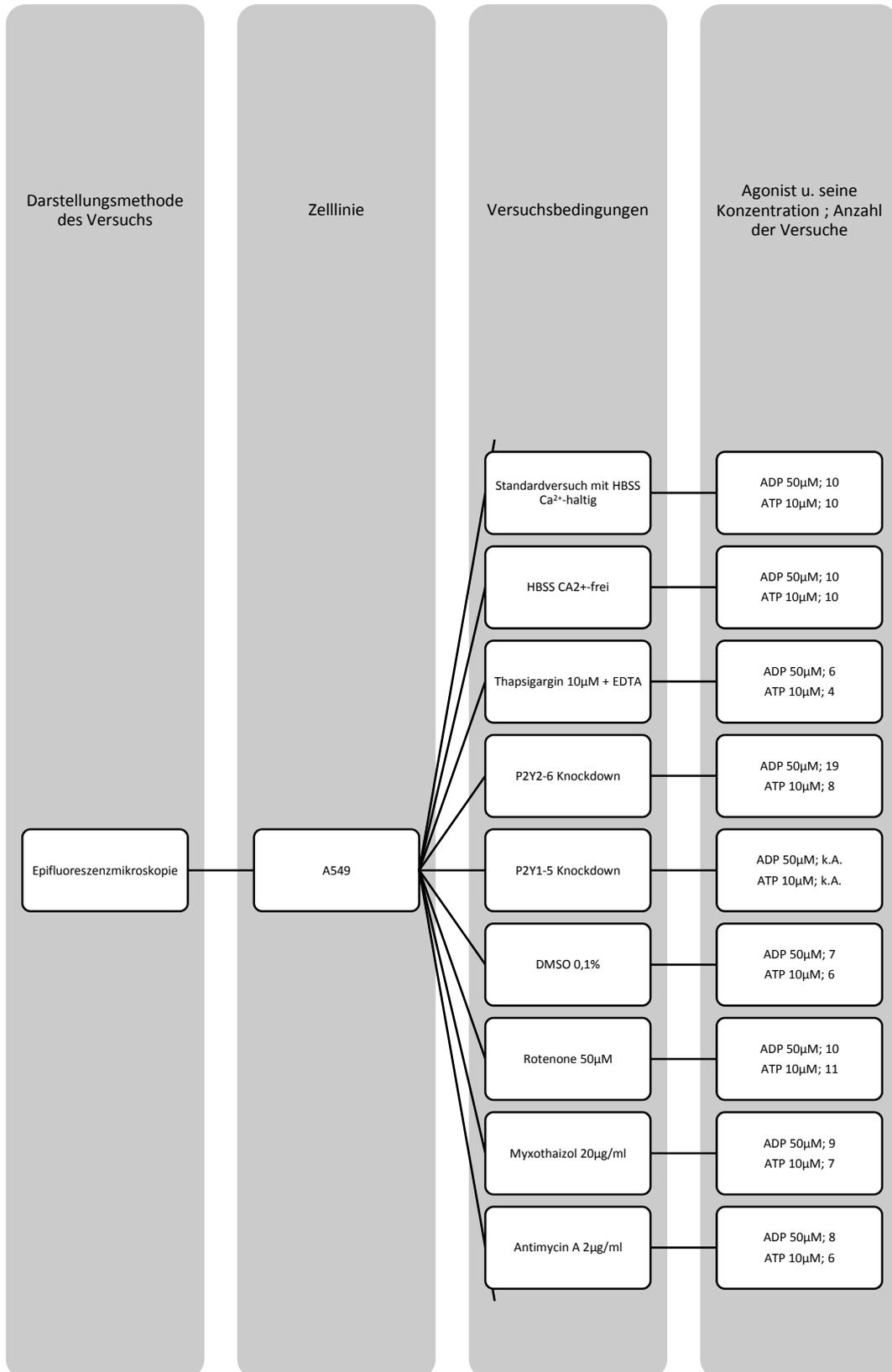
Die Transfektion von A549-Zellen mit siRNA für die Rezeptoren P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> und scrambled (scr) siRNA (Qiagen, Hilden, Deutschland) erfolgte nach dem Protokoll

des Herstellers. Zunächst wurden die Zellen bei einer Konfluenz von etwa 70-80% mittels Trypsin/EDTA-Lösung aus den T75 Kulturflaschen (Sarstedt) gelöst, zentrifugiert, in komplettem Nährmedium resuspendiert und auf objektträgerbasierte Zellkulturkammern ausplattiert. Außerdem wurde die Transfektionslösung, je Zellkulturkammer bestehend aus siRNA (P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub> oder P2Y<sub>1</sub>; je 20µM), 500µl Serum-freiem Opti-MEM I Medium und 5µl Lipofectamine® 2000 angesetzt und für 10-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie zu den Zellen pipettiert wurde. Zur Kontrolle wurden weitere Zellen mit einer scr-siRNA-Transfektionslösung transfiziert. Alle siRNAs waren mit Alexa Fluor 488 (Qiagen) fluoreszenz-markiert, sodass ein direkter mikroskopischer Nachweis der Aufnahme des Transfektionskomplexes durch die Zellen erbracht werden konnte. Die transfizierten Zellen wurden, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, 48 Stunden inkubiert, bevor die Rezeptor-Down-Regulation mittels PCR (Gen-Ebene) kontrolliert wurde, oder die Zellen für Ca<sup>2+</sup>-*Imaging*-Versuche verwendet wurden.

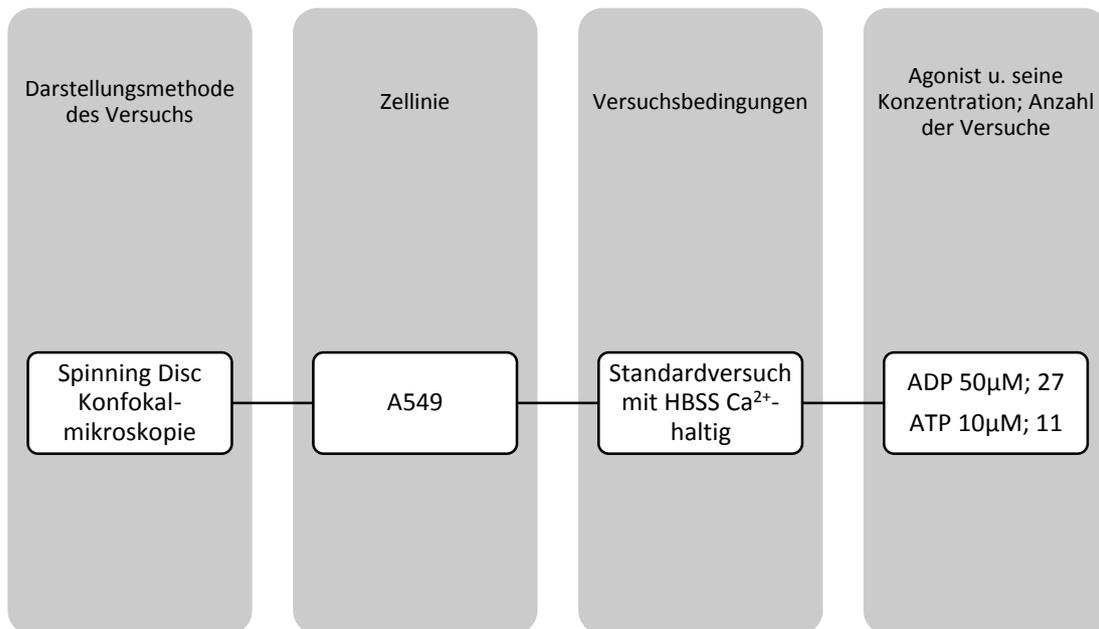
### **3.2.3.2 Transfektion von A549-Zellen mit Plasmid-DNA für die Expression von GECIs**

Die Transfektion der A549-Zellen wurde gemäß dem Protokoll für FuGENE® Transfection Reagent für adhärente Zellen durchgeführt. Dazu wurden A549-Zellen am Tag vor der Transfektion trypsinisiert und je Well einer 2-Well objektträgerbasierten Zellkulturkammer 50.000 Zellen ausplattiert. Am folgenden Tag wurde die Plasmid-DNA mittels Opti-MEM® auf eine Konzentration von 2µg Plasmid-DNA/100µl Opti-MEM (0,02µg/µl) verdünnt und sodann mit FuGENE® Transfection Reagent für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (5µl FuGENE®/2µg Plasmid-DNA). Anschließend wurde der Transfektions-Komplex in das Nährmedium der am Tag zuvor ausplattierten Zellen gegeben. Die FRET-Versuche konnten 48 Stunden später durchgeführt werden.

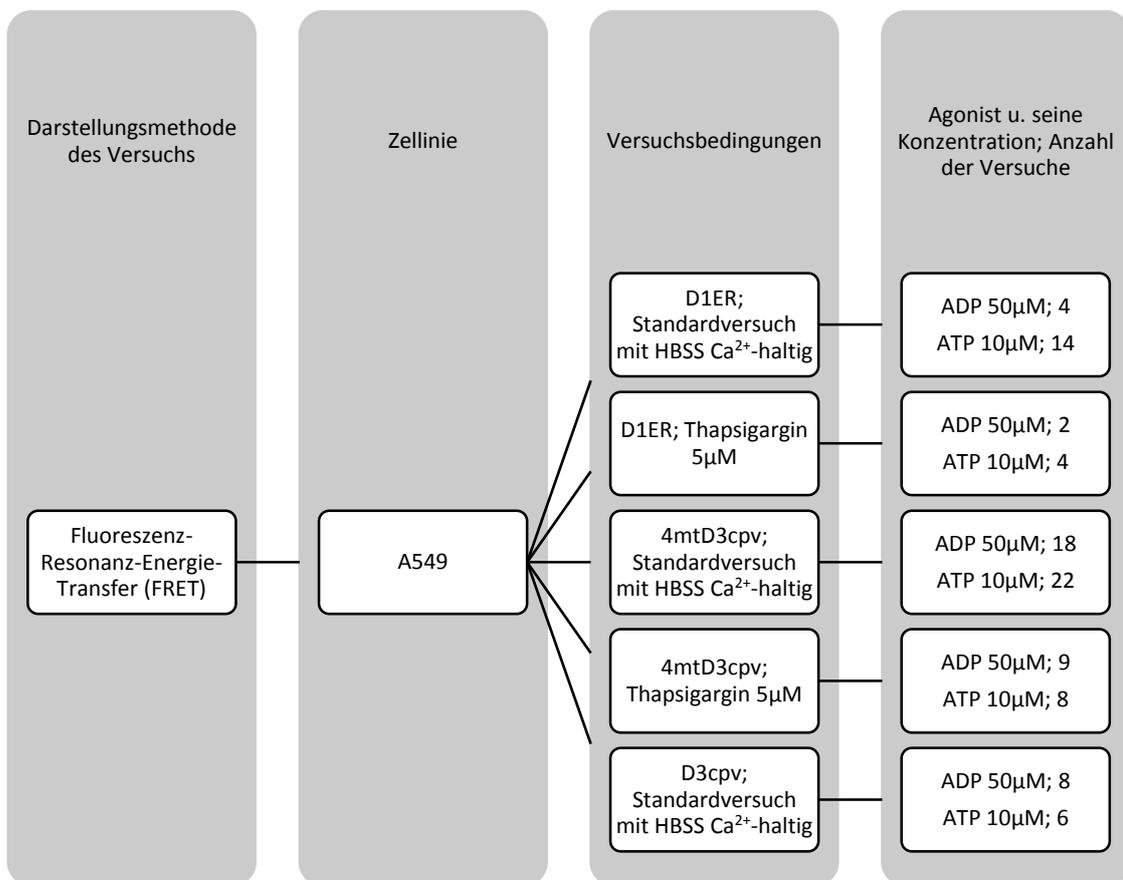
### 3.2.4 Versuchsgruppen



**Abbildung 6: Gruppeneinteilung der Epifluoreszenzmikroskopie-Versuche mit A549-Zellen.**



**Abbildung 7: Versuchsgruppen der Konfokalmikroskopie-Versuche mit A549-Zellen.**



**Abbildung 8: Versuchsgruppen der FRET-Versuche mit A549-Zellen.**

### 3.2.5 Auswertung

Das Programm Metaflour® berechnet aus der Ratio von Fluoreszenzintensitäten eine absolute  $[Ca^{2+}]$  und ermöglicht es, diese direkt in das Programm Microsoft Excel® zu übertragen. Es werden die Fluoreszenzintensitäten innerhalb einer *Region of Interest* (ROI), die daraus berechnete Ratio und  $[Ca^{2+}]$  und der dazu gehörige Zeitpunkt der Aufnahme angegeben. Die Versuche mit dem Epifluoreszenzmikroskop und die FRET-Versuche wurden mit Metaflour® ausgewertet. Volocity® *3D Image Analysis Software* gibt lediglich Fluoreszenzintensitäten zu einem „Timepoint“ und keine Ionenkonzentrationen an. Mit Volocity® wurden die Konfokalmikroskopie-Versuche ausgewertet.

### 3.3 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (MW  $\pm$  SEM) angegeben. Vergleiche der  $[Ca^{2+}]$  oder Fluoreszenzintensitäten in verschiedenen Zellregionen oder Versuchsgruppen wurden mittels t-Test für abhängige Stichproben bzw. Zweistichproben-t-Test und ANOVA-Test mit bzw. ohne Messwiederholung (One way (Repeated Measures) Analysis of Variance) mit nachfolgendem Tukey oder Holm-Sidak Post-hoc-Test durchgeführt. Waren die Messwerte innerhalb einer Stichprobe nicht normalverteilt, wurden die Unterschiede zwischen den  $[Ca^{2+}]$  bzw. Fluoreszenzintensitäten mittels Mann-Whitney-Rangsummentest oder (Repeated Measures) ANOVA on Ranks analysiert. Ein  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant eingestuft. Einfache Berechnungen wurden mit dem Programm Microsoft Excel®, komplexere statistische Analysen mit dem Programm SigmaPlot® (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) durchgeführt. SigmaPlot® wurde ebenfalls zur Erstellung der Diagramme verwendet.

## 4. Ergebnisse

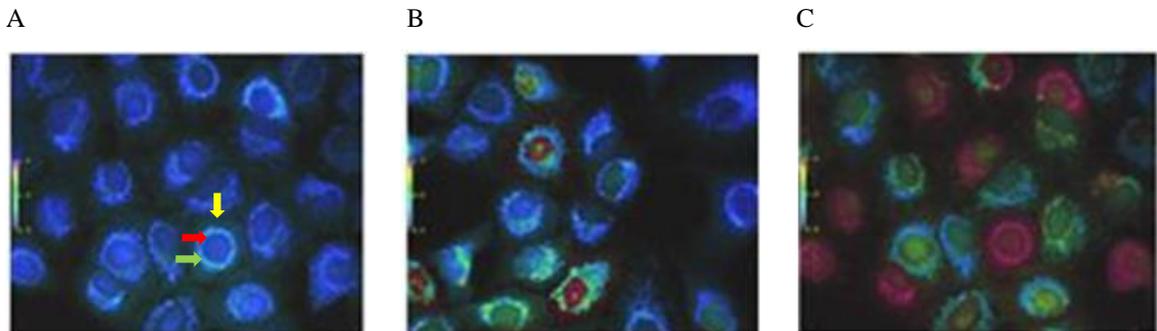
### 4.1 Standardversuch

A549, humane Lungenkarzinomzellen, zeigen, wenn sie mit ADP (50 $\mu$ M) oder ATP (10 $\mu$ M) stimuliert werden, eine aus mehreren Hinsichten unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort. Zum einen ist der maximale absolute  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in den Zellen im Durchschnitt geringer, wenn sie mit ADP statt ATP stimuliert werden, zum anderen unterscheiden sich bei einem Großteil der Zellen das Reaktionsprofil, der prozentuale Anteil der reagierenden Zellen und die Zeitspanne bis zum Beginn und die Dauer der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort. Außerdem scheint die  $[\text{Ca}^{2+}]$  je nach Agonist vornehmlich in unterschiedlichen Zellregionen anzusteigen.

#### 4.1.1.1 Zellregionen

Mit Fura-2 gefärbte A549-Zellen stellen sich bei Betrachtung mit einem Fluoreszenzmikroskop grün fluoreszierend dar. Steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration innerhalb der mit Fura-2 beladenen Zellen, wird die grüne Fluoreszenz intensiver. Das Imaging-Programm Metafluor® vermag die durch Fura-2 und  $\text{Ca}^{2+}$  hervorgerufene Fluoreszenz in Falschfarben darzustellen. Zellen mit geringer  $[\text{Ca}^{2+}]$  im Zytosol werden in Blautönen abgebildet, während sich Zellen, in denen die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ansteigt, grün, gelb bis hin zu rot darstellen. Bei genauer Betrachtung der Zellen im Ruhezustand (Abb. 9A) fällt auf, dass sich die Zellen farblich in verschiedene Regionen unterteilen lassen. Um die Auswertung für die Regionen standardisieren zu können, wurden also diese farblich unterschiedlichen Bereiche in der Zelle als voneinander abgrenzbare Zellregionen festgelegt. Der Zellkern grenzt sich dunkelblau vom Zytosol ab, welches sich farblich nochmals in zwei Regionen unterteilen lässt. Die direkt an den Zellkern angrenzende perinukleäre Region stellt sich scharf abgegrenzt und leuchtend hell blau dar, während sich ein nach peripher angrenzender Zytosolsaum schwach blau abzeichnet. Zusammen sind die perinukleäre Region und der Zytosolsaum das Zytosol. Die perinukleäre Region wird zusätzlich gesondert dargestellt. Im Standardversuch fällt auf, dass ADP typischerweise eine ausschließliche Rotfärbung in den Regionen

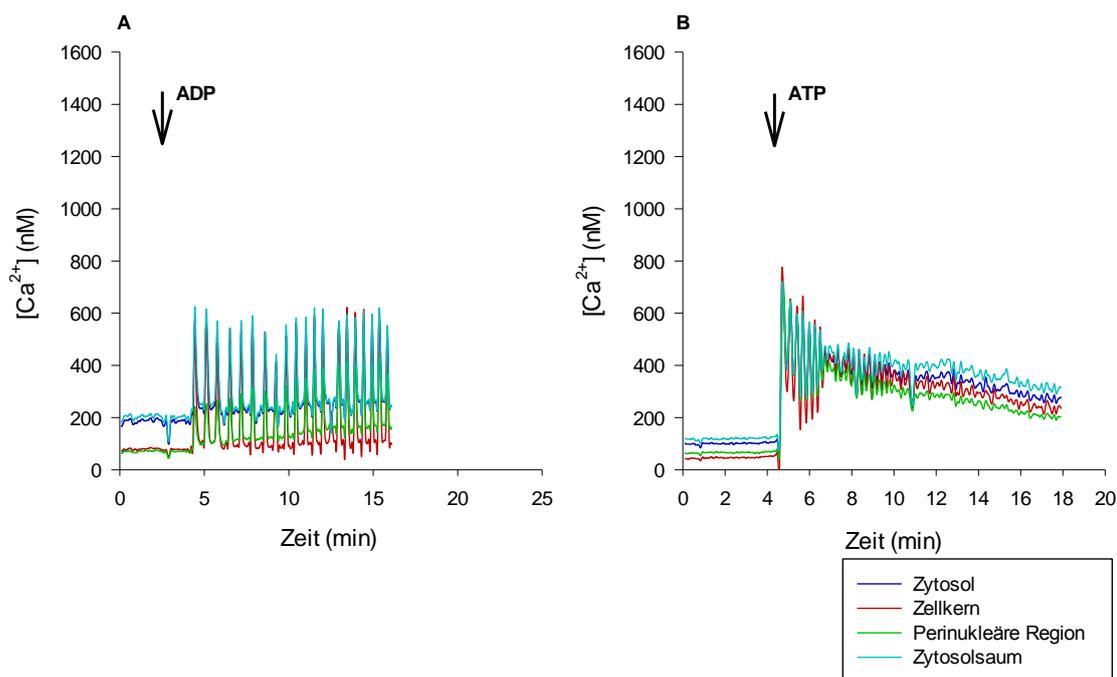
Zellkern und Zytosolsaum bewirkt, während die perinukleäre Region sich nur gering verändert (Abb. 9C). ATP führt meist in der gesamten Zelle zu einer Rotfärbung, gleichbedeutend mit der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]$  in allen Zellregionen (Abb. 9B).



**Abbildung 9: Fura-2-Ratio: Darstellung in Falschfarben.** Repräsentative Fura-2-Ratio-Abbildungen von A549-Zellen in Falschfarben zu Ausgangsbedingungen (9A) und nach Agonisten-Stimulation mit ADP (9B) oder ATP (9C). 1 cm  $\cong$  5  $\mu$ m. In Abb. 9A sind die beschriebenen Zellregionen durch Pfeile gekennzeichnet (rot  $\cong$  Zellkern, grün  $\cong$  perinukleäre Region, gelb  $\cong$  Zytosolsaum).

#### 4.1.2 $Ca^{2+}$ -Reaktionsprofile

Die beispielhaft dargestellten Reaktionsprofile in Abbildung 10 zeigen je einen charakteristischen Verlauf der  $[Ca^{2+}]$  innerhalb der Zellregionen im ADP- (Abb. 10A) und ATP-Versuch (Abb. 10B). Abbildung 10A zeigt, wie die  $[Ca^{2+}]$  in den verschiedenen Zellregionen nach ADP-Stimulation ausgehend vom Basalwert periodisch steil ansteigt und wieder auf den Basalwert abfällt. Diese Oszillationen können bis zu 45 Minuten und länger andauern. Nach ATP-Stimulation zeigt sich typischerweise ein Profil mit einem unmittelbaren sehr steilen Anstieg der  $[Ca^{2+}]$  in allen Zellregionen, die dann über die Zeit allmählich in Schulterform abfällt (Abb. 10B). Dieser schulterförmige Abfall der  $[Ca^{2+}]$  wird in seinem Verlauf von  $Ca^{2+}$ -Spikes überlagert („Spike-Überlagerungen“), das heißt der Konzentrationsverlauf ist nicht glatt abfallend. Es ereignen sich immer wieder geringe Anstiege und Abfälle der  $[Ca^{2+}]$ , bis sie wieder Basalwerte erreicht. Es ist zu sehen, dass die  $[Ca^{2+}]$  sowohl im ADP- als auch im ATP-Versuch im Zellkern am stärksten ansteigt, wohingegen die Amplitude der  $[Ca^{2+}]$  in der perinukleären Region in beiden Fällen signifikant geringer als im Zellkern ist.



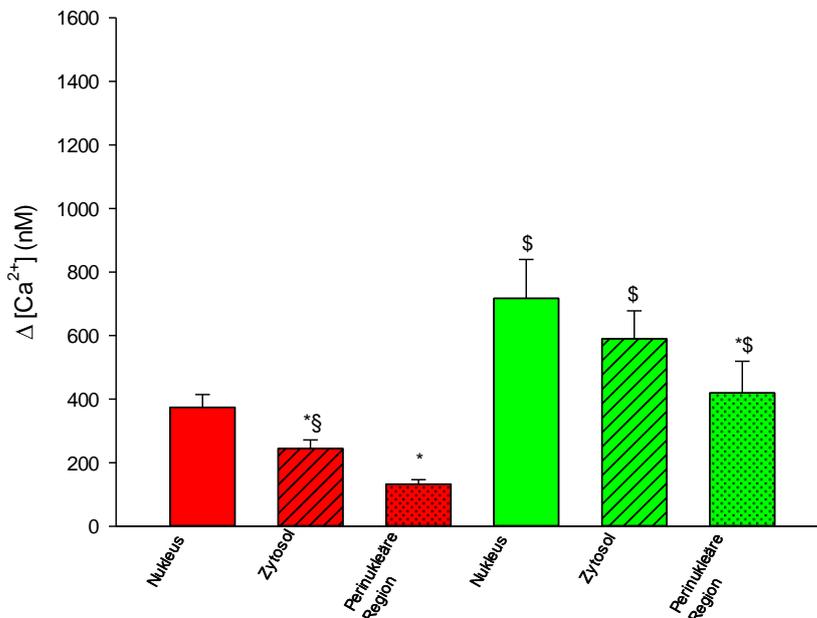
**Abbildung 10: Repräsentative Reaktionsprofile der  $[Ca^{2+}]$  in den einzelnen Zellregionen von A549-Zellen im Standardversuch nach Stimulation mit ADP (10A) oder ATP (10B).** Der Vollständigkeit halber wird die Region Zytosolsaum abgebildet; in der Auswertung ist die Region Teil der Region Zytosol.

#### 4.1.3 Mittlerer maximaler $Ca^{2+}$ -Anstieg

Zunächst fiel auf, dass sich selbst die Messwerte der zu Ausgangsbedingungen in allen Zellregionen vorherrschenden  $[Ca^{2+}]$  ( $\cong$  Basalwerte) im Mittel zwischen der Versuchsreihe mit ADP und ATP unterscheiden. Die Zellen in den ATP-Versuchen haben durchschnittlich signifikant höhere Basalwerte für die  $[Ca^{2+}]_{\text{nuk/perinuk/zyt}}$  ( $p < 0,05$ ).

Die statistische Auswertung nach Stimulation ergab, dass die im ADP-Versuch gemessene Amplitude der  $[Ca^{2+}]$  ( $\Delta [Ca^{2+}]$  (nM)) in der Zellregion Zellkern höher ist als in der perinukleären Region und im Zytosol höher als in der perinukleären Region ( $p < 0,05$ ). Die  $Ca^{2+}$ -Antwort nach ATP-Stimulation fällt nur in der perinukleären Region geringer aus als die im Zellkern ( $p < 0,05$ ). Zwischen den Regionen Zellkern und Zytosol ergibt sich kein Unterschied. Die durchschnittlichen  $[Ca^{2+}]$ -Amplituden nach ADP-Stimulation sind jeweils geringer als die nach ATP-Stimulation (Abb. 11).

Im Standardversuch mit ADP lag die durchschnittliche  $[Ca^{2+}]_{nuk}$  zu Ausgangsbedingungen bei  $99,1 \pm 12,7$  nM, die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  bei  $343 \pm 40,2$  nM und die  $[Ca^{2+}]_{perinuk}$  bei  $106 \pm 12$  nM. Nach Intervention mit ADP stieg die  $[Ca^{2+}]_{nuk}$  im Mittel um  $374 \pm 40,1$  nM (Anstieg um 377%), die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  um  $245 \pm 27,3$  nM (Anstieg um 71,3%) und die  $[Ca^{2+}]_{perinuk}$  um  $133 \pm 13,8$  nM (Anstieg um 125%). Im Standardversuch mit ATP ergaben die Messungen durchschnittliche Basalwerte der  $[Ca^{2+}]_{nuk}$  von  $205 \pm 28,2$  nM, der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  von  $544 \text{ nM} \pm 77,4$  nM und der  $[Ca^{2+}]_{perinuk}$  von  $220 \pm 29$  nM. Nach Intervention mit ATP betrug die durchschnittliche maximale Amplitude der  $[Ca^{2+}]_{nuk}$   $717 \pm 122$  nM (Anstieg um 350%), der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$   $589 \pm 88$  nM (Anstieg um 108%) und der  $[Ca^{2+}]_{perinuk}$   $419 \pm 99,7$  nM (Anstieg um 191%).

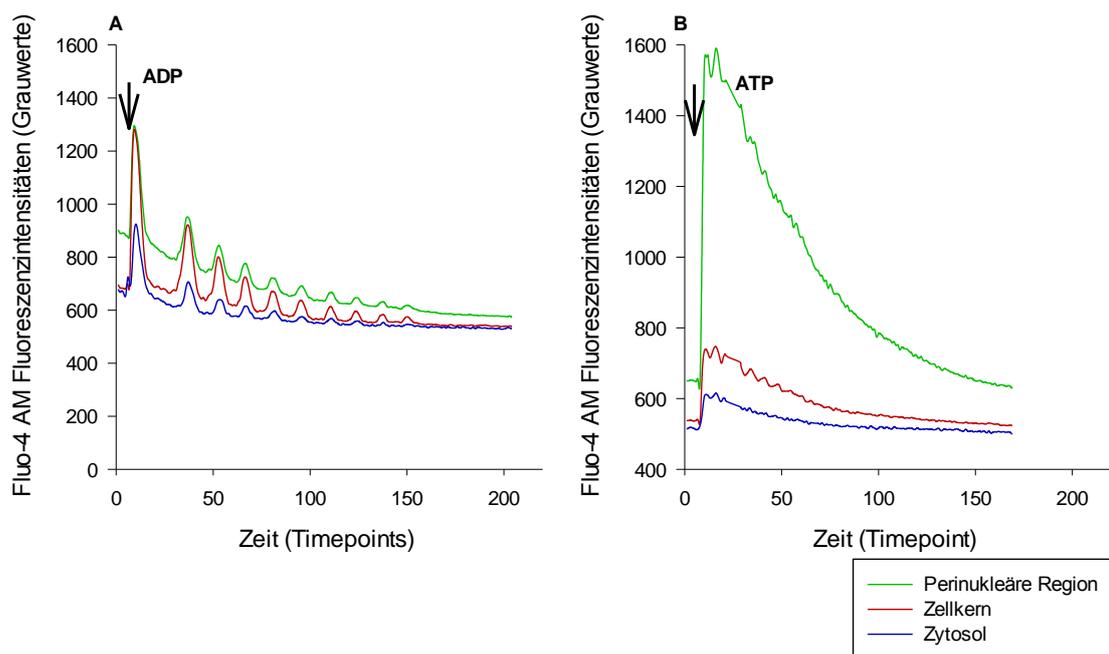


**Abbildung 11: Mittlerer maximaler Anstieg der  $[Ca^{2+}]$  in den untersuchten Zellregionen nach Stimulation mit ADP und ATP.** n = 10; \*p < 0,05 vs. Nucleus der jeweiligen Interventionsgruppe; §p < 0,05 vs. perinukleäre Region im ADP-Versuch; \$p < 0,05 vs. korrespondierende Region nach ADP-Stimulation.

## 4.2 Konfokalmikroskopie

Die Standardversuche mit ADP und ATP wurden ebenfalls konfokalmikroskopisch durchgeführt, um die untersuchten Zellen dreidimensional darzustellen und so die einzelnen Zellkompartimente, vor allem den Zellkern, während der  $Ca^{2+}$ -Antwort auf

die purinerge Stimulation überlagerungsfrei darstellen zu können. Abbildung 12 macht deutlich, dass im konfokalmikroskopischen Versuch Reaktionsprofile beobachtet werden können, die mit denen im epifluoreszenzmikroskopischen Versuch vergleichbar sind. Dabei konnte sowohl nach ADP- als auch nach ATP-Stimulation eine nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort aufgezeichnet werden.



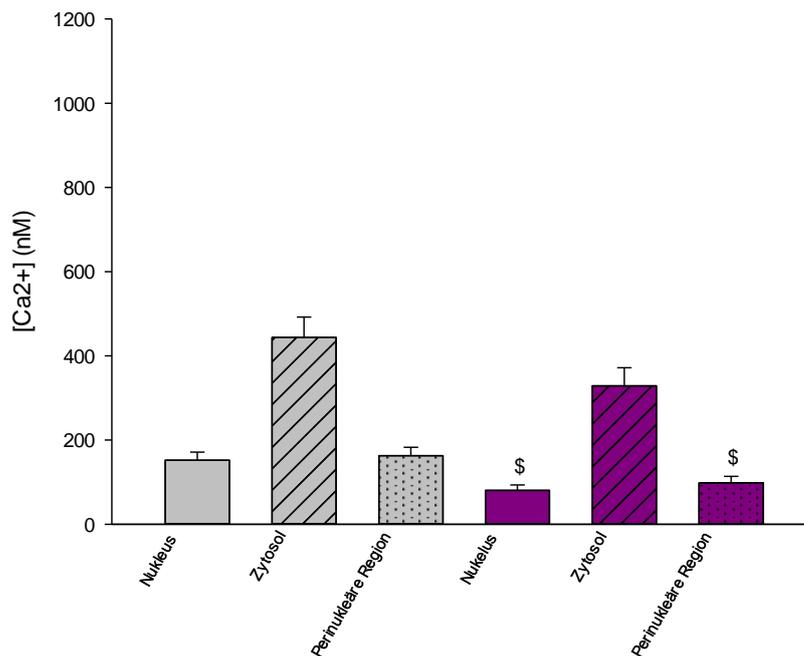
**Abbildung 12: Repräsentative Reaktionsprofile der Fluoreszenzintensitäten in den einzelnen Zellregionen von A549-Zellen im konfokalmikroskopischen Versuch mit ADP- (12A) und ATP- (12B) Stimulation.** Die Zellen wurden mit Fluo-4 angefärbt. Die Aufnahmeperiode vor der Stimulation mit den Agonisten ist zur Vermeidung starken *Photobleachings* kurz gewählt worden. ADP: n = 27; ATP: n = 11.

### 4.3 Herkunft des $\text{Ca}^{2+}$ -Signals

#### 4.3.1 Versuche mit $\text{Ca}^{2+}$ -freiem HBSS-Puffer

Zur Beurteilung der Abhängigkeit des zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des extrazellulären Mediums wurden Versuche mit ADP und ATP unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen durchgeführt. Das im Standard-Versuch verwendete  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige extrazelluläre Medium (HBS-Lösung) wurde in diesen Versuchen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -freien

HBSS ersetzt, der außerdem den  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator EGTA enthält. Vergleicht man die Basalwerte unter  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen und  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen miteinander (Abb. 13), so fallen bereits für letztere zum Teil geringere Werte auf. Dabei unterscheiden sich im Vergleich die Werte für die nukleäre und die perinukleäre Region ( $p < 0,05$ ), nicht aber die Werte im Zytosol.



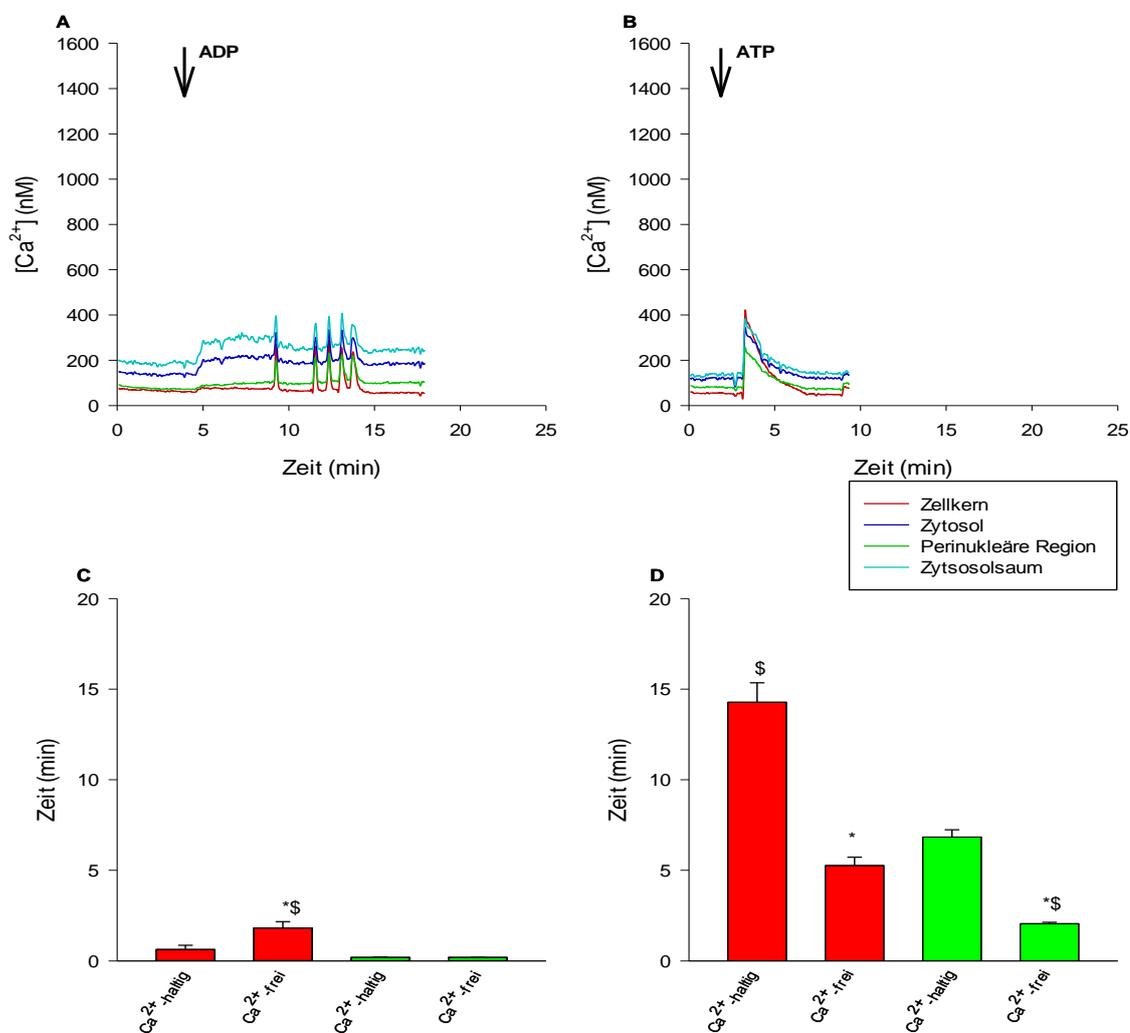
**Abbildung 13: Vergleich der Basalwerte unter  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen (grau) und -freien (lila) Bedingungen.**  $n = 20$ . \$ $p < 0,05$  vs. korrespondierende Region  $\text{Ca}^{2+}$ -haltig.

Abbildung 14A und B bilden exemplarisch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort einer in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier HBS-Lösung inkubierten, mit ADP respektive ATP stimulierten Zelle ab. Die Reaktionsprofile unterscheiden sich optisch von denen im Standardversuch. In 14A ist eine verringerte Oszillationsfrequenz sichtbar. Des Weiteren zeigt das in Abbildung 14B dargestellte Reaktionsprofil, dass der auf den steilen Anstieg folgende Abfall der  $[\text{Ca}^{2+}]$ , die sogenannte Schulter des Profils, sich im Versuch mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem HBS-

Puffer sehr viel glatter darstellt als im Standardversuch. Die hochfrequenten Spike-Überlagerungen fehlen unter dieser Bedingung.

In Abb. 14C und D sind die mittlere Zeitverzögerung bis zum Beginn der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort und die Reaktionsdauer jeweils nach ADP und ATP-Stimulation und unter  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen und  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen dargestellt. Im Vergleich zum Standardversuch ist unter ADP-Stimulation eine erhöhte Zeitverzögerung bis zum Beginn der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort (14C) und unter ADP- und ATP-Stimulation eine verringerte Reaktionsdauer zu beobachten (14D) ( $p < 0,05$ ). Die mittlere Zeitverzögerung bis zum Beginn der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort beträgt im Versuch mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem HBS-Puffer und ADP  $0,9 \pm 0,22$  min bzw. mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem HBS-Puffer  $2,2 \pm 0,33$  min; im Versuch mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem HBS-Puffer und ATP beträgt die Zeitverzögerung bis zum Beginn der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort  $0,2 \text{ min} \pm 0,03$  min bzw. mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem HBS-Puffer  $0,19 \pm 0,01$  min. Im Versuch mit ADP ist der Unterschied zwischen dem Versuch mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem und -freiem HBS-Puffer signifikant ( $p < 0,05$ ).

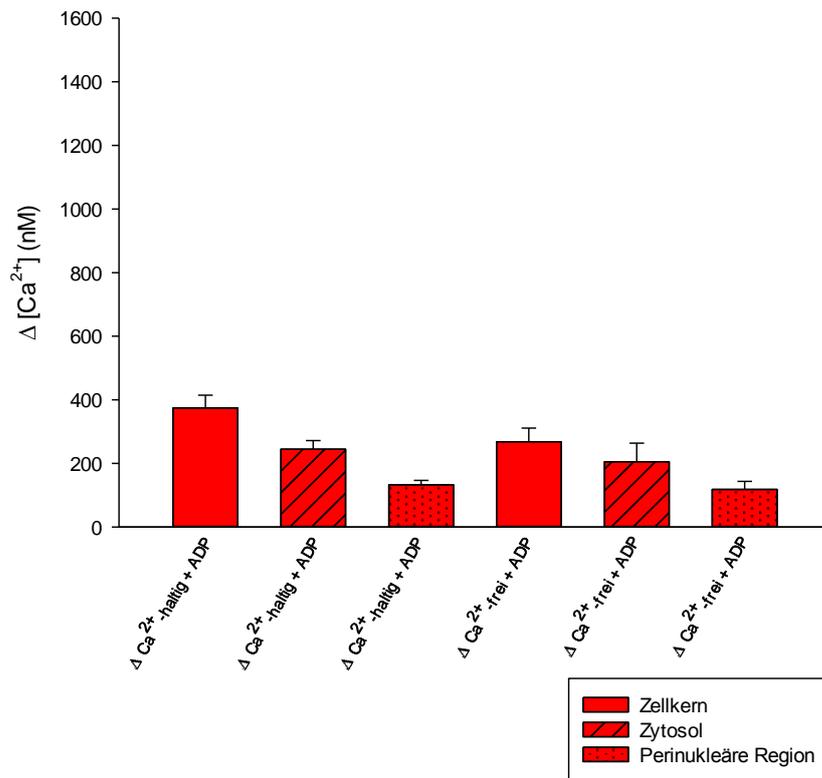
Die mittlere Reaktionsdauer liegt im Versuch mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem HBS-Puffer und ADP bei  $14,3 \pm 1,07$  min, während sie im Versuch mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem HBS-Puffer im Mittel  $5,26 \pm 0,47$  min beträgt. Im Versuch mit ATP beträgt die Reaktionsdauer unter  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Bedingungen  $6,84 \pm 0,4$  min und unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen  $2,06 \pm 0,08$  min. Beide Unterschiede sind signifikant ( $p < 0,05$ ).



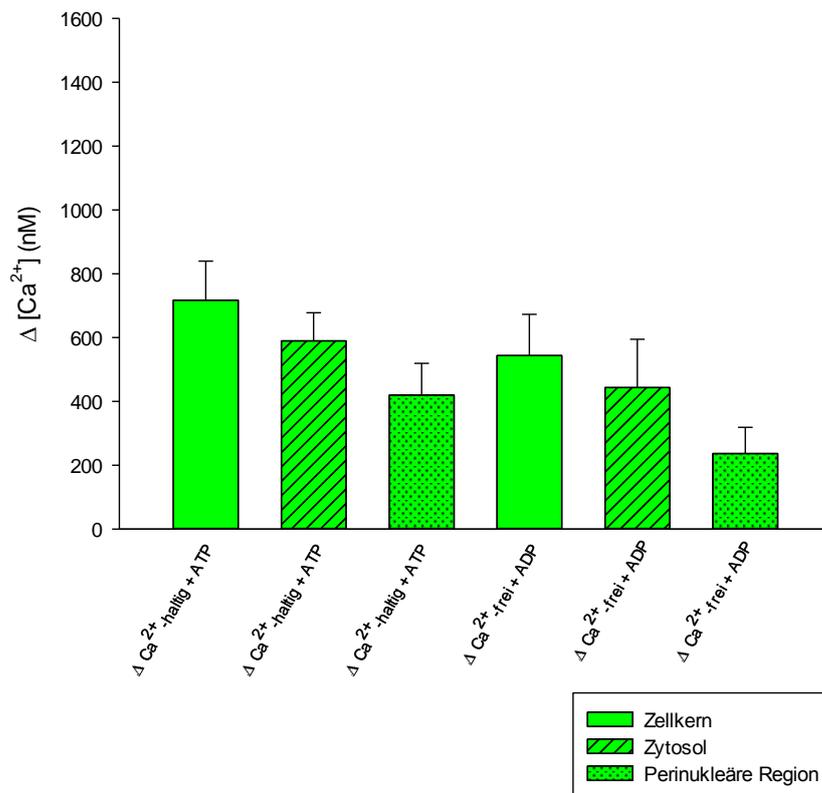
**Abbildung 14: Repräsentative Reaktionsprofile der  $[Ca^{2+}]$  in den einzelnen Zellregionen von A549-Zellen nach Stimulation mit ADP (14A;  $n = 10$ ) und ATP (14B;  $n = 10$ ) im Versuch mit HBSS  $Ca^{2+}$ -frei. Mittlere Zeitverzögerung bis zum Beginn der  $Ca^{2+}$ -Antwort (14C) und mittlere Reaktionsdauer (14D) der Versuche mit ADP (rot) und ATP (grün) in  $Ca^{2+}$ -freiem Medium, beides im Vergleich zu den Versuchen unter  $Ca^{2+}$ -haltigen Bedingungen. 14C/D: \* $p < 0,05$  vs. der mittleren Zeitverzögerung bis zum Beginn der  $Ca^{2+}$ -Antwort bzw. der Reaktionsdauer des korrespondierenden Versuches unter  $Ca^{2+}$ -haltigen Bedingungen; \$ $p < 0,05$  vs.  $Ca^{2+}$ -haltig und  $Ca^{2+}$ -frei der jeweils anderen Versuchsgruppe.**

Abbildung 15 und 16 zeigen Vergleiche der maximalen  $[Ca^{2+}]$ -Amplitude nach ADP- und ATP-Stimulation jeweils unter  $Ca^{2+}$ -haltigen und  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen. Die Höhe der  $[Ca^{2+}]$ -Amplituden unter  $Ca^{2+}$ -haltigen und  $Ca^{2+}$ -freien Bedingungen unterscheidet sich in beiden Gruppen nicht.

Der mittlere maximale Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{nuk}$  beträgt  $268 \pm 43,1$  nM (Anstieg um 456%), der der  $[Ca^{2+}]_{zyt}$   $205 \pm 58,1$  nM (Anstieg um 110%) und der der  $[Ca^{2+}]_{perinuk}$   $118 \pm 25,3$  nM (Anstieg um 163%). Im Mittel steigt die  $[Ca^{2+}]_{nuk}$  im Versuch mit  $Ca^{2+}$ -freiem Puffer und ATP um  $543 \pm 129$  nM (Anstieg um 534%), die  $[Ca^{2+}]_{zyt}$  um  $443 \pm 151$  nM (Anstieg um 157%) und die  $[Ca^{2+}]_{perinuk}$  um  $236 \pm 82,2$  nM (Anstieg um 191%). Zum Vergleich werden nochmals die Werte für die Standardversuche aufgeführt: ADP:  $[Ca^{2+}]_{nuk}$   $374 \pm 40,1$  nM (Anstieg um 377%),  $[Ca^{2+}]_{zyt}$   $245 \pm 27,3$  nM (Anstieg um 71,3%),  $[Ca^{2+}]_{perinuk}$  um  $133 \pm 13,8$  nM (Anstieg um 125%). ATP:  $[Ca^{2+}]_{nuk}$   $717 \pm 122$  nM (Anstieg um 350%),  $[Ca^{2+}]_{zyt}$   $589 \pm 88$  nM (Anstieg um 108%),  $[Ca^{2+}]_{perinuk}$   $419 \pm 99,7$  nM (Anstieg um 191%).



**Abbildung 15: Vergleich der Mittelwerte der maximalen [Ca<sup>2+</sup>]-Amplituden der in den einzelnen Zellregionen in Ca<sup>2+</sup>-haltigem und -freiem Puffer nach ADP-Stimulation. n = 10. Es ergibt sich im direkten Vergleich der Zellregionen kein signifikanter Unterschied.**

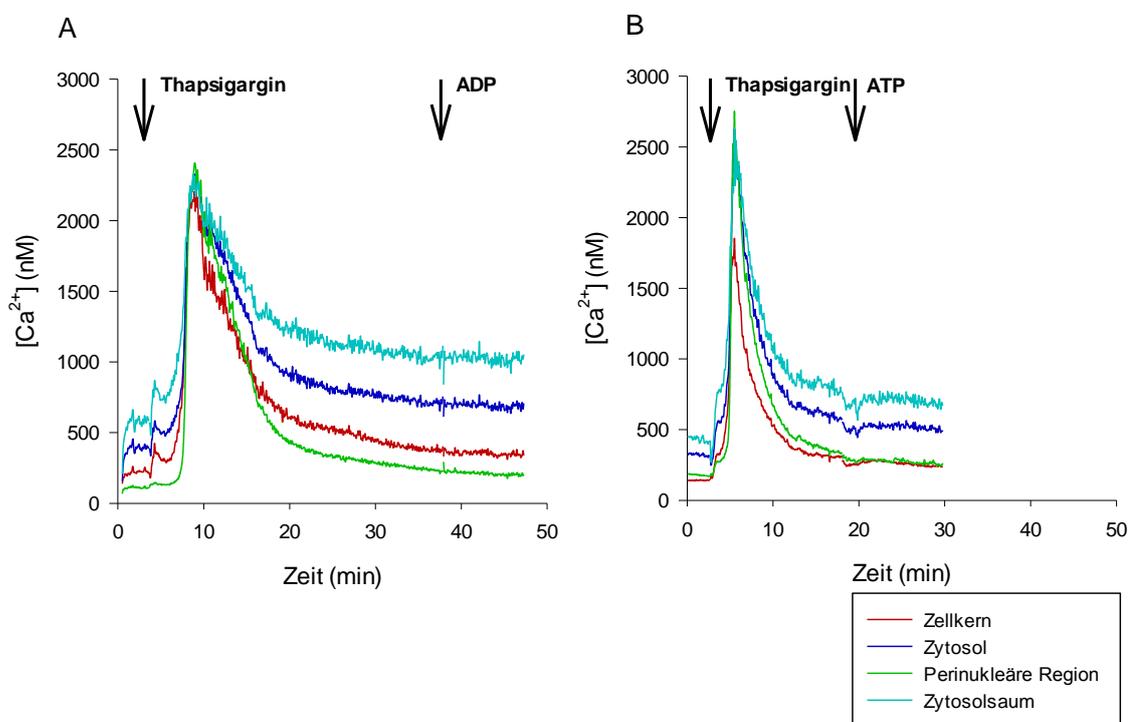


**Abbildung 16:** Vergleich der Mittelwerte der maximalen  $[Ca^{2+}]$ -Amplituden der in den einzelnen Zellregionen in  $Ca^{2+}$ -haltigem und -freiem Puffer nach ATP-Stimulation.  $n = 10$ . Es ergibt sich im direkten Vergleich der Zellregionen kein signifikanter Unterschied.

### 4.3.2 Thapsigargin

Thapsigargin ist ein nicht-kompetitiver Inhibitor der  $Ca^{2+}$ -ATPase des sarko- und endoplasmatischen Retikulums (SERCA). Es bewirkt, dass sich das  $Ca^{2+}$  des größten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichers, des sarko- oder endoplasmatischen Retikulums, vollständig in das Zytosol der Zelle entleert und vom ER nicht wiederaufgenommen werden kann. Nach Gabe des Thapsigargin steigt im Versuch zunächst die  $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$  stark an, um dann durch den Verlust des  $Ca^{2+}$  nach extrazellulär oder in kleinere intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Speicher allmählich wieder auf den Basalwert abzufallen. Erfolgt dann die Intervention mit ADP oder ATP, kann anhand der darauffolgenden  $Ca^{2+}$ -Antwort der Zellen deren Abhängigkeit vom  $Ca^{2+}$  des endoplasmatischen Retikulums

bestimmt werden. Nach ADP- und/oder ATP-Stimulation gab es, zu Erkennen in den in Abbildung 17 beispielhaft dargestellten Reaktionsprofilen, nach Intervention mit den Agonisten in keiner der Zellregionen einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]$  mehr.



**Abbildung 17:** Repräsentative Reaktionsprofile der  $[Ca^{2+}]$  in den einzelnen Zellregionen von A549-Zellen während der Präinkubation mit Thapsigargin und nach Stimulation mit ADP (17A; n = 6) oder ATP (17B; n = 4).

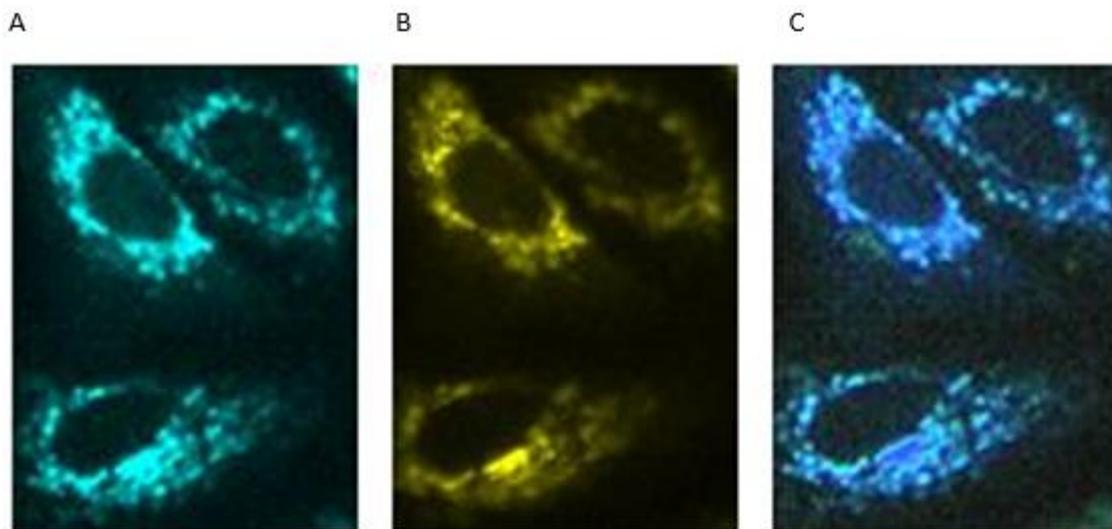
#### 4.4 Förster Resonanz Energie Transfer-Mikroskopie

Die Ergebnisse der  $Ca^{2+}$ -freien und Thapsigargin-Versuche zeigen, dass der Einfluss extrazellulären Calciums auf den Anstieg intrazellulären Calciums nach Stimulation mit ADP und ATP nicht signifikant ist und der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  somit vom  $Ca^{2+}$  innerhalb der Zelle abhängig ist. Die Durchführung der FRET-Mikroskopie-Versuche diente im Folgenden der Untersuchung der Beteiligung verschiedener Zellorganellen, genauer der Mitochondrien und des ERs, an den im Standardversuch gemessenen  $Ca^{2+}$ -Antworten. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt. Bei den Ergebnissen

handelt es sich hier um die Beschreibung der sichtbaren Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten.

#### 4.4.1 Mitochondrium

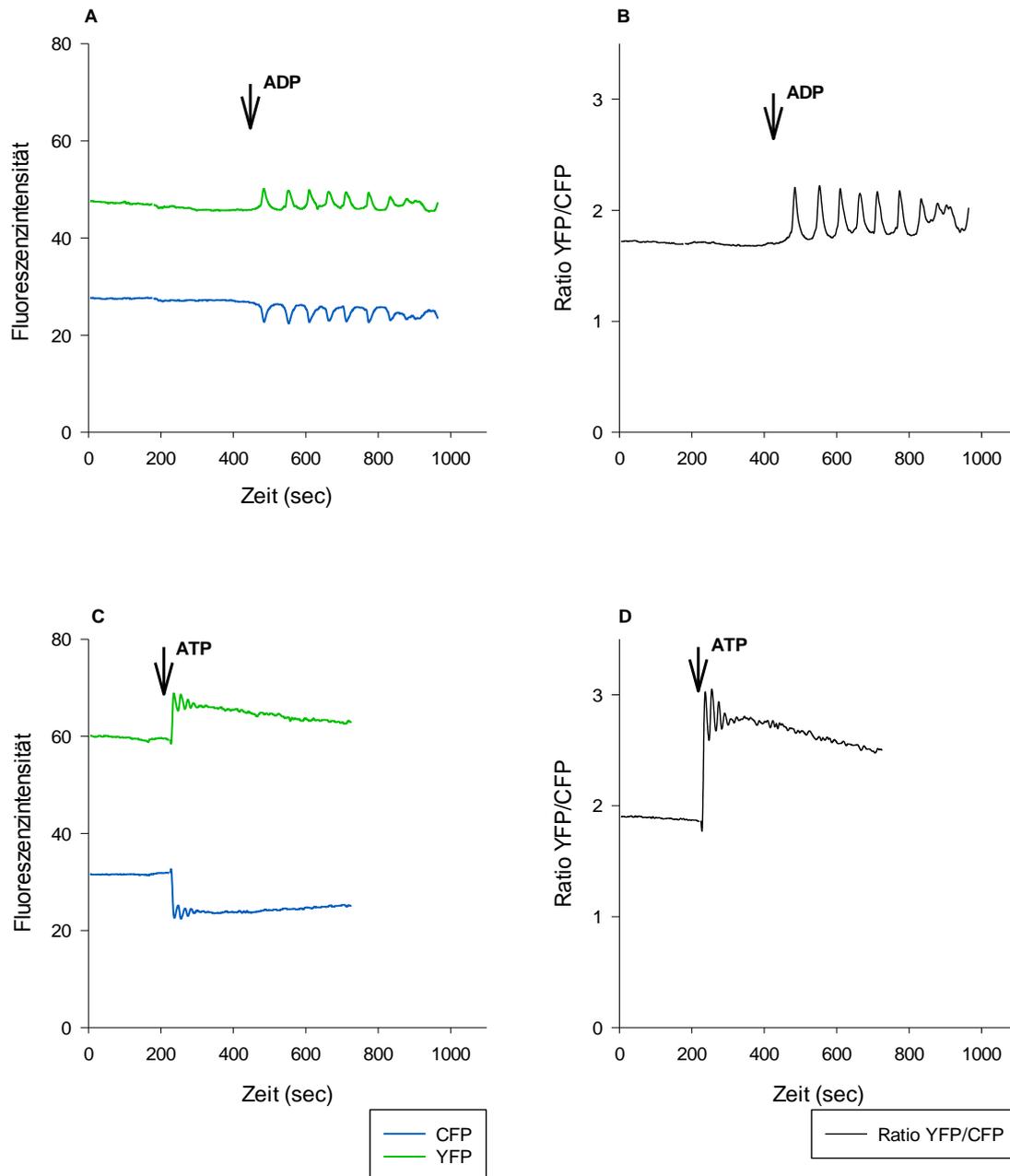
Zellen, die 48 Stunden vor Versuchsbeginn mit dem GECI 4mtD3cpv transfiziert wurden, zeigten bei dessen Exzitation ein mitochondriales Verteilungsmuster des GECIs (Abb. 18). Fluoreszenz-Emissionsmaxima liegen für diesen  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator bei 480 und 535nm.



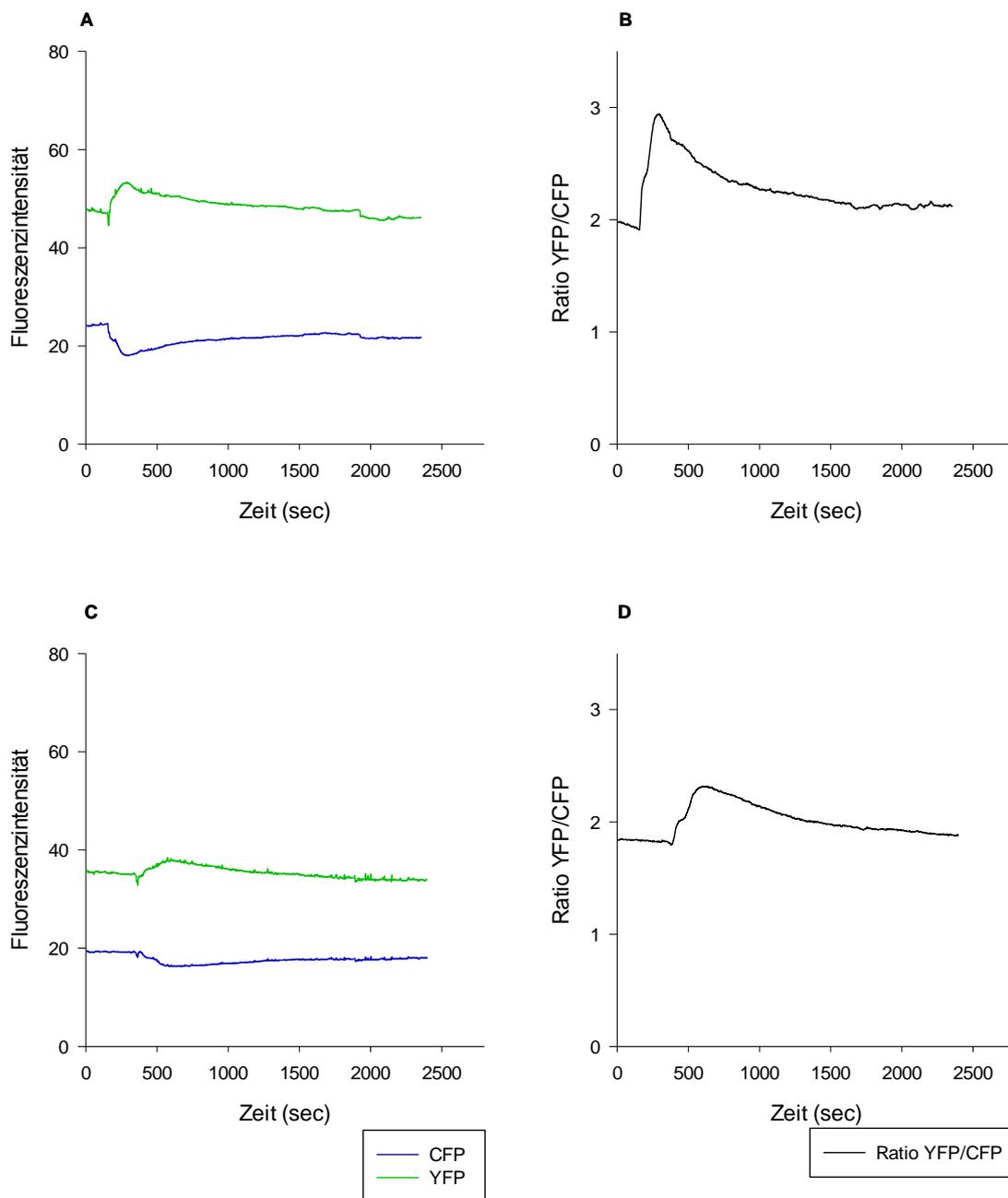
**Abbildung 18:** Aufnahmen der CFP (A) und YFP (B) Fluoreszenz und der Falschfarben-codierten YFP/CFP Ratio (C) von mit 4mtD3cpv transfizierten A549-Zellen zu Ausgangsbedingungen. Man sieht ein mitochondriales Verteilungsmuster des GECIs. 1 cm  $\cong$  5  $\mu\text{m}$ .

Wie in Abbildungen 19A und C und 20A und C in repräsentativen Reaktionsprofilen ersichtlich, führt eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]$  in den Mitochondrien zugleich zu einer Abnahme der Donor- (CFP) und Zunahme der Akzeptor-Emission (cpV = circular permutation venus/YFP) und damit zu einem Anstieg der aus YFP/CFP errechneten Ratio (19B, D und 20B, D). Dies ist gleichbedeutend mit einer Konformationsänderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Elements und der Erhöhung von FRET (Palmer & Tsien, 2006). Abbildung 19 verdeutlicht auch, dass die Stimulation der Zellen mit ADP und ATP in FRET-Experimenten Reaktionsprofile hervorruft, die in Form und zeitlichem Verlauf den Reaktionsprofilen in Epifluoreszenzmikroskopie-Versuchen vergleichbar sind. Im Versuch mit ADP nähern sich beide Fluorophore periodisch bei zunehmender  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$

an und entfernen sich bei abnehmender  $[Ca^{2+}]_{mito}$  wieder voneinander. Es entsteht ein Reaktionsprofil mit Oszillationen. ATP führt nur anfangs zur Annäherung der Fluorophore. Dann entfernen sie sich allmählich voneinander. Das Profil des Anstiegs mit schulterförmigem Abfall entsteht. Im Versuch mit ADP wird  $Ca^{2+}$  also immer wieder zwischen dem Inneren der Mitochondrien und einem anderen Zellkompartiment hin und her verschoben, während die  $[Ca^{2+}]$  innerhalb der Mitochondrien im Versuch mit ATP initial steil ansteigt und danach schulterförmig abfällt. Analog zu den Versuchen mit dem Epifluoreszenzmikroskop zeigt Abbildung 20 anhand beispielhaft ausgewählter Reaktionsprofile, dass sowohl im Versuch mit ADP als auch in dem mit ATP nach der Entleerung des  $Ca^{2+}$  aus dem ER mittels Thapsigargin keinerlei Reaktion mehr hervorgerufen werden kann. Die Mitochondrien nehmen das sich aus dem ER entleerende  $Ca^{2+}$  einmalig auf und geben es langsam wieder ab. Im Anschluss nehmen sie trotz Stimulation kein  $Ca^{2+}$  mehr auf.



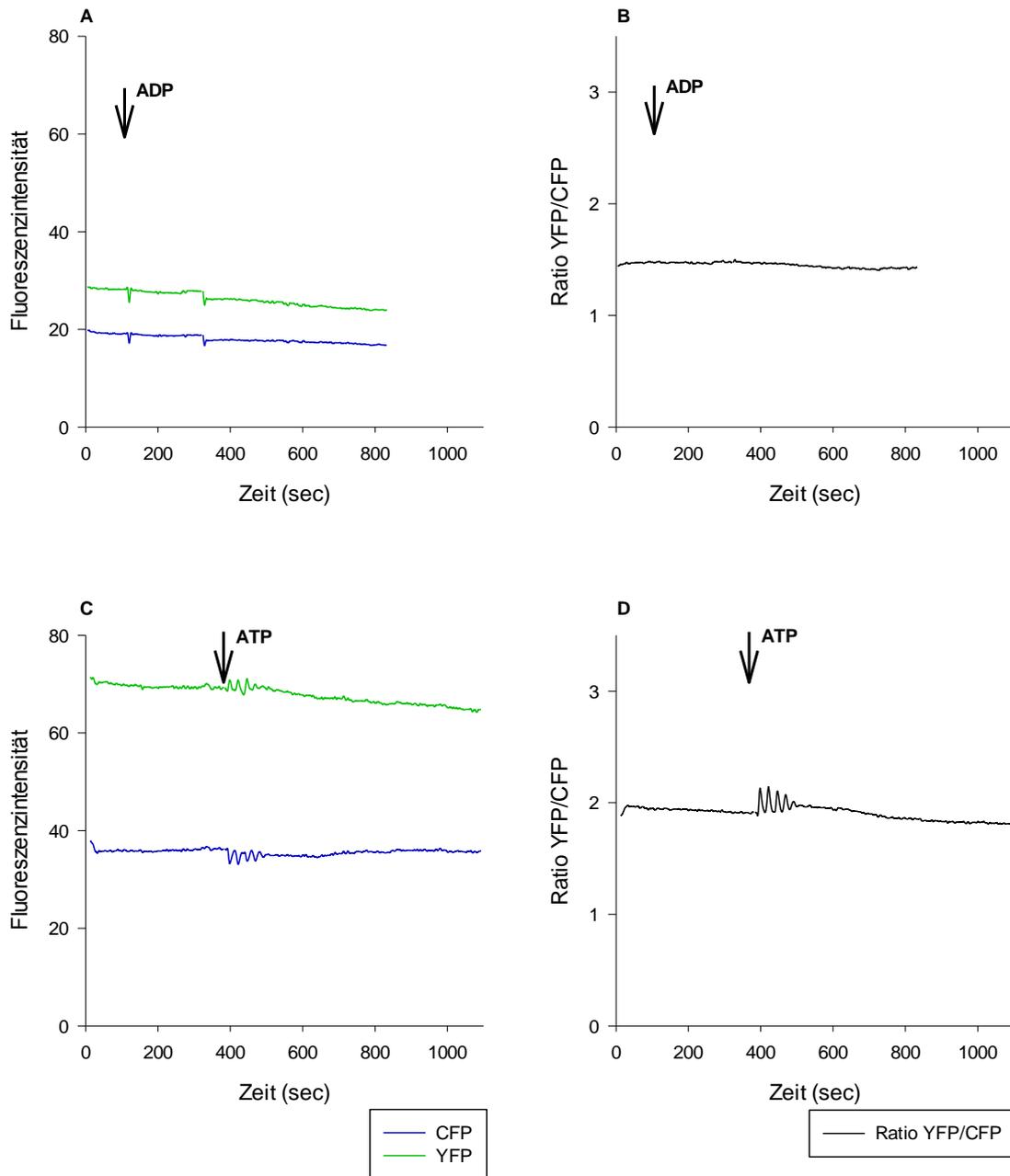
**Abbildung 19: Repräsentative Reaktionsprofile von FRET mit dem durch die Zellen exprimierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor 4mtD3cpv und Agonistenstimulation mit ADP ( $n = 18$ ) und ATP ( $n = 22$ ). Stimulation mit ADP (A, B) oder ATP (C, D). A und C zeigen Verläufe der Fluoreszenzintensität von YFP und CFP; B und D zeigen die daraus berechnete Ratio.**



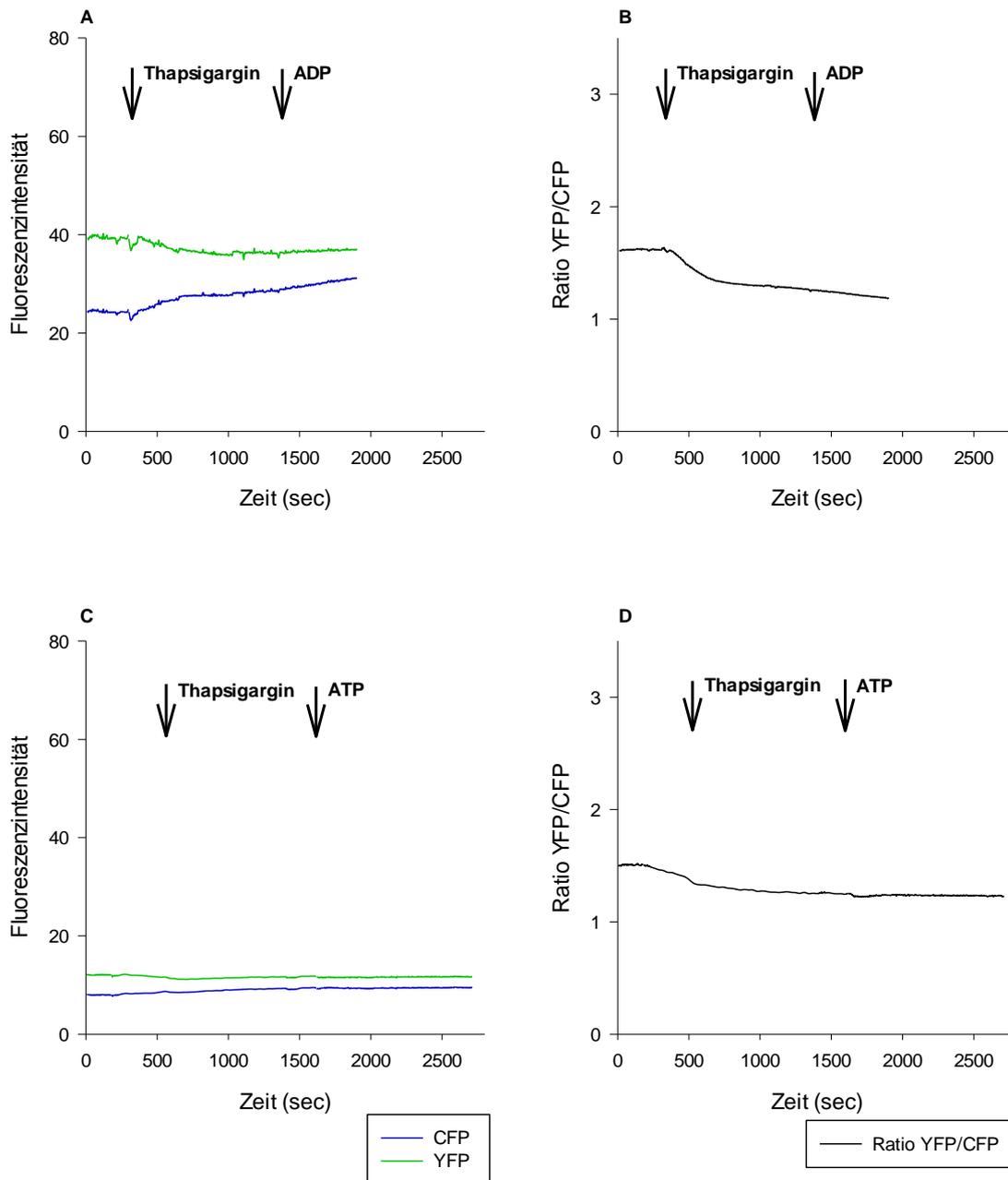
**Abbildung 20: Repräsentative Reaktionsprofile von FRET mit dem durch die Zellen exprimierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor 4mtD3cpv und Präinkubation mit Thapsigargin vor der Agonistenstimulation mit ADP (n = 9) und ATP (n = 8). Stimulation mit ADP (A, B) oder ATP (C, D). A und C zeigen Verläufe der Fluoreszenzintensität von YFP und CFP; B und D zeigen die daraus berechnete Ratio.**

#### 4.4.2 ER

Zellen, die 48 Stunden vor Versuchsbeginn mit dem GECI D1ER transfiziert wurden, zeigten bei dessen Exzitation ein retikuläres Verteilungsmuster des GECIs. Fluoreszenz-Emissionsmaxima liegen für diesen  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator bei 480 und 535nm. Wie in den Abbildungen 21A und C und 22A und C in repräsentativen Reaktionsprofilen ersichtlich, werden die Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten und damit auch der Ratio YFP/CFP sowohl im Standardversuch mit D1ER-transfizierten Zellen als auch im Versuch mit Thapsigargin und D1ER-transfizierten Zellen kaum sichtbar. Eine Abnahme der  $[\text{Ca}^{2+}]$  im ER ist gleichbedeutend mit einer Zunahme der Donor- (CFP), einer Abnahme der Akzeptor-Emission (cpV = circular permutation venus/YFP) und einem Abfall der aus YFP/CFP errechneten Ratio (21B, D und 22B, D) messbar. In Abbildung 21C und D sind nach Gabe von ATP Oszillationen der Fluoreszenzintensitäten und der Ratio YFP/CFP zu erkennen.  $\text{Ca}^{2+}$  wird also auch hier einige Male zwischen ER und einem anderen Zellkompartiment hin und her verlagert. Enthält das ER, nach Gabe des SERCA-Inhibitors Thapsigargin, kein  $\text{Ca}^{2+}$  mehr, sind auch hier durch ADP oder ATP keinerlei Veränderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  mehr auszulösen (Abb. 22).



**Abbildung 21: Repräsentative Reaktionsprofile von FRET mit dem durch die Zellen exprimierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor D1ER und Agonistenstimulation mit ADP ( $n = 4$ ) und ATP ( $n = 14$ ).** Stimulation mit ADP (A, B) oder ATP (C, D). A und C zeigen Verläufe der Fluoreszenzintensität von YFP und CFP; B und D zeigen die daraus berechnete Ratio.



**Abbildung 22: Repräsentative Reaktionsprofile von FRET mit dem durch die Zellen exprimierten Ca<sup>2+</sup>-Sensor D1ER und Präinkubation mit Thapsigargin vor der Agonistenstimulation mit ADP (n = 2) und ATP (n = 4). Stimulation mit ADP (A, B) oder ATP (C, D). A und C zeigen Verläufe der Fluoreszenzintensität von YFP und CFP; B und D zeigen die daraus berechnete Ratio.**

## 4.5 Purinerge Signaltransduktion

Da verschiedene Purinnukleotide, unter anderem ADP und ATP, in A549-Zellen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort hervorrufen, wurde die Expression verschiedener Purinrezeptoren auf A549-Lungenadenokarzinomzellen auf unterschiedlichen Ebenen von der messenger-RNA (mRNA), über das Protein, bis hin zum funktionstüchtigen membranständigen Rezeptor charakterisiert. Dazu wurden unterschiedliche Untersuchungsmethoden rtPCR, Western Blot und P2Y-Rezeptor-Knockdown in Verbindung mit Live Cell  $\text{Ca}^{2+}$ /Fura-2-AM-Ratio-Imaging herangezogen. Aufgrund der unter 4.3.1 beschriebenen Ergebnisse, die keinen signifikanten Unterschied des Ausmaßes der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem und  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Puffer weder nach ADP- noch nach ATP-Stimulation zeigen, wird davon ausgegangen, dass P2X-Rezeptoren keine Rolle für das  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* in den A549-Zellen spielen. Daher konzentrieren sich die Untersuchungen auf die P2YRs, die eine intrazelluläre  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Erhöhung über die Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern vermitteln. Wurde das  $\text{Ca}^{2+}$  des größten  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichers der Zelle, dem ER, nämlich vollständig mittels Thapsigargin entleert, war danach keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort mehr messbar.

### 4.5.1 PCR

Um den Nachweis der P2YR auf mRNA-Ebene zu erbringen, wurde die rtPCR-Methode bemüht. Demnach konnte für A549-Zellen die Expression von mRNA für P2Y<sub>1</sub>R, P2Y<sub>2</sub>R und P2Y<sub>6</sub>R nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde mittels der rtPCR auch der erfolgreiche Rezeptor-*Knockdown* für die P2Y<sub>1</sub>R, P2Y<sub>2</sub>R und P2Y<sub>6</sub>R bestätigt.



**Abbildung 23: rtPCR mit Nachweis von mRNA für P2Y<sub>1</sub>R, P2Y<sub>2</sub>R und P2Y<sub>6</sub>R in A549-Zellen.** Dargestellt ist ein 2%-Agarose-Gel der amplifizierten Produkte. Die Expression konnte jeweils mittels spezifischer, aber nicht mit scrambled siRNA herunter reguliert werden. n = 2-3 je Rezeptorgen.

### 4.5.2 Western Blot

Im Anschluss an den Nachweis von Rezeptor-mRNA mittels rtPCR erfolgte die Untersuchung auf das Vorhandensein der jeweiligen Rezeptorproteine mittels Western Blot. Obwohl P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>13</sub> auf der mRNA-Ebene nicht gefunden wurden, wurde der Vollständigkeit halber dennoch das Vorkommen der Rezeptorproteine überprüft. Es zeigte sich, dass A549-Zellen über Rezeptorproteine für die Rezeptoren P2Y<sub>1</sub>R, P2Y<sub>2</sub>R, und P2Y<sub>6</sub>R, nicht aber über Rezeptorproteine für

P2Y<sub>4</sub>R, P2Y<sub>11</sub>R, P2Y<sub>12</sub>R und P2Y<sub>13</sub>R verfügen. An P2Y<sub>1</sub>R, P2Y<sub>12</sub>R und P2Y<sub>13</sub>R gilt ADP als spezifischer Agonist.

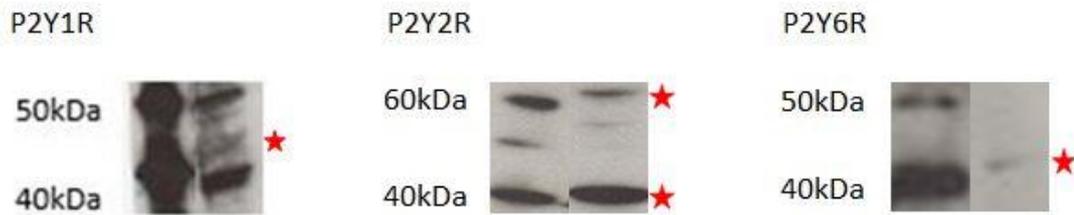
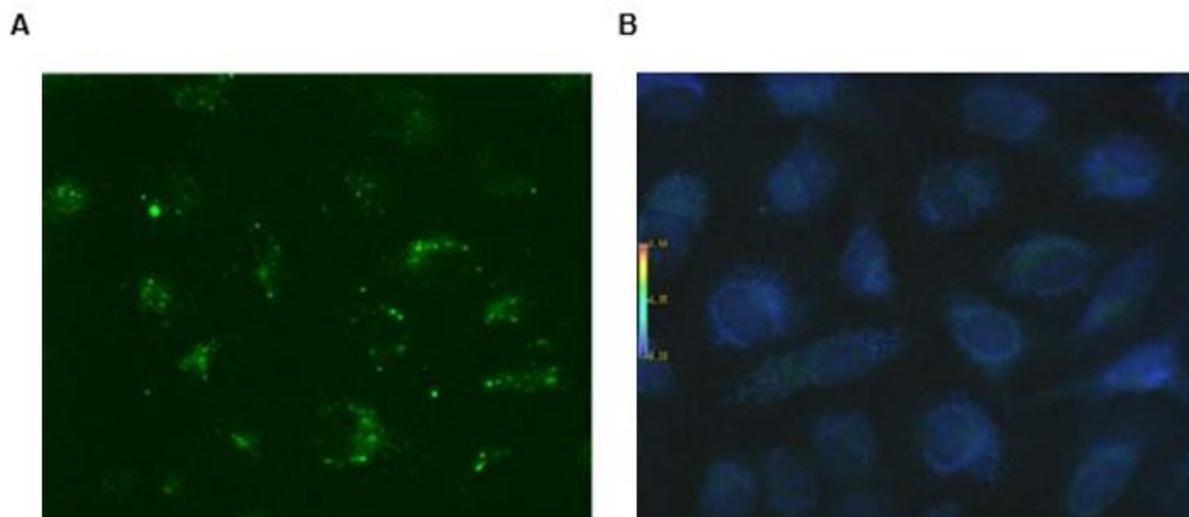


Abbildung 24: Western-Blots der P2Y<sub>1</sub>R (45kDa), P2Y<sub>2</sub>R (40/60kDa) und P2Y<sub>6</sub>R (45kDa), die in A549-Zellen exprimiert werden (☆). n = 3 je Rezeptor.

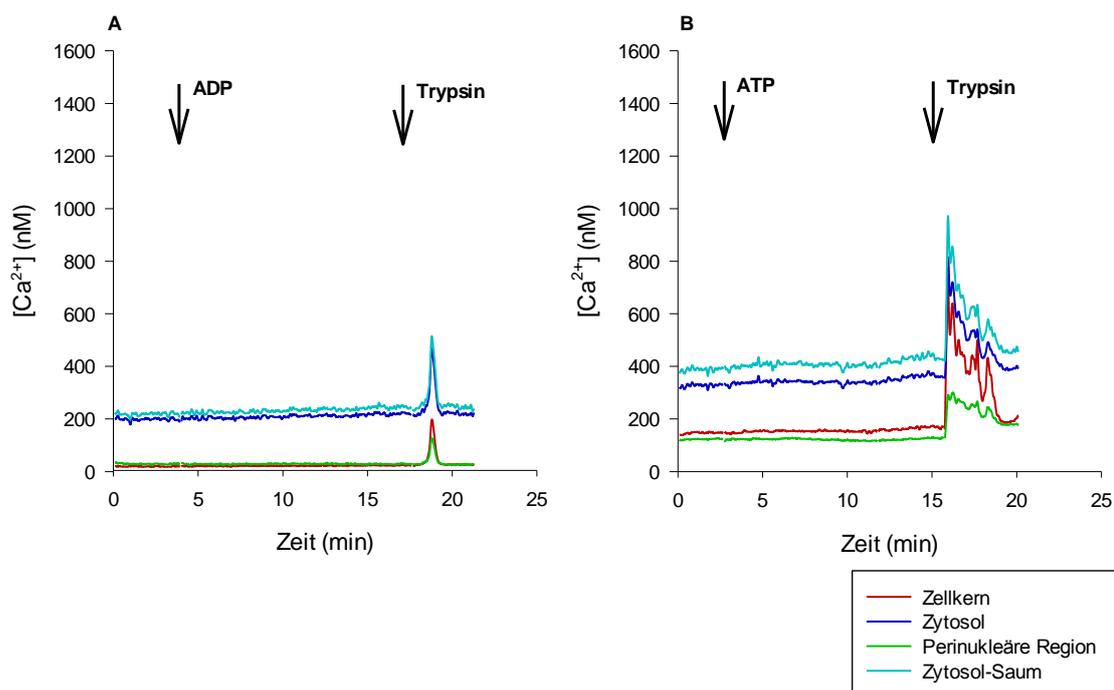
### 4.5.3 P2Y-Rezeptor-Knockdown

#### 4.5.3.1 P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor

Wurde die Expression des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors durch die Transfektion der Zellen mit siRNA verhindert, war sowohl nach Intervention mit ADP (Abb. 26A) als auch nach der Intervention mit ATP (Abb. 26B) keine signifikante Ca<sup>2+</sup>-Antwort der Zellen mehr messbar. Dies ist durch zwei repräsentative Reaktionsprofile in Abbildung 26 verdeutlicht. Trypsin ruft in A549-Zellen eine Ca<sup>2+</sup>-Antwort über einen anderen G-Protein gekoppelten Rezeptor (*Proteinase activated Receptor 2*, PAR-2) hervor als Purinnukleotide. Die sich an die Stimulation mit ADP und/oder ATP anschließende Stimulation mit Trypsin eignet sich demnach, die Fähigkeit der transfizierten Zellen zur Ca<sup>2+</sup>-Antwort zu beweisen (Abb. 26).



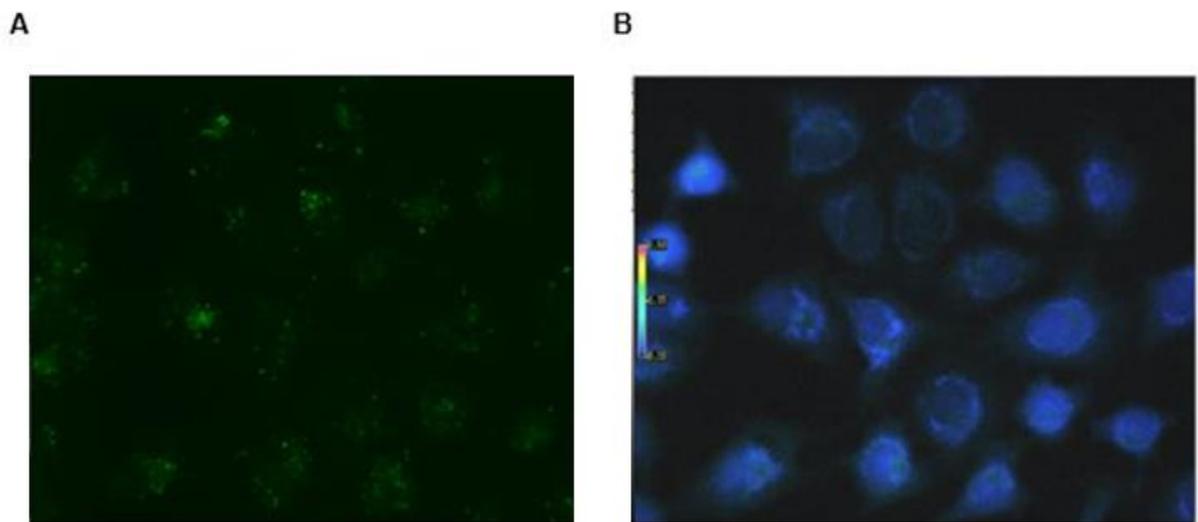
**Abbildung 25: Aufnahmen von A549-Zellen mit *Knockdown* des P2Y<sub>2</sub>R durch siRNA-Transfektion.** Fluoreszenzmarkierung der transfizierten siRNA in A549-Zellen mit Alexa Fluor 488 und Darstellung mittels entsprechendem Filter (25A) und dasselbe Gesichtsfeld dargestellt mittels Fura-2-Filter, Darstellung der mit Fura-2 gefärbten Zellen in Falschfarben (25B). 1 cm  $\cong$  5  $\mu$ m.



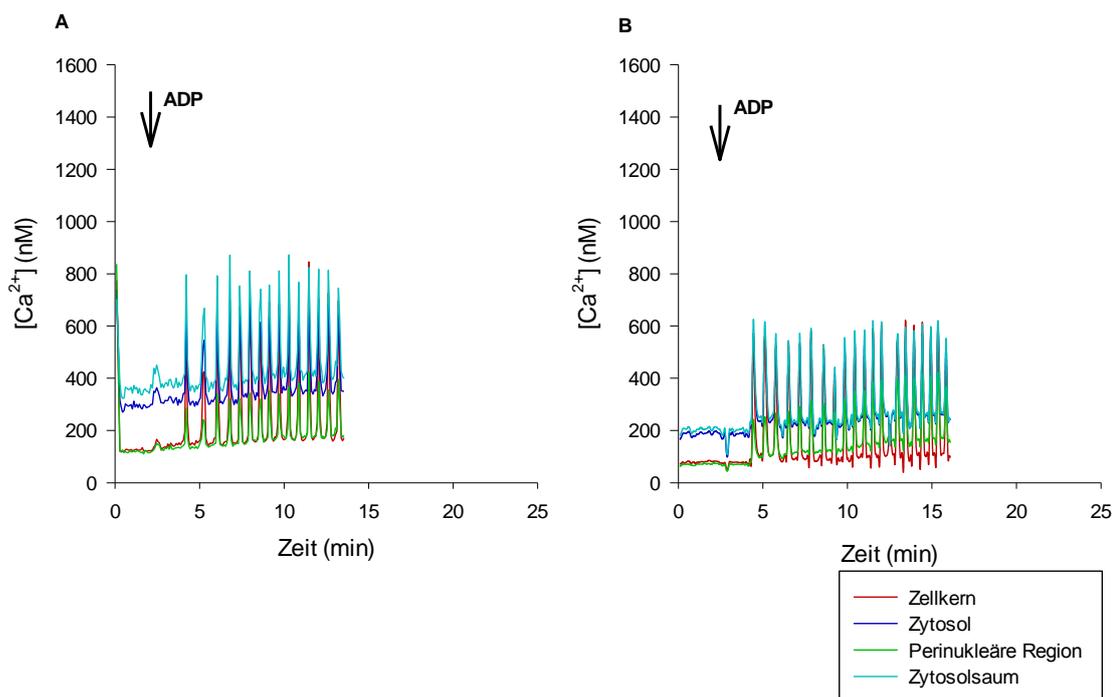
**Abbildung 26: Repräsentative Reaktionsprofile der  $[Ca^{2+}]$  in den einzelnen Zellregionen von Zellen mit P2Y<sub>2</sub>R-*Knockdown* nach Stimulation mit ADP (n = 19) und Trypsin (A) und ATP (n = 8) und Trypsin (B).** Die Stimulation mit Trypsin, welches über den PAR-2-Rezeptor wirkt, dient nach Ausbleiben der Reaktion auf die Stimulation mit den Purinnukleotiden dem Beweis der erhaltenen Fähigkeit der Zellen zur  $Ca^{2+}$ -Antwort.

#### 4.5.3.2 P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor

Trotz der oben beschriebenen Ergebnisse nach dem *Knockdown* des P2Y<sub>2</sub>Rs wurden der Vollständigkeit halber der Knockdown des P2Y<sub>1</sub>R und Versuche mit den transfizierten Zellen und ADP-Stimulation durchgeführt, da dieser Rezeptor als der spezifische Rezeptor für ADP gilt (Burnstock, 2007). Zum Nachweis der gelungenen Transfektion diente die rtPCR und die Verwendung von mit Alexa Fluor 488 markierten siRNA-Molekülen (27A). Im Epifluoreszenzmikroskopie-Versuch war die Ca<sup>2+</sup>-Antwort transfizierter Zellen vergleichbar zu der Ca<sup>2+</sup>-Antwort nicht transfizierter Zellen (Abb. 28).



**Abbildung 27:** Aufnahmen von A549-Zellen mit *Knockdown* des P2Y<sub>1</sub>R durch siRNA-Transfektion. Fluoreszenzmarkierung der transfizierten siRNA in A549-Zellen mit Alexa Fluor 488 und Darstellung mittels entsprechendem Filter (27A) und dasselbe Gesichtsfeld dargestellt mittels Fura-2-Filter, Darstellung der mit Fura-2 gefärbten Zellen in Falschfarben (27B). 1 cm  $\cong$  5  $\mu$ m.



**Abbildung 28:** Repräsentatives Reaktionsprofil der  $[Ca^{2+}]$  einer Zelle mit P2Y<sub>1</sub>R-Knockdown nach Stimulation mit ADP (28A) und zum Vergleich ein repräsentatives Reaktionsprofil der  $[Ca^{2+}]$  einer Zelle ohne Rezeptor-Knockdown nach Stimulation mit ADP (28B).

#### 4.6 Die Beteiligung der Mitochondrien am $Ca^{2+}$ -Signalling nach ADP- bzw. ATP-Stimulation

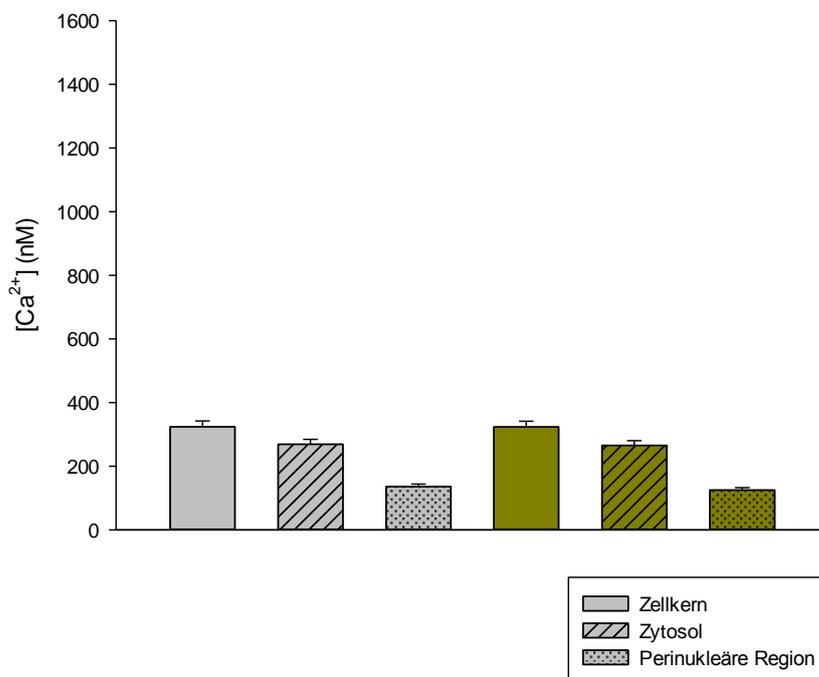
Um den Einfluss der Mitochondrien und der in den Mitochondrien gebildeten ROS auf das  $Ca^{2+}$ -Signalling in den A549-Zellen zu untersuchen, wurde die Atmungskette an verschiedenen Positionen mittels pharmakologischer Substanzen (Rotenone, Myxothiazol, Antimycin A) inhibiert.

##### 4.6.1.1 DMSO Vehikelkontrolle

Zum Ausschluss einer bereits durch Dimethylsulfoxid (DMSO), einem organischen Lösungsmittel für Rotenone, Myxothiazol und Antimycin A, hervorgerufenen zellulären  $Ca^{2+}$ -Antwort, wurde eine Vehikelkontrolle mit 0,1% DMSO durchgeführt. Dazu wurde in 7 ADP- bzw. 6 ATP-Versuchen zum Zeitpunkt der eigentlichen Zugabe des jeweiligen in DMSO gelösten Inhibitors der Atmungskette, ausschließlich DMSO in 0,1%iger Lösung in das Zellmedium pipettiert. Um die Auswirkungen des

Lösungsmittels auf die zelluläre Signaltransduktion zu untersuchen, wurden nach einer Latenz von etwa 10 Minuten ( $9,9 \pm 0,87\text{min}$ ) entweder ADP oder ATP hinzugegeben.

Aus der statistischen Auswertung (Abb. 29) geht hervor, dass DMSO allein die  $[\text{Ca}^{2+}]$  innerhalb der verschiedenen Zellregionen nicht verändert und sich die gemessenen Basalwerte und die Werte nach Intervention mit DMSO nicht unterscheiden (Anstiege nach ADP und ATP bei Vorinkubation mit DMSO: Zellkern  $0,83 \pm 19\text{ nM}$ , Zytosol<sub>gesamt</sub>  $10,85 \pm 16,78\text{ nM}$ , perinukleäre Region  $3,61 \pm 17,19\text{ nM}$ ).



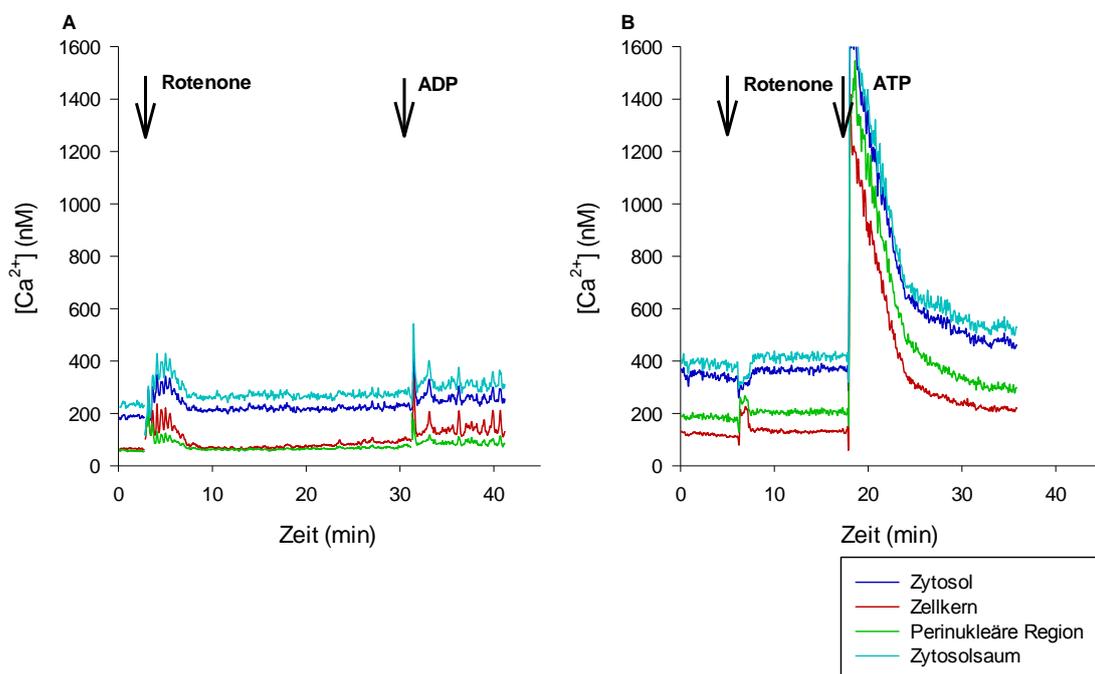
**Abbildung 29: Mittelwert der  $\text{Ca}^{2+}$ -Basalwerte**  **und die mittlere  $[\text{Ca}^{2+}]$  unter Einfluss von DMSO 0,1%**  **(Vehikelkontrolle).**  $n = 20$  respektive 13; in 10 bzw. 7 Versuchen folgte eine ADP-, in 10 bzw. 6 Versuchen eine ATP-Stimulation. Die gemessenen mittleren Basalwerte und die Werte für die mittlere  $[\text{Ca}^{2+}]$  nach Inkubation mit dem Lösungsmittel DMSO unterscheiden sich nicht signifikant.

#### 4.6.1.1 Rotenone

Rotenone ist ein ursprünglich pflanzlicher Komplex I-Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette. Es inhibiert den Elektronentransfer von Komplex I der Atmungskette auf

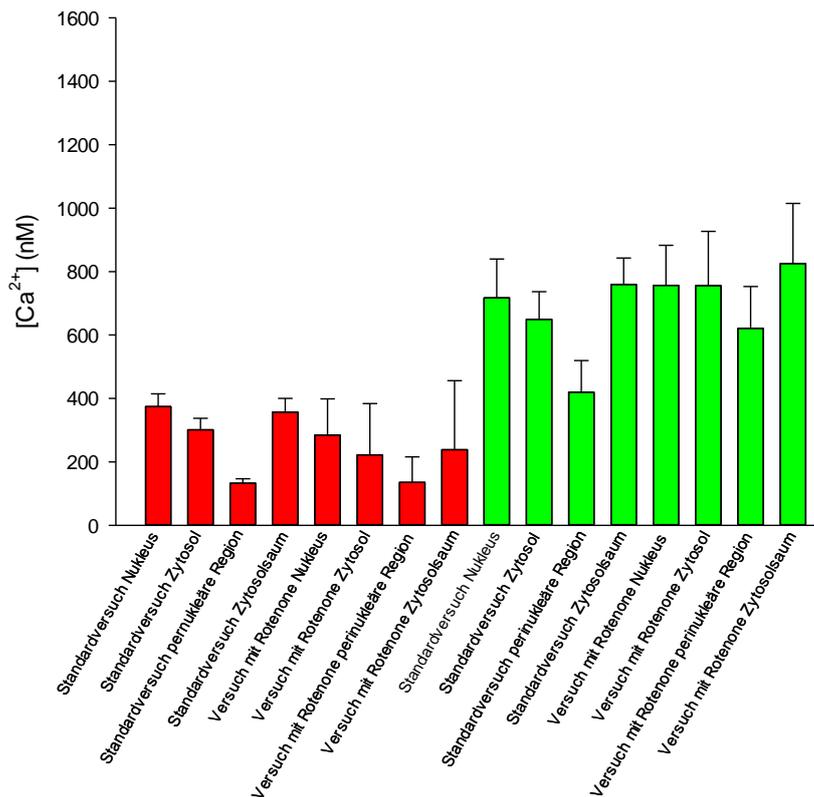
Ubichinon. Dadurch kommt es zu einer Anhäufung von Redox-Äquivalenten, vornehmlich aus dem Zitratzyklus (NADH), und zu einem verminderten Anfall von ROS, vor allem Superoxidanion.

Während sich das **Profil** der durch ADP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort der A549-Zellen durch die Präinkubation mit Rotenone sichtbar verändert, beeinflusst Rotenone das **Profil** der ATP-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort augenscheinlich kaum. Im Versuch mit Rotenone und ADP sind die Oszillationen im Vergleich zu denen in den Standardversuchen weniger regelmäßig und mit  $0,79 \pm 0,13/\text{min}$  niedriger in ihrer Frequenz (Frequenz im Standardversuch  $1,4 \pm 0,11/\text{min}$ ;  $p < 0,05$ ). Hohe Oszillationen treten vermindert auf, stattdessen finden sich gehäuft Oszillationen niedriger Amplitude. In Versuchen mit ATP führt Rotenone zu einer verminderten Frequenz der Spike-Überlagerungen mit durchschnittlich  $1,29 \pm 0,2/\text{min}$  (Frequenz im Standardversuch  $2,7 \pm 0,11/\text{min}$ ;  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 30: Repräsentative Reaktionsprofile der  $[\text{Ca}^{2+}]$  in den einzelnen Zellregionen von A549-Zellen während der Präinkubation mit Rotenone  $50\mu\text{M}$  und nach Stimulation mit ADP (A;  $n = 10$ ) oder ATP (B;  $n = 11$ ).** Rotenone beeinflusst die Reaktionsprofile. Im Versuch mit ADP kommt es zu unregelmäßigeren und niederfrequenteren Oszillationen ( $p < 0,05$ ) und im Versuch mit ATP zu einer verminderten Frequenz der Spike-Überlagerungen ( $p < 0,05$ ).

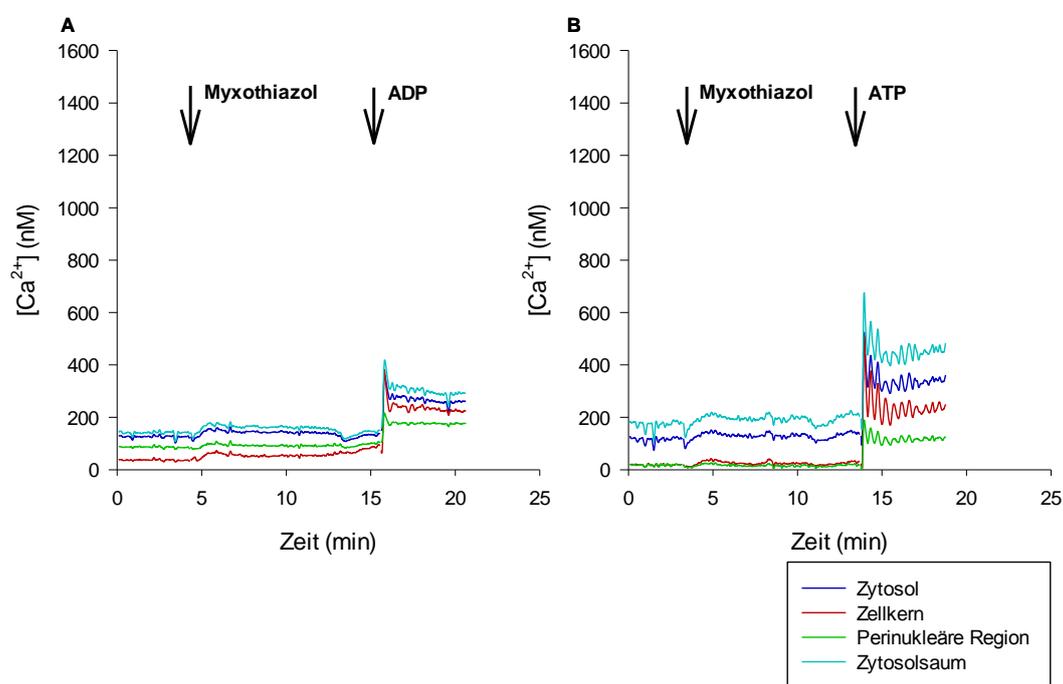
Sowohl in der Interventionsgruppe mit Rotenone und ADP als auch in der mit Rotenone und ATP unterscheiden sich die erreichten maximalen Amplituden der  $[Ca^{2+}]$  im direkten Vergleich korrespondierender Zellregionen nicht von denen im Standardversuch (ADP: Zellkern: Standardversuch  $374 \pm 40,1$  nM vs. Versuch mit Rotenone  $284 \pm 114$  nM, Zytoplasma: Standardversuch  $301 \pm 36$  nM vs. Versuch mit Rotenone  $222 \pm 161$  nM, perinukleäre Region: Standardversuch  $133 \pm 13,8$  nM vs. Versuch mit Rotenone  $135 \pm 80,3$  nM, Zytoplasmasaum: Standardversuch  $357 \pm 43,4$  nM vs. Versuch mit Rotenone  $238 \pm 218$  nM; ATP: Zellkern: Standardversuch  $717 \pm 122$  nM vs. Versuch mit Rotenone  $756 \pm 127$  nM, Zytoplasma: Standardversuch  $649 \pm 87,6$  nM vs. Versuch mit Rotenone  $755 \pm 171$  nM, perinukleäre Region: Standardversuch  $419 \pm 99,7$  nM vs. Versuch mit Rotenone  $620 \pm 133$  nM, Zytoplasmasaum: Standardversuch  $759 \pm 83,6$  nM vs. Versuch mit Rotenone  $825 \pm 190$  nM).



**Abbildung 31: Vergleichende Darstellung der mittleren maximalen  $[Ca^{2+}]$ -Amplitude nach ADP- (rot) und ATP- (grün) Stimulation unter Standardbedingungen und Vorbehandlung der Zellen mit Rotenone  $50\mu\text{M}$ . Keine der erreichten maximalen Amplituden der  $[Ca^{2+}]$  im Versuch mit Rotenone unterscheidet sich im direkten Vergleich der Zellregionen von denen im Standardversuch. ADP: jeweils n = 10; ATP: n = 10 bzw. 11.**

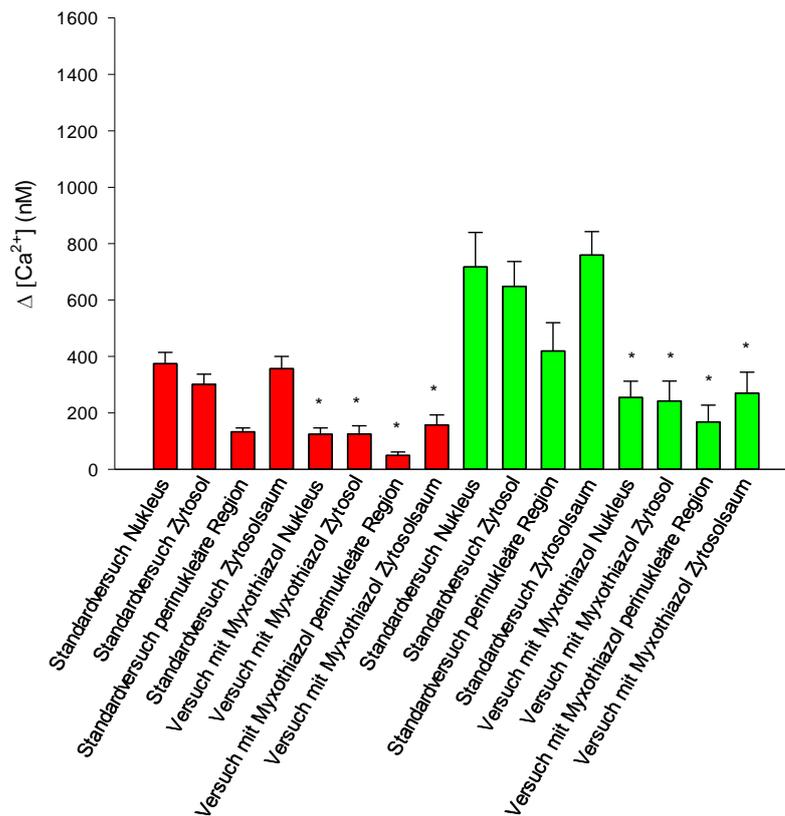
#### 4.6.1.1 Myxothiazol

Myxothiazol ist ein aus dem Myxobakterium *Myxococcus fulvus* abgeleiteter Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette proximal am Cytochrom bc1-Komplex (Coenzym Q – Cytochrom C-Reduktase, bzw. Komplex III). Es verhindert den Elektronentransfer auf das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein und die Oxidation von Ubichinol zu Semichinon. Unter dem Einfluss von Myxothiazol wird die Produktion von ROS am Komplex III der Atmungskette vermindert. Bereits bei der Betrachtung der ausgewählten repräsentativen Reaktionsprofile in Abbildung 32A und B wird deutlich, dass die Amplituden der  $[Ca^{2+}]$  nach der Intervention mit ADP oder ATP unter dem Einfluss von Myxothiazol in allen ausgewerteten Zellregionen geringer sind als im Standardversuch. In der statistischen Auswertung bestätigt sich dies ( $p < 0,05$ ). Die Oszillationen im Versuch mit ADP sind deutlich abgeschwächt und kaum mehr auszumachen. In beiden Interventionsgruppen ist außerdem zu beobachten, dass nach dem postinterventionellen steilen Anstieg die  $[Ca^{2+}]$  in alle Zellregionen ein Plateau erreicht und die Basalwerte nicht wieder erreicht werden.



**Abbildung 32: Repräsentative Reaktionsprofile der  $[Ca^{2+}]$  in den einzelnen Zellregionen von A549-Zellen während der Präinkubation mit Myxothiazol  $20\mu\text{g/ml}$  und nach Stimulation mit ADP (A;  $n = 9$ ) oder ATP (B;  $n = 7$ ). Die Oszillationen sind im ADP Versuch deutlich abgeschwächt. In beiden Interventionsgruppen werden die Basalwerte nach dem postinterventionellen steilen Anstieg der  $[Ca^{2+}]$  nicht wieder erreicht.**

Die statistische Auswertung ergibt für ADP: Zellkern: Standardversuch  $374 \text{ nM} \pm 40,1 \text{ nM}$  vs. Versuch mit Mxothiazol  $124 \pm 22,6 \text{ nM}$ , Zytosol: Standardversuch  $301 \pm 36 \text{ nM}$  vs. Versuch mit Mxothiazol  $125 \pm 29,2 \text{ nM}$ , perinukleäre Region: Standardversuch  $133 \pm 13,8 \text{ nM}$  vs. Versuch mit Mxothiazol  $49 \pm 12,3 \text{ nM}$ , Zytsosolsaum: Standardversuch  $357 \pm 43,4 \text{ nM}$  vs. Versuch mit Mxothiazol  $157 \pm 35,5 \text{ nM}$  und für ATP: Zellkern: Standardversuch  $717 \pm 122 \text{ nM}$  vs. Versuch mit Myxothiazol  $254 \pm 58,2 \text{ nM}$ , Zytosol: Standardversuch  $649 \pm 87,6 \text{ nM}$  vs. Versuch mit Mxothiazol  $242 \pm 70,5 \text{ nM}$ , perinukleäre Region: Standardversuch  $419 \pm 99,7 \text{ nM}$  vs. Versuch mit Mxothiazol  $168 \pm 59,7 \text{ nM}$ , Zytsosolsaum: Standardversuch  $759 \pm 83,6 \text{ nM}$  vs. Versuch mit Mxothiazol  $270 \pm 74,5 \text{ nM}$ . Die Unterschiede sind für alle Zellregionen im direkten Vergleich signifikant ( $p < 0,05$ ).

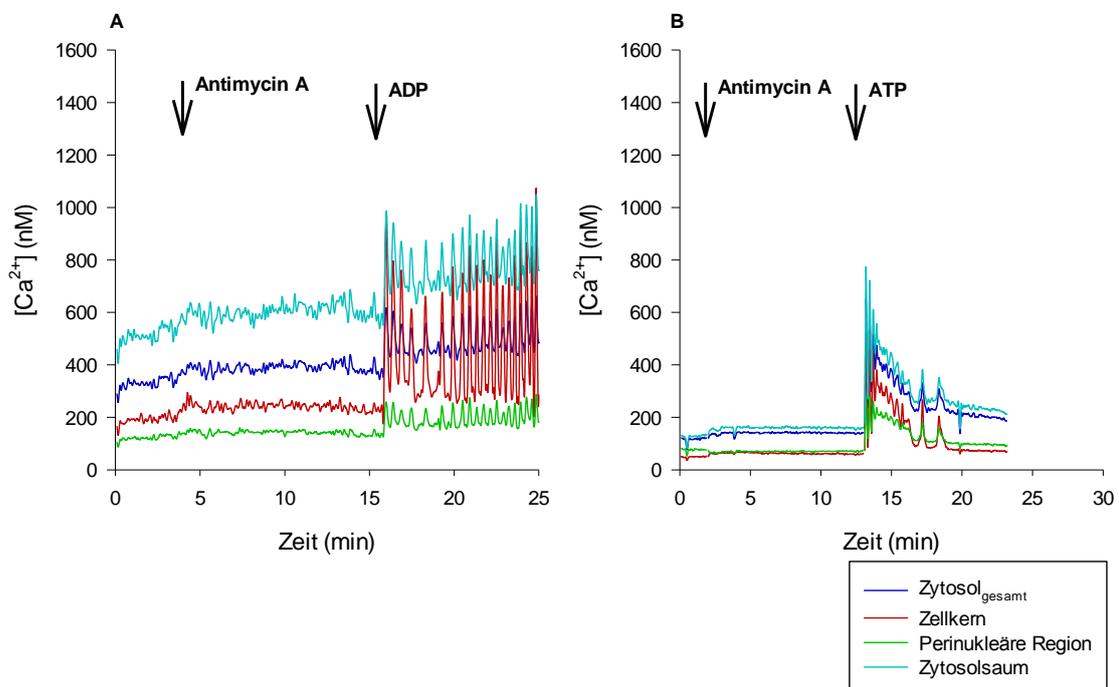


**Abbildung 33: Vergleichende Darstellung der maximalen  $[\text{Ca}^{2+}]$  nach ADP (rot) und ATP (grün) Applikation unter Standardbedingungen und Vorbehandlung der Zellen mit Myxothiazol  $20 \mu\text{g/ml}$ . Im direkten Vergleich der Zellregionen unterscheiden diese sich sowohl im ADP- ( $n = 9$ ) als auch im ATP-Versuch ( $n = 7$ ) sämtlich signifikant;  $*p < 0,05$  vs. korrespondierende Säulen 1-4 bzw. Säulen 9-12.**

#### 4.6.1.1 Antimycin A

Antimycin ist ein von Streptomyzeten produzierter Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette distal des Komplex III am Cytochrom bc1 Komplex. Es verhindert die Oxidation von Ubisemichinon zu Cytochrom C1 und steigert die ROS-Produktion (Corda, Laplace, Vicaut, & Duranteau, 2001). Ubisemichinon ist in der Lage, Superoxid ( $O_2^-$ ) zu produzieren, welches dann über die Superoxiddismutase (SOD) zu  $H_2O_2$  umgesetzt wird.

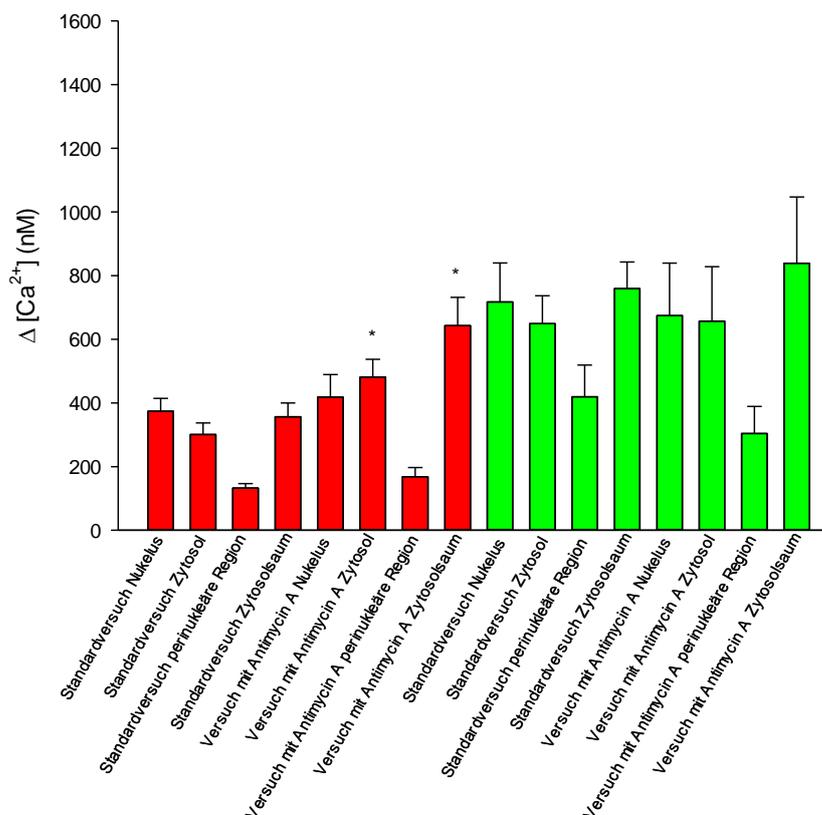
Die zur Veranschaulichung ausgewählten beispielhaften Profile der  $Ca^{2+}$ -Antwort auf ADP und ATP unter dem Einfluss von Antimycin A zeigen in beiden Fällen vor allem eine Beschleunigung der Oszillations- bzw. Spikefrequenz (Abb. 34). Im Standardversuch liegt die Oszillationsfrequenz im Versuch mit ADP bei  $1,4 \pm 0,11/\text{min}$  und die Spikefrequenz im Versuch mit ATP bei im Mittel  $2,7 \pm 0,11/\text{min}$ . Unter der Einwirkung von Antimycin A beschleunigen sich die Frequenzen im ADP-Versuch auf  $2,1 \pm 0,21/\text{min}$  und im ATP-Versuch auf durchschnittlich  $3,6 \pm 0,18/\text{min}$ . In beiden Fällen ist dies ein signifikanter Anstieg der Oszillationsfrequenz ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 34: Repräsentative Reaktionsprofile der  $[Ca^{2+}]$  in den einzelnen Zellregionen von A549-Zellen während der Präinkubation mit Antimycin A  $2\mu\text{g/ml}$  und nach Stimulation mit ADP (A;  $n = 8$ ) oder ATP (B;  $n = 6$ ). Die Profile zeigen eine signifikante Beschleunigung der Oszillations- bzw. Spikefrequenz ( $p < 0,05$ )**

Im Vergleich mit den Standardversuchen sind lediglich für die Zellregionen Zytosol ( $481 \pm 56,1$  nM) und Zytoplasma ( $643 \pm 89,1$  nM) im Experiment mit Antimycin A und ADP höhere maximale  $[Ca^{2+}]$  zu verzeichnen ( $p < 0,05$ ).

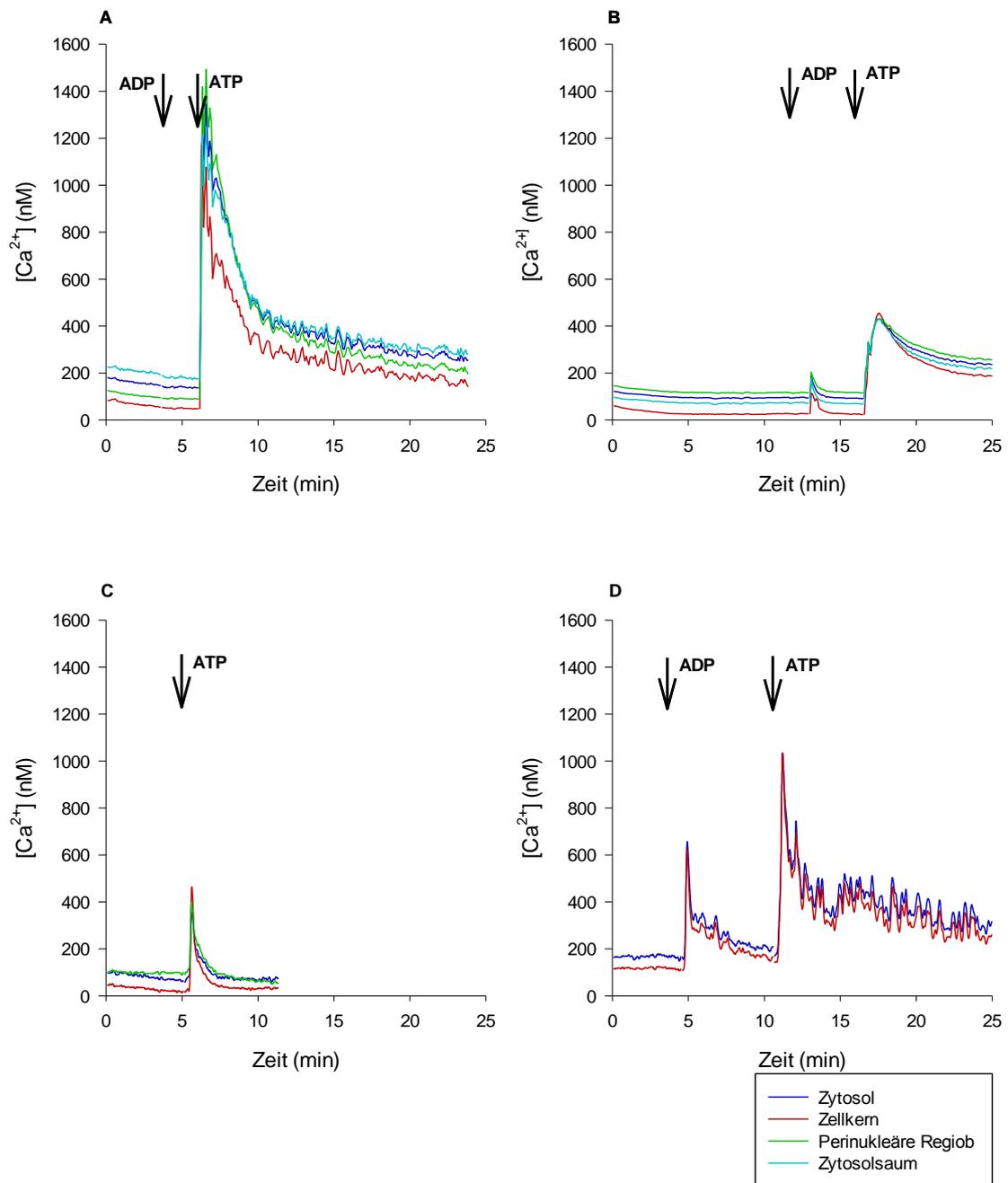
Die statistische Auswertung ergibt für ADP: Zellkern: Standardversuch  $374 \text{ nM} \pm 40,1 \text{ nM}$  vs. Versuch mit Antimycin  $419 \pm 70,8$  nM, Zytosol: Standardversuch  $301 \pm 36$  nM vs. Versuch mit Antimycin  $481 \pm 56,1$  nM, perinukleäre Region: Standardversuch  $133 \pm 13,8$  nM vs. Versuch mit Antimycin  $168 \pm 28,8$  nM, Zytoplasma: Standardversuch  $357 \pm 43,4$  nM vs. Versuch mit Antimycin  $643 \pm 89,1$  nM und für ATP: Zellkern: Standardversuch  $717 \pm 122$  nM vs. Versuch mit Antimycin  $674 \pm 165$  nM, Zytosol: Standardversuch  $649 \pm 87,6$  nM vs. Versuch mit Antimycin  $657 \pm 171$  nM, perinukleäre Region: Standardversuch  $419 \pm 99,7$  nM vs. Versuch mit Antimycin  $304 \pm 85,1$  nM, Zytoplasma: Standardversuch  $759 \pm 83,6$  nM vs. Versuch mit Antimycin  $839 \pm 208$  nM.



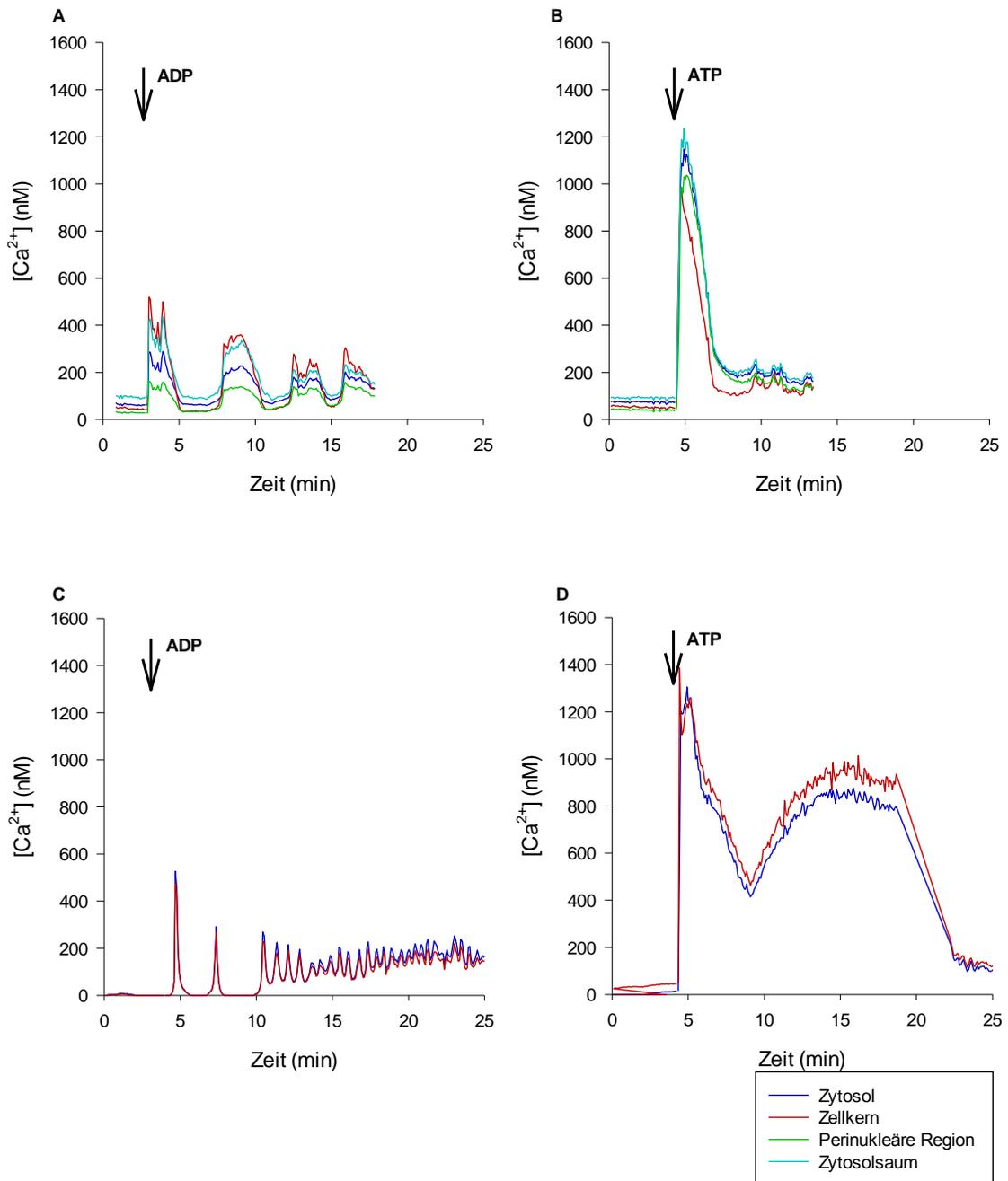
**Abbildung 35: Vergleichende Darstellung der maximalen [Ca<sup>2+</sup>] nach ADP- ■ und ATP- ■ Stimulation unter Standardbedingungen und Vorbehandlung der Zellen mit Antimycin A 2µg/ml. Lediglich im Versuch mit ADP ergeben sich signifikante Unterschiede für die Zellregionen Zytosol und Zytosolsaum im direkten Vergleich; \*p < 0,05 vs. korrespondierende Säule 2 bzw. korrespondierende Säule 4. ADP: n = 8; ATP: n = 6.**

#### 4.7 Epithelzellen anderen Ursprungs

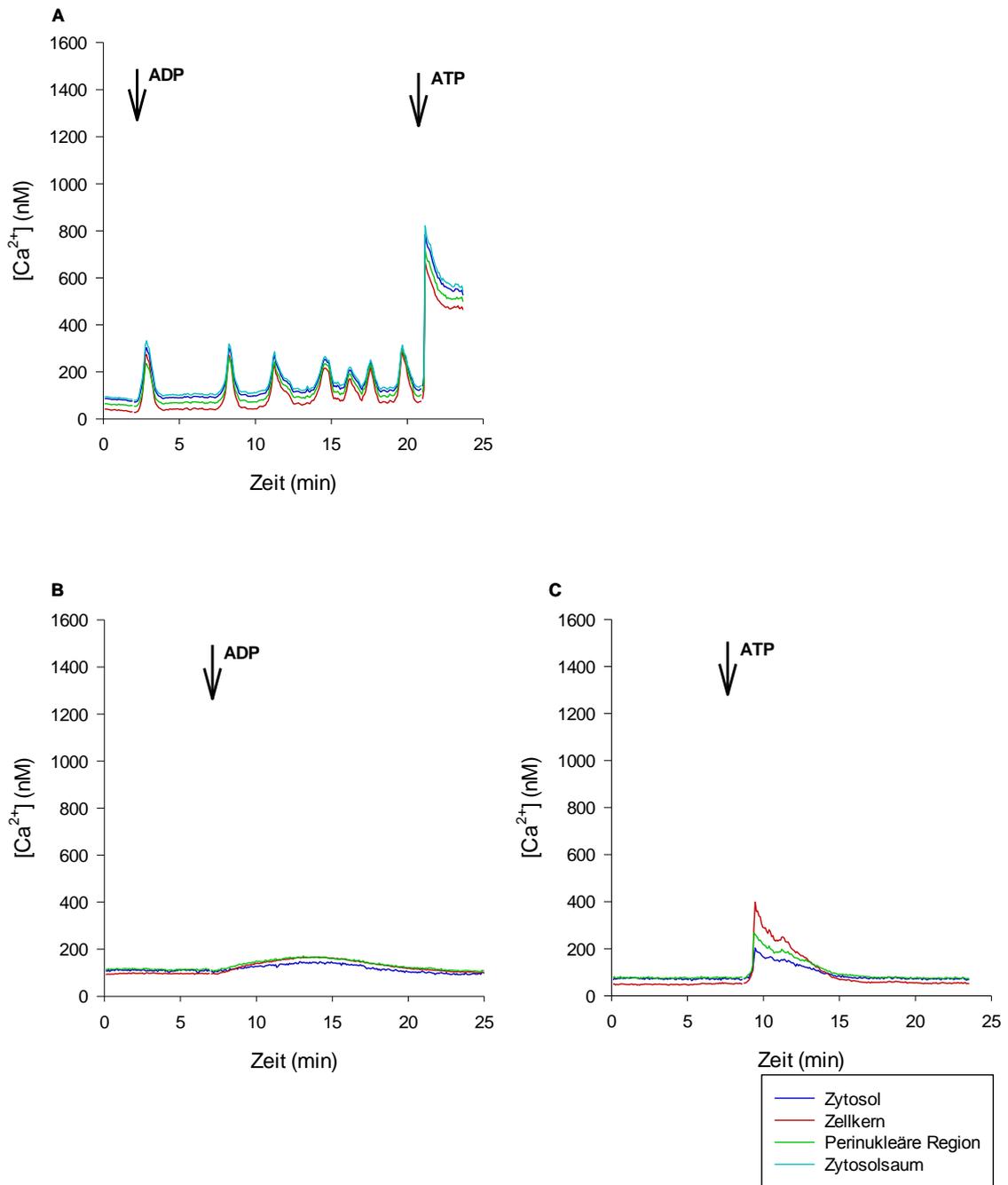
Um Aufschluss darüber zu gewinnen, ob die beobachtete Ca<sup>2+</sup>-Antwort auf ADP den A549-Zellen eigen ist, oder diese sich auch in gesunden Epithel- und Endothel- oder anderen Karzinomzellen findet, wurden Zellen verschiedenster anderer Gewebe ebenfalls diesem Stimulanz ausgesetzt (L2, R3/1, MDCK, MCF-7, MDA-MB, EPMEC, Keratinozyten). Keine der untersuchten Zelllinien zeigte eine vergleichbare Ca<sup>2+</sup>-Antwort auf ADP, wobei die Keratinozyten, MCF-7-Zellen und MDA-MB 231-Zellen ein ansatzweise oszillierendes Reaktionsprofil aufwiesen. In den folgenden drei Abbildungen werden beispielhaft charakteristische Reaktionsprofile der untersuchten Epithel-/Endothelzellen abgebildet.



**Abbildung 36: Exemplarisch ausgewählte Reaktionsprofile der  $[Ca^{2+}]$  in den einzelnen Zellregionen von verschiedenen Epithelzellen nach Stimulation mit ADP, ATP oder beiden P2Y-Agonisten nacheinander.** A und B zeigen Reaktionsprofile von L2-Zellen jeweils zuerst Stimulation mit ADP, dann ATP; C zeigt das einer R3/1-Zelle, stimuliert mit ATP, D das einer MDCK-Zelle die ebenfalls zuerst mit ADP, dann mit ATP stimuliert wurde.



**Abbildung 37: Exemplarisch ausgewählte Reaktionsprofile der  $[Ca^{2+}]$  in den einzelnen Zellregionen von verschiedenen Epithelzellen nach Stimulation mit ADP, ATP oder beiden P2Y-Agonisten nacheinander.** A und B zeigen Reaktionsprofile von MCF-7-Zellen, C und D zeigen Reaktionsprofile von MDA-MB 231 Zellen. A und C jeweils Stimulation mit ADP und B und D mit ATP.



**Abbildung 38: Exemplarisch ausgewählte Reaktionsprofile der  $[Ca^{2+}]$  in den einzelnen Zellregionen von verschiedenen Epithelzellen nach Stimulation mit ADP, ATP oder beiden P2Y-Agonisten nacheinander.** A zeigt das Reaktionsprofil eines Keratinozyts, zuerst Stimulation mit ADP, dann ATP; B und C zeigen HPMEC-Zellen, die in B mit ADP und in C mit ATP stimuliert wurden.

## 5. Diskussion

### 5.1 ADP generiert ein $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in AEZ Typ II.

Im Jahr 1972 führte Geoffrey Burnstock erstmals den Begriff purinerge Transmission ein und stellte damit der bekannten adrenergen und cholinergen Signalübertragung eine nicht-adrenerge und nicht-cholinerge Art der Signaltransduktion gegenüber (Burnstock, 1972). Einige Jahre später wurden erstmals membranständige Purinrezeptoren beschrieben und man wurde der Vielzahl an Geweben gewahr, in denen purinerge Signaltransduktion eine Rolle spielt (Burnstock, 1976). Insbesondere auch die Alveolarepithelien nutzen die purinerge Signaltransduktion, was sie zu einem vielversprechenden Forschungsgebiet zum Verständnis der Entstehung und zur Therapie pulmonaler Erkrankungen macht. Während die purinerge Signaltransduktion durch ATP in Alveolarepithelien bereits seit ihrer Entdeckung Gegenstand der Forschung ist, wurde das *Signalling* durch die Abbauprodukte des Nukleotids bisher weniger gut erforscht. ATP ist nur lokal, also als auto- oder parakriner aber nicht als endokriner Mediator aktiv, da es rasch von ubiquitär vorkommenden Ektonukleotidasen zu seinen Abbauprodukten ADP, AMP und Adenosin abgebaut wird (Robson et al., 2006). Bisher gibt es vergleichsweise wenige Studien dazu, ob und wie ADP als *first messenger* wirkt.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ADP, wie auch ATP, in A549-Zellen ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal auslöst und sich beide Signale in mehreren Aspekten unterscheiden.

### 5.2 In A549-Zellen unterscheiden sich die durch ADP und ATP generierten $\text{Ca}^{2+}$ -Signale

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit ist auffällig, dass sich die durch ADP bzw. ATP ausgelösten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in A549-Zellen bezüglich ihrer Amplitude, ihrer Lokalisation in der Zelle, ihres Profils (Verlauf über die Zeit), der Latenz bis zu ihrem Beginn und ihrer Dauer unterscheiden.

### 5.2.1 Amplitude

Bereits die gemittelten Basalwerte der  $[Ca^{2+}]$  sind für alle Zellregionen zwischen der Versuchsreihe mit ADP und ATP unterschiedlich. Die Basalwerte für die  $[Ca^{2+}]_{nuk/zyt/perinuk}$  sind im Mittel in den Versuchen mit ATP signifikant höher ( $p < 0,05$ ). Ein systematischer Messfehler kann aufgrund der Versuchsanordnung mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da an jedem Versuchstag sowohl Versuche mit ADP als auch mit ATP in zufälliger Reihenfolge durchgeführt wurden. Dies zeigt, dass die mittels Fluoreszenzmikroskopie und SMCI gemessenen absoluten Werte für die  $[Ca^{2+}]_i$  bereits innerhalb einer Zellart ausgesprochen heterogen und ihre Veränderungen in Relation zum Ausgangsniveau zu betrachten sind. Diese Veränderungen werden im Folgenden als relative Anstiege bzw. Abfälle bezeichnet. Die numerischen werden absolute Veränderungen genannt.

Die Auswertung des Standardversuchs mit ADP und ATP zeigt, dass die maximale absolute  $Ca^{2+}$ -Amplitude in allen Zellregionen unter Einfluss von ADP signifikant geringer ist als nach ATP-Stimulation ( $p < 0,05$ ). Dabei steigen die absoluten  $[Ca^{2+}]$  innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe im Zellkern am stärksten und in der perinukleären Region am geringsten an. Der relative Anstieg der  $[Ca^{2+}]$  ist im Zellkern jedoch nach ADP-Intervention mit 377% vom Basalwert höher als der nach ATP-Stimulation mit 350%. Die geringsten relativen Anstiege sind unter beiden Agonisten im gesamten Zytosol zu messen. In der perinukleären Region ist der relative Anstieg der  $[Ca^{2+}]$  jeweils niedriger als im Zellkern, aber höher als im gesamten Zytosol. In den beiden Zellregionen Zytosol<sub>gesamt</sub> und perinukleäre Region sind die relativen Anstiege unter Einfluss von ATP jedoch jeweils deutlich höher als unter ADP (Zytosol<sub>gesamt</sub> 108% vs. 71,3%, perinukleäre Region 191% vs. 125%). Dies bedeutet, dass beide Agonisten ein starkes nukleäres  $Ca^{2+}$ -Signal hervorrufen, während das Signal in den beiden anderen Zellregionen schwächer ausfällt. Der  $Ca^{2+}$ -Anstieg im Zellkern unter ADP übersteigt relativ den unter ATP, während die  $Ca^{2+}$ -Anstiege in den beiden anderen Regionen unter ADP verglichen mit dem Anstieg im Zellkern signifikant geringer sind ( $p < 0,05$ ). Der eigentliche Unterschied besteht also darin, dass unter ADP die Signale der beiden Regionen Zytosol<sub>gesamt</sub> und perinukleäre Region verglichen mit

dem Signal im Zellkern signifikant geringer sind ( $p < 0,05$ ). Im Versuch mit ATP gilt dies nur für die perinukleäre Region.

Dass das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal unter ADP-Einfluss insgesamt von geringerer Amplitude ist als unter ATP-Einfluss, könnte daran liegen, dass ADP ein schwächerer purinerges Agonist ist als ATP (Burnstock, 2007). Dass das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal durch ADP speziell in der perinukleären Region gering ansteigt, lässt sich möglicherweise durch die in dieser Region besonders dicht gelegenen Mitochondrien erklären, die  $\text{Ca}^{2+}$  sequestrieren und bei Anstiegen der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  als Puffer wirken können, um den Zellkern von sehr hohen  $[\text{Ca}^{2+}]$  abzuschirmen. Dadurch, dass die Mitochondrien  $\text{Ca}^{2+}$  aufnehmen, stehen sie dem Fortlauf von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen im Zytosol entgegen (Alonso et al., 2006), was vor allem bei einer Zellstimulation durch geringe Konzentrationen des Agonisten zum Tragen kommen kann (Tinel et al., 1999). Die Mitochondrien könnten also bei insgesamt geringem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  durch den schwächeren Agonisten bzw. seine geringe Konzentration noch in der Lage sein, das  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytoplasma zu sequestrieren bevor es den Zellkern erreicht. Unter ATP erscheint das zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal hingegen derart hoch und prompt, dass die Mitochondrien regelrecht „überschwemmt“ werden und deshalb nicht in der Lage sind, das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal vom Nukleus abzuschirmen. Auch Gerasimenko et al (2004) zeigten, dass hohe Konzentrationen eines Agonisten zu heftigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in den Zellen führen, die die mitochondriale Barriere zum Zellkern durchbrechen (O. Gerasimenko & Gerasimenko, 2004), sodass die Differenz zwischen den Anstiegen der zytosolischen und nukleären  $[\text{Ca}^{2+}]$  marginal ausfällt (al-Mohanna, Caddy, & Bolsover, 1994). Das Gleiche findet sich auch in den in Abbildung 11 dargestellten Ergebnissen wieder. Der Agonist ATP in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  führt zu im Zellkern und im gesamten Zytosol von A549-Zellen nicht signifikant unterschiedlichen Anstiegen der  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

Wenn das durch ADP ausgelöste  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal den Zellkern aufgrund der mitochondrialen Barriere jedoch kaum erreichen kann, scheint die Tatsache, dass der nukleäre Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]$  unter ADP relativ am höchsten ausfällt, dazu zunächst im Widerspruch zu stehen. Leite et al. (2003) stellten in Experimenten mit HepG2 Leberzellen und ATP als purinergem Agonisten aber fest, dass eine submaximale Stimulation einer Zelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale erzeugt, die im Zellkern früher einzusetzen scheinen als im Zytosol, es außerdem eher zu oszillierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen und bei

geringer  $[IP_3]$  zu im Zellkern höheren  $Ca^{2+}$ -Signalen als im Zytosol kommt (Leite et al., 2003). Der Zellkern hatte demnach eine niedrigere Schwelle für  $IP_3$ -induzierte  $Ca^{2+}$ -Signale als das Zytosol, weshalb es bei submaximaler Stimulation zu vornehmlich nukleärem  $Ca^{2+}$ -*Signalling* kam. In kommenden Arbeiten könnte die Fragestellung untersucht werden, ob eine Stimulation der A549-Zellen mit geringeren ATP-Konzentrationen  $Ca^{2+}$ -Signale hervorruft, die mit den durch ADP evozierten  $Ca^{2+}$ -Antworten vergleichbar sind.

Die erreichten Amplituden der  $[Ca^{2+}]$  in den drei Zellregionen sind in den Versuchen dieser Arbeit zwar unterschiedlich, dennoch treten die Anstiege der  $[Ca^{2+}]$  nach der jeweiligen Stimulation mit ADP oder ATP synchron auf und haben den gleichen Profilverlauf. Es ist möglich, dass die Unterschiede der Amplituden allein durch das Verhalten der verwendeten Farbstoffe zustande kommen. Fluoreszenzindikatoren werden durch die Umgebung im jeweiligen Kompartiment, z.B. den pH-Wert des Milieus, beeinflusst und verteilen sich ungleichmäßig auf die Kompartimente der Zelle (Bootman et al., 2000). Unter anderem akkumulieren sie über die Zeit im Nukleoplasma, da sie dort an verschiedene Strukturen binden können. So kommt dort eine stärkere Fluoreszenz zustande. Außerdem werden sie teilweise im ER sequestriert, tragen dort aber nicht zum zytoplasmatischen Signal bei, da die  $[Ca^{2+}]$  im ER zum Zeitpunkt des Signals absinkt. So könnte das zytoplasmatische Signal unter- und das nukleäre überschätzt werden (Bootman et al., 2000). Für Fluo-3 kann beispielsweise eine *per se* höhere Fluoreszenzintensität in nukleoplasmatischen als in zytoplasmatischen Homogenaten gemessen werden (Perez-Terzic et al., 1997). Während Fura-2 in den Epifluoreszenzmikroskopie-Versuchen dieser Arbeit in der perinukleären Region am schwächsten fluoresziert, weist Fluo-4 in den Konfokalmikroskopie-Versuchen in dieser Region die höchste Fluoreszenzintensität auf. Um diesen potentiellen Fluoreszenzfarbstoff-bedingten Messfehler ausschließen und eine Berechnung verlässlicher Absolut-Werte für  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen in einzelnen Zellregionen/-kompartimenten durchführen zu können, müssten alle Farbstoffe gesondert für jedes Zellkompartiment und dabei ohne Überlagerung durch andere Zellkompartimente kalibriert und ihre gleichmäßige Verteilung in der Zelle gewährleistet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Kalibrierung anhand einer zufällig über der Zelle platzierten ROI durchgeführt, nicht aber überlagerungsfrei für jedes einzelne

Zellkompartiment. Es wäre demnach möglich, dass die gemessenen Amplituden der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in allen Kompartimenten zum Beispiel gleich hoch oder in den einzelnen Kompartimenten deutlich von den gemessenen Werten abweichend sind. Im Rahmen dieser Arbeit ermöglichen jedoch die durchgeführten Ratio-Berechnungen, Werte der  $[\text{Ca}^{2+}]$  unabhängig von der Fluoreszenzfarbstoffkonzentration angeben zu können.

Die gemessenen unterschiedlichen Amplituden können sich auch aufgrund der ungleichen Verteilung  $\text{Ca}^{2+}$ -puffernder Systeme in den einzelnen Zellkompartimenten oder aber die Überlagerung von Zellkompartimenten in der zweidimensionalen Darstellung ergeben. Unterschiedliche Pufferkapazitäten für  $\text{Ca}^{2+}$  entstehen z.B. durch eine ungleiche Proteinverteilung zwischen den Zellkompartimenten (Bootman et al., 2000). Überlagerungsartefakte sind zumindest in den Versuchen mit dem Epifluoreszenzmikroskop und den FRET-Versuchen eine unvermeidbare Gegebenheit. Sie können sich sogar während eines Versuches durch Dicken-Änderungen, Bewegungen einer Zelle oder dynamische Verschiebungen ihrer Zellkompartimente verändern (Bootman, Rietdorf, Collins, Walker, & Sanderson, 2013). Die genannten Variablen der Überlagerung von Zellkompartimenten und Pufferung von  $\text{Ca}^{2+}$  sind bei der Arbeit mit lebenden Zellen (*Live-Cell Imaging*) immanent. Eine Methode, die Überlagerungseffekte ausschließt, ist die Konfokalmikroskopie, die aus diesem Grund im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls angewendet wurde. Obwohl mittels Konfokalmikroskopie und Fluo-4 gefärbten Zellen lediglich die Darstellung von Fluoreszenzintensitäten möglich ist, ergeben sich in den Versuchen vergleichbare Verhältnisse, sodass letztendlich davon ausgegangen wird, dass es sich bei den Messwerten um reale Unterschiede der  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden handelt.

### **5.2.2 Lokalisation des $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in der Zelle**

Bezüglich der Lokalisation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals innerhalb der Zelle ist im Epifluoreszenzmikroskopie-Versuch besonders eindrücklich, dass ATP zumindest optisch ein gesamtzelluläres und ADP vornehmlich ein nukleäres  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* auslöst. Daraufhin stellt sich die Frage, ob es sich bei letzterem tatsächlich um ein nukleäres Signal handeln kann und es autonom, also unabhängig von Signalen im Zytosol direkt innerhalb des Zellkerns generiert wird. Um dieser Frage nachzugehen,

sind die Standardversuche konfokalmikroskopisch verifiziert worden. Es zeigt sich dabei, dass das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal tatsächlich die gesamte Zelle erreicht und bis in den Zellkern gelangt. Diese Beobachtung machten Lipp et al (1997) zuvor bereits mittels Konfokalmikroskopie-Versuchen (Lipp et al., 1997). Autonome, vom Zytosol unabhängige nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale können im Rahmen dieser Arbeit jedoch selbst konfokalmikroskopisch nicht dargestellt werden, da die Fluoreszenzintensitäten synchron in allen Zellregionen ansteigen. Die vermeintliche Existenz und Funktion voneinander unabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale im Zytosol und im Zellkern einer Zelle ist seit mehreren Dekaden Gegenstand der Forschung und noch immer herrscht über dieses Thema Uneinigkeit. Es ist bekannt, dass  $\text{Ca}^{2+}$  für die Kontrolle fundamentaler nukleärer Prozesse wie Gentranskription, Zellwachstum und Apoptose unerlässlich ist (O. V. Gerasimenko, Gerasimenko, Tepikin, & Petersen, 1995; Tombes, Simerly, Borisy, & Schatten, 1992). Außerdem geben viele Untersuchungen Hinweise darauf, dass Zellkerne einen eigenen über Plasmamembranrezeptoren gesteuerten Phosphoinositol-Zyklus besitzen und damit darauf, dass sie  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* betreiben können. Es findet sich  $\text{PIP}_2$  in ihren Membranen, verschiedene teils  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig teils NLS-abhängig (*nuclear localisation sequence*, NLS) vom Zytosol in den Zellkern translozierte Isoformen des Enzyms PLC (Ito, Shikano, Kuroda, & Miyazaki, 2008; Okada, Ishimoto, Naito, Hirata, & Yagisawa, 2005),  $\text{IP}_3$ -Kinase (phosphoryliert  $\text{IP}_3$  zu  $\text{IP}_4$ ) und funktionale  $\text{IP}_3$ Rs (Divecha, Banfic, & Irvine, 1991). Letztere finden sich sowohl an der äußeren Membran des NE und sind Richtung Zytoplasma ausgerichtet als auch an der inneren Membran des NE mit Ausrichtung zum Nukleoplasma. Die innere Membran des NE enthält zusätzlich zyklische Adenosindiphosphat-ribose-sensitive (cADPR) Ryanodinrezeptoren (RyRs).  $\text{IP}_3$ Rs und RyRs gelten als die beiden wichtigsten bekannten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle (O. V. Gerasimenko et al., 1995). Der NE könnte also im Zellkern ähnlich wie das ER im Zytosol ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Pool für autonom nukleäres  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* sein (Lui, Kong, Fung, & Lee, 1998). Neben dem NE und seinen tubulären Einstülpungen gelten sehr kleine (50nm),  $\text{IP}_3$ -sensitive nukleoplasmatische Vesikel als weitere potenzielle  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher für ausschließlich im Zellkern auftretende  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (Huh, Huh, Chu, Kweon, & Yoo, 2006; Yoo et al., 2014). Bei der Entstehung von Oszillationen der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuk}}$  ist die Rückkehr der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuk}}$  zu Basalwerten aber genauso wichtig wie ihr Anstieg. Da die Anstiege der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuk}}$  im

Rahmen von Oszillationen also transient sind, muss  $\text{Ca}^{2+}$  den Zellkern verlassen können (O. V. Gerasimenko et al., 1995). Der inneren Membran des NE fehlen aber  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen, um  $\text{Ca}^{2+}$  wieder in den Intermembranraum des NE zu schleusen. Es gibt lediglich Hinweise auf die Existenz eines NCX, der zumindest teilweise an der Umkehrung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals im Zellkern beteiligt ist und dessen Aktivität durch die Bindung eines nukleären Gangliosids (GM1) beschleunigt werden kann (R. W. Ledeen & Wu, 2008). Zusätzlich verlässt  $\text{Ca}^{2+}$  den Zellkern über die NPCs und transiente Öffnungen der PTP und wird im Zytosol von  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen der äußeren NE-Membran zurück in den NE geschleust (R. Ledeen & Wu, 2007; Xie, Wu, Lu, & Ledeen, 2002). Insgesamt kommt ein Teil der mit verschiedenen Zellarten und Methoden durchgeführten Studien zu nukleärem  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* zu dem Ergebnis, dass nukleär-zytosolische Gradienten in der  $[\text{Ca}^{2+}]$  existieren, der andere Teil wiederum kann die Existenz dieser Gradienten nicht belegen (Bootman et al., 2000). Mazzanti et al. (1990) zeigten mit *patch clamp*-Experimenten, dass NPCs nicht frei für Ionen permeabel sind (Mazzanti, DeFelice, Cohn, & Malter, 1990). Da aber die *patch clamp*-Methode späteren Erkenntnissen zu Folge zu Deformierung der Membranen führt, lässt diese keine verlässlichen Aussagen zu (Bootman et al., 2009). Dagegen zeigten Experimente mit der *Hourglass* (Sanduhr)-Methode, die die Membran unbeeinflusst lässt, dass NPC konstitutiv für Ionen permeabel sind und daher zwischen der zytosolischen und nukleären  $[\text{Ca}^{2+}]$  ein Ausgleich durch Diffusion stattfindet (Danker, Shahin, Schlune, Schafer, & Oberleithner, 2001); abhängig von der Dichte der NPCs kann dies mehr oder weniger lange dauern (Wang & Clapham, 1999). So wird dem NE teilweise allenfalls eine den Konzentrationsausgleich verzögernde Wirkung zugesprochen, sodass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg im Zellkern geringfügig später zu erwarten ist als im Zytosol (Eder & Bading, 2007; Lui, Kong, Fung, et al., 1998). Das vermeintlich spätere Auftreten nukleärer Signale kann aufgrund der zeitlichen Auflösung der Versuche dieser Arbeit hier weder belegt noch widerlegt werden. Ergebnisse weiterer Autoren zeigten, dass der NE zwar bei  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  unter 300nM durchlässig für  $\text{Ca}^{2+}$  ist, bei Konzentrationen darüber hinaus aber eine Barriere darstellt und hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale aus dem Zytosol nur in abgemilderter Form das Innere des Zellkerns erreichen (al-Mohanna et al., 1994). Diese Ergebnisse können jedoch nicht konsequent reproduziert werden und sind aktuelleren Arbeiten nach Folge eines methodischen Fehlers, bei dem keine unabhängige Kalibrierung der

Fluoreszenzindikatoren für das jeweilige Zellkompartiment stattfand und Unterschiede in ihrer Fluoreszenzintensität in den verschiedenen Zellkompartimenten missinterpretiert wurden (Bootman et al., 2009). Das im Standardversuch der vorliegenden Arbeit verwendete Fura-2 reichert sich nicht gleichmäßig im Nukleoplasma sondern im NE und um den Nukleus herum an (O. V. Gerasimenko et al., 1995). Dies kann die Messwerte für  $[Ca^{2+}]_{\text{nuk}}$  in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verfälschen. Dextran-gebundene fluoreszierende  $Ca^{2+}$ -Indikatoren verteilen sich dagegen gleichmäßig im Nukleoplasma einer Zelle und eignen sich daher besser die  $[Ca^{2+}]_{\text{nuk}}$  zu messen. Verlässlichere Aussagen zum Auftreten und zu den Amplituden nukleoplasmatischer Signale brächten demnach in Zukunft Versuche, bei denen das Fura-2 mit Dextran gekoppelt wird. So konnten Gerasimenko et al (1995) mit Hilfe Dextran-gekoppelter Fluoreszenzfarbstoffe eine hohe Durchlässigkeit des NE für  $Ca^{2+}$  demonstrieren, da Veränderungen der zytoplasmatischen bzw. externen  $[Ca^{2+}]$  zu ähnlichen Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_{\text{nuk}}$  führten.

Die Leitfähigkeit der NPCs wird durch die Anwesenheit verschiedener Moleküle/Stoffe, wie  $Ca^{2+}$  und ATP beeinflusst (Assandri & Mazzanti, 1997). So sollen die NPCs zu vom  $Ca^{2+}$ -Gehalt des NE abhängigen Konformationsänderungen bis hin zum Verschluss durch einen zentralen „Stopfen“ fähig sein (Perez-Terzic, Pyle, Jaconi, Stehno-Bittel, & Clapham, 1996; Stoffler, Goldie, Feja, & Aebi, 1999). O'Brien et al. (2007) beschrieben allerdings, dass in Ihrer Arbeit die Leitfähigkeit der NPCs vom zytoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Gehalt und somit direkt von  $IP_3$ -induzierten  $Ca^{2+}$ -Signalen abhängig war (O'Brien, Gomes, Sehgal, & Nathanson, 2007). Gerasimenko und Gerasimenko (2004) kamen durch ihre Arbeit allerdings zu dem Schluss, es gäbe dennoch zu jeder Zeit genügend offene NPCs für einen Austausch kleiner Ionen mit dem Zytosol, da Änderungen der zytosolischen bzw. der  $[Ca^{2+}]$  im den Zellkern umgebenden Medium regelhaft und schnell durch Diffusion zu korrespondierenden Änderungen der  $[Ca^{2+}]_{\text{nuk}}$  führten (O. Gerasimenko & Gerasimenko, 2004).

Leiteten sich  $Ca^{2+}$ -Signale einfach durch Diffusion in den Zellkern fort, ließe sich schlussfolgern, dass der o.g. nukleäre Phosphoinositol-Zyklus entweder inaktiv, zusätzlich zum zytosolischen Phosphoinositol-Zyklus oder nur in besonderen Situationen aktiv ist. Für die Aktivität des nukleären Phosphoinositol-Zyklus und die Fähigkeit des Zellkerns bei Zellstimulation von extrazellulär  $IP_3$ -abhängig eigene  $Ca^{2+}$ -Signale

generieren zu können spricht, dass IP<sub>3</sub> klein genug ist, um die NPCs überwinden zu können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich zytosolische und nukleäre Ca<sup>2+</sup>-Signale durch gezielte IP<sub>3</sub>- bzw. Heparin-Injektionen getrennt voneinander auslösen und inhibieren lassen (Lui, Kong, Fung, et al., 1998). Heparin fungiert dabei im jeweiligen Kompartiment als Inhibitor für IP<sub>3</sub>R.

Gegen eigens nukleäre IP<sub>3</sub>-abhängige Ca<sup>2+</sup>-Signale sprechen Studien anderer Arbeitsgruppen, die Ca<sup>2+</sup>-Signale in beiden Kompartimenten durch zytosolische IP<sub>3</sub>-Injektionen auslösen und durch gleichzeitige Heparin-Injektionen verhindern konnten (Hennager, Welsh, & DeLisle, 1995). Dabei wurden durch das Heparin nur zytosolische IP<sub>3</sub>Rs blockiert, während die nukleären funktional blieben, was später mit in den Nukleus eingespritztem IP<sub>3</sub> getestet wurde. Die Ausbreitung des Ca<sup>2+</sup>-Signals erfolgte hier offenbar durch Diffusion vom Zytosol in den Zellkern. Die nukleären IP<sub>3</sub>Rs reagierten nicht auf das IP<sub>3</sub>-Signal aus dem Zytosol oder aber IP<sub>3</sub> konnte in diesem Fall den NE doch nicht überwinden. Shirakawa und Myazaki (1996) konnten in diesem Zusammenhang beobachten, dass Ca<sup>2+</sup>-Signale trotz direkter Stimulation der IP<sub>3</sub>Rs der inneren NE-Membran durch in den Nukleus eingespritztes IP<sub>3</sub> im Zytosol entspringen und von dort in den Zellkern gelangen (Shirakawa & Miyazaki, 1996). Sie beschreiben, dass IP<sub>3</sub> den Nukleus verlassen haben muss, um vorzugsweise zytosolische IP<sub>3</sub>Rs zu erreichen. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf zellspezifischen, oder aber auf sich durch die aktuelle Stoffwechsellage der Zelle ergebenden Unterschieden der Leitfähigkeit des NE beruhen. Verschiedene Autoren, die sich mit nukleärem Ca<sup>2+</sup>-*Signalling* befassen, beschreiben immer wieder oszillierende Ca<sup>2+</sup>-Signale in unterschiedlichen Zelltypen nach Agonisten-Stimulation. Wie in der vorliegenden Arbeit beobachteten auch sie immer zeitgleich auftretende Oszillationen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>zyt</sub> (Alonso et al., 2006). Insgesamt wird deutlich, wie komplex die Darstellung nukleärer Ca<sup>2+</sup>-Signale, ihres Ursprungs und ihrer Autonomie ist.

Es ist fraglich, wie ein von außen auf die Zelle treffendes Signal, das im Zytosol eine prompte Reaktion auslöst, parallel, aber auf anderem Wege, derart schnell in den Zellkern übermittelt werden kann, dass hier dieselbe prompte Reaktion zu beobachten ist. Es müsste dazu einen Signalweg zwischen Plasmamembran(-rezeptoren) der Zelle und ihrem Zellkern geben, der eine schnellere Signalübermittlung erlaubt, als die

Signalübermittlung von der Außenseite der Plasmamembran auf ihre Innenseite dauert. Es kommen hierfür verschiedene Signalwege infrage:

1. Der *first messenger* (z.B. ATP o. ADP) bewirkt im Zytosol und im Zellkern zeitgleich aber unabhängig voneinander einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]$ . Eine Eigenschaft extrazellulärer Signalmoleküle ist aber, dass sie Plasmamembranen nicht überwinden können. Das heißt, der *first messenger* selbst kann nicht als solcher am NE wirken. Es wird ein *second messenger* benötigt. An Plasmamembranen entsteht als erster *second messenger* unter anderem  $IP_3$ .
2. Um zeitgleich im Zytosol und im Zellkern ein  $Ca^{2+}$ -Signal hervorzurufen, müsste  $IP_3$  schneller in den Zellkern gelangen als es im Zytosol ein  $Ca^{2+}$ -Signal auslöst.  $IP_3$  hat intrazellulär im Vergleich zu  $Ca^{2+}$  einen größeren Diffusionskoeffizienten ( $283\mu m$ ) und wird weniger gepuffert, sodass sich  $IP_3$  schneller verteilt und weitere Strecken innerhalb des Zytosols der Zelle zurücklegen kann (Allbritton, Meyer, & Stryer, 1992). Mehrere Autoren halten es für möglich, dass an der Plasmamembran entstandenes  $IP_3$  fast zeitgleich am ER des Zytosols und dem NE des Zellkerns  $Ca^{2+}$ -Signale auslösen kann (Humbert, Matter, Artault, Koppler, & Malviya, 1996; Lui, Kong, Fung, et al., 1998).
3. Der NE gilt als Teil des ER. Es ist umstritten, ob  $IP_3$  den NE ungehindert überwinden kann (Hennager et al., 1995). Könnte  $IP_3$  den NE nicht überwinden, wäre denkbar, dass an das ER bindendes  $IP_3$  nicht nur zur Öffnung der  $IP_3Rs$  am ER sondern auch zur Öffnung der  $IP_3Rs$  an der inneren NE-Membran führt.
4. Bei im Zellkern vorhandener PLC könnte  $IP_3$  aber auch zeitgleich an der Plasmamembran und der inneren Membran des NE entstehen. Dann müsste aber die nukleäre PLC schneller arbeiten oder zeitgleich mit der PLC der Plasmamembran aktiviert werden. Es bräuchte ein weiteres Signalmolekül, welches das an der Plasmamembran auftreffende Signal schnell an die PLC des Zellkerns weiterleitet und sie aktiviert. Und auch hier müsste dies geschehen, bevor das zytosolische  $Ca^{2+}$ -Signal einsetzt.
5. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die als nukleär angesehenen  $Ca^{2+}$ -Signale *de facto* am ER und statt im Zellkern nur in unmittelbarer Nähe zu diesem als sogenannte ‚perinukleäre Puffs‘ entspringen (Bootman & Berridge, 1995;

Bootman et al., 2009; Lipp et al., 1997; Shirakawa & Miyazaki, 1996). Die nur geringe Distanz zu den NPCs des Zellkerns können sie per Diffusion überwinden. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffs an den  $\text{IP}_3\text{Rs}$  des ER würden auf diese Weise ein nukleär entstandenes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal „vortäuschen“. Da wie beschrieben die Pufferkapazität für  $\text{Ca}^{2+}$  im Zellkern weniger hoch ist als im Zytosol, er selbst nur wenig effektive Möglichkeiten der aktiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Elimination hat und kein  $\text{Ca}^{2+}$  sequestriert, breitet sich ein einmal in den Zellkern gelangtes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal über eine weitere Strecke aus, als es dies im Zytosol tut. Je höher die Frequenz der auftretenden *Puffs*, desto höher ist das nukleäre Signal.

6. Denkbar wären auch im Zellkern zuerst entspringende  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, die sich in das Zytosol fortpflanzen um dort im Sinne eines CICR die korrespondierenden zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale hervorzurufen. Für im Zellkern entspringende  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale sprechen mehrere Studien mit unterschiedlichen Zellen, in denen jeweils im Zellkern früher als im Zytosol einsetzende  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale gemessen wurden (Fox, Burgstahler, & Nathanson, 1997; Lui, Kong, Fung, et al., 1998; Przywara, Bhave, Bhave, Wakade, & Wakade, 1991). Gründe für die im Zellkern früher einsetzenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale sind unter anderem der genannte für  $\text{IP}_3$  (oder cADPR) sensiblere nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher oder die geringere nukleäre Pufferkapazität für  $\text{Ca}^{2+}$  (Allbritton, Oancea, Kuhn, & Meyer, 1994; Borst & Sakmann, 1996; Fox et al., 1997; Lui, Kong, Fung, et al., 1998). Alternativ kommt eine methodisch bedingte Fehlinterpretation infrage: die genannten, im Zellkern früher einsetzenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wurden konfokalmikroskopisch observiert. Das bedeutet, dass zu einem Zeitpunkt immer nur eine Ebene der dreidimensionalen Zelle betrachtet wurde. Nun könnten aber  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale diese Ebene von darüber oder darunter erreicht haben. So käme der Eindruck von im Zellkern entstandenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen zustande (Bootman et al., 2000).

Auch wenn beide Kompartimente, Zytosol und Zellkern, getrennt voneinander  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale generieren können, so bleibt doch die Frage, warum in den Versuchen dieser Arbeit in beiden Kompartimenten zur selben Zeit Signale gleicher Morphologie, ausgelöst durch denselben *second messenger* ( $\text{IP}_3$ ) entstehen sollten. Die perinukleären *Puffs* als Quelle der Entstehung „nukleärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale“ scheinen schließlich auch aufgrund der Synchronität der Signale im Zytosol und Zellkern am plausibelsten. Wären

nukleäres und zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* voneinander unabhängig, wären die NPCs für  $\text{Ca}^{2+}$  Einbahnstraßen heraus aus dem Zellkern. Sind sie jedoch in beide Richtungen für  $\text{Ca}^{2+}$  passierbar, wäre ein strikt getrenntes  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* in Nukleus und Zytoplasma gar nicht möglich. Die Ergebnisse dieser Arbeit ergeben auch nicht, dass die Höhe der  $[\text{Ca}^{2+}]$  im Zellkern wie bei al-Mohanna et al. (1994) begrenzt wäre, also wie bei ihnen immer unter 300nM bliebe und sich die NPCs bei höheren Konzentrationen verschlössen. Es werden im Rahmen dieser Arbeit höhere und sehr heterogene Amplituden der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuk}}$  beobachtet (im ADP Versuch rangieren die Werte der Amplituden der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuk}}$  zwischen 294,5 nM und 767 nM, im ATP Versuch zwischen 485,2 nM und 1972 nM). Das heißt, dass, selbst wenn getrennte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in Zellkern und Zytoplasma generiert werden, dies vermutlich nicht der Begrenzung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuk}}$  dient. Unter „physiologischen“ Bedingungen, unter denen Agonisten-stimulierte Plasmamembran-Rezeptor-kontrollierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in einem der Kompartimente nicht künstlich verhindert werden, entstehen also immer zytosolische oder relativ zeitgleich zytosolische **und** nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale. Und obwohl der Nukleus über alle Teile der  $\text{IP}_3$ -Maschinerie verfügt, kommt es eventuell nur unter besonderen Bedingungen vor, dass im Zellkern selbst  $\text{IP}_3$  entsteht und über  $\text{IP}_3$ Rs der inneren NE-Membran des nukleoplasmatischen Retikulums oder der nukleoplasmatischen Vesikel ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal generiert wird. So scheinen bestimmte *first messenger* bevorzugt zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auszulösen, die sich je nach ihrer Lokalisation in den Zellkern fortpflanzen (Lipp et al., 1997); dies gilt unter anderem auch für Nukleotide, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wirken. Andere Messenger, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Hormone (Insulin), lösen über eine Rezeptorinternalisierung und nukleäre Translokation bevorzugt nukleäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale aus (Bootman et al., 2009; Gomes et al., 2008; Visnjic & Banfic, 2007), indem sie die nukleäre PLC über Wachstumsfaktor-Rezeptor-Stimulation oder Insulin-Rezeptor-Stimulation aktivieren. Die zytosolische Isoform des Enzyms PLC dagegen wird durch G-Proteine aktiviert (Rodrigues, Gomes, Andrade, Leite, & Nathanson, 2008; Visnjic & Banfic, 2007).

Unterschiedliche biologische Funktionen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in Zytoplasma und Nukleus, bedeuten nicht, dass sich die Signale unbedingt gänzlich voneinander unterscheiden oder nukleäre Signale nukleäre Prozesse steuern müssten. Dass die Signale im Zytoplasma

andere verstanden werden als im Nukleus, liegt somit vermutlich nicht am  $\text{Ca}^{2+}$ -Code selbst, sondern an der unterschiedlichen Dekodierung. Letztere führt zu den unterschiedlichen *Downstream* Effekten. Während diese aller Wahrscheinlichkeit nach im Zytosol eher kurzfristige und zellspezifische Effekte wie z.B. Kontraktion (Muskelzellen), Sekretion (Epithelien, Drüsen) und Ausschüttung von Neurotransmittern (Neurone) darstellen (Gatti & Zunino, 2005; Rodrigues et al., 2007), sind es im Zellkern eher langfristige Effekte wie die Veränderung der Transkription von Genen (Eder & Bading, 2007).

Ein weiterer Faktor, der die Lokalisation und Morphologie von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in der Zelle beeinflussen kann, ist die Verteilung der  $\text{IP}_3\text{R}$  und ihren Subtypen (Kim, Son, Subedi, Kim do, & Woo, 2010). Beide führen zu streng lokalen Modulationen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen (Hirose, Kadowaki, Tanabe, Takeshima, & Iino, 1999; Mikoshiba, 2007; Miyakawa et al., 1999). In Regionen der Zelle, in denen es keine  $\text{IP}_3\text{Rs}$  gibt, gelangt  $\text{Ca}^{2+}$  ausschließlich über Diffusion, wobei verschiedene intrazelluläre Puffer das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal aufhalten und es begrenzen können.  $\text{IP}_3\text{Rs}$  vom Typ III sind weniger empfindlich für  $\text{IP}_3$ -Stimulation und es kommt seltener zu Oszillationen, dagegen sind Typ II  $\text{IP}_3\text{Rs}$  hoch empfindlich für  $\text{IP}_3$ -Stimulationen und es treten gehäuft oszillierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auf. In zukünftigen Untersuchungen könnte die Bestimmung der in A549-Zellen vorkommenden  $\text{IP}_3\text{R}$  Subtypen und ihrer Verteilung innerhalb der Zelle bei der Lokalisation des Ursprungs der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale hilfreich sein.

### 5.2.3 Profil

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit löst eine [ATP] von  $10\mu\text{M}$  im extrazellulären Medium in über 90% der A549-Zellen einen initialen steilen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]$  in allen Zellregionen aus. Darauf folgt ein allmählicher „Schulter-förmiger“ Abfall der  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Dieser Abfall ist nicht „glatt“, sondern wird von  $\text{Ca}^{2+}$ -Spikes überlagert. Das heißt, die  $[\text{Ca}^{2+}]$  steigt und fällt immer wieder minimal während sie aber insgesamt absinkt. Diese minimalen Anstiege und Abfälle der  $[\text{Ca}^{2+}]$  werden im Folgenden Spike-Überlagerungen genannt.

$50\mu\text{M}$  [ADP] führen in etwa 80% der A549-Zellen zu oszillierenden Anstiegen der  $[\text{Ca}^{2+}]$  in allen Zellregionen, wobei die  $[\text{Ca}^{2+}]$  zwischen den Anstiegen immer wieder

bis auf die Basalwerte abfällt. Der Abfall geschieht dabei ohne Verzögerung, sodass sich keine „Schulterform“ ergibt. Erstmals wurden  $[Ca^{2+}]$ -Oszillationen dieser Art im Jahr 1986 in hormonell stimulierten Ratten-Hepatozyten beschrieben und seither in vielen anderen Zellarten beobachtet (Woods, Cuthbertson, & Cobbold, 1986). Evans et al. (1999) beschreiben, dass ATP konzentrationsabhängig verschiedene  $Ca^{2+}$ -Profile in Atemwegsepithel-Zellen hervorruft (Evans & Sanderson, 1999). Dieses Phänomen konnte in den Versuchen unserer Arbeitsgruppe ebenfalls beobachtet werden (unpublizierte Daten). Initial kann demnach immer ein transients, in seinem Ausmaß von der  $[ATP]$  abhängiger Anstieg der  $[Ca^{2+}]$  beobachtet werden.  $[ATP]$  zwischen 0,5 und  $10\mu M$  lösen periodische  $Ca^{2+}$ -Oszillationen aus, wie sie im Rahmen dieser Arbeit in A549-Zellen nach einer Stimulation mit ADP  $50\mu M$  auftreten. Höhere  $[ATP]$  (ab 10 bis  $100\mu M$ ) rufen dagegen  $Ca^{2+}$ -Profile ohne Oszillationen hervor, wie sie in dieser Arbeit in A549-Zellen bei einer  $[ATP]$  von  $10\mu M$  zu beobachten sind. Wenn nun ADP in den Versuchen dieser Arbeit sukzessive enzymatisch zu ATP aufgebaut würde, entstünden immer wieder geringe Konzentrationen von ATP. Blieben diese, wie bei Evans et al. beschrieben, unterhalb eines bestimmten Schwellenwertes (bei Evans et al.  $10\mu M$ ), würden oszillierende Verläufe der  $[Ca^{2+}]$  in den Zellen hervorgerufen werden. Die Unterschiede im Profil der  $Ca^{2+}$ -Antworten auf ADP- und ATP-Stimulation entstünden demnach nicht dadurch, dass sie durch zwei verschiedene Agonisten hervorgerufen werden, sondern durch die Wirkungsweise unterschiedlicher Konzentrationen eines einzigen Agonisten (ATP).

Sogenannte Ektonukleosid Diphosphokinasen (E-NDPK) oder extrazelluläre Adenylatkinasen (E-AK) sind zum Aufbau von ATP aus ADP in der Lage. Diese Enzyme sind für Atemwegsepithelien nachgewiesen und werden von den Zellen entweder aktiv vom Zellinneren in das Zellmedium transportiert oder als vormals der Plasmamembran assoziierte Enzyme in das extrazelluläre Medium „abgeschilfert“ (Donaldson et al., 2002). Sie sind durch ihre senkende oder steigernde Wirkung auf die Konzentrationen extrazellulärer Purinnukleotide eine wichtige Komponente purinerger Signaltransduktion. Dabei ist es wahrscheinlich, dass ihre Aktivität in verschiedenen, sowohl gesunden als auch pathologisch veränderten Geweben unterschiedlich reguliert ist. Gleiches trifft für die zeitgleich aktiven Ektonukleotidasen (E-NTPase) zu, die ATP zu ADP, AMP und Adenosin abbauen. Unter welchen Bedingungen die Aktivität auf-

bzw. abbauender Enzyme überwiegt, ist im *in vitro*-Versuch schwer nachzuvollziehen. In gesundem Gewebe wird die extrazelluläre [ATP] ( $[ATP]_e$ ) durch oben genannte Enzyme in engen Grenzen gehalten (Picher, Burch, Hirsh, Spychala, & Boucher, 2003), da ATP in hohen Konzentrationen als parakriner purinerger Entzündungsmediator und proinflammatorisches Gefahren-Signal wirken kann (Bours, Swennen, Di Virgilio, Cronstein, & Dagnelie, 2006). Geschädigte (Atemwegsepithel-) Zellen setzen nämlich vergleichsweise mehr ATP frei als gesunde. Unter anderem vermittelt ATP (über P2X<sub>7</sub>R) einen K<sup>+</sup>-Verlust nach extrazellulär, einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zelle, die Produktion von IL-1 $\beta$ , die Aktivierung von Caspase-1, die Entstehung von nicht-selektiv permeablen Poren in der Plasmamembran der Zelle und die Apoptose (Riteau et al., 2010).

Um herauszufinden, ob die Entstehung oben beschriebener Profile auf eine Stimulation mit unterschiedlicher Konzentration des Agonisten (hier ATP) zurückzuführen ist, böten sich Versuche in absteigender ATP-Konzentration an. Das Ausmaß des initialen transienten Anstiegs der  $[Ca^{2+}]$  und auch die zum Teil folgenden Oszillationen scheinen außerdem, wie auch bei Evans und Sanderson (1999) beschrieben, von der individuellen Sensitivität der Zelle für die Agonisten und der Aktivität o.g. Enzyme abhängig zu sein (Evans & Sanderson, 1999), sodass zukünftig auch Versuche sinnvoll sein können, in denen die Expression bzw. die Aktivität der ATP auf- und abbauenden Enzyme herauf- bzw. herunterreguliert wird.

Der schulterförmige Abfall der  $[Ca^{2+}]$  und die Spike-Überlagerungen der Profile werden später im Zuge der Diskussion der Quellen für das Ca<sup>2+</sup>-*Signalling* diskutiert.

#### **5.2.4 Latenz und Dauer**

Die verlängerte Zeit bis zum Beginn des Ca<sup>2+</sup>-*Signallings* und dessen zum Teil sehr lange Dauer nach ADP-Stimulation könnten durch oben beschriebene Agonistenschwäche, den Mechanismus der enzymatischen Konversion des ADPs zu ATP und/oder das Mitwirken der Mitochondrien am *Signalling* begründet sein. Die enzymatische Konversion des ADPs zu ATP braucht Zeit; so könnte die Verzögerung bis zum Beginn der Reaktion erklärt werden. Eine immer wieder eintretende Sättigung der Enzyme mit ADP würde die prolongierte Reaktionsdauer erklären können. Erst

wenn das Enzym ADP zu ATP umgewandelt hätte, könnte es ein neues ADP-Molekül umwandeln. Die Agonistenschwäche wäre zumindest eine Erklärung für die Verzögerung bis zum Reaktionsbeginn, da ADP den P2YR weniger gut zu aktivieren vermag als ATP. Die Beteiligung der Mitochondrien wiederum kann eine Begründung für die lange Reaktionsdauer sein. Obwohl in den FRET-Versuchen dieser Arbeit augenscheinlich nur eine geringe Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER gezeigt werden konnte, nehmen die Mitochondrien initial einen Teil des aus dem ER freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$  auf und geben es bei absinkender  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  wieder ab. Das allein und das dadurch ausgelöste positive Feedback auf die  $\text{IP}_3\text{Rs}$  prolongiert das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Um die beschriebenen Mechanismen und ihre tatsächliche Rolle für die Verzögerung bis zum Reaktionsbeginn und das prolongierte Signal unter Stimulation mit ADP weiter untersuchen zu können, böten sich wiederum Versuche mit geringeren  $[\text{ATP}]$ , Zusatz von E-NDPKs/E-AKs oder Hemmstoffen dieser Enzyme oder Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme durch die Mitochondrien an.

### **5.3 Wie wird das $\text{Ca}^{2+}$ -Signal durch ADP generiert?**

#### **5.3.1 Purinrezeptoren**

Zur Klärung der Frage, welche Purinrezeptoren an der Vermittlung des  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signallings* in A549-Zellen nach ADP und ATP-Stimulation beteiligt seien, werden im Rahmen dieser Arbeit die Experimente mittels Fluoreszenzmikroskopie, die die Visualisierung und Quantifizierung der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort auf die Stimulation mit unterschiedlichen Purin-Derivaten ermöglichen, mit zellbiologischen Methoden, wie der PCR, des Western Blot und der Transfektion mit siRNA, kombiniert. Die vorliegende Literatur zur Charakterisierung der bekannten Purinrezeptoren legt nahe, dass die unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten auf die Stimulation von A549-Zellen mit ATP und ADP über verschiedene Purinrezeptoren vermittelt werden (Burnstock, 2007; von Kugelgen & Hoffmann, 2016). Außerdem liegt die Vermutung nahe, dass sie über den jeweils für das Purinnukleotid spezifischen Rezeptor vermittelt werden. P1-Rezeptoren und P2X-Rezeptoren kommen nicht in Frage. P1-Rezeptoren nicht, da der alleinige Agonist am P1-Rezeptor Adenosin ist, A549-Zellen aber auf Adenosin keinerlei Reaktion zeigen (eigene unpublizierte Beobachtungen und (Clunes & Kemp, 1996).

P2X-Rezeptoren nicht, da P2XR-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten auf den Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  angewiesen sind. In A549-Zellen sind aber auch in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten generierbar, die sich quantitativ nicht signifikant von den  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Milieu unterscheiden. Das deutet darauf hin, dass nach Stimulation von A549-Zellen mit ADP oder ATP keine P2X-Rezeptoren am  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal beteiligt sind. Demnach müssen die beobachteten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in A549-Zellen über P2YR ausgelöst werden. ATP ist neben UTP einer der potentesten natürlichen Agonisten am P2Y<sub>2</sub>R und darüber hinaus Agonist am P2Y<sub>6</sub>R. ADP dagegen ist der potenteste natürliche Agonist am P2Y<sub>1</sub>R, dem P2Y<sub>12</sub>R und P2Y<sub>13</sub>R. Wird die Translation der P2Y<sub>1</sub>R-mRNA durch die Transfektion mit siRNA verhindert, hat dies keine Auswirkungen auf das durch ADP ausgelöste  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in A549-Zellen. In diesem Zusammenhang konnten Schafer et al. (2003) zeigen, dass die Stimulation von A549-Zellen mit ADP und ATP die Zellproliferation *in vitro* gleichermaßen bis zu dreifach erhöht (Schafer et al., 2003). P2Y<sub>1</sub>R-selektive synthetische Agonisten, wie 2-MeSADP oder Adenosine-5'-( $\alpha$ -thio)-triphosphate (ATP $\alpha$ S) hatten dagegen keinen Effekt auf die Proliferation. Außerdem ließ sich die Proliferation nicht durch die Präinkubation der Zellen mit spezifischen Antagonisten des P2Y<sub>1</sub>R (ARL-67156, A3P5P) mindern. Zusammen weisen die Ergebnisse darauf hin, dass der P2Y<sub>1</sub>R weder für das in dieser Arbeit durch ADP ausgelöste  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalling noch für die von Schafer et al. beobachtete durch ADP gesteigerte Proliferation von A549-Zellen eine Rolle spielt. Auch Schafer et al. hielten eine Konversion von ADP zu ATP durch Ektonukleosid-Diphosphokinasen für eine mögliche Erklärung desselben Effektes der beiden Nukleotide (Buxton, Kaiser, Oxhorn, & Cheek, 2001; Donaldson et al., 2002; Schafer et al., 2003).

Die potentesten Agonisten am P2Y<sub>2</sub>R sind ATP und UTP gleichermaßen. ADP ist ebenfalls Agonist am P2Y<sub>2</sub>R, wenn auch laut Literatur ein schwächerer als ATP und UTP (Burnstock, 2007). Wird P2Y<sub>2</sub>R in A549-Zellen durch siRNA-Transfektion herunterreguliert, wird durch ADP und ATP kein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal mehr ausgelöst.

Die rtPCR zeigt, dass A549-Zellen mRNA für P2Y<sub>1</sub>R, P2Y<sub>2</sub>R, und P2Y<sub>6</sub>R synthetisieren. Im Western Blot lassen sich Rezeptorproteine für die Rezeptoren P2Y<sub>1</sub>R, P2Y<sub>2</sub>R und P2Y<sub>6</sub>R finden. Aus diesen Resultaten lässt sich in der Zusammenschau schlussfolgern, dass die durch ATP und ADP erzeugten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten trotz ihrer

Verschiedenheit möglicherweise beide über P2Y<sub>2</sub>R vermittelt werden. Wird also angenommen, dass beide Agonisten über P2Y<sub>2</sub>R wirken, ADP aber laut der Literatur ein schwächerer Agonist an diesem Rezeptor ist, könnte allein diese Tatsache die unterschiedlichen Signale erklären. Andererseits stützt das Ergebnis, dass beide Ca<sup>2+</sup>-Antworten über P2Y<sub>2</sub>R vermittelt werden, ebenfalls die Theorie, dass ADP im Extrazellularraum zu ATP aufgebaut wird. Das aufgebaute ATP würde dann über den P2Y<sub>2</sub>R wirken und aufgrund seiner vermeintlich „geringen“ Konzentration ein anderes Ca<sup>2+</sup>-Antwort-Profil hervorrufen.

### **5.3.2 Quellen für das Ca<sup>2+</sup>-Signalling**

#### **5.3.2.1 Extrazellularraum**

Werden A549-Zellen in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium der Stimulation mit ADP oder ATP ausgesetzt, erreichen die Amplituden der [Ca<sup>2+</sup>] in allen Zellregionen der Zellen beider Interventionsgruppen numerisch niedrigere Ca<sup>2+</sup>-Werte als in Ca<sup>2+</sup>-haltigem Medium. Die relativen Anstiege der [Ca<sup>2+</sup>] (Anstieg vom Basalwert) sind jedoch im Vergleich höher. Die beschriebenen Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Es wird demnach davon ausgegangen, dass die erreichten maximalen Amplituden der Ca<sup>2+</sup>-Antworten weder nach ADP- noch nach ATP-Stimulation signifikant vom Ca<sup>2+</sup>-Gehalt des extrazellulären Mediums abhängig sind. Darüber hinaus ändern sich unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen die Verhältnisse der Anstiege der [Ca<sup>2+</sup>] in den drei Zellregionen nicht. Das heißt, nach wie vor steigt die [Ca<sup>2+</sup>] im Zellkern am meisten an, während sie im Zytosol am geringsten ansteigt.

In Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium verkürzt sich die Reaktionsdauer sowohl nach ADP- als auch nach ATP-Stimulation signifikant ( $p < 0,05$ ). Es fehlen des Weiteren unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen und ATP-Stimulation die Spike-Überlagerungen (Abflachung des schulterförmigen Abfalls) und es verringert sich die Oszillationsfrequenz des Ca<sup>2+</sup>-Profils im Versuch mit ADP.

Jeder Stimulation mit einem Agonisten geht in den Versuchen dieser Arbeit eine Aufnahmeperiode von etwa fünf Minuten voraus, in der die Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen in den verschiedenen Kompartimenten der Zellen unter Basalbedingungen aufgezeichnet

werden. Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -freies extrazelluläres Milieu ist unphysiologisch und bedeutet einen starken Konzentrationsgradienten zwischen Zellinnerem und Extrazellularraum. Aufgrund der Vielzahl ständig aktiver Ionenkanäle in den Membranen einer Zelle ist es denkbar, dass im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Milieu bereits während der Zeit bis zur Stimulation mit einem Agonisten  $\text{Ca}^{2+}$  nach extrazellulär verloren geht. So fallen beim Vergleich der Basalwerte unter  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen und  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen für letztere bereits zum Teil signifikant geringere Werte auf ( $p < 0,05$ ). Im spezifischen Vergleich der Zellregionen unterscheiden sich die Basalwerte für die nukleäre und die perinukleäre Region signifikant ( $p < 0,05$ ), während sich die Werte für das gesamte Zytosol nicht signifikant unterscheiden, unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen aber dennoch niedriger sind. Dies spricht dafür, dass tatsächlich bereits vor Versuchsbeginn intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  nach extrazellulär verloren geht, welches der Zelle bei der Agonisten-Stimulation dann nicht mehr für das *Signalling* zu Verfügung steht. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Verlust nach extrazellulär könnte eine teilweise Erklärung für die in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium leicht abgeschwächten, erheblich niederfrequenteren und signifikant verkürzten Signale darstellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass vor allem die Morphologie des  $\text{Ca}^{2+}$ -Profils in beiden Gruppen teilweise vom Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellularraum abhängig ist. Potentielle Mechanismen sind folgende:

1. Das Entleeren der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher führt zu deren Wiederauffüllung durch einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellularraum. Der zugrundeliegende Mechanismus ist der *Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry* (SOCE) oder auch *capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry* und wird vermutlich nach Stimulation durch einen Agonisten über nicht-selektive Kationenkanäle (*transient receptor potential protein* (trp)) der Plasmamembranen vermittelt (Putney, 1986; Tran et al., 2000). Die Entleerung intrazellulärer Speicher löst den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär aus, um für ihre Wiederauffüllung zu sorgen (Putney, 1986). So wird von Putney et al. beschrieben, dass in ihren Versuchen unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen im Zellmedium der Plateau-Teil der Agonisten-stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort fehlte, aber bei Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  zum extrazellulären Medium wieder auftrat. SOCE beeinflusst also vor allem den Plateau-Teil einer Agonisten-stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort.

2. G-Protein-gekoppelte Purinrezeptoren wie P2Y<sub>2</sub>R, bei deren Aktivierung IP<sub>3</sub> entsteht, induzieren nach Bindung ihres Liganden eine transiente [Ca<sup>2+</sup>]-Spitze, gefolgt von einem langsam abfallenden Plateau. Ist ATP der Agonist am P2Y<sub>2</sub>R und Ca<sup>2+</sup> im extrazellulären Medium enthalten, wird das Plateau von Spikes überlagert (Rice & Singleton, 1987). Es wurde von Pickett und Edwardson (2006) gezeigt, dass diesen lokalen Ca<sup>2+</sup>-Spikes in Typ II AEZ Fusionen von Lamellarkörperchen mit der Plasmamembran vorausgehen. Dieser positive *Feedback*-Mechanismus, bei dem Fusionen von Lamellarkörperchen die Fusion weiterer Lamellarkörperchen verursachen und Ca<sup>2+</sup> einströmt, wird *fusion activated Ca<sup>2+</sup> entry* (FACE) genannt. Es handelt sich dabei um eine alles-oder-nichts-Antwort auf den Agonisten (ATP), bei der entweder alle (*Compound Exocytosis*) oder keine Lamellarkörperchen fusionieren (Pickett & Edwardson, 2006). FACE erhöht demnach mit lokalen Ca<sup>2+</sup>-Anstiegen die Wahrscheinlichkeit, dass *surfactant* an seinem Wirkort, dem apikalen Zellpol, ausgeschüttet wird (Dietl, Haller, & Frick, 2012). Im Weiteren ist Ca<sup>2+</sup> für die sogenannte *fusion pore expansion* nötig, die die Ausschüttung des Inhaltes der bereits fusionierten Vesikel erst ermöglicht (Haller et al., 2001). P2X<sub>4</sub>R ist ein integriertes Protein der Lamellarkörperchenmembran und wird bei deren Fusion mit der Plasmamembran ein Teil von ihr. Wirkt ATP als Agonist an den P2X<sub>4</sub>R, fungieren sie als Ca<sup>2+</sup>-Ionenkanal. Der folgende Ca<sup>2+</sup>-Einstrom könnte eine Erklärung für die o.g. und auch in den eigenen Untersuchungen zu beobachtenden Ca<sup>2+</sup>-Spikes im ATP-Versuch sein (Miklavc et al., 2009; Miklavc et al., 2011; Novak, 2011). ATP führt also zur Exozytose von *surfactant* und zum Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über die P2X<sub>4</sub>R. Auch ADP ist laut Literatur ein effektives Sekretagogum (ein sekretionsförderndes Mittel) für *surfactant*, wenn auch ein schwächeres als ATP (Rice & Singleton, 1986). ADP wird aber anders als ATP nicht als Agonist am P2X<sub>4</sub>R beschrieben (Burnstock, 2007). Demnach kann eine Stimulation der A549-Zellen mit ADP zur Sekretion von *surfactant* führen nicht aber zum folgenden Einstrom von Ca<sup>2+</sup> über P2X<sub>4</sub>R. Dies passt zu den Ca<sup>2+</sup>-Antwortprofilen der ADP-Versuche dieser Arbeit, denn es zeigen sich hierin keine Ca<sup>2+</sup>-Spike-Überlagerungen. FACE verursacht also vor allem die Spike-Überlagerungen einer ATP-stimulierten Ca<sup>2+</sup>-Antwort.

Aufgrund des im Versuch mit ADP in Ca<sup>2+</sup>-haltigem Medium fehlenden Plateaus und den Ergebnissen von Putney et al. kann vermutet werden, dass das durch ADP (bzw. die geringen aus dem vermeintlich stattfindenden Aufbau von ADP entstehenden ATP-Mengen) ausgelöste Signal weniger vom Ca<sup>2+</sup> des Extrazellularraums abhängig ist als das Ca<sup>2+</sup>-Signal nach ATP-Stimulation in Ca<sup>2+</sup>-haltigem Medium. Das fehlende Plateau nach ADP-Stimulation gibt Hinweis darauf, dass der SOCE-Mechanismus nicht auslöst wird. Dies könnte daran liegen, dass sich die Speicher nach ADP-Stimulation nicht so stark entleeren und somit ihre Auffüllung durch den Einstrom von Ca<sup>2+</sup> aus dem Extrazellularraum (SOCE) nicht in gleichem Maße nötig wird, als wenn mit ATP 10µM stimuliert würde.

Befindet sich im Extrazellulärmedium kein Ca<sup>2+</sup>, könnte dies bedeuten, dass keine Fusionen von Lamellarkörperchen stattfinden oder sich fusionierte Lamellarkörperchen nicht nach extrazellulär entleeren können. Die fehlenden Spike-Überlagerungen im ATP-Versuch unter Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen ließen sich dadurch erklären.

Es kommt außerdem unabhängig vom Ca<sup>2+</sup>-Gehalt des Mediums in den Versuchen dieser Arbeit nach ADP-Stimulation zu geringerer Spike-Überlagerung des Ca<sup>2+</sup>-Signals als nach ATP-Stimulation. Zum einen kann dies daran liegen, dass ADP kein Agonist am P2X<sub>4</sub>R ist und zum anderen daran, dass ADP bzw. die geringen daraus aufgebauten ATP-Mengen nicht als Gefahrensignal für die Zellen gelten und eine vermehrte *surfactant*-Ausschüttung daher unnötig ist. Das heißt, FACE findet nach ADP-Stimulation nicht statt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die beschriebenen Mechanismen zeigen, dass vor allem die Morphologie des Profils der Ca<sup>2+</sup>-Antwort und hier besonders die Plateauphase der Ca<sup>2+</sup>-Antwort nach ATP-Stimulation vom Ca<sup>2+</sup> des Extrazellularraumes abhängig ist. Nicht davon abhängig ist der Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>] nach Stimulation weder mit ADP noch mit ATP.

### **5.3.2.2 ER**

Um die Rolle des ER für das purinerge *Signalling* und vor allem das durch ADP ausgelöste Ca<sup>2+</sup>-Signal zu untersuchen, werden in der vorliegenden Arbeit Versuche mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin und die FRET-Versuche mit dem GECI-D1ER

herangezogen. Das ER ist der größte  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher einer Zelle und setzt sich um den Nukleus einer Zelle als NE fort. Werden die Zellen mit Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren stimuliert, teilen letztere sich in ihre Untereinheiten und aktivieren innerhalb der Zelle weitere Proteine, zum Beispiel die PLC. Die PLC spaltet  $\text{PIP}_2$  aus der Plasmamembran in DAG und  $\text{IP}_3$ .  $\text{IP}_3$  kann sich innerhalb der Zelle schnell ausbreiten und aktiviert  $\text{IP}_3\text{R}$  in der ER-/NE-Membran. Dies löst einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER aus. ADP und ATP wirken auf G-Protein-gekoppelte P2YR und können die sogenannte  $\text{IP}_3$ -Kaskade auslösen. Die durch purinerge Stimulation hervorgerufenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale werden in den Untersuchungen dieser Arbeit durch die Präinkubation mit Thapsigargin in allen Zellregionen komplett unterbunden. Sie sind also in allen Zellregionen entscheidend abhängig von  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern, die  $\text{Ca}^{2+}$  über SERCA Pumpen aufnehmen. Dazu gehören vor allem das ER und auch der NE, an dessen äußerer Membran SERCA nachgewiesen worden sind (Gensburger, Freyermuth, Klein, & Malviya, 2003). Da Thapsigargin SERCA enthaltende  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher entleert bzw. verhindert, dass diese  $\text{Ca}^{2+}$  aufnehmen, ist es schlüssig, dass in der vorliegenden Arbeit nach Thapsigargin-Gabe kein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal von diesen Speichern mehr ausgeht. Die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den SERCA enthaltenden intrazellulären Speichern bedingt also das Auftreten oder Ausbleiben eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals sowohl nach ATP- als auch nach ADP-Stimulation und sowohl im Zytosol als auch im Zellkern.

Wie in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beschrieben ist es mit dem verwendeten GECI-D1ER kaum möglich,  $\text{Ca}^{2+}$ -Bewegungen aus dem ER heraus oder in das ER hinein darzustellen. Dies könnte daran liegen, dass der gewählte GECI im ER-Milieu der A549-Zellen aufgrund seiner Eigenschaften nicht funktionieren kann. Dies kann an einem für den GECI unpassenden pH-Wert liegen oder auch an der  $[\text{Ca}^{2+}]$  im ER. Des Weiteren könnten auch Faktoren wie die Temperatur, bei der die Versuche durchgeführt wurden, einen Einfluss auf die Funktion eines GECIs haben (Perez Koldenkova & Nagai, 2013).

### **5.3.2.3 Mitochondrium & ROS**

Die Mitochondrien sind der zweitgrößte  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher einer Zelle und sind über das Zytoskelett eng mit dem ER verbunden. Sie modulieren durch Aufnahme und Abgabe von  $\text{Ca}^{2+}$  intrazelluläre Agonisten-stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale (Csordas & Hajnoczky,

2009). Daher wird ihre Bedeutung für das durch ADP generierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die zur weiteren Aufklärung dieser Bedeutung bemühten Experimente sind die unter Einfluss der drei Hemmstoffe der mitochondrialen Atmungskette Rotenone, Myxothiazol und Antimycin A und die FRET-Versuche mit dem GECI 4mtD3cpv. Letztere zeigen, dass Mitochondrien unter dem Einfluss von ATP und ADP  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol bzw. dem ER in ihr Inneres aufnehmen und wieder abgeben können. Es ergibt sich eine Analogie zwischen den  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in den Epifluoreszenzmikroskopie-Versuchen und den gemessenen intramitochondrialen Fluoreszenzintensitäten von CFP und YFP im FRET-Experiment. Die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  durch die Mitochondrien hat verschiedene Funktionen:

1. Für Mitochondrien ist eine die Zelle schützende Puffer-Funktion beschrieben, bei der sie ein zu viel an zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  temporär aufnehmen, um es bei absinkender  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  wieder an das Zytosol abzugeben. Mitochondrien stehen in engem Kontakt mit den  $\text{IP}_3\text{Rs}$  des ER und sind in der Lage, das aus dem ER freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$  aufzunehmen (Hajnoczky, Csordas, Madesh, & Pacher, 2000).
2. Das Sequestrieren von  $\text{Ca}^{2+}$  durch die Mitochondrien führt zu einer Modulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale und damit der Zellkommunikation. Zytosolische  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Anstiege treten im Rahmen verschiedener zellulärer Prozesse auf, die zum Teil absolut gegensätzlich sind. Dazu gehören das  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* während der Entstehung neuen Lebens und neuer Zellen, das  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* zum Schutz von Zellen vor dem Zelltod (Zhang et al., 1998) und das  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* zur Induktion und Promotion des Zelltodes (Clapham, 1995). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme durch die Mitochondrien supprimiert den positiven *feedback* von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die  $\text{IP}_3\text{R}$ , sodass die Sensibilität für  $\text{IP}_3$  und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung sinkt (Hajnoczky, Hager, & Thomas, 1999). Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER triggert wiederum eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den Mitochondrien (*mitochondrial calcium induced calcium signalling*, mCICR) (Falcke et al., 1999).  $\text{Ca}^{2+}$  selbst kann zusätzlich den MCU für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme sensibilisieren und desensibilisieren (Moreau et al., 2006). Mitochondrien sind demnach starke Einflussnehmer auf Amplitude und Profil intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale.

3. Ein weiterer Grund für das Sequestrieren von  $\text{Ca}^{2+}$  durch die Mitochondrien ist, dass sie  $\text{Ca}^{2+}$  benötigen, um mitochondriale Prozesse zu steuern. Die Beteiligung der Mitochondrien an den zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen führt unter anderem zur Steigerung der (mitochondrialen) Respiration, um die Bedürfnisse eines lokal gesteigerten Stoffwechsels zu decken.
4. Eine Überladung der Mitochondrien mit  $\text{Ca}^{2+}$  gilt als einer der Auslöser für die Apoptose einer Zelle. Die Apoptose ist für die Entwicklung multizellulärer Organismen und die unschädliche Eliminierung (keine Entzündung, keine Nekrose) beschädigter Zellen (Zell-Homöostase) unter physiologischen und pathologischen Konditionen essenziell (Ellis, Yuan, & Horvitz, 1991; Hetts, 1998; X. Jiang & Wang, 2004; Nagata, 1997). Für die Apoptose bestehen ein extrinsischer und ein intrinsischer Aktivierungsweg. Ersterer wird durch die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren und die Cytochrom-C-Freisetzung aus den Mitochondrien vermittelt (Wallach et al., 1999). Letzterer wird durch zytotoxische Stimuli und eine Überladung der Mitochondrien mit  $\text{Ca}^{2+}$  zusammen mit einer Reihe anderer Co-Faktoren (pH, Adenin-Nukleotide, freie Radikale, mitochondriales Membranpotential) ausgelöst und beinhaltet eine Steigerung der mitochondrialen Permeabilität für Cytochrom C und die Entstehung des Apoptosoms (X. Jiang & Wang, 2004).

In gesunden Zellen führt eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$  nicht zur Apoptose sondern zur Aktivierung mitochondrialer Dehydrogenasen des Zitratzyklus, um den gesteigerten Energieverbrauch der aktivierten/stimulierten Zelle decken zu können (Hajnoczky, Robb-Gaspers, Seitz, & Thomas, 1995; Ichas & Mazat, 1998; McCormack, Halestrap, & Denton, 1990). Selbst hohe lokale Anstiege der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  (über 10-100  $\mu\text{M}$ ), wie sie an den  $\text{IP}_3\text{Rs}$  des ER vorkommen, führen allein nicht zwingend zur Einleitung der Apoptose (Alonso et al., 2006). Sieht sich eine Zelle mit proapoptotischen Stimuli (z.B. Ceramid oder Staurosporin = „Apoptotic Switch“) konfrontiert, steigt die Sensibilität der PTP auf  $\text{Ca}^{2+}$ , sodass  $\text{IP}_3$ -medierte  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ -Anstiege zur Öffnung der PTP, Cytochrom C-Freisetzung und dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi$ ) führen können (Szalai et al., 1999). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER durch  $\text{IP}_3\text{Rs}$  wird in vielen Modellen direkt für die Überladung der Mitochondrien mit  $\text{Ca}^{2+}$  verantwortlich gemacht (Hajnoczky et al., 2000; Jayaraman &

Marks, 1997; Pinton et al., 2001; Szalai et al., 1999). Die Apoptose könnte also auch durch purinerge Stimulation eingeleitet werden, sollten zur selben Zeit proapoptotische Stimuli auf die Zelle einwirken. Ob die in dieser Arbeit gemessenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Mitochondrien und schließlich zur Apoptose der A549-Zellen führen, ist bisher unklar und sollte Bestandteil künftiger Untersuchungen sein. Dennoch fällt auf, dass durch ATP hervorgerufene Signale stets sehr hoch ausfallen und die mitochondriale Barriere zum Zellkern zu überschwemmen scheinen. Unter dem Einfluss von ATP in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  wäre demnach die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Mitochondrien in den A549-Zellen denkbar. Die FRET-Versuche zeigen aber, dass die Mitochondrien das aufgenommene  $\text{Ca}^{2+}$  über die Zeit wieder abgeben. Ob dies aktiv oder passiv (Verlust) geschieht, kann aus den Versuchen nicht entnommen werden. Das durch ADP hervorgerufene Signal fällt initial gering aus und scheint den Mitochondrien eine bessere Möglichkeit zu bieten, aus dem in der Folge aufgenommenen  $\text{Ca}^{2+}$  eigene Signale zu generieren. Im Zuge der dann entstehenden  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Oszillationen sinkt die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$  wie beschrieben immer wieder ab, sodass die PTP vermeintlich gar nicht geöffnet oder wieder verschlossen wird und der mitochondriale Stoffwechsel intakt bleibt (Szalai et al., 1999). Periodische  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiege kommen aber auch zustande, wenn das aus den Mitochondrien bei der Apoptose freigesetzte Cytochrom C an die  $\text{IP}_3\text{Rs}$  des ER bindet. Es blockiert das negative *Feedback* von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die  $\text{IP}_3$ -medierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , sodass ungehindert  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt und von den Mitochondrien aufgenommen werden kann. Dies bewirkt dann die weitere Freisetzung von Cytochrom C im Sinne einer *feed forward*-Amplifikation (Boehning et al., 2003; Hirose et al., 1999).  $\text{Ca}^{2+}$  wird dabei periodisch aus dem ER freigesetzt, sodass oszillierende Verläufe der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$  entstehen (Boehning et al., 2003; Boehning, van Rossum, Patterson, & Snyder, 2005). Ichas et al. (1997) beschrieben, dass repetitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Impulse und weniger die kontinuierliche Stimulation der Mitochondrien mit derselben  $\text{Ca}^{2+}$ -Dosis besonders effektiv bei der Aktivierung der PTP sind (Ichas et al., 1997).

Störungen der Apoptose, wie übermäßige oder zu geringe Apoptoseaktivität, können unter anderem zu Immunschwächen, Neurodegeneration und Malignomen führen (X. Jiang & Wang, 2004; Nicotera & Lipton, 1999). Dabei wird die Apoptose bei viralen und malignen Erkrankungen auf molekularer Ebene umgangen (Pinton et al., 2001). Da

A549-Zellen Malignomzellen sind, ist es möglich, dass oben beschriebene Vorgänge in ihnen anders bzw. nicht ablaufen.

Wie bereits beschrieben, sind ER und Mitochondrien physisch gekoppelt. Csordas beschrieb, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme durch die Mitochondrien empfindlich gestört wird, wenn diese Verbindung durch limitierte Proteolyse mittels Trypsin gelöst wird und sich die Distanz zwischen den Organellen vergrößert (Csordas et al., 2006). Um die Rolle der Mitochondrien für das purinerge  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* in A549-Zellen bzw. die Interaktion zwischen Mitochondrien und ER in diesem Prozess noch genauer zu untersuchen, könnten Versuche mit limitierter Proteolyse der Protein-Protein-Verbindungen zwischen ER und Mitochondrien und auch Versuche mit simultan transfizierten GECIs für die Darstellung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Bewegungen in Mitochondrien und im ER sinnvoll sein.

Der Stoffwechsel der Mitochondrien ist eine wichtige Quelle der Entstehung von ROS ( $\text{O}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), die unter anderem als intrazelluläre Botenstoffe dienen, wobei sie ihren Einfluss mitunter über  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* bzw. die Modulation zellulärer Targets ausüben, die an der Entstehung Agonisten-stimulierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beteiligt sind (SERCA,  $\text{IP}_3\text{R}$  u.a.) (Parsons, Williams, & Chance, 1966). Rotenone und Myxothiazol vermindern, Antimycin A steigert die Produktion von ROS (Corda et al., 2001). In den Versuchen dieser Arbeit kann bei reduzierter ROS-Produktion durch die Präinkubation mit Rotenone oder Myxothiazol zumeist eine Minderung von Amplitude und Oszillations-/Spikefrequenz des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals beobachtet werden. Unter Einfluss von Rotenone fällt im Versuch mit ADP allerdings auf, dass der maximale Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{perinuk}}$  kaum vermindert und im Versuch mit ATP der maximale Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]$  in allen Zellregionen nochmals ansteigt und vor allem in der perinukleären Region besonders hoch ist. Unter Myxothiazol vermindern sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beider Interventionsgruppen. Nach der Präinkubation mit Antimycin A steigen die Oszillations-/Spikefrequenz und zum Teil auch die Amplituden signifikant an ( $p < 0,05$ ). Dazu passend fanden Waypa und Schumacker (2002) heraus, dass ein verminderter Anfall von ROS in Endothelzellen und Myozyten aus Lungenarterien eine durch Hypoxie ausgelöste intrazelluläre  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Erhöhung abschwächt (Waypa & Schumacker, 2002). Des Weiteren konnten Yan et al. (2008) durch die Inhibition

sowohl zytosolischer (NADPH-Oxidase) als auch mitochondrialer ROS-Produktion (Atmungskette), letzteres mit Myxothiazol, demonstrieren, dass ein basales ROS-Level verantwortlich für die Mehrheit spontaner zellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Spike-Aktivität ist, da ROS den Redox-Status und damit die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Kanäle (RYRs,  $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) verändern (Yan et al., 2008). Die Aktivität von SERCA steigt, je weniger ROS anfallen (Csordas & Hajnoczky, 2009). Folglich wird  $\text{Ca}^{2+}$  unter Einfluss von Rotenone oder Myxothiazol mit höherer Geschwindigkeit in das ER gepumpt und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale abgeschwächt. Hoher oxidativer Stress, wie unter Einfluss von Antimycin A, führt zu einer reversiblen Hemmung der SERCA-Aktivität und zur Sensibilisierung von  $\text{IP}_3\text{R}$  für  $\text{IP}_3$  und somit zur Entleerung des ER (Anzai, Ogawa, Ozawa, & Yamamoto, 2000).  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale werden verstärkt, indem unter stark oxidativen Konditionen nicht nur weniger  $\text{Ca}^{2+}$  zurück in das ER gepumpt, sondern zusätzlich noch vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt wird (Csordas & Hajnoczky, 2009). Zusammengenommen handelt es sich um einen *Feedback*-Mechanismus, bei dem Mitochondrien durch Agonisten-stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale ausgehend vom ER und die folgende Hochregulation ihres Stoffwechsels zu vermehrter ROS-Produktion angeregt werden und dadurch wiederum über die Hemmung der SERCA und die Sensibilisierung der  $\text{IP}_3\text{Rs}$  das ER zu vermehrter  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung anregen. Hu et al. konnten in diesem Kontext zeigen, dass ein extrazellulärer Agonist allein keine intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Oszillationen auslöst. Erst die Steigerung der intrazellulären  $[\text{ROS}]$  ( $[\text{H}_2\text{O}_2]$ ) und die folgende Sensibilisierung der  $\text{IP}_3\text{Rs}$  für  $\text{IP}_3$  ließ  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Oszillationen entstehen (Hu et al., 2002). Die im Rahmen dieser Arbeit aufgezeichneten  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Profile und die Ergebnisse von Hu et al. (2002) zu ROS-abhängig auftretenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen lassen vermuten, dass die Stimulation der A549-Zellen mit ADP (bzw. geringen  $[\text{ATP}]$ ) zu mehr ROS-Produktion führt als die Stimulation der Zellen mit ATP (hohen  $[\text{ATP}]$ ). Dies könnte die Vermutung bestärken, dass der mitochondriale Stoffwechsel unter ADP- (geringer ATP-) Stimulation einer Zelle intakt bleibt, während er durch die Zellstimulation mit ATP (hoher  $[\text{ATP}]$ ) gestört wird.

ROS inhibieren aber im Sinne eines negativen *Feedbacks* schließlich auch den Zitratzyklus, sodass weniger Redoxäquivalente entstehen und die Aktivität des mitochondrialen Stoffwechsels und der Enzyme der Atmungskette sinken. Schließlich kann dies sogar zur Übersäuerung der mitochondrialen Matrix, zum Zusammenbruch

von  $\Delta\psi$  und zur Apoptose der Zellen führen. Nicht zuletzt wird auch die Öffnung der PTP durch hohe [ROS] begünstigt.

#### **5.4 Welche Auswirkungen könnte das $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* durch ADP auf die Alveolarepithelzelle und den Organismus haben?**

Verschiedenste physiologische und pathologische Stimuli führen in AEZ zur Ausschüttung von Purinnukleotiden, die als parakrine Mediatoren wirken und sowohl kurzfristige Effekte, wie die Sekretion von Ionen und *surfactant* (Gatti, L., and Zunino, F. (2005) *Methods Mol. Med.* 111, 127–148) (Rodrigues et al., 2007), als auch langfristige Effekte, wie die Gentranskription und den Progress des Zellzyklus, vermitteln (Schafer et al., 2003).

Kiefmann et al. (2005) beschreiben, dass eine mechanische Ausdehnung des Alveolarepithels (z.B. durch Ventilation mit großen Volumina) und Scherstress die Ausschüttung von ATP aus AEZ Typ I und Typ II stimulieren (R. Kiefmann, Islam, Lindert, Parthasarathi, & Bhattacharya, 2009; Patel et al., 2005). ATP vermittelt die Freisetzung von *surfactant* (Pian, Dobbs, & Duzgunes, 1988) und dies vor allem dann, wenn der hervorgerufene Anstieg der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$  von längerer Dauer ist (Frick, Eschertzhuber, Haller, Mair, & Dietl, 2001). Dies dient der Zelle zum Schutz vor einem zu geringen luminalen Flüssigkeitsfilm und hoher Oberflächenspannung (Dietl et al., 2012). Über ATP wird jedoch auch eine Ansammlung von Flüssigkeit in den Alveolen und schließlich die Entstehung eines Lungenödems vermittelt (Rich et al., 2003). AEZ Typ I haben keine ausreichende Anzahl von Mitochondrien, um effektiv Flüssigkeit abtransportieren zu können. Sie leiden im Besonderen unter mechanischer Ausdehnung und stellen bei ihrem Untergang eine große Quelle extrazellulären ATPs dar (Perlman & Bhattacharya, 2007). AEZ Typ II hingegen besitzen die mitochondriale Dichte, um den Energiebedarf für den Abtransport alveolärer Flüssigkeit zu decken (Mason, 2006). Beim Auftreten von Lungenödemen infolge verschiedener pulmonaler Pathologien (Infektion, Intoxikation, Malignom, Hypoxie) könnte parakrines purinerges *Signalling* und/oder der Untergang von AEZ Typ I und damit der Verlust von Purinnukleotiden in das Interstitium AEZ Typ II anregen, vermehrt Flüssigkeit abzutransportieren. Parallel dazu wird die Proliferation der AEZ Typ II und ihre Differenzierung zu AEZ Typ I zum Zwecke einer Reparatur des Alveolarepithels

beschleunigt (Mason, 2006). Proliferation und Differenzierung sind längerfristige Prozesse. Zytoplasmatisches  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* reguliert dabei die Transkription von Genen, indem es die  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-abhängige Aktivierung oder den in den Kern gerichteten Transport von Transkriptionsfaktoren, wie NFAT oder NF $\kappa$ B, bewirkt. Agonisten-stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen erhöhen die Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM ( $[\text{Ca}^{2+}\text{-CaM}]_{\text{frei}}$ ) und die Translokation von  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM in den Nukleus. Je mehr  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM in den Nukleus transloziert, desto mehr  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM abhängige Prozesse können dort ablaufen. Je länger  $\text{Ca}^{2+}$  im Nukleus erhöht bleibt, desto länger sind die Transkriptionsfaktoren aktiv (Bootman et al., 2009; Teruel, Chen, Persechini, & Meyer, 2000). NF $\kappa$ B ist ein  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Oszillationsfrequenz-sensitiver Transkriptionsfaktor (Dolmetsch et al., 1998; Hu et al., 1999) und in vielen Zellen sensitiv auf deren Redox-Status (Bowie an O'Neill, 2000; Chakrabarti et al., 2007, Foncea et al., 2000) (Zhu et al., 2008). Seine Transkriptionsaktivität wird vor allem über die kumulative Spike-Dauer (CSD) bzw. die kumulative Dauer der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung reguliert. Seine Aktivität wird noch gesteigert, wenn die  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung durch eine Agonisten-Stimulation ausgelöst wurde, da zeitgleich ROS produziert werden, mit denen die Agonisten-stimulierten Oszillationen der  $[\text{Ca}^{2+}]$  eine Signalkooperation eingehen (Dolmetsch, Xu, & Lewis, 1998; Zhu et al., 2008; Zhu et al., 2011). Eine Sättigung der NF $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität konnte von Zhu et al. nach einer Oszillationsdauer von 90min und länger beobachtet werden (Zhu et al., 2011). Werden die Zellen dabei pulsatilem Agonistenstimulationen ausgesetzt, wie es unter (patho-)physiologischen Bedingungen am ehesten vorkommt, steigt die maximale Transkriptionsaktivität von NF $\kappa$ B im Vergleich zu durch einmalige Agonistenstimulation erzeugten  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen nochmals an, da sein Inhibitor dadurch längerfristig inaktiviert wird (Bootman, 1994; de Pascual & Garcia, 2007; DiDonato, Hayakawa, Rothwarf, Zandi, & Karin, 1997). Wenn in den Versuchen dieser Arbeit aus ADP nach und nach ATP aufgebaut wird, entspräche dies im Vergleich mit der einmaligen Gabe von ATP am ehesten einer pulsatilem Stimulation der Zellen. Es resultiert aus der ADP-Stimulation der Zellen oftmals ein langanhaltendes oszillierendes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal mit hoher CSD. Die Oszillationen sind Hinweis auf eine Steigerung der ROS-Produktion unter ADP-Stimulation, da, wie Hu et al. zeigen konnten, bei einer Agonistenstimulation von Zellen nur dann ein oszillierendes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal entsteht, wenn gleichzeitig eine

Steigerung der intrazellulären [ROS] ( $[H_2O_2]$ ) und die einhergehende Sensibilisierung der  $IP_3$ Rs für  $IP_3$  erfolgen (s.o., (Hu et al., 2002)). Insgesamt könnten durch die Stimulation von A549-Zellen mit ADP und die folgende ROS-Erhöhung und lange CSD eine höhere NF $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität und Genexpression resultieren als nach ATP-Stimulation (Zhu et al., 2008). Der Agonist setzt folglich parallel mehrere Signalwege in Gang, die gemeinsam zur Erhöhung der Transkriptionseffizienz der Zelle beitragen.

Nukleäres  $Ca^{2+}$ -*Signalling* reguliert die Transkription von Genen, indem zum einen die Chromatinstruktur durch Bindung von  $Ca^{2+}$  verändert wird (Shirakawa & Miyazaki, 1996) und  $Ca^{2+}$  zum anderen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagiert (CREST/CREB (cyclic AMP response element-binding protein) (Alonso et al., 2006; Hardingham, Arnold, & Bading, 2001), Elk1 (Pusl et al., 2002), DREAM (downstream regulatory element-antagonistic modulator) (Cheng et al., 2002). Gatti und Zunino (2005) konnten durch zielgerichtete lokale Pufferung nukleärer, aber nicht zytoplasmatischer  $Ca^{2+}$ -Signale die Proliferation von Zellen inhibieren, indem sie dadurch die  $G_2/M$ -Transition oder die Mitose verhinderten und die [p-CREB] (aktive Form von CREB  $\hat{=}$  Phospho-CREB) verminderten (Gatti, L., and Zunino, F. (2005) *Methods Mol. Med.* 111, 127–148) (Rodrigues et al., 2007). Die Pufferung der  $Ca^{2+}$ -Signale im Zellkern induziert dabei nicht die Apoptose, sondern ruft einen mitotischen Block hervor. Dies könnte zur kontrollierten Synchronisation des Zellzyklus in Tumorzellen genutzt werden, bei dessen Aufhebung alle Tumorzellen zur selben Zeit in einem Stadium des Zellzyklus wären, in dem sie empfindlich auf bestimmte Chemotherapeutika reagierten. Tatsächlich nimmt purinerges *Signalling* durch seine Auswirkungen auf die Zellproliferation Einfluss auf die Wirkung von Chemotherapeutika wie Cisplatin, Paclitaxel und Etoposid, die den Progress des Zellzyklus inhibieren und Anwendung in der Therapie von Bronchialkarzinomen finden (Schafer et al., 2003). Ihre Wirkung wurde in A549-Zellen durch ATP verstärkt bzw. abgeschwächt. Die unterschiedliche Wirkung lag darin begründet, wo und wie das jeweilige Chemotherapeutikum im Zellzyklus ansetzte (Schafer et al., 2003). Die Ergebnisse von Schafer et al. machen deutlich, dass purinerges  $Ca^{2+}$ -*Signalling* aufgrund seiner Wirkung auf den Zellzyklus als wichtiger Faktor in der Pharmakotherapie neoplastischer Erkrankungen Anerkennung finden sollte (Schafer, Hartig, Sedehizade, Welte, & Reiser, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit werden

Veränderungen der Gentranskription/Genexpression nach Stimulation mit ADP oder ATP nicht eigens dargestellt. Zukünftig soll dies vermehrt in den Fokus der Untersuchungen rücken.

### **5.5 Gibt es Epithel- oder Karzinomzellen anderen Ursprungs, die auf eine ADP-Stimulation dasselbe $Ca^{2+}$ -*Signalling* zeigen wie A549-Zellen?**

Während ATP in A549-Zellen ein starkes gesamtzelluläres vom ER als  $Ca^{2+}$ -Speicher abhängiges  $Ca^{2+}$ -Signal auslöst, verursacht ADP in diesen Zellen ein vorwiegend nukleäres vom ER und den Mitochondrien als  $Ca^{2+}$ -Speicher und Produzenten reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) abhängiges  $Ca^{2+}$ -Signal. Um der Frage nachzugehen, ob es andere Zelllinien gibt, die auf eine ADP- (oder ATP-) Stimulation dasselbe  $Ca^{2+}$ -*Signalling* zeigen wie A549-Zellen, wurden Versuche mit weiteren, teils neoplastisch veränderten, (Lungen-)Epithelien, epithelialen Karzinomzellen anderen Organursprungs und Endothelzellen durchgeführt. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit bereits eine beträchtliche Anzahl verschiedener Zellen untersucht wurde, konnte bisher keine andere Zelllinie gefunden werden, die nach ATP- oder ADP-Stimulation dasselbe  $Ca^{2+}$ -*Signalling* zeigt wie A549-Zellen. Zu bemerken ist, dass sich die verschiedenen Zellen, werden sie mittels Fura-2 gefärbt und mittels Epifluoreszenzmikroskop betrachtet, bereits optisch z.T. deutlich unterschieden. Teilweise kann eine perinukleäre Region, wie man sie bei A549-Zellen abgrenzen kann, abgegrenzt werden und teilweise nicht. Aus diesem Grund konnten bei den Messungen zum Teil nicht dieselben ROIs gesetzt werden. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann nicht davon ausgegangen werden, dass das beobachtete *Signalling* einer universellen Sprache entspricht, die in vielen verschiedenen Zelltypen vorkommt und hier jeweils dieselben *Downstream*-Effekte bewirkt. Vielmehr könnte das beobachtete *Signalling* Malignomzellen eigen sein, die aus pulmonalen/bronchialen Epithelien hervorgegangen sind.

## 6. Zusammenfassung

Purinerges *Signalling* via dem *second messenger*  $\text{Ca}^{2+}$  beeinflusst diverse Funktionen und damit die Pathophysiologie des Alveolarepithels. Diese Arbeit erforscht das bisher wenig untersuchte purinerge *Signalling* durch das Purinnukleotid ADP in AEZ Typ II und vergleicht es mit dem deutlich besser charakterisierten *Signalling* durch das Purinnukleotid ATP.

Zur Klärung, ob und wie ADP ein  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* in AEZ Typ II auslöst, ob sich dieses und seine Effekte vom *Signalling* durch ATP unterscheiden und ob es weitere Zelltypen gibt, die in gleicher Weise auf eine ADP-Stimulation reagieren wie AEZ Typ II, wurden verschiedene Methoden des *Live-Cell-Calcium-Imagings* (Epifluoreszenz- und Konfokalmikroskopie, FRET) und der Zell- und Molekularbiologie (rtPCR, Western Blot, Rezeptor-*Knockdown*) genutzt.

Es wurde gezeigt, dass die Stimulation von A549-Zellen mit ADP ein  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* hervorruft, welches sich von dem ATP induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* unterscheidet. Nach ADP-Stimulation ergeben sich  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, nach ATP-Stimulation ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortprofil mit initialem steilem Anstieg und schulterförmigem Abfall. Beide Agonisten lösen ein gesamtzelluläres, in allen beobachteten Zellregionen gleichförmiges und synchrones Signal aus. Die Signalamplitude differiert sowohl in den verschiedenen Regionen einer Zelle als auch zwischen den Versuchsgruppen. Die Amplitude der  $[\text{Ca}^{2+}]$  ist nach ADP-Stimulation insgesamt geringer als die nach ATP-Stimulation und im Zellkern höher als im Zytosol und der perinukleären Region. Nach ATP-Stimulation ist der Anstieg im Zellkern ausschließlich höher als der in der perinukleären Region. Nach ADP tritt die Reaktion später auf und ist von längerer Dauer als nach ATP. Das Auftreten von Signalen ist sowohl nach ADP und ATP vom  $\text{Ca}^{2+}$  in SERCA-enthaltenden Speichern (ER, NE) und die Signaldauer vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des Extrazellulärraumes abhängig. FRET-Versuche ergeben, dass die Mitochondrien vor allem am  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signalling* nach ADP-Stimulation beteiligt sind, indem sie  $\text{Ca}^{2+}$  immer wieder rasch aufnehmen und wieder abgeben. Nach ATP-Stimulation nehmen die Mitochondrien nur einmalig  $\text{Ca}^{2+}$  auf. Auch die Herunter- bzw. Hochregulation mitochondrialer ROS-Produktion hat Effekte auf das *Signalling*. Ersteres vermindert in allen Zellregionen und beiden Versuchsgruppen, letzteres steigert unter ADP-Stimulation die Amplitude in Zytosol und Zytoplasma und in beiden Versuchsgruppen die Oszillations-/Spikefrequenz. Die Untersuchungen zu den in A549-Zellen exprimierten und an den  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen beteiligten Purinrezeptoren ergeben, dass beide Signale vermutlich über den  $\text{P}_2\text{Y}_2$ -Rezeptor vermittelt werden. Andere Zelltypen, die in gleicher Weise auf die Stimulation mit ADP reagieren, können im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Die Interpretation der Ergebnisse bleibt vage, da die in der Literatur gängige Annahme, ADP sei an AEZ Typ II ein schwächerer Agonist als ATP, und die eigene Hypothese, ADP sei ein unabhängiger purinerges Agonist mit charakteristischen Effekten, nicht abschließend bewiesen werden kann. Die Arbeit wirft neue Fragen auf und liefert damit neue Ansätze für weitere Untersuchungen. Ob und wann eine enzymatische Konversion von ADP zu ATP und/oder umgekehrt erfolgt und welche langfristigen Effekte, wie z.B. die Änderung der Gentranskriptionsaktivität, eine ADP-Stimulation auf AEZ Typ II hat, bleibt zu untersuchen. Schließlich müssen die in der *in vitro*-Forschung gewonnenen Ergebnisse auf ihre physiologische Bedeutung hin überprüft werden. Es wird durch diese Arbeit deutlich, wie komplex das purinerge *Signalling* in AEZ Typ II ist und wie schwierig es ist, mit den zum Zeitpunkt der durchgeführten Versuche zur Verfügung stehenden Methoden, die Funktionen einzelner Zellorganellen oder Signalmoleküle herauszuarbeiten. Es wird aber auch nochmals deutlich, was purinerges *Signalling* für ein enormes pharmakologisches Potenzial für die Therapie pulmonaler Erkrankungen besitzt.

## 7. Summary

Purinergic signalling via  $\text{Ca}^{2+}$  as second messenger affects various functions and therefore the pathophysiology of the alveolar epithelium. This doctoral research study investigates ADP triggered purinergic signalling in AEC type II about which little has been investigated and compares it with the well characterized signalling following ATP-stimulation.

To explore whether ADP triggers a  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling in AEC type II, whether it and its effects differ from the ATP-triggered signalling and whether there are other cell types that react to ADP-stimulation the same way AEC type II cells do, different forms of *live-cell-calcium-imaging* (epifluorescent and confocal microscopy, FRET) and methods of cell and molecular biology (rtPCR, Western Blot, receptor-knockdown) were used.

It was shown that ADP-stimulation evoked  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling, which differs from ATP-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling. ADP-stimulation causes an oscillating profile of the  $\text{Ca}^{2+}$ -signal while ATP-stimulation generates a profile with a steep increase and a gradual decrease. Both agonists induce a signal within the entire cell that is uniform and occurs synchronously in all cell regions. The signal's amplitude differs in the different cell regions as well as between trial groups. After ADP-stimulation the overall amplitude is smaller than after ATP-stimulation but generally higher in the cell's nucleus than in the cytosol or the perinuclear region. After ATP-stimulation the signal's amplitude in the cell's nucleus only exceeds that in the perinuclear region. When stimulated with ADP the cells reaction occurs later and lasts longer than after ATP-stimulation. It was shown that the occurrence of signals after both ADP- and ATP-stimulation was dependent on SERCA-containing  $\text{Ca}^{2+}$ -stores (ER, NE) and the duration of the signals was dependent on the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration. FRET trials show that mitochondria are especially involved in the  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling following ADP-stimulation taking up and releasing  $\text{Ca}^{2+}$  over and over again when after ATP-stimulation mitochondria take up  $\text{Ca}^{2+}$  only once. Up- and down-regulation of ROS production within the mitochondria also has effects on  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling. While down-regulation lessens the amplitudes of  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling in all cell regions and both trial groups, up-regulation in combination with ADP-stimulation increases signal amplitudes in the cytosol and increases in both trial groups frequency of oscillations or accordingly spike-frequency. Research regarding the involved purinoceptors shows that the signals both after ADP- and ATP-stimulation are likely to be mediated by  $\text{P}_2\text{Y}_2\text{R}$ . Other cell types that react to an ADP-stimulation the same way AEC type II cells do, cannot be presented within this study.

Interpretation of the results mentioned above remains airy because neither can the prevalent assumption that ADP was a weaker agonist on AEC type II than ATP nor the own hypothesis that ADP was an independent agonist with characteristic effects be definitely proven. This doctoral research study presents further questions and new approaches for further research. If and when enzymatic conversion of ADP to ATP or vice versa occurs and which longterm effects, like changes in gene transcription activity, are caused by ADP-stimulation remains to be investigated. Finally, results that were obtained by in vitro research must be verified for their physiological relevance. This doctoral research study shows how complex purinergic signalling in AEC type II is and how difficult it is to carve out the distinct functions of individual cell organelles and signalling molecules by means of the methods available when research was conducted. But again, the enormous pharmacological potential of purinergic signalling in treating pulmonary diseases becomes undoubtedly apparent.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AEC	Alveolar epithelial cells
AEZ	Alveolarepithelzellen
AM	Acetoxymethylester
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ca	Calcium
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /CaM abhängige Protein Kinase II
CCE	<i>capacitative calcium entry</i>
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i>
CICR	<i>Calcium induced calcium release</i>
COX	Cyclooxygenase
CSD	<i>Cumulative spike duration</i>
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DREAM	<i>downstream regulatory element-antagonistic modulator</i>
E-AK	Extrazelluläre Adenylatkinasen
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

ER	Endoplasmatisches Retikulum
E-NDPK	Ektonukleosid Diphosphokinasen
E-NTPase	Ektonukleotidasen
FACE	<i>Fusion activated calcium entry</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
Fura-2 AM	Fura-2 Acetoxymethylester
GECI	<i>Genetically encoded calcium indicator</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> /G-protein gekoppelter Rezeptor
HPMEC	<i>Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells</i>
IMM	<i>Inner mitochondrial membrane</i>
IP <sub>3</sub> R	Inositol 1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisphosphat
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
MAM	<i>Mitochondria associated ER-membrane</i>
MCU	<i>Mitochondrial calcium uniporter</i>
MFN2	Mitofusin
Mg	Magnesium
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCX	<i>Sodium-Calcium-Exchanger</i>
NE	<i>Nuclear envelope</i>

NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLS	<i>Nuclear localisation sequence</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>
(E-)NTDPase	(Ekto-)Nucleosidtriphosphat-diphosphohydrolase
OMM	<i>Outer mitochondrial membrane</i>
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
PK	Proteinkinase
PIP <sub>2</sub>	Posphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Ca <sup>2+</sup> ATPase
PTP	<i>Permeability transition pore</i>
RB2	<i>Reactive blue 2</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of interest</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rtPCR	<i>Real time Polymerasekettenreaktion</i>
RYR	Ryanodin-Rezeptor
SERCA	Sarkoplasmatisches/Endoplasmatisches Retikulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
SMCI	<i>Small molecular calcium indicators</i>
SOC	<i>Store-operated calcium entry</i>

Abkürzungsverzeichnis

---

SR	Sarkoplasmatischen Retikulum
TRP	<i>Transient receptor potential protein</i>
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
VDAC	<i>Voltage dependent anion channel</i>

## 9. Literaturverzeichnis

- al-Mohanna, F. A., Caddy, K. W., & Bolsover, S. R. (1994). The nucleus is insulated from large cytosolic calcium ion changes. *Nature*, *367*(6465), 745-750. doi:10.1038/367745a0
- Allbritton, N. L., Meyer, T., & Stryer, L. (1992). Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science*, *258*(5089), 1812-1815.
- Allbritton, N. L., Oancea, E., Kuhn, M. A., & Meyer, T. (1994). Source of nuclear calcium signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(26), 12458-12462.
- Alonso, M. T., Villalobos, C., Chamero, P., Alvarez, J., & Garcia-Sancho, J. (2006). Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell Calcium*, *40*(5-6), 513-525. doi:10.1016/j.ceca.2006.08.013
- Anzai, K., Ogawa, K., Ozawa, T., & Yamamoto, H. (2000). Oxidative modification of ion channel activity of ryanodine receptor. *Antioxid Redox Signal*, *2*(1), 35-40. doi:10.1089/ars.2000.2.1-35
- Assandri, R., & Mazzanti, M. (1997). Ionic permeability on isolated mouse liver nuclei: influence of ATP and Ca<sup>2+</sup>. *J Membr Biol*, *157*(3), 301-309.
- Bakowski, D., Nelson, C., & Parekh, A. B. (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria coupling: local Ca<sup>2+</sup>(+) signalling with functional consequences. *Pflugers Arch*, *464*(1), 27-32. doi:10.1007/s00424-012-1095-x
- Berridge, M. J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *Journal of Experimental Biology*, *200*(2), 315-319.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *4*(7), 517-529. doi:10.1038/nrm1155
- Bkaily, G., Nader, M., Avedanian, L., Choufani, S., Jacques, D., D'Orleans-Juste, P., . . . Al-Khoury, J. (2006). G-protein-coupled receptors, channels, and Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger in nuclear membranes of heart, hepatic, vascular endothelial, and smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol*, *84*(3-4), 431-441. doi:10.1139/y06-002
- Boehning, D., Patterson, R. L., Sedaghat, L., Glebova, N. O., Kurosaki, T., & Snyder, S. H. (2003). Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nature Cell Biology*, *5*(12), 1051-1061. doi:10.1038/ncb1063
- Boehning, D., van Rossum, D. B., Patterson, R. L., & Snyder, S. H. (2005). A peptide inhibitor of cytochrome c/inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding blocks intrinsic and extrinsic cell death pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(5), 1466-1471. doi:10.1073/pnas.0409650102

- Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., De Marchi, E., Suski, J. M., Bononi, A., . . . Pinton, P. (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal*, 8(3), 343-357. doi:10.1007/s11302-012-9305-8
- Bootman, M. D. (1994). Quantal Ca<sup>2+</sup> release from InsP<sub>3</sub>-sensitive intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *Mol Cell Endocrinol*, 98(2), 157-166.
- Bootman, M. D., & Berridge, M. J. (1995). The elemental principles of calcium signaling. *Cell*, 83(5), 675-678.
- Bootman, M. D., Fearnley, C., Smyrnias, I., MacDonald, F., & Roderick, H. L. (2009). An update on nuclear calcium signalling. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 14), 2337-2350. doi:10.1242/jcs.028100
- Bootman, M. D., Rietdorf, K., Collins, T., Walker, S., & Sanderson, M. (2013). Ca<sup>2+</sup>-sensitive fluorescent dyes and intracellular Ca<sup>2+</sup> imaging. *Cold Spring Harb Protoc*, 2013(2), 83-99. doi:10.1101/pdb.top066050
- Bootman, M. D., Thomas, D., Tovey, S. C., Berridge, M. J., & Lipp, P. (2000). Nuclear calcium signalling. *Cell Mol Life Sci*, 57(3), 371-378.
- Borst, J. G., & Sakmann, B. (1996). Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse. *Nature*, 383(6599), 431-434. doi:10.1038/383431a0
- Bourguignon, L. Y., Iida, N., Sobrin, L., & Bourguignon, G. J. (1994). Identification of an IP<sub>3</sub> receptor in endothelial cells. *J Cell Physiol*, 159(1), 29-34. doi:10.1002/jcp.1041590105
- Bours, M. J., Swennen, E. L., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N., & Dagnelie, P. C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*, 112(2), 358-404. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.013
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., & Carafoli, E. (2013). Intracellular calcium homeostasis and signaling. *Met Ions Life Sci*, 12, 119-168. doi:10.1007/978-94-007-5561-1\_5
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*, 24(3), 509-581.
- Burnstock, G. (1976). Purinergic receptors. *J Theor Biol*, 62(2), 491-503.
- Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, 64(12), 1471-1483. doi:10.1007/s00018-007-6497-0
- Buxton, I. L., Kaiser, R. A., Oxhorn, B. C., & Cheek, D. J. (2001). Evidence supporting the Nucleotide Axis Hypothesis: ATP release and metabolism by coronary endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281(4), H1657-1666. doi:10.1152/ajpheart.2001.281.4.H1657
- Camello-Almaraz, C., Gomez-Pinilla, P. J., Pozo, M. J., & Camello, P. J. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291(5), C1082-1088. doi:10.1152/ajpcell.00217.2006
- Chamero, P., Villalobos, C., Alonso, M. T., & Garcia-Sancho, J. (2002). Dampening of cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations on propagation to nucleus. *J Biol Chem*, 277(52), 50226-50229. doi:10.1074/jbc.C200522200
- Cheng, H. Y., Pitcher, G. M., Laviolette, S. R., Whishaw, I. Q., Tong, K. I., Kockeritz, L. K., . . . Penninger, J. M. (2002). DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. *Cell*, 108(1), 31-43.

- Chorna, N. E., Santiago-Perez, L. I., Erb, L., Seye, C. I., Neary, J. T., Sun, G. Y., . . . Gonzalez, F. A. (2004). P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. *Journal of Neurochemistry*, *91*(1), 119-132. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02699.x
- Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell*, *80*(2), 259-268.
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, *131*(6), 1047-1058. doi:10.1016/j.cell.2007.11.028
- Clunes, M. T., & Kemp, P. J. (1996). P2u purinoceptor modulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> in a human lung adenocarcinoma cell line: down-regulation of Ca<sup>2+</sup> influx by protein kinase C. *Cell Calcium*, *20*(4), 339-346.
- Communi, D., Painsavoine, P., Place, G. A., Parmentier, M., & Boeynaems, J. M. (1999). Expression of P2Y receptors in cell lines derived from the human lung. *Br J Pharmacol*, *127*(2), 562-568. doi:10.1038/sj.bjp.0702560
- Corde, S., Laplace, C., Vicaut, E., & Duranteau, J. (2001). Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *24*(6), 762-768. doi:10.1165/ajrcmb.24.6.4228
- Cox, G. (2012). *Optical Imaging Technologies in Cell Biology*: CRC Press.
- Csordas, G., & Hajnoczky, G. (2009). SR/ER-mitochondrial local communication: calcium and ROS. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1787*(11), 1352-1362. doi:10.1016/j.bbabi.2009.06.004
- Csordas, G., Renken, C., Varnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., . . . Hajnoczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *Journal of Cell Biology*, *174*(7), 915-921. doi:10.1083/jcb.200604016
- Csordas, G., Thomas, A. P., & Hajnoczky, G. (1999). Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *Embo Journal*, *18*(1), 96-108. doi:10.1093/emboj/18.1.96
- Danker, T., Shahin, V., Schlune, A., Schafer, C., & Oberleithner, H. (2001). Electrophoretic plugging of nuclear pores by using the nuclear hourglass technique. *J Membr Biol*, *184*(2), 91-99.
- de Brito, O. M., & Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, *456*(7222), 605-610. doi:10.1038/nature07534
- de Pascual, R., & Garcia, A. G. (2007). Ouabain augments and maintains the catecholamine release responses evoked by repetitive pulses of potassium, caffeine or histamine in perfused bovine chromaffin cells. *Eur J Pharmacol*, *568*(1-3), 99-105. doi:10.1016/j.ejphar.2007.04.050
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., & Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature*, *388*(6642), 548-554. doi:10.1038/41493
- 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), 296-302. doi:10.1016/j.ceca.2012.04.010
- Divecha, N., Banfic, H., & Irvine, R. F. (1991). The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the

- plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *Embo Journal*, 10(11), 3207-3214.
- Dolmetsch, R. E., Xu, K., & Lewis, R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, 392(6679), 933-936. doi:10.1038/31960
- Donaldson, S. H., Picher, M., & Boucher, R. C. (2002). Secreted and cell-associated adenylate kinase and nucleoside diphosphokinase contribute to extracellular nucleotide metabolism on human airway surfaces. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26(2), 209-215. doi:10.1165/ajrcmb.26.2.4650
- Drago, I., Pizzo, P., & Pozzan, T. (2011). After half a century mitochondrial calcium in- and efflux machineries reveal themselves. *Embo Journal*, 30(20), 4119-4125. doi:10.1038/emboj.2011.337
- Echevarria, W., Leite, M. F., Guerra, M. T., Zipfel, W. R., & Nathanson, M. H. (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nature Cell Biology*, 5(5), 440-446. doi:10.1038/ncb980
- Eder, A., & Bading, H. (2007). Calcium signals can freely cross the nuclear envelope in hippocampal neurons: somatic calcium increases generate nuclear calcium transients. *BMC Neurosci*, 8, 57. doi:10.1186/1471-2202-8-57
- Ellis, R. E., Yuan, J. Y., & Horvitz, H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology*, 7, 663-698. doi:10.1146/annurev.cb.07.110191.003311
- Elmer, P. Retrieved from <http://www.perkinelmer.de>
- Evans, J. H., & Sanderson, M. J. (1999). Intracellular calcium oscillations induced by ATP in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology*, 277(1 Pt 1), L30-41.
- Falcke, M., Hudson, J. L., Camacho, P., & Lechleiter, J. D. (1999). Impact of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> cycling on pattern formation and stability. *Biophysical Journal*, 77(1), 37-44. doi:10.1016/S0006-3495(99)76870-0
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der physik*, 437(1-2), 55-75.
- Foskett, J. K., White, C., Cheung, K. H., & Mak, D. O. (2007). Inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. *Physiol Rev*, 87(2), 593-658. doi:10.1152/physrev.00035.2006
- Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L., & Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res*, 243(2), 359-366. doi:10.1006/excr.1998.4172
- Fox, J. L., Burgstahler, A. D., & Nathanson, M. H. (1997). Mechanism of long-range Ca<sup>2+</sup> signalling in the nucleus of isolated rat hepatocytes. *Biochemical Journal*, 326 ( Pt 2), 491-495.
- Frick, M., Eschertzhuber, S., Haller, T., Mair, N., & Dietl, P. (2001). Secretion in alveolar type II cells at the interface of constitutive and regulated exocytosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25(3), 306-315. doi:10.1165/ajrcmb.25.3.4493

- Gatti, L., & Zunino, F. (2005). Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods Mol Med*, *111*, 127-148. doi:10.1385/1-59259-889-7:127
- Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W. N., Bishop-Stewart, J., Gray, D., & Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes. *Cell Calcium*, *27*(2), 97-106. doi:10.1054/ceca.1999.0095
- Gensburger, C., Freyermuth, S., Klein, C., & Malviya, A. N. (2003). In vivo nuclear Ca<sup>2+</sup>-ATPase phosphorylation triggers intermediate size molecular transport to the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*, *303*(4), 1225-1228.
- Gerasimenko, O., & Gerasimenko, J. (2004). New aspects of nuclear calcium signalling. *Journal of Cell Science*, *117*(Pt 15), 3087-3094. doi:10.1242/jcs.01295
- Gerasimenko, O. V., Gerasimenko, J. V., Tepikin, A. V., & Petersen, O. H. (1995). ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca<sup>2+</sup> from the nuclear envelope. *Cell*, *80*(3), 439-444.
- Giacomello, M., Drago, I., Bortolozzi, M., Scorzeto, M., Gianelle, A., Pizzo, P., & Pozzan, T. (2010). Ca<sup>2+</sup> hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca<sup>2+</sup> mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Molecular Cell*, *38*(2), 280-290. doi:10.1016/j.molcel.2010.04.003
- Gomes, D. A., Rodrigues, M. A., Leite, M. F., Gomez, M. V., Varnai, P., Balla, T., . . . Nathanson, M. H. (2008). c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J Biol Chem*, *283*(7), 4344-4351. doi:10.1074/jbc.M706550200
- Griffiths, E. J., & Rutter, G. A. (2009). Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1787*(11), 1324-1333. doi:10.1016/j.bbabi.2009.01.019
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, *260*(6), 3440-3450.
- Hajnóczky, G., Csordas, G., Madesh, M., & Pacher, P. (2000). The machinery of local Ca<sup>2+</sup> signalling between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol*, *529 Pt 1*, 69-81.
- Hajnóczky, G., Hager, R., & Thomas, A. P. (1999). Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4, 5-trisphosphate receptors by Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem*, *274*(20), 14157-14162.
- Hajnóczky, G., Robb-Gaspers, L. D., Seitz, M. B., & Thomas, A. P. (1995). Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*, *82*(3), 415-424.
- Halestrap, A. P. (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *46*(6), 821-831. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.02.021
- Haller, T., Dietl, P., Pfaller, K., Frick, M., Mair, N., Paulmichl, M., . . . Maly, K. (2001). Fusion pore expansion is a slow, discontinuous, and Ca<sup>2+</sup>-dependent process regulating secretion from alveolar type II cells. *Journal of Cell Biology*, *155*(2), 279-289. doi:10.1083/jcb.200102106
- Hardingham, G. E., Arnold, F. J., & Bading, H. (2001). Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nature Neuroscience*, *4*(3), 261-267. doi:10.1038/85109

- Hennager, D. J., Welsh, M. J., & DeLisle, S. (1995). Changes in either cytosolic or nucleoplasmic inositol 1,4,5-trisphosphate levels can control nuclear  $Ca^{2+}$  concentration. *J Biol Chem*, 270(10), 4959-4962.
- Hetts, S. W. (1998). To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*, 279(4), 300-307.
- Higazi, D. R., Fearnley, C. J., Drawnel, F. M., Talasila, A., Corps, E. M., Ritter, O., . . . Roderick, H. L. (2009). Endothelin-1-stimulated InsP3-induced  $Ca^{2+}$  release is a nexus for hypertrophic signaling in cardiac myocytes. *Molecular Cell*, 33(4), 472-482. doi:10.1016/j.molcel.2009.02.005
- Hirose, K., Kadowaki, S., Tanabe, M., Takeshima, H., & Iino, M. (1999). Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex  $Ca^{2+}$  mobilization patterns. *Science*, 284(5419), 1527-1530.
- Hirst, R. A., Harrison, C., Hirota, K., & Lambert, D. G. (2005). Measurement of  $[Ca^{2+}]_i$  in whole cell suspensions using fura-2. *Methods Mol Biol*, 312, 37-45. doi:10.1385/1-59259-949-4:037
- Hollenbeck, P. J. (1996). The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci*, 1, d91-102.
- Hollopeter, G., Jantzen, H. M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., . . . Conley, P. B. (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*, 409(6817), 202-207. doi:10.1038/35051599
- Horton, H. R., A, M. L., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., & Rawn, J. D. (2008). *Biochemie* (K. Biele, Trans. 4 ed.): Pearson Studium.
- Hu, Q., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Takeda, K., Irani, K., & Ziegelstein, R. C. (2002). Critical role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in generating  $Ca^{2+}$  oscillations in human aortic endothelial cells stimulated by histamine. *J Biol Chem*, 277(36), 32546-32551. doi:10.1074/jbc.M201550200
- Huh, Y. H., Huh, S. K., Chu, S. Y., Kweon, H. S., & Yoo, S. H. (2006). Presence of a putative vesicular inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive nucleoplasmic  $Ca^{2+}$  store. *Biochemistry*, 45(5), 1362-1373. doi:10.1021/bi051837f
- Humbert, J. P., Matter, N., Artault, J. C., Koppler, P., & Malviya, A. N. (1996). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J Biol Chem*, 271(1), 478-485.
- Ichas, F., Jouaville, L. S., & Mazat, J. P. (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*, 89(7), 1145-1153.
- Ichas, F., & Mazat, J. P. (1998). From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1366(1-2), 33-50.
- Ito, M., Shikano, T., Kuroda, K., & Miyazaki, S. (2008). Relationship between nuclear sequestration of PLCzeta and termination of PLCzeta-induced  $Ca^{2+}$  oscillations in mouse eggs. *Cell Calcium*, 44(4), 400-410.

- Jayaraman, T., & Marks, A. R. (1997). T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(6), 3005-3012.
- Jiang, D., Zhao, L., & Clapham, D. E. (2009). Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Science*, *326*(5949), 144-147. doi:10.1126/science.1175145
- Jiang, X., & Wang, X. (2004). Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*, *73*, 87-106. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706
- Jong, Y. J., Kumar, V., Kingston, A. E., Romano, C., & O'Malley, K. L. (2005). Functional metabotropic glutamate receptors on nuclei from brain and primary cultured striatal neurons. Role of transporters in delivering ligand. *J Biol Chem*, *280*(34), 30469-30480. doi:10.1074/jbc.M501775200
- Kiefmann, M. (2012). ADP induces a mitochondrial regulated nuclear Ca<sup>2+</sup> signalling. *Am J Respir Crit Care Med*, *185*.
- Kiefmann, R., Islam, M. N., Lindert, J., Parthasarathi, K., & Bhattacharya, J. (2009). Paracrine purinergic signaling determines lung endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *296*(6), L901-910. doi:10.1152/ajplung.90549.2008
- Kim, J. C., Son, M. J., Subedi, K. P., Kim do, H., & Woo, S. H. (2010). IP<sub>3</sub>-induced cytosolic and nuclear Ca<sup>2+</sup> signals in HL-1 atrial myocytes: possible role of IP<sub>3</sub> receptor subtypes. *Mol Cells*, *29*(4), 387-395. doi:10.1007/s10059-010-0039-6
- Ledeer, R., & Wu, G. (2007). GM1 in the nuclear envelope regulates nuclear calcium through association with a nuclear sodium-calcium exchanger. *Journal of Neurochemistry*, *103 Suppl 1*, 126-134. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04722.x
- Ledeer, R. W., & Wu, G. (2008). Nuclear sphingolipids: metabolism and signaling. *J Lipid Res*, *49*(6), 1176-1186. doi:10.1194/jlr.R800009-JLR200
- Leite, M. F., Thrower, E. C., Echevarria, W., Koulen, P., Hirata, K., Bennett, A. M., . . . Nathanson, M. H. (2003). Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(5), 2975-2980. doi:10.1073/pnas.0536590100
- Lipp, P., Thomas, D., Berridge, M. J., & Bootman, M. D. (1997). Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *Embo Journal*, *16*(23), 7166-7173. doi:10.1093/emboj/16.23.7166
- Lohse, M. J., Nuber, S., & Hoffmann, C. (2012). Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacol Rev*, *64*(2), 299-336. doi:10.1124/pr.110.004309
- Lui, P. P., Chan, F. L., Suen, Y. K., Kwok, T. T., & Kong, S. K. (2003). The nucleus of HeLa cells contains tubular structures for Ca<sup>2+</sup> signaling with the involvement of mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, *308*(4), 826-833.
- Lui, P. P., Kong, S. K., Fung, K. P., & Lee, C. Y. (1998). The rise of nuclear and cytosolic Ca<sup>2+</sup> can be uncoupled in HeLa cells. *Pflugers Arch*, *436*(3), 371-376.
- Lui, P. P., Kong, S. K., Kwok, T. T., & Lee, C. Y. (1998). The nucleus of HeLa cell contains tubular structures for Ca<sup>2+</sup> signalling. *Biochem Biophys Res Commun*, *247*(1), 88-93. doi:10.1006/bbrc.1998.8649

- Marullo, S., & Bouvier, M. (2007). Resonance energy transfer approaches in molecular pharmacology and beyond. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(8), 362-365. doi:10.1016/j.tips.2007.06.007
- Mason, R. J. (2006). Biology of alveolar type II cells. *Respirology*, 11 Suppl, S12-15. doi:10.1111/j.1440-1843.2006.00800.x
- Mason, R. J., Williams, M. C., Widdicombe, J. H., Sanders, M. J., Misfeldt, D. S., & Berry, L. C., Jr. (1982). Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(19), 6033-6037.
- Mazzanti, M., DeFelice, L. J., Cohn, J., & Malter, H. (1990). Ion channels in the nuclear envelope. *Nature*, 343(6260), 764-767. doi:10.1038/343764a0
- McCombs, J. E., & Palmer, A. E. (2008). Measuring calcium dynamics in living cells with genetically encodable calcium indicators. *Methods*, 46(3), 152-159. doi:10.1016/j.ymeth.2008.09.015
- McCormack, J. G., Halestrap, A. P., & Denton, R. M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev*, 70(2), 391-425.
- Miklavc, P., Albrecht, S., Wittekindt, O. H., Schullian, P., Haller, T., & Dietl, P. (2009). Existence of exocytotic hemifusion intermediates with a lifetime of up to seconds in type II pneumocytes. *Biochemical Journal*, 424(1), 7-14. doi:10.1042/BJ20091094
- Miklavc, P., Mair, N., Wittekindt, O. H., Haller, T., Dietl, P., Felder, E., . . . Frick, M. (2011). Fusion-activated Ca<sup>2+</sup> entry via vesicular P2X<sub>4</sub> receptors promotes fusion pore opening and exocytotic content release in pneumocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(35), 14503-14508. doi:10.1073/pnas.1101039108
- Mikoshiha, K. (2007). IP<sub>3</sub> receptor/Ca<sup>2+</sup> channel: from discovery to new signaling concepts. *Journal of Neurochemistry*, 102(5), 1426-1446. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04825.x
- Miyakawa, T., Maeda, A., Yamazawa, T., Hirose, K., Kurosaki, T., & Iino, M. (1999). Encoding of Ca<sup>2+</sup> signals by differential expression of IP<sub>3</sub> receptor subtypes. *Embo Journal*, 18(5), 1303-1308. doi:10.1093/emboj/18.5.1303
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., & Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645), 882-887. doi:10.1038/42264
- Moreau, B., Nelson, C., & Parekh, A. B. (2006). Biphasic regulation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake by cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration. *Current Biology*, 16(16), 1672-1677. doi:10.1016/j.cub.2006.06.059
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3), 355-365.
- Nicholls, D. G. (1974). The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur J Biochem*, 50(1), 305-315.
- Nicotera, P., & Lipton, S. A. (1999). Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19(6), 583-591. doi:10.1097/00004647-199906000-00001

- Novak, I. (2011). Purinergic signalling in epithelial ion transport: regulation of secretion and absorption. *Acta Physiol (Oxf)*, 202(3), 501-522. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02225.x
- O'Brien, E. M., Gomes, D. A., Sehgal, S., & Nathanson, M. H. (2007). Hormonal regulation of nuclear permeability. *J Biol Chem*, 282(6), 4210-4217. doi:10.1074/jbc.M606300200
- Okada, M., Ishimoto, T., Naito, Y., Hirata, H., & Yagisawa, H. (2005). Phospholipase Cdelta1 associates with importin beta1 and translocates into the nucleus in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Febs Letters*, 579(22), 4949-4954. doi:10.1016/j.febslet.2005.07.082
- Palmer, A. E., Jin, C., Reed, J. C., & Tsien, R. Y. (2004). Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(50), 17404-17409. doi:10.1073/pnas.0408030101
- Palmer, A. E., & Tsien, R. Y. (2006). Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nature Protocols*, 1(3), 1057-1065. doi:10.1038/nprot.2006.172
- Palty, R., Silverman, W. F., Hershinkel, M., Caporale, T., Sensi, S. L., Parnis, J., . . . Sekler, I. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(1), 436-441. doi:10.1073/pnas.0908099107
- Parekh, A. B. (2011). Decoding cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(2), 78-87. doi:10.1016/j.tibs.2010.07.013
- Parsons, D. F., Williams, G. R., & Chance, B. (1966). Characteristics of isolated and purified preparations of the outer and inner membranes of mitochondria. *Ann N Y Acad Sci*, 137(2), 643-666.
- Patel, A. S., Reigada, D., Mitchell, C. H., Bates, S. R., Margulies, S. S., & Koval, M. (2005). Paracrine stimulation of surfactant secretion by extracellular ATP in response to mechanical deformation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289(3), L489-496. doi:10.1152/ajplung.00074.2005
- Perez-Terzic, C., Pyle, J., Jaconi, M., Stehno-Bittel, L., & Clapham, D. E. (1996). Conformational states of the nuclear pore complex induced by depletion of nuclear Ca<sup>2+</sup> stores. *Science*, 273(5283), 1875-1877.
- Perez-Terzic, C., Stehno-Bittel, L., & Clapham, D. E. (1997). Nucleoplasmic and cytoplasmic differences in the fluorescence properties of the calcium indicator Fluo-3. *Cell Calcium*, 21(4), 275-282.
- Perez Koldenkova, V., & Nagai, T. (2013). Genetically encoded Ca(2+) indicators: properties and evaluation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1833(7), 1787-1797. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.01.011
- Perlman, C. E., & Bhattacharya, J. (2007). Alveolar expansion imaged by optical sectioning microscopy. *J Appl Physiol (1985)*, 103(3), 1037-1044. doi:10.1152/jappphysiol.00160.2007
- Pian, M. S., Dobbs, L. G., & Duzgunes, N. (1988). Positive correlation between cytosolic free calcium and surfactant secretion in cultured rat alveolar type II cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 960(1), 43-53.

- Picher, M., Burch, L. H., Hirsh, A. J., Spychala, J., & Boucher, R. C. (2003). Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J Biol Chem*, 278(15), 13468-13479. doi:10.1074/jbc.M300569200
- Pickett, J. A., & Edwardson, J. M. (2006). Compound exocytosis: mechanisms and functional significance. *Traffic*, 7(2), 109-116. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00372.x
- Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Di Virgilio, F., Pozzan, T., & Rizzuto, R. (2001). The Ca<sup>2+</sup> concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *Embo Journal*, 20(11), 2690-2701. doi:10.1093/emboj/20.11.2690
- Pizzo, P., Lissandron, V., Capitanio, P., & Pozzan, T. (2011). Ca(2+) signalling in the Golgi apparatus. *Cell Calcium*, 50(2), 184-192. doi:10.1016/j.ceca.2011.01.006
- Poburko, D., & Demaurex, N. (2012). Regulation of the mitochondrial proton gradient by cytosolic Ca(2)(+) signals. *Pflugers Arch*, 464(1), 19-26. doi:10.1007/s00424-012-1106-y
- Przywara, D. A., Bhave, S. V., Bhave, A., Wakade, T. D., & Wakade, A. R. (1991). Stimulated rise in neuronal calcium is faster and greater in the nucleus than the cytosol. *Faseb Journal*, 5(2), 217-222.
- Pusl, T., Wu, J. J., Zimmerman, T. L., Zhang, L., Ehrlich, B. E., Berchtold, M. W., . . . Bennett, A. M. (2002). Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J Biol Chem*, 277(30), 27517-27527. doi:10.1074/jbc.M203002200
- Putney, J. W., Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7(1), 1-12.
- Putney, J. W., Jr., & McKay, R. R. (1999). Capacitative calcium entry channels. *Bioessays*, 21(1), 38-46. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199901)21:1<38::AID-BIES5>3.0.CO;2-S
- Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, 50(3), 413-492.
- Rice, W. R., & Singleton, F. M. (1986). P2-purinoceptors regulate surfactant secretion from rat isolated alveolar type II cells. *Br J Pharmacol*, 89(3), 485-491.
- Rice, W. R., & Singleton, F. M. (1987). P2Y-purinoceptor regulation of surfactant secretion from rat isolated alveolar type II cells is associated with mobilization of intracellular calcium. *Br J Pharmacol*, 91(4), 833-838.
- Rich, P. B., Douillet, C. D., Mahler, S. A., Husain, S. A., & Boucher, R. C. (2003). Adenosine triphosphate is released during injurious mechanical ventilation and contributes to lung edema. *J Trauma*, 55(2), 290-297. doi:10.1097/01.TA.0000078882.11919.AF
- Riteau, N., Gasse, P., Fauconnier, L., Gombault, A., Couegnat, M., Fick, L., . . . Couillin, I. (2010). Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 182(6), 774-783. doi:10.1164/rccm.201003-0359OC

- Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., & Pozzan, T. (1993). Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*, 262(5134), 744-747.
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefani, D., . . . Pinton, P. (2009). Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1787(11), 1342-1351. doi:10.1016/j.bbabbio.2009.03.015
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., . . . Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science*, 280(5370), 1763-1766.
- Robson, S. C., Sevigny, J., & Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*, 2(2), 409-430. doi:10.1007/s11302-006-9003-5
- Rodrigues, M. A., Gomes, D. A., Andrade, V. A., Leite, M. F., & Nathanson, M. H. (2008). Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology*, 48(5), 1621-1631. doi:10.1002/hep.22424
- Rodrigues, M. A., Gomes, D. A., Leite, M. F., Grant, W., Zhang, L., Lam, W., . . . Nathanson, M. H. (2007). Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J Biol Chem*, 282(23), 17061-17068. doi:10.1074/jbc.M700490200
- Schafer, R., Hartig, R., Sedehizade, F., Welte, T., & Reiser, G. (2006). Adenine nucleotides inhibit proliferation of the human lung adenocarcinoma cell line LXF-289 by activation of nuclear factor kappaB1 and mitogen-activated protein kinase pathways. *Febs Journal*, 273(16), 3756-3767. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05384.x
- Schafer, R., Sedehizade, F., Welte, T., & Reiser, G. (2003). ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285(2), L376-385. doi:10.1152/ajplung.00447.2002
- Schicker, K., Hussl, S., Chandaka, G. K., Kosenburger, K., Yang, J. W., Waldhoer, M., . . . Boehm, S. (2009). A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793(2), 325-334. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.09.014
- Shi, Y., Jiang, C., Chen, Q., & Tang, H. (2003). One-step on-column affinity refolding purification and functional analysis of recombinant human VDAC1. *Biochem Biophys Res Commun*, 303(2), 475-482.
- Shirakawa, H., & Miyazaki, S. (1996). Spatiotemporal analysis of calcium dynamics in the nucleus of hamster oocytes. *J Physiol*, 494 ( Pt 1), 29-40.
- Shoshan-Barmatz, V., Israelson, A., Brdiczka, D., & Sheu, S. S. (2006). The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des*, 12(18), 2249-2270.
- Sohal, R. S., & Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 273(5271), 59-63.
- Spring, K. R. Fluorescence Microscopy.

- Stoffler, D., Goldie, K. N., Feja, B., & Aebi, U. (1999). Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time-lapse atomic force microscopy. *J Mol Biol*, 287(4), 741-752. doi:10.1006/jmbi.1999.2637
- Szalai, G., Krishnamurthy, R., & Hajnoczky, G. (1999). Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *Embo Journal*, 18(22), 6349-6361. doi:10.1093/emboj/18.22.6349
- Tahara, E. B., Navarete, F. D., & Kowaltowski, A. J. (2009). Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med*, 46(9), 1283-1297. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.008
- Teruel, M. N., Chen, W., Persechini, A., & Meyer, T. (2000). Differential codes for free Ca(2+)-calmodulin signals in nucleus and cytosol. *Current Biology*, 10(2), 86-94.
- Tinel, H., Cancela, J. M., Mogami, H., Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., Tepikin, A. V., & Petersen, O. H. (1999). Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca(2+) signals. *Embo Journal*, 18(18), 4999-5008. doi:10.1093/emboj/18.18.4999
- Tombes, R. M., Simerly, C., Borisy, G. G., & Schatten, G. (1992). Meiosis, egg activation, and nuclear envelope breakdown are differentially reliant on Ca<sup>2+</sup>, whereas germinal vesicle breakdown is Ca<sup>2+</sup> independent in the mouse oocyte. *Journal of Cell Biology*, 117(4), 799-811.
- Tran, Q. K., Ohashi, K., & Watanabe, H. (2000). Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 48(1), 13-22.
- Visnjic, D., & Banfic, H. (2007). Nuclear phospholipid signaling: phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phosphoinositide 3-kinase. *Pflugers Arch*, 455(1), 19-30. doi:10.1007/s00424-007-0288-1
- von Kugelgen, I., & Hoffmann, K. (2016). Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*, 104, 50-61. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.10.030
- Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., & Boldin, M. P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*, 17, 331-367. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.331
- Wang, H., & Clapham, D. E. (1999). Conformational changes of the in situ nuclear pore complex. *Biophysical Journal*, 77(1), 241-247. doi:10.1016/S0006-3495(99)76885-2
- Waring, P. (2005). Redox active calcium ion channels and cell death. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 434(1), 33-42. doi:10.1016/j.abb.2004.08.001
- Watt, W. C., Lazarowski, E. R., & Boucher, R. C. (1998). Cystic fibrosis transmembrane regulator-independent release of ATP. Its implications for the regulation of P2Y<sub>2</sub> receptors in airway epithelia. *J Biol Chem*, 273(22), 14053-14058.

- Waypa, G. B., & Schumacker, P. T. (2002). O<sub>2</sub> sensing in hypoxic pulmonary vasoconstriction: the mitochondrial door re-opens. *Respir Physiol Neurobiol*, *132*(1), 81-91.
- Woods, N. M., Cuthbertson, K. S., & Cobbold, P. H. (1986). Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature*, *319*(6054), 600-602. doi:10.1038/319600a0
- Xie, X., Wu, G., Lu, Z. H., & Ledeen, R. W. (2002). Potentiation of a sodium-calcium exchanger in the nuclear envelope by nuclear GM1 ganglioside. *Journal of Neurochemistry*, *81*(6), 1185-1195.
- Yamamoto, K., Korenaga, R., Kamiya, A., & Ando, J. (2000). Fluid shear stress activates Ca<sup>2+</sup> influx into human endothelial cells via P2X<sub>4</sub> purinoceptors. *Circulation Research*, *87*(5), 385-391.
- Yan, Y., Liu, J., Wei, C., Li, K., Xie, W., Wang, Y., & Cheng, H. (2008). Bidirectional regulation of Ca<sup>2+</sup> sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*, *77*(2), 432-441. doi:10.1093/cvr/cvm047
- Yoo, S. H., Chu, S. Y., Kim, K. D., & Huh, Y. H. (2007). Presence of secretogranin II and high-capacity, low-affinity Ca<sup>2+</sup> storage role in nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> store vesicles. *Biochemistry*, *46*(50), 14663-14671. doi:10.1021/bi701339m
- Yoo, S. H., Huh, Y. H., Huh, S. K., Chu, S. Y., Kim, K. D., & Hur, Y. S. (2014). Localization and projected role of phosphatidylinositol 4-kinases IIalpha and IIbeta in inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup>(+) store vesicles. *Nucleus*, *5*(4), 341-351. doi:10.4161/nucl.29776
- Zalk, R., Israelson, A., Garty, E. S., Azoulay-Zohar, H., & Shoshan-Barmatz, V. (2005). Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *Biochemical Journal*, *386*(Pt 1), 73-83. doi:10.1042/BJ20041356
- Zhang, S., Fritz, N., Ibarra, C., & Uhlen, P. (2011). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype-specific regulation of calcium oscillations. *Neurochem Res*, *36*(7), 1175-1185. doi:10.1007/s11064-011-0457-7
- Zhu, L., Luo, Y., Chen, T., Chen, F., Wang, T., & Hu, Q. (2008). Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency regulates agonist-stimulated gene expression in vascular endothelial cells. *Journal of Cell Science*, *121*(Pt 15), 2511-2518. doi:10.1242/jcs.031997
- Zhu, L., Song, S., Pi, Y., Yu, Y., She, W., Ye, H., . . . Hu, Q. (2011). Cumulated Ca<sup>2+</sup> spike duration underlies Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency-regulated NFkappaB transcriptional activity. *Journal of Cell Science*, *124*(Pt 15), 2591-2601. doi:10.1242/jcs.082727

## **10. Danksagung**

Herrn Professor Dr. Kiefmann und Frau Dr. Kiefmann danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die Betreuung dieser Arbeit, sowie für die Hilfe und Unterstützung sowohl bei den täglichen praktischen Tätigkeiten im Labor als auch beim Verfassen dieser Arbeit.

Frau M. Weber, Frau C. Lüchau, Frau K. Pfeiffer-Drenkhahn und Frau A. Pawelczyk danke ich für die hervorragende Einarbeitung im Labor und die folgende tägliche Unterstützung bei der praktischen Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Frau M. Weber, die darüber hinaus zu einer Freundin wurde.

Ich danke außerdem besonders Frau H. Cuvenhaus, Herrn C. Cuvenhaus, Frau E. Cuvenhaus, Herrn H. Cuvenhaus, Herrn C. Runge, Frau M. Sander und Frau F. Ebert, die mich beim Verfassen dieser Dissertation motiviert und vielseitig unterstützt haben.

## **11. Lebenslauf**

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.



## 12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

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