Universität Ulm
Institut für Allgemeine Physiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Paul Dietl

Streptolysin-induzierte Zellschädigung humaner respiratorischer Epithelien

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Johanna Kiss
Heidenheim

2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Dietl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Grissmer

Tag der Promotion: 14.11.2013

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis II
1 Einleitung 1
1.1 Streptokokken 1
1.2 Streptolysin O 2
1.3 Flüssigkeitshomöostase in den distalen Atemwegen 4
1.4 Makrolidantibiotika 6
1.5 Ziele der Arbeit 7
2 Material und Methoden 8
2.1 Materialien 8
2.2 Statistische Analyse 10
2.3 Streptolysin O 10
2.4 Zellkultur 11
2.5 Widerstandsmessung 14
2.6 Chemolumineszenz-Messung 15
2.7 Propidium-Iodid-Färbung 18
2.8 Polymerase Kettenreaktion 19
2.9 Ussing-Kammer 24
3 Ergebnisse 27
3.1 Transporteigenschaften von H441-Zellen 27
3.2 Primärkultur von Zellen der oberen Atemwege aus humanem polypoidem Gewebe 33
3.3 SLO-Effekte auf epitheliale Zellkulturen 39
4 Diskussion 57
4.1 Zellkulturen 57
4.2 Streptolysin O 58
4.3 Regulation des Epithelialen Natriumkanals 59
4.4 Auswirkung von Pathogenen auf die Flüssigkeitsclearance der Atemwege 64
4.5 Immunologische Effekte durch SLO 65
5 Zusammenfassung 70
6 Literaturverzeichnis 71
Anhang 83
Abbildungsverzeichnis 83
Tabellenverzeichnis 85
Formelverzeichnis 86
Curriculum vitae 87

Abkürzungsverzeichnis

ALI	acute lung injury; akute Lungenschädigung
ARDS	acute respiratory distress syndrome; akutes Atemnotsyndrom
ASL	airway surface liquid; Flüsigkeitsfilm der Atemwege
AT II-Zellen	alveoläre Typ II-Zellen
AT I-Zellen	alveoläre Typ I-Zellen
C. pneumoniae	Chlamydia pneumoniae
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAP1	channel-activating protease; kanalaktivierende Protease
CCL	Chemokin Ligand
CCR	Chemokin Rezeptor
CDC	cholesterol-depending cytolysin; cholesterolanhängiges Zytolysin
CDK	Cyclin-dependent Kinase; Cyclinabhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
CF	Cystische Fibrose, Mucoviszidose
CFTR	Cystische Fibrose Transmembranregulator Protein
CK	Cytokeratin
COPD	chronic obstructive pulmonary disease; chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX	Cyclooxigenase
ct	cycle threshold, schwellenwertüberschreitender Zyklus
CXCR	CXC-Motiv-Chemokin Rezeptor
Cyc	Cyclin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribunucleinsäure
DPB	Diffuse Panbronchiolitis
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetic acid; Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor; epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EGTA	Ethylenglycoltetraacetic acid; Ethylenglycoltetraessigsäure
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
FCS	fetal calf serum; fetales Kälberserum
FGFR	Fibroblast growth factor receptor; Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor
FOX J1	Forkhead box J1
H. influenzae	Haemophilus influencae
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HNO	Hals-Nasen-Ohren
I.U	international units; internationale Einheiten
IC_{50}	mittlere inhibitorische Konzentration
IGFR	Insulin-like growth factor receptor; insulinähnlicher Wachstumsfaktor Rezeptor
IL	Interleukin
IPD	invasive pneumococcal disease; invasive Pneumokokken-Erkrankungen
I_{SC}	Short circuit current; Kurzschlussstrom
$I_{SC,amil}$	amiloridsensitiver Kurzschlusstrom
ITS	Insulin, Transferrin, Sodium-Selenit
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid

MAPK	mitogen-activated Protein Kinase; mitogenaktivierte Proteinkinase
MEK	MAP Kinase/extracellular signal-regulated Kinase Kinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MUC	Mucin
N	Anzahl
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OCLN	Occludin
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PAMP	pathogen associated molecular pattern; pathogen-assoziertes molekulares Muster
PBS	phosphate buffered saline; phosphatgepufferte Salzlösung
PCL	periciliary liquid layer; periciliäre Flüssigkeitsschicht
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PK	Proteinkinase
p-value	probability-value, Wahrscheinlichkeitswert
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. pneumoniae	Streptococcus pneumoniae
S. pyogenes	Steptococcus pyogenes
SEM	Standard error of the mean; Standardabweichung des Mittelwerts
SLO	Streptolysin O
SP	Surfactant Protein
SPLUNC1	short palate lung and nasal epithelial clone 1
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand
TGF	Tumor growth factor; Tumorwachstumsfaktor
TLR	Toll like Rezeptor
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
TSS	Toxic shock syndrom; toxisches Schocksyndrom
TUB β4	Tubulin β4
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor, Gefäßendothel-Wachstumsfaktor R.
VIM	Vimentin
V_{TE}	transepitheliale Spannung

1 Einleitung

1.1 Streptokokken

Streptokokken sind häufige Erreger einer Vielzahl lokaler und invasiver Erkrankungen. Allein an von *Streptococcus pneumoniae* verursachten Infektionen versterben jedes Jahr etwa zwei Millionen Menschen. Vor allem ältere, immunsupprimierte Menschen sind gefährdet, an einer durch *S. pneumoniae* verursachten Pneumonie, Meningitis oder Mittelohrentzündung zu erkranken. Über 90% aller Lobärpneumonien werden durch *S. pneumoniae* verursacht [69]. Hierbei füllen sich die Luftwege eines Lungenabschnitts mit entzündlichem Exsudat. Es kann sich eine Akute Lungenschädigung (acute lung injury, ALI) bis hin zu einem lebensbedrohlichen Akuten Atemnotsyndrom (acute respiratory distress syndrome, ARDS) entwickeln.

Streptococcus pyogenes, ein Bakterium der Serogruppe A, verursacht lokale Erkrankungen vor allem des oberen Respirationstrakts (Tonsillopharyngitis, Sinusitis, Otitis media) und der Haut (Impetigo contagiosa, Erysipel) [49]. Bei Einschwemmung der Bakterien in die Blutbahn kann es zur generalisierten Streptokokken-Sepsis kommen. *S. pyogenes* produziert eine Reihe von zellwandständigen sowie sezernierbaren Substanzen, die als Virulenzfaktoren wirken und sowohl die Pathogenität der Erreger erhöhen, indem sie dazu beitragen, die Abwehrmechanismen des Wirtes (siehe Abbildung 1) zu umgehen, als auch eigenständige, toxinvermittelte Krankheiten auslösen. Beispiele hierfür sind Scharlach und das Streptokokken-Toxic-Shock-Syndrome (TSS) [23, 85]. Im Anschluss an eine Streptokokkeninfektion kann es als Komplikation zu einem autoimmun vermittelten Akuten rheumatischen Fieber mit Beteiligung von Herzmuskulatur und Gelenken sowie zu einer Akuten Glomerulonephritis kommen.

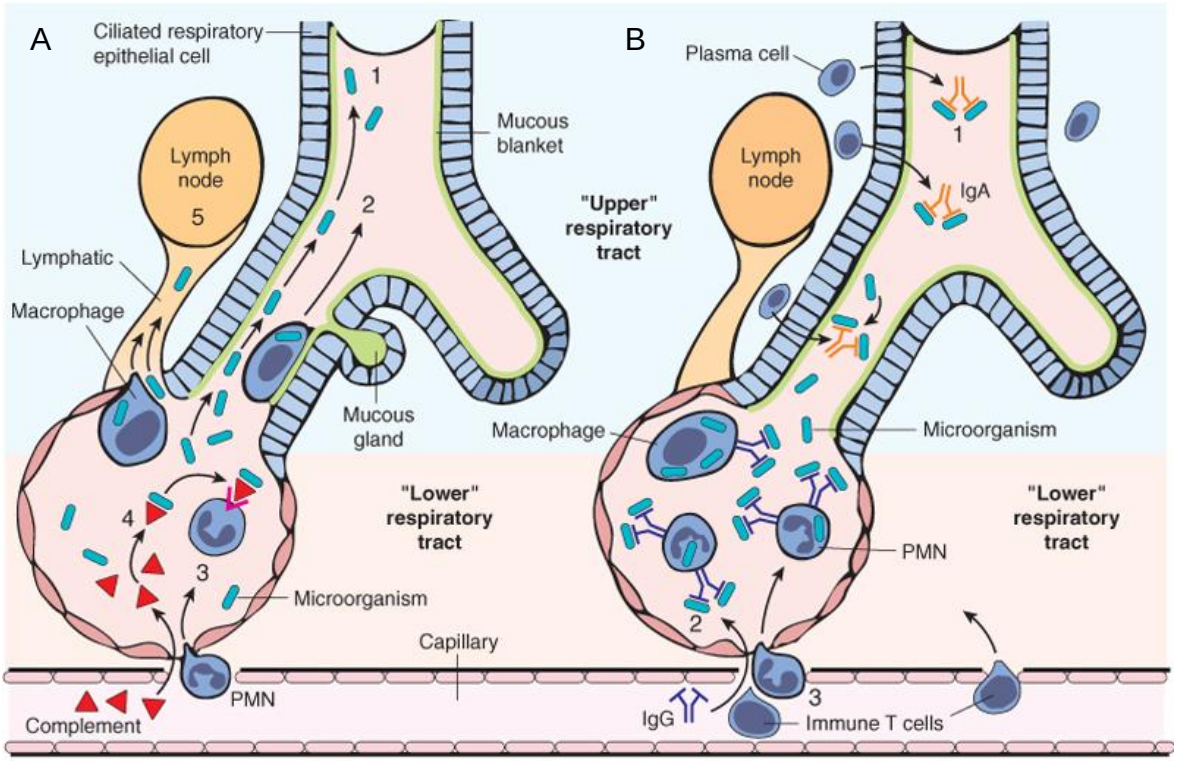


Abbildung 1: Abwehrmechanismen der Atemwege. A) Angeborenes Immunsystem: Pathogene werden mittels Mucociliärer Clearance, Phagozytose durch Makrophagen und Neutrophile und Opsonisierung durch lösliche Komplementfaktoren eliminiert. B) Die adaptive Immunantwort trägt durch spezifische über Schleimhäute sezernierte (IgA) und über den Blutweg zirkulierende Antikörper (IgG und IgM) und einwandernde Lymphozyten (T-Zellen und Plasmazellen) zur Abwehr von Pathogenen bei. PMN: Polymorphnukleäre Zellen, IgA: Immunglobulin A, IgG: Immunglobulin G. Abbildung aus [69].

1.2 Streptolysin O

Einen wichtigen von *S. pyogenes* sezernierten Virulenzfaktor stellt Streptolysin O dar [121]. Er erhöht die Mortalität invasiver Streptokokkenerkrankungen [65]. SLO gehört zur Gruppe der porenbildenden Zytolysine [133]. Diese binden an cholesterolreiche Zellmembranen (cholesterol-depending cytolysins, CDCs) und bilden durch Oligomerisierung Poren, welche die Integrität der Zellmembran zerstören [94]. Dies führt zur Veränderung der Flüssigkeitshomöostase in den distalen Atemwegen, was zur Flüssigkeitsretention bis hin zum ARDS beiträgt. Zudem wird die Invasion des Erregers in das Lungengewebe und somit die Verteilung im Organismus befördert. Über den zytotoxischen Effekt hinaus führen bereits sublytische SLO-Konzentrationen zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen durch epitheliale Zellen [105] und Zellen des Immunsystems, sowie zu einer Invasion von Neutrophilen und Makrophagen.

Der lytische Effekt der Mitglieder der Gruppe der porenbildenden Zytolysine, zu denen unter anderem auch Pneumolysin, Perfringolysin und Listeriolysin gehören,

wurde bereits 1966 beobachtet [37]. Diese bakteriellen Pathogenitätsfaktoren weisen eine hohe strukturelle und funktionelle Homologie auf [62, 94] und ähneln sich in ihren biologischen und immunologischen Eigenschaften.

Tabelle 1: Charakteristische Größen von Streptolysin O. Angaben aus [9, 10, 16, 62, 92].

Molekulargewicht	61,5 kDa
Polypeptidlänge	538 Aminosäuren
Oligomergröße	25-80 Monomere
Porengröße	bis 30 nm

Die Membranschädigung durch CDCs geschieht durch Bindung löslicher Monomere an cholesterolreiche Regionen der Zielmembran und nachfolgende Oligomerisierung (siehe Formel 1) [84, 119, 133]. Die reversible Membranbindung wird über die tryptophanreiche C-terminale Domäne 4 des Moleküls vermittelt [142]. Dabei erfolgt eine Konformationsänderung des Moleküls, welche die irreversible Oligomerisierung und Porenbildung erst ermöglicht [93, 132]. Durch die allosterische Transition, die nur bei Kontakt mit der cholesterolhaltigen Zielmembran erfolgen kann, wird eine Bildung von Oligomeren in Lösung oder auf ungeeigneten Oberflächen verhindert [1].

Formel 1: Model der Oligomerisierung von Streptolysin O. Nach [92].

$$\mathrm{Monomer}_{\mathrm{gelöst}} \leftrightarrow \mathrm{Monomer}_{\mathrm{gebunden}} \rightarrow \mathrm{Oligomer}$$

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen wird deutlich, dass die Anlagerung weiterer Monomere, welche durch laterale Diffusion innerhalb der Zellmembran geschieht, zur Ausbildung von Bogen- und Ringstrukturen führt (siehe Abbildung 2) [84]. Die halbmondförmigen Oligomere werden auf der einen Seite durch Streptolysinmoleküle gebildet; ihnen gegenüber liegt eine freie Lipidkante [91]. Sie stellen bereits stabile, funktionelle Poren dar, die den Durchtritt von Ionen und Makromolekülen gestatten [10, 53], und können durch Anlagerung weiterer Monomere zu ringförmigen Poren erweitert werden [91].

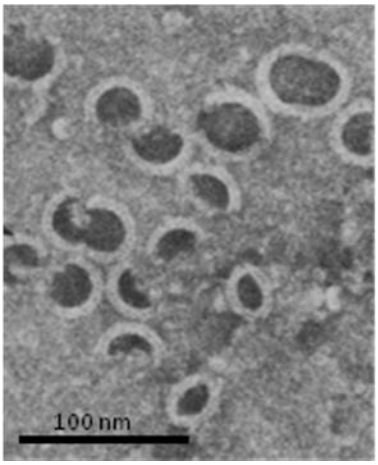


Abbildung 2: Durch SLO lysierte Erythrozyten, elektronenmikroskopische Aufnahme. Deutlich sichtbar sind die bogen- und kreisförmigen Läsionen, welche von SLO-Oligomeren umrandet werden. SLO: Streptolysin O. Abbildung modifiziert nach [10].

1.3 Flüssigkeitshomöostase in den distalen Atemwegen

Um die Lungenfunktion zu gewährleisten, müssen Atemwege und Alveoli mit einem Flüssigkeitsfilm, der sogenannten apikalen Oberflächenflüssigkeit (apical surface liquid, ASL) ausgekleidet sein. Das ASL-Volumen muss dabei genauestens reguliert werden [130].

Die ASL kann in zwei Phasen unterteilt werden (siehe Abbildung 3): Der periziliäre Anteil (periciliary liquid, PCL) bildet eine 7 µm dicke Schicht, die die apikalen Kinozilien des Atemwegepithels umgibt. Der zweite, variablere Anteil bildet die Mucusschicht und besteht aus Wasser, Salzen und Muzinen. Er stellt das Volumenreservoir für die PCL dar [129]. Dadurch kann die Mucociliäre Clearance, welche eine Mindesthöhe an PCL erfordert, beim gesunden Menschen über weite Bereiche aufrechterhalten werden. Der Mucustransport wird durch den Zilienschlag in proximale (=orale) Richtung erzeugt und trägt zur Reinigung der Atemwege und zur Abwehr von Pathogenen bei (siehe Abbildung 1 und Abbildung 3).

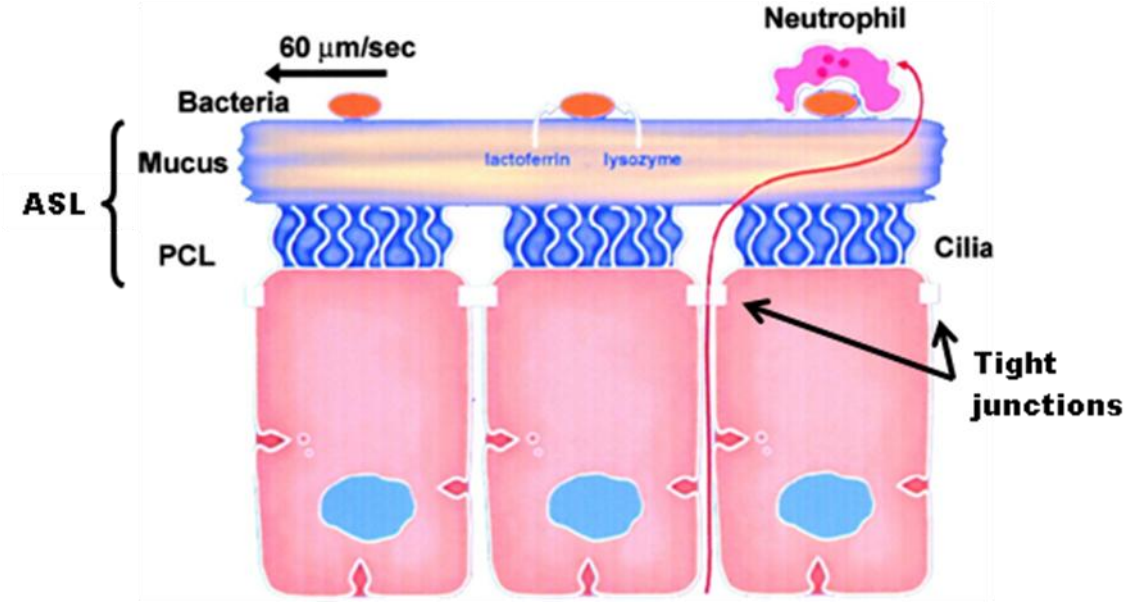


Abbildung 3: Mucociliäre Clearance. Die PCL bildet eine Schicht mit niedrigem Widerstand, die effektive Zilienschläge ermöglicht und ein Anhaften der Mucusschicht an der Oberfläche des respiratorischen Epithels verhindert. Durch Zilienschlag erfolgt der Transport der Mucusschicht in proximale Richtung. PCL: periciliary liquid layer, ASL: airway surface liquid. Abbildung modifiziert nach [13].

Der zur Regulation des ASL-Volumens notwendige transepitheliale Flüssigkeitstransport ist ein aktiver Vorgang [129], der durch das polarisierte Epithel der distalen Atemwege und das alveolaren Epithel ausgeführt wird. Die treibende Kraft im aktiven Transport stellt die basolateral lokalisierte Na^+K^+ATPase dar. Sie baut das nötige Transmembran- bzw. transzelluläre Potential auf, dem Na^+-Ionen passiv nachfolgen. Wasser strömt osmotisch - durch Wasserkanäle, sogenannte Aquaporine, transzellulär oder durch Lücken der Tight junctions - nach [29].

Störungen des Flüssigkeitstransports führen zu pathologischen Zuständen: Beim Ödem ist die Lunge nicht in der Lage, die Flüssigkeitsclearance im nötigen Ausmaß aufrecht zu erhalten; es kommt zur Überflutung der Atemwege mit Flüssigkeit und in der Konsequenz zur Verschlechterung des Gasaustauschs [78]. Im Gegensatz dazu kann eine Hyperabsorption von PCL, wie sie bei der Cystischen Fibrose auftritt [71], zu einer Verschlechterung der Mucociliären Clearance führen. Da diese einen essentiellen Bestandteil der angeborenen Immunität darstellt (siehe Abbildung 1), kann daraus eine Obstruktion, Inflammation und Infektion der Atemwege resultieren [13].

Die Regulation der Flüssigkeits-Clearance in der Lunge erfolgt unter physiologischen und pathologischen Bedingungen über katecholaminabhängige und -unabhängige Mechanismen [115].

Prinzipiell kann der transzelluläre Transport auf zahlreichen Ebenen, transkriptionell, translationell und post-translationell gesteuert werden [32]. Den größten Einfluss hierbei haben Mechanismen, die den Epithelialen Natriumkanal ENaC betreffen. Dessen Expression und Funktion stellt den geschwindigkeitslimitierenden Faktor dar [18].

1.4 Makrolidantibiotika

Makrolide sind eine Gruppe bakteriostatischer Antibiotika, welche ursprünglich als Stoffwechselprodukt von *Streptomyces*-Spezies isoliert wurden. Heute existieren zahlreiche halbsynthetische Derivate. Die chemische Struktur zeichnet sich durch einen macrocyclischen Laktonring mit einem oder mehreren Zuckerresten aus [60]. Die für gewöhnlich klinisch eingesetzten Substanzen sind aus einem 14- bis 16-gliedrigem Ringsystem mit Modifikationen oder Austausch chemischer Gruppen aufgebaut (siehe Abbildung 4) [22].

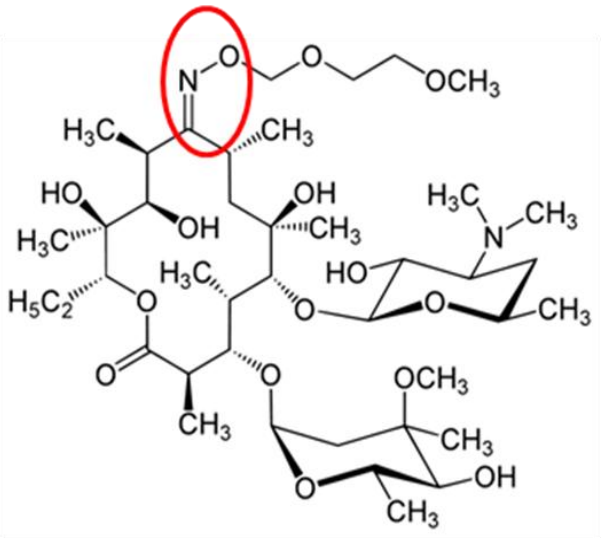


Abbildung 4: Strukturformel von Roxithromycin, einem Vertreter der Makrolidklasse mit 14-gliedrigem Laktonring. Die 9-CO-Gruppe wird zu einer Oximgruppe (C=N−OH) umgewandelt.

Der antibakterielle Mechanismus der Makrolide beruht auf der Inhibition der bakteriellen Proteinsynthese [148]. Seit den 1950er Jahren, als Erythromycin A als erstes 14-gliedriges Makrolid isoliert wurde [141], wird diese Substanzgruppe vor allem bei chronischen Erkrankungen der Atemwege mit inflammatorischer Komponente eingesetzt [47, 60]. Hierbei zeigte sich nicht nur die gute antibakterielle Wirkung gegen typische Erreger von Atemwegsinfektionen wie z.B. *S. aureus*, *H. influenzae*, *Streptococcus species*, *Corynebacterium diphteriae*, *Bordetella pertussis*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* und *Legionella species* [60] und die gute Ver-

träglichkeit, die die Substanzgruppe vor allem für die Anwendung bei Kindern prädestinierte [63]. Es wurde darüber hinaus bald deutlich, dass vor allem 14- und 15-gliedrige Substanzen wie Roxithromycin, Clarithromycin und Azithromycin immunmodulatorische und immunsuppressive Effekte zeigten, die sich positiv auf den Verlauf chronischer, inflammatorischer Erkrankungen auswirken [22].

1.5 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Zellmodelle für Epithelien verschiedener Abschnitte des Respirationstraktes zu etablieren. Dabei sollten humane distale Atemwegsepithelien (NCI-H441-Zellen) unter verschiedenen Kulturbedingungen, unter anderem als realitätsnahe air-liquid-Kultur, kultiviert werden. Um ein Zellmodell der proximalen Atemwege zu erhalten, wurde die Primärkultur humaner polypoider Zellen angestrebt.

An diesen Zellmodellen sollten die zytotoxischen und proinflammatorischen Effekte des SLO untersucht werden. Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit den Fragestellungen, in welchem Ausmaß verschiedene Antibiotika aus der Gruppe der Makrolide den zytotoxischen Effekt des Streptolysins verringern können. Darüber hinaus sollten mögliche Einflüsse auf den transepithelialen Ionen- und Flüssigkeitstransport aufgeklärt werden. Die SLO-sezernierenden Bakterien könnten von der Produktion eines zähen Sekrets profitieren, welches eine Elimination der Erreger aus dem Respirationstrakt erschwert (siehe Abbildung 1).

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien. PCR: Polymerase Kettenreaktion.

24-well-Platten	SARSTEDT, Nümbrecht, GER
8-Kammer-Objektträger	Ibidi, Verona, WI, USA
96-well-Platten	Nunc, Langenselbold, GER
96-well-Platten	SARSTEDT, Nümbrecht, GER
CryoTube™ Vials 1 ml	Nunc, Langenselbold, GER
Einmalskalpelle	B.Braun,Melsungen, GER
Falcon tubes 15 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, GER
Falcon tubes 50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, GER
PCR Folie	SARSTEDT, Nümbrecht, GER
Petrischalen	Nunc, Langenselbold, GER
Pipetten	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Pipettenspitzen	SARSTEDT, Nümbrecht, GER
RNase ZAP®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Safe Seal Tubes 1,5 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, GER
Transwell-Filter 3470	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
twin.tec real-time PCR plates 96	Eppendorf, Hamburg, GER
Zellkulturflaschen, 25 cm^2	SARSTEDT, Nümbrecht, GER

Tabelle 3: Geräte. CCD: Charge-coupled Device, PCR: Polymerase Kettenreaktion, RT-PCR: Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion.

CCD-Kamera CoolSNAP EZ	Photometrics, Tucson, AZ, USA
Easy-mount Diffusionskammern	Physiologic Instruments, SanDiego, USA
Environmental Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA
Filtersets für Fluoreszenzmikroskopie	Chroma Technology Corp., Bellows Falls, VT, USA
Gefrierschrank Forma 900 Series	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Inkubator HERAcell 150	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Mikroplattenleser infinite M200	Tecan, Männedorf, CH
Mikroskop Axio Observer.Z1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, GER
Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, GER
Ohmmeter	World Precision Instruments, Sarasota, USA
PCR-Gerät Mastercycler epgradient S realplex	Eppendorf, Hamburg, GER
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, GER
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, GER
RT-PCR-Gerät primus96 advanced	PEQLAB, Erlangen, GER
Safeflow 1.2 Biologische Sicherheitswerkbank	Nunc, Langenselbold, GER
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, GER
Zentrifuge Labofuge 400e	Heraeus Instruments, Hanau, GER

Tabelle 4: Zellkulturmedien. DMEM: Dulbecco´s Modified Eagle Medium, ITS: Insulin, Transferrin, Sodium-Selenit, Na^+: Natrium, PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung.

Airway Epithelial Cell Basal Medium	PromoCell, Heidelberg, GER
Airway Epithelial Growth Medium (Supplement)	PromoCell, Heidelberg, GER
Caco 2 Transportpuffer	Gibco, Darmstadt, GER
DMEM/Ham F12 + L-Glutamin	Gibco, Darmstadt, GER
Fetal bovine serum	HyClone Perbio, Bonn, GER
ITS liquid media supplement	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Na^+-Pyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin, GER
PC 1™	BioWhittaker Lonza, Köln, GER
RPMI 1640 + L-Glutamin	PAN-Biotech, Aidenbach, GER

Tabelle 5: Chemikalien. DMSO: Dimethylsulfoxid, EGTA: Ethylenglykoltetraessigsäure, HEPES: Hydroxyethylpiperazinyl-Ethansulfonsäure, KCl: Kaliumchlorid, $MgCl_2$: Magnesiumchlorid, NaCl: Natriumchlorid, EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure.

5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Amilorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Azithromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bacillol® AF	BODE Chemie, Hamburg, GER
Benzamil	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Clarithromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Digitonin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EGTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Erythromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hoechst-Farbstoff 33342	Invitrogen, Eugene, OR, USA
Isopropanol	Klinikapotheke Universität Ulm, GER
KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Matrigel™	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
$MgCL_2$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ouabain	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phenamil	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Propidium-Iodid	Abcam, Cambridge, UK
Protease XIV	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Roxithromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Spiramycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Streptolysin O	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA Lösung 0,25%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Wasser für molekularbiologische Zwecke	Carl Roth, Karlsruhe, GER

Tabelle 6: Kits. CDK: Cyclinabhängige Kinase, MAPK: Mitogenaktivierte Proteinkinase, PK: Proteinkinase, RTK: Rezeptor Tyrosinkinase.

CDK-Inhibitoren	BIAFFIN, Kassel, GER
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	Promega Corporation, Madison, USA
Express SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix	Invitrogen, Eugene, OR, USA
MAPK-Inhibitoren	BIAFFIN, Kassel, GER
PK-Inhibitoren	BIAFFIN, Kassel, GER
QIAshredder	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QuantiTect® Primer Assay	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Rneasy® Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RTK-Inhibitoren	BIAFFIN, Kassel, GER
SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Eugene, OR, USA

Tabelle 7: Software. PCR: Polymerase Kettenreaktion.

Excel 2007	Microsoft, Redmond, WA, USA
Igor Pro 5.0.4.8	WaveMetrics, Portland, OR , USA
LabVIEW software package	National Instruments, München, GER
MetaMorph 7.5.5.0	MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA
PCR-Programm realplex	Eppendorf, Hamburg, GER
Platereader-Programm Tecan i-control	Tecan, Männedorf, CH
Word 2007	Microsoft, Redmond, WA, USA

2.2 Statistische Analyse

Soweit nicht anders beschrieben, sind alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

Um die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen verschiedenen experimentellen Gruppen zu ermitteln, wurden zweiseitige, studentische t-Tests angewandt; dabei wurden p-Werte von $p<0,05$ als signifikant erachtet.

2.3 Streptolysin O

Streptolysin O (SLO) wurde unmittelbar vor Verwendung aktiviert, indem es in Kontrolllösung mit 5 mM Dithiothreitol (DTT) gelöst wurde, wodurch Disulfidbrücken reduziert wurden. Oxidation durch Luftsauerstoff vermindert die SLO-Aktivität. Die Thiolaktivierung sollte daher unmittelbar vor Verwendung des SLO geschehen. Für die Kontrolllösung wurden die Substanzen laut Tabelle 8 in destilliertem Wasser gelöst und die Lösung mit NaOH auf pH 7,4 titriert.

Tabelle 8: Kontrolllösung. NaCl: Natriumchlorid, KCl: Kaliumchlorid, HEPES: Hydroxyethyl-piperazinyl-Ethansulfonsäure, $MgCl_2$: Magnesiumchlorid, EGTA: Ethylenglykoltetraessigsäure.

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	140
KCl	5
HEPES	10
$MgCl_2$	1
EGTA	10
Glucose	5

2.4 Zellkultur

2.4.1 H441-Zellen

Für die Experimente wurden als permanente Zelllinie humane distale Atemwegsepithelien (NCI-H441) verwendet, die sich von einem papillären Adenocarcinom der Lunge ableiten.

Tabelle 9: Kulturmedium der permanenten Zelllinie NCI-H441. Na^+: Natrium, Pen/Strep: Penicillin/Streptomycin, FCS: Fetales Kälberserum, ITS: Insulin, Transferrin, Sodium-Selenit.

Medium NCI-H441 Zellkultur
RPMI 1640 + L-Glutamin
1% Na^+-Pyruvat
1% Pen/Strep
10% FCS
ITS Media Supplement
200 nM Dexamethason

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit in 25 cm^2-Zellkulturflaschen. Sobald eine Zelldichte von 70% bis 90% Konfluenz erreicht wurde, wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert, bis sie sich vom Flaschenboden ablösten. Die Suspension wurde in 5 ml vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und die Zellen in einer Tischzentrifuge 5 min bei 700 rpm pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert, die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt und je $5*10^5$ Zellen auf 9 ml Zellmedium in neue Kulturflaschen gegeben.

2.4.2 Primärkultur von Zellen der oberen Atemwege aus humanem polypoidem Gewebe

Die Grundlage für eine Zellkultur aus humanen Zellen der oberen Atemwege bildeten Biopsien von Polypen der Schleimhaut von Nase und Nasennebenhöhlen.

Tabelle 10: Medien zur Primärkultur polypoider Zellen. DMEM: Dulbecco´s Modified Eagle Medium, Pen/Strep: Penicillin/Streptomycin, BPE: Boviner Hypophysenextrakt, hEGF: humane epidermaler Wachstumsfaktor, HC: Hydrocortison, RA: Retinsäure.

Medium	Zusammensetzung
Grundmedium	50 ml DMEM/Ham´s F12 + L-Glutamin
	500 µl Pen/Strep
Proteasemedium	5 ml DMEM/Ham´s F12 + L-Glutamin
	100 µl Protease XIV (100 mg/ml)
	0,7 µl Amphotericin B (20 mM)
	50 µl Pen/Strep
Kulturmedium	500 ml Airway epithelial basal Medium
	Supplement Pack/Airway epithelial cell growth Medium (enthält BPE-26, hEGF-5, Insulin-2,5, HC-250, T3-3,35, Transferrin-5. RA-50)
	36 µl Amphotericin B (20 mM)
	5 ml Pen/Strep

Die Gewebeproben wurden direkt nach Exzision im OP der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Ulm in 10 ml eisgekühltes Grundmedium gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung im Labor auf Eis belassen. Die Proben wurden dort in einer Petrischale mechanisch dissoziiert, in 5 ml frisch hergestelltem Proteasemedium (siehe Tabelle 10) aufgenommen und bei 4°C über Nacht unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl FCS gestoppt. Die Gewebssuspension wurde durch ein Zellsieb mit 100 µm Maschenweite filtriert. Um eine möglichst hohe Zellmenge zu gewinnen wurde das Sieb mit 5 bis 10 ml Grundmedium nachgespült.

Daraufhin erfolgte die Sedimentation der aus dem Gewebsverband herausgelösten Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 1200 rpm. Das so erhaltene Zellpellet wurde in 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium (siehe Tabelle 10) aufgeschüttelt, die Suspension in eine 25 cm^2 Kulturflasche überführt und 3 h bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte inkubiert. Im Verlauf dieser Inkubation adhärierten Fibroblasten, wohingegen Epithelzellen in Suspension blieben. Die im Überstand suspendierten epithelialen Zellen wurden in eine neue Kulturflasche überführt. Fibroblasten und epitheliale Zellen wurden getrennt voneinander über Nacht kultiviert. Um Zelltrümmer und Gewebsreste aus dem Überstand zu entfernen wurde am nächsten Tag das gesamte Medium ausgetauscht. In der Folge wurde jeden zweiten Tag die Hälfte des Kulturmediums durch frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt.

Eine erstmalige Passagierung der Polypenzellkultur erfolgte aufgrund des langsamen Wachstums aus wenigen Ausgangszellen etwa nach 10 bis 15 Tagen. Da-

nach konnte die Kultur alle 7 bis 10 Tage passagiert werden. In den Experimenten wurden Zellen bis Passage 5 verwendet.

Das Einfrieren von Polypenzellen für spätere Experimente erfolgte aus Passage 1 oder 2, da eine Dedifferenzierung der Zellen bei Kulturen höherer Passagen nicht auszuschließen war. Zum Einfrieren wurden 10^6 Zellen in 1 ml Kulturmedium mit 10% DMSO in Cryo-vials pipettiert und in einer mit Isopropanol befüllten Kühlbox über Nacht auf -80°C herunter gekühlt. Am nächsten Tag wurden die Zellen für die dauerhafte Lagerung in flüssigen Stickstoff gegeben.

2.4.3 Kultivierung von Epithelien

Um Epithelien zu erhalten, wurden NCI-H441-Zellen auf Transwell®-Filtern kultiviert. Eine Kultivierung von Polypenzellen auf Transwell®-Filtern wurde ebenfalls angestrebt.

Die Filter stellen Einsätze für 24-well-Platten dar. Sie bestehen aus einer Polyester-Membran mit 0,33 cm^2 Fläche und einer Porengröße von 0,4 µm. Durch die Poren kann eine Diffusion gelöster Substanzen erfolgen.

Man erhält, getrennt durch die Membran, ein apikales und ein basolaterales Kompartiment.

Es können verschiedene realitätsnahe Wachstumsbedingungen erzeugt werden, da sich apikales und basolaterales Kompartiment getrennt regulieren lassen. Für die Kultivierung als liquid-liquid-Interface erhielten die Zellkulturen apikales und basolaterales Mediumangebot. Unter air-liquid-Bedingungen kultivierte Zellen erhielten nur basolateral Medium. Hierfür wurde ab Tag 2 der Kulturdauer die Flüssigkeit im apikalen Kompartiment abgesaugt und dies gegebenenfalls täglich wiederholt, bis die Ausbildung eines konfluenten Zellrasens mit dichten Zellkontakten (tight junctions) die Diffusion des basolateralen Mediums ins apikale Kompartiment verhinderte.

H441-Zellen wurden unter air-liquid-Bedingungen kultiviert. Die Kultur von Polypenzellen erfolgte sowohl unter air-liquid- als auch liquid-liquid-Bedingungen.

Für die Kultivierung von Epithelien wurden, soweit nicht anders angegeben, je Filter 10000 Zellen in 200 µl Kulturmedium eingesetzt. Im basolateralen Komparti-

ment befinden sich 800 µl Medium. Das apikale und basolaterale Medium wurde alle zwei Tage gewechselt.

2.5 Widerstandsmessung

2.5.1 Durchführung der Messung

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) erfolgte mittels eines Ohmmeters. Der TEER gibt Aufschluss über die Qualität des Epithels: Bei Erreichen von Konfluenz und Ausbildung von Zellkontakten steigt der TEER an. Um den elektrischen Widerstand, der von einem Epithel aufgebaut wird, bestimmen zu können, wurden die jeweiligen Zellen auf Transwell-Filtern kultiviert. Zur Messung des TEER wurde je eine Elektrode des Ohmmeters ins apikale und basolaterale Kompartiment eingebracht. Da beide Elektroden für die Messung mit Flüssigkeit umgeben sein müssen, musste bei der air-liquid-Kultivierung für die Zeit der Messung 100 µl Medium ins apikale Kompartiment gegeben werden. Unmittelbar nach der Messung wurde das Medium aus dem apikalen Kompartiment entfernt. Um den zeitlichen Verlauf des TEER zu bestimmen, wurde der Widerstand täglich gemessen.

2.5.2 Einfluss von SLO auf den TEER von H441-Zellen

An Epithelien aus H441-Zellen, die mit Medium mit oder ohne Zusatz von 200 nM Dexamethason unter air-liquid-Bedingungen kultiviert wurden, wurde der Einfluss von Streptolysin O auf den TEER untersucht. Hierfür wurde zu 11 Tage alten Zellen über einen Zeitraum von 48 h je dreimal täglich (8.00 Uhr, 12.00 Uhr und 16.00 Uhr) 100 µl einer sublytischen SLO-Lösung ins apikale Kompartiment gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte die TEER-Messung, nach der die SLO-Lösung wieder entfernt wurde. Außerdem wurde der kurzzeitige Effekt einer sublytischen SLO-Konzentration untersucht, indem der TEER zu Beginn und Ende der ersten Inkubation (t_1=0 min, t_2=30 min) gemessen wurde.

2.5.3 Abhängigkeit des TEER von den Kulturbedingungen bei Polypenzellkulturen

Die TEER-Messung wurde auch genutzt, um den Einfluss verschiedener Kulturbedingungen (siehe Tabelle 11) auf die Ausbildung eines Epithels aus primärkultivierten Polypenzellen zu untersuchen. Zur Zusammensetzung des Polypen-

Kulturmediums siehe Tabelle 10. Matrigel™ wurde laut Herstellerangaben als dünne (16 µl) oder dicke (50 µl) Schicht in die Transwell-Filter eingebracht und bildete eine wachstumsfördernde Matrix. Die verwendeten Fibroblasten stammten als Beiprodukt aus der Primärkultur der Polypenzellen. Sie wurden entweder direkt im basolateralen Kompartiment kultiviert oder es wurde Medium aus mit Fibroblasten bewachsenen Kulturflaschen als Kulturmedium für die Polypenzellen verwendet.

Tabelle 11: Kulturbedingungen Polypenzellen. ITS: Insulin, Transferrin, Sodium-Selenit.

Kulturbedingung	Medium	Modifikation
liquid-liquid	Polypen-Kulturmedium	-
air-liquid	Polypen-Kulturmedium	-
air-liquid	Polypen-Kulturmedium + 200 nM Dexamethason	-
air-liquid	RPMI 1640 + L-Glutamin + ITS Media Supplement	ab Tag 30
air-liquid	Polypen-Kulturmedium	Matrigel dünn
air-liquid	Polypen-Kulturmedium	Matrigel dick
air-liquid	Polypen-Kulturmedium aus Fibroblastenkultur	ab Tag 30
air-liquid	Polypen-Kulturmedium	basolateral Fibroblasten
air-liquid	Polypen-Kulturmedium + 200 nM Dexamethason	basolateral Fibroblasten

2.6 Chemolumineszenz-Messung

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils toter Zellen nach Inkubation mit schädigenden oder protektiven Substanzen wurde der CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay angewandt. Hierbei wird die Chemolumineszenz, die bei der Reaktion des Substrats mit Proteasen erzeugt wird, im Platereader gemessen. Proteasen werden bei Membranschädigung von den betroffenen Zellen freigesetzt. Das Kit enthält einen Assay-Puffer, der mit den Proteasen unter Erzeugung von Chemolumineszenz reagiert. Die emittierte elektromagnetische Strahlung ist direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen.

In den Experimenten wurden jeweils Zellen derselben Isolation miteinander verglichen, um Unterschiede durch Einflüsse wie Kulturbedingungen oder Reagenzienzubereitung auf die Zellvulnerabilität zu vermeiden.

2.6.1 Erstellen einer Konzentration-Wirkungs-Kurve für SLO

Eintausend H441-, bzw. primärkultivierte Polypenzellen wurden pro Kavität in einer 96-well-Platte zwei bzw. sieben Tage kultiviert. Nach Kultivierung wurden die Zellen zweimal mit 100 µl serumfreiem Kulturmedium gewaschen, um eventuell bereits vorhandene Proteasen zu entfernen. Um die Konzentrationsabhängigkeit

der Zytotoxizität von SLO zu bestimmen, wurde das Medium abgesaugt und 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 1000 ng/ml, 3000 ng/ml oder 10000 ng/ml SLO jeweils in einem Volumen von 30 µl serumfreiem Kulturmedium zu den Zellen gegeben und bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit 5 h inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl geschädigter und ungeschädigter Zellen bestimmt.

Bestimmung des Anteils geschädigter Zellen $n_{geschädigt}$: Nach der Inkubation wurden 20 µl des Überstandes in eine 96-well-Platte pipettiert. Für die Chemolumineszenz-Messung wurden weiße Nunclon-Platten verwendet.

Bestimmung des Anteils ungeschädigter Zellen n_{intakt}: Das Inkubationsmedium wurde vollständig abgesaugt. Ungeschädigte Zellen verblieben im Reaktionsgefäß und wurden 15 min bei Rautemperatur in 30 µl Lyse-Puffer inkubiert. Daraufhin wurden 20 µl des Lyse-Puffers von den Zellen in eine Nunclon-Platte transferiert.

Zu allen Kavitäten der Nunclon-Platte wurden je 20 µl vorbereiteter Assay-Puffer gegeben. Nach einminütigem Schütteln wurde weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Reaktion des Assay-Puffers mit den freigesetzten Proteasen zu ermöglichen. Durch die Proteasen wird das AAF-Molekül (Alanin-Alanin-Phenylalanin) vom Substrat der Luciferase abgespalten; dieses kann somit zur Lichterzeugung dienen. Die Lichterzeugung ist proportional zur vorliegenden Proteasen-Konzentration und folglich zur Anzahl toter Zellen.

Die Chemolumineszenz wurde im Platereader gemessen. Man erhielt pro Versuchsansatz zwei Messwerte: die Chemolumineszenz der Zellen, die durch die zu testende Lösung geschädigt worden waren ($n_{geschädigt}$) und die der restlichen Zellen, die ursprünglich intakt geblieben waren und dann durch den Lyse-Puffer zerstört wurden (n_{intakt}). $n_{geschädigt}$ und n_{intakt} gemeinsam ergeben die Gesamtzahl der Zellen in dem jeweiligen Versuchsansatz.

Da die Proteaseaktivität bei der Bestimmung von $n_{geschädigt}$ aufgrund der fünfstündigen Inkubationszeit abnimmt, muss mit Kontrollsubstanzen ein Korrekturfaktor bestimmt werden. Dieser Faktor ergibt sich aus dem Durchschnittswert mehrerer Chemolumineszenzmessungen von Zellen, die mit Digitonin inkubiert wurden. Die verwendete Konzentration lysiert über 95% aller Zellen. Der Quotient der Chemolumineszenzwerte nach 15-minütiger und nach fünfstündiger Inkubation ergibt den Korrekturfaktor (k).

Der prozentuale Anteil der Zellen, die durch die Inkubation mit der Testsubstanz geschädigt wurden, lässt sich nach folgender Formel bestimmen:

Formel 2: Anteil geschädigter Zellen, Bestimmung mittels Chemolumineszenz. n: Anzahl, k: Korrkturfaktor.

$$A = \frac{n_{geschädigt} \cdot k}{n_{geschädigt} \cdot k + n_{intakt}} \cdot 100\%$$

2.6.2 Einfluss von Kinase-Inhibitoren

H441-Zellen wurden mit einer SLO-Konzentration, die zu einer dreißig- bis fünfzigprozentigen Schädigung führt, inkubiert (siehe Abschnitt 2.6.1). Zudem wurden dem Inkubationsmedium Kinase-Inhibitoren zugesetzt, um deren Einfluss auf die Vulnerabilität der Zellen zu untersuchen. Folgende Kinase-Inhibitoren wurden getestet:

Tabelle 12: Kinase-Inhibitoren. CDK: Cyclinabhängige Kinase, MAPK: Mitogenaktivierte Proteinkinase, RTK: Rezeptor Tyrosinkinase, PK: Proteinkinase.

Substanzklasse	Substanz	Konzentration
CDK-Inhibitoren	Kenpaullone	7,5 µM
	Purvanolol	75 nM
	Purvanolol	1 µM
	Roscovitine	0,7 µM
MAPK-Inhibitoren	SL 327	20 µM
	SP 600125	1,5 µM
	SB 203580	5 µM
RTK-Inhibitoren	Picropodophyllin	10 nM
	PD 153035	0,25 nM
	Tyrphostin	1,5 µM
	SU 11274	20 µM
PK-Inhibitoren	HA 1077	20 µM
	Staurosporine	100 nM
	H 8	0,5 µM
	H 89	35 nM

2.6.3 Einfluss von Makrolid-Antibiotika

Um den Effekt von Makroliden auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurden H441-Zellen zusätzlich zu einer SLO-Konzentration, die 30-50% der Zellen schädigt, mit folgenden Substanzen aus der Klasse der Makrolid-Antibiotika inkubiert:

Tabelle 13: Makrolide. I.U.: Internationale Einheiten.

Substanzklasse	Substanz	Konzentration
Makrolide	Roxithromycin	100 µM
	Clarithromycin	100 µM
	Azithromycin	100 µM
	Erythromycin	100 µM
	Spiramycin	300 I.U./ml

2.7 Propidium-Iodid-Färbung

Als eine weitere Methode zur Bestimmung der Zellviabilität bzw. Zellschädigung wurden die Zellen mit Propidium-Iodid (Verdünnung 1:500) und mit Hoechst-Farbstoff 33342 (Trihydrochlorid-Trihydrat) (Verdünnung 1:5000) gefärbt. Der membrangängige Hoechst-Farbstoff 33342 kann die intakte Zellmembran überwinden und bindet an die DNA. Der Nukleus kann dadurch im Epifluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Propidium-Iodid kann nur bei zerstörter Integrität der Zellmembran in die Zelle gelangen. Es interkaliert zwischen die Basen der DNA und erzeugt eine rote Fluoreszenz der geschädigten Zellen. Die Beobachtung der Zellen erfolgte mittels Epifluoreszenzmikroskopie, die Auswertung der Bilder wurde mit Image J (Mac Biophotonics) durchgeführt.

Tabelle 14: Charakteristika der in der Epifluoreszenzmikroskopie verwendeten Filter. DAPI: Diamidinophenylindol.

Filter	Exzitation [nm]	Emission [nm]	Dichroitischer Spiegel [nm]
DAPI	300-390	430-480	410
DsRed	530-560	590-650	570

Zur Bestimmung des Anteils geschädigter Zellen wurden die Anzahl geschädigter Zellen $n_{geschädigt}$ (rote Fluoreszenz) zur Gesamtzellzahl n_{total} (blaue Fluoreszenz) ins Verhältnis gesetzt.

Formel 3: Anteil geschädigter Zellen, mikroskopische Bestimmung. n: Anzahl.

$$A = \frac{n_{geschädigt}}{n_{total}} \cdot 100\%$$

2.7.1 Erstellen einer Konzentration-Wirkungs-Kurve für SLO

Für die Zellschädigungs-Experimente wurden je 10000 H441-Zellen in 400 µl Medium in 8-Kammer-Objektträgern kultiviert. An Tag 2 bis 3 wurden die Zellen mit RPMI + 1% Na^+-Pyruvat (Inkubationsmedium) gewaschen und für 20 min bei 37°C

mit Propidium-Iodid und 30 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, 1000 ng/ml, 3000 ng/ml oder 10000 ng/ml SLO-Lösung inkubiert. Danach wurde das Inkubationsmedium entfernt und es erfolgt eine dreiminütige Inkubation mit Hoechst-Farbstoff und Propidium-Iodid in Badlösung. Daraufhin wurden die mikroskopischen Aufnahmen erstellt.

2.7.2 Einfluss von Makrolid-Antibiotika

Der Effekt von Makroliden auf die Zellviabilität bei Inkubation mit lytischen SLO-Konzentrationen wurde untersucht, indem die Zellen nach dem Waschen für 10 min bei 37°C mit Makroliden in Inkubationsmedium vorinkubiert wurden. Für die verwendeten Konzentrationen siehe Tabelle 13.

Danach erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit Inkubationsmedium mit Makrolid, Propidium-Iodid und einer SLO-Konzentration, die bei 30-50% der Zellen zu einer Zerstörung der Zellmembranintegrität führt. Als letzter Schritt wurden die Zellen wiederum 3 min mit Hoechst-Farbstoff und Propidium-Iodid in Badlösung inkubiert, bevor die Aufnahme der Bilder erfolgt.

2.8 Polymerase Kettenreaktion

2.8.1 RNA Extraktion

Nach Trypsinisierung und Sedimentation der benötigten Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 10000 rpm erfolgte nochmaliges Waschen mit PBS und eine weitere 2-minütige Zentrifugation. Nach Entfernen des Überstandes konnten die Zellen direkt zur RNA-Extraktion verwendet werden oder für spätere Experimente bei -80°C eingefroren werden.

Die RNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe der QIAshredder- und Rneasy® Mini-Kits (beide QIAGEN, Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben. Die resuspendierten Zellen wurden mittels QIAshredder homogenisiert, die RNA an eine Silica-Matrix gebunden und kontaminierende genomische DNA mit Hilfe von DNase hydrolysiert. Abschließend wurde die RNA nach mehrmaligem Waschen in RNase-freiem Wasser eluiert. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration durch Messung der optischen Dichte der Lösung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.8.2 RT-PCR

Um aus der extrahierten RNA cDNA zu gewinnen, wurde eine Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) durchgeführt. Hierfür wurde der SuperScript® VILO™ cDNA Synthese Kit verwendet.

Tabelle 15: Ansatz RT-PCR. RT-PCR: Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion, RNA: Ribonukleinsäure, H_2O: Wasser.

5x VILO Reaction Mix	4 µl
10x SuperScript Enzyme Mix	2 µl
RNA	2 µl
DEPC H_2O	12 µl

2.8.3 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde als semiquantitative realtime PCR durchgeführt. Pro Ansatz wurde folgender Mastermix in eine 96-well PCR-Platte pipettiert:

Tabelle 16: Ansatz realtime PCR. PCR: Polymerase Kettenreaktion, cDNA: komplementäre Desoxyribonukleinsäure, DEPC H_2O: Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser.

Supermix	7,5 µl
Primer	0,75 µl
cDNA	1 µl
DEPC H_2O	5,75 µl

Folgende Programmeinstellungen wurden gewählt:

Tabelle 17: PCR-Programm. PCR: Polymerase Kettenreaktion.

Reaktionsschritt		Dauer [min]	Temperatur [°C]
	Initiale Denaturierung	02:00	95
50 Zyklen	Denaturierung	00:15	95
	Primer-Annealing	00:15	60
	Elongation	01:00	60

Die Melting Curve Analyse zur Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte mittels eines 20-minütigen Temperaturgradienten von 60°C auf 95°C.

Alle Expressionen wurden in Relation zum arithmetischen Mittelwert der Expressionen dreier Housekeeping-Gene [102] berechnet (Tabelle 18).

Tabelle 18: Housekeeping-Gene.

Proteingruppe	Genprodukt
Housekeeping-Gene	HMBS
	SF3A1
	EEF1A2

Zur Überprüfung der Effizienz der PCR wurden für jeden Primer Regressionsgeraden erstellt, in denen die Expression des PCR-Produktes über drei Verdünnungskonzentrationen der eingesetzten cDNA aufgetragen wurden. Die Steigung der Regressionsgerade wurde mit dem Kalkulationsprogramm Igor berechnet. Für alle verwendeten Primer lag die Effizienz nahe 2, was einer Verdopplung des Genproduktes bei jedem durchlaufenen Zyklus und somit einer optimalen Effizienz entspricht.

Zur Berechnung der Expression eines Genproduktes in Relation zum Mittelwert der Housekeeping-Gen-Expression wurden die von der PCR-Software CalQPlex bestimmten Schnittpunkte der Expressionskurve mit dem Schwellenwert (ct) verwendet. Aus den Schnittpunkten der drei Housekeeping-Gene (ct_{HMBS}, ct_{SF3A1}, ct_{EEF1A2}) wurde der Mittelwert ($ct_{housekeeping}$) berechnet.

Formel 4: Berechnung $ct_{housekeeping}$.

$$ct_{housekeeping} = \frac{ct_{HMBS} + ct_{SF3A1} + ct_{EEF1A2}}{3}$$

Daraufhin erfolgt die Berechnung der Differenz zwischen dem Schnittpunkt der Expressionskurve des jeweiligen Genprodukts (ct_{gen}) und dem $ct_{housekeeping}$.

Formel 5: Berechnung Δct.

$$\Delta ct = ct_{housekeeping} - ct_{gen}$$

Die Expression E_{gen} des jeweiligen Genprodukts erfolgt durch Potenzierung der Effizienz, in diesem Fall 2, mit Δct.

Formel 6: Berechnung E_{gen}.

$$E_{gen} = 2^{\Delta ct}$$

Zusammengefasst lässt sich die relative Expression der Genprodukte somit folgendermaßen berechnen:

Formel 7: Berechnung der Genexpression mittels der ct-Werte des gesuchten Gens und dreier Housekeeping-Gene.

$$E_{gen} = 2^{\frac{ct_{HMBS} + ct_{SF3A1} + ct_{EEF1A2}}{3} - ct_{gen}}$$

2.8.4 Charakterisierung der primärkultivierten polypoiden Zellen

Zur Charakterisierung der primärkultivierten Zellen aus Polypengewebe wurden folgende Genprodukte untersucht:

Tabelle 19: Primer Polypenzellen.

Proteingruppe	Genprodukt	Abkürzung
Intermediärfilamente	Cytokeratin 8	CK 8
	Cytokeratin 18	CK 18
	Vimentin	VIM
Ionenkanäle	Epithelialer Na^+-Kanal, α-Untereinheit	ENaC α
	Epithelialer Na^+-Kanal, β-Untereinheit	ENaC β
	Epithelialer Na^+-Kanal, γ-Untereinheit	ENaC γ
	Epithelialer Na^+-Kanal, δ-Untereinheit	ENaC δ
	Cystische Fibrose Transmembranregulator	CFTR
Mucine	Mucin 2	MUC 2
	Mucin 5AC	MUC 5AC
	Mucin 5B	MUC 5B
Zellkontakte	Occludin	OCLN
Zilienmarker	Forkhead box J1	FOX J1
	Tubulin β4	TUB β4
Komponenten des Immunsystems	Toll like Rezeptor 1	TLR 1
	Toll like Rezeptor 2	TLR 2
	Cyclooxigenase 2	COX 2
	Chemokin Rezeptor 4	CCR 4
	Chemokin Ligand 5	CCL 5
	CXC-Motiv-Chemokin Rezeptor 3	CXCR 3

Dabei wurden Zellkulturen der Passage 3 aus Kulturflaschen und von Transwell®-Filtern (air-liquid-Interface) nach einer Kultivierungsdauer von 16 bzw. 12, 20 und 28 Tagen untersucht.

Außerdem wurde der Einfluss von 200 nM Dexamethason im Kulturmedium auf die Expression der Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals ENaC in 28 Tage auf Filtern unter air-liquid-Bedingungen kultivierten Polypenzellen untersucht.

2.8.5 Einfluss sublytischer SLO-Konzentrationen auf die Expression inflammatorischer Proteinen

H441-Zellen wurden bis zum Erreichen von Konfluenz auf Ibidi-dishes kultiviert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen für 20 min mit SLO (sublytische Konzentration, 300 ng/ml) in Kontrolllösung bei 37°C inkubiert. Zum Zeitpunkt t=0 wurde das Inkubationsmedium entfernt, die Zellen zweimal mit frischen, vorgewärmten Medium gewaschen und bis zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion weiter inkubiert. Um die Zeitverläufe der Immunantwort abbilden zu können, wurden für verschiedene Genprodukte unterschiedliche Zeitpunkte für die RNA-Extraktion gewählt.

Tabelle 20: Zeitpunkte der RNA-Extraktion zur Bestimmung von Inflammationsmarkern. COX 2: Cyclooxygenase 2, RNA: Ribonukleinsäure.

Genpodukt	Zeitpunkte der RNA-Extraktion
Interleukin 8	t=1,2,3,4,6,8,24 h
Surfactant Protein B	
Toll like Rezeptor 1	
Toll like Rezeptor 2	
Chemokin Rezeptor 3	
Chemokin Rezeptor 4	
COX 2	
c-FOS	t=0,15,30,45,60,75,90 min

2.8.6 Einfluss von Dexamethason auf Expression der ENaC-Untereinheiten

Das Glucocorticoid Dexamethason kann zu einer Erhöhung der Expression aller ENaC-Untereinheiten führen. Um den Einfluss von Dexamethason auf H441-Zellen zu untersuchen, wurden diese 10 Tage unter air-liquid-Bedingungen kultiviert. Es wurde Standard-Kulturmedium (siehe Tabelle 9) ohne Dexamethason bzw. mit Zusatz von 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 mM oder 1 µM Dexamethason verwendet.

Der Effekt von Dexamethason auf Polypenzellkulturen wurde ebenfalls untersucht, indem 28 Tage alte Zellen, die mit Kulturmedium (siehe Tabelle 10) und Zusatz von 200 nM Dexamethason kultiviert wurden, mit Zellen ohne Dexamethasonkontakt verglichen wurden.

2.8.7 Einfluss von SLO auf Expression der ENaC-Untereinheiten

Um die Veränderungen der Expression der ENaC-Gene durch Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen zu untersuchen, wurden H441-Zellen auf Transwell-Filter unter air-liquid-Bedingungen, allerdings ohne Zusatz von Dexamethason zum Medium, kultiviert (siehe Abschnitt 2.4.3). Nach Erreichen von Konfluenz und Anstieg des TEER wurden ab Tag 7 dreimal täglich (8.00 Uhr, 12.00 Uhr, 16.00 Uhr) 100 µl Inkubationsmedium mit 300 ng/ml SLO für 30 min ins apikale Kompartiment gegeben. Nach der Inkubation wurden die air-liquid-Bedingungen wiederhergestellt.

Die RNA-Extraktion erfolgte nach 2 h (nur eine Inkubation), nach 24, 48 und 96 h. Es wurden jeweils die relativen Expressionen der ENaC-Untereinheiten α, β und γ bestimmt.

2.8.8 Einfluss von Kinase-Inhibitoren auf Hochregulation der ENaC γ Expression nach Inkubation mit SLO

Da die Expression der γ-Untereinheit des Epithelialen Natriumkanals bei Inkubation mit sublytischem SLO am stärksten hochreguliert wurde, wurde der Einfluss von Kinase-Inhibitoren auf diesen Effekt untersucht.

Es wurde die Expression von ENaC γ nach 96 h Inkubation mit SLO und zusätzlich hinzugefügtem Kinase-Inhibitor untersucht. (Konzentrationen siehe Tabelle 12). Um den Einfluss der Kinase-Inhibitoren auf die ENaC γ-Expression zu untersuchen, wurden zusätzliche Kulturen als Kontrollen ohne SLO inkubiert.

2.9 Ussing-Kammer

Die Ussing-Kammer ist die einzige Methode, die einen Epithelzellverband funktionell untersuchen kann. Um in der Ussing-Kammer eingesetzt zu werden, wurden Zellen wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben kultiviert (Kulturmedium siehe Tabelle 9).

Zur Abbildung der Abhängigkeit von I_{SC} und $I_{SC,amil}$ von der Dexamethasonkonzentration im Kulturmedium wurden H441-Kulturen ohne Zusatz von Dexamethason bzw. mit Zusatz von verschiedenen Dexamethasonkonzentrationen (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM oder 1000 nM) unter ansonsten konstanten Bedingungen kultiviert.

Nach Erreichen von Konfluenz und Etablierung eines ausreichenden TEER wurden die Filter in die Ussing-Kammer eingesetzt und apikales sowie basolaterales Kompartiment gleichmäßig mit je 5 ml auf 37°C vorgewärmtem Caco 2-Transportpuffer befüllt, um hydrostatische Druckdifferenzen zu vermeiden. Die beiden Kompartimente wurden stets mit eingeleiteter Raumluft begast, um eine optimale Durchmischung der zugegebenen Testsubstanzen mit der Pufferlösung zu gewährleisten.

Die Epithelien wurden vor Beginn der Experimente für 5 min bis 10 min in der Kammer belassen, bis sich ein konstanter transepithelialer Strom, erzeugt durch den Ionentransport des Epithels, einstellte. Dieser Strom baut die transepitheliale Spannung V_{TE} auf. Durch Anlage eines Stromes umgekehrter Polarität wurde nun die V_{TE} auf 0 V „geklemmt“. Der benötigte Strom wird als Kurzschlussstrom I_{SC} bezeichnet und als Maß für die Transportleistung des Epithels automatisch alle 5 Sekunden aufgezeichnet.

Bei Zugabe von Substanzen, die Transportwege von Ionen modulieren oder blockieren, kann deren Effekt als Auswirkung auf den I_{SC} beobachtet werden.

Zur Charakterisierung der verwendeten Zelllinien wurden H441-Zellen an Tag 10 bis 11 verwendet. Nach Einsetzen der Epithelien in die Ussing-Kammer wurden folgende Hemmstoffe des Epithelialen Natriumkanals ENaC in steigenden Konzentrationen ins apikale Kompartiment gegeben und jeweils die Einstellung eines Gleichgewichts des I_{SC} abgewartet.

Tabelle 21: ENaC-Inhibitoren. ENaC: Epithelialer Natriumkanal, EIPA: Ethylisopropylamilorid.

Substanz	Konzentrationen [M]
Amilorid	$3*10^{-8}$, 10^{-7}, $3*10^{-7}$, 10^{-6}, $3*10^{-6}$, 10^{-5}
Benzamil	$3*10^{-8}$, 10^{-7}, $3*10^{-7}$, 10^{-6}, $3*10^{-6}$, 10^{-5}
Phenamil	$3*10^{-9}$, 10^{-8}, $3*10^{-8}$, 10^{-7}, $3*10^{-7}$, 10^{-6}
EIPA	10^{-7}, $3*10^{-7}$, 10^{-6}, $3*10^{-6}$, 10^{-5}, $3*10^{-5}$, 10^{-4}, $3*10^{-4}$

Um eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu erhalten, wurde der Mittelwert der letzten 5 Messwerte des I_{SC} vor Zugabe der nächsten Konzentration ermittelt und relativ zum Startwert ausgedrückt. Somit ließ sich die prozentuale Veränderung des I_{SC} durch Zugabe des Hemmstoffs darstellen. Die Kalkulation und graphische Darstellung erfolgte mittels Igor Pro.

2.9.1 Einfluss von SLO auf I_{SC}

Um den Einfluss von SLO auf die Transporteigenschaften eines Epithels zu untersuchen, wurden H441-Zellen ohne Zusatz von Dexamethason zum Kulturmedium kultiviert, da dessen Effekt, die Hochregulation der Expression der ENaC-Untereinheiten, jeden Effekt einer anderen modulierenden Substanz überlagert (siehe Abschnitt 2.8.6). Die Zellkulturen (air-liquid-Bedingungen) wurden nach Erreichen von Konfluenz einmalig mit 200 µl Kulturmedium oder SLO in einer Konzentration von 300 ng/ml in Medium überschichtet und für 30 min inkubiert. In weiteren Experimenten wurden Zellkulturen im Verlauf von 48 h sechsmal für 30 min mit Medium oder SLO im apikalen Kompartiment inkubiert (8.00 Uhr, 12.00 Uhr, 16.00 Uhr). Nach jeder Inkubation wurde das Inkubationsmedium entfernt, um die air-liquid-Bedingungen wieder herzustellen.

2.9.2 Transporteigenschaften von Polypenzellkulturen

Polypenzellkulturen sollten in der Ussing-Kammer untersucht werden, um ihre Transporteigenschaften zu bestimmen. Trotz zahlreicher Modifikationen der Kulturbedingungen (siehe Tabelle 11) gelang es bislang nicht, ein Epithel mit ausreichender Transportfunktion zu erzeugen.

3 Ergebnisse

3.1 Transporteigenschaften von H441-Zellen

3.1.1 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Amilorid-Derivaten

Die Transporteigenschaften von H441-Zellen wurden in der Ussing-Kammer charakterisiert. Die Wirkung von Amilorid und Amildoridderivaten auf den Kurzschlussstrom I_{SC} wurde untersucht, indem die jeweilige Substanz in zunehmender Konzentration dem apikalen Kompartiment zugesetzt wurde (siehe Tabelle 21). Wie in Abbildung 5 zu erkennen, konnte der I_{SC} durch Amilorid konzentrationsabhängig inhibiert werden.

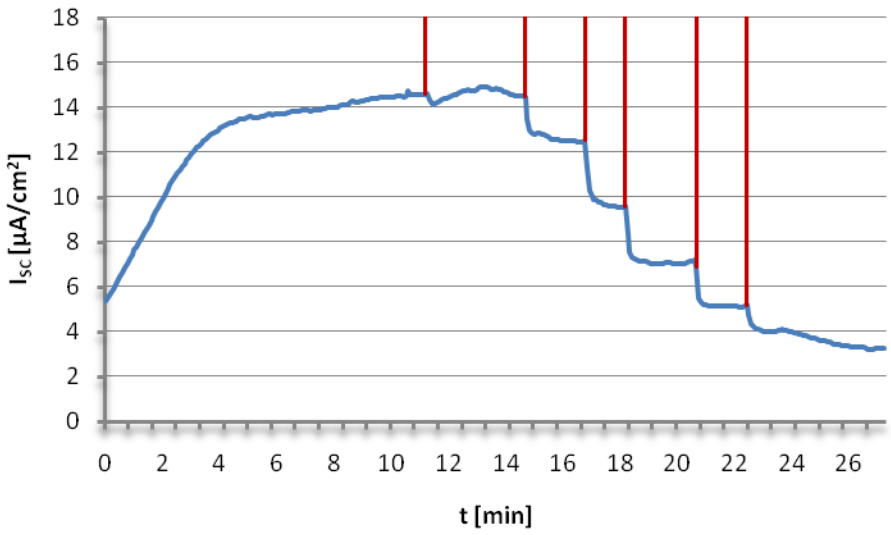


Abbildung 5: Wirkung von Amilorid auf den I_{SC}. Unter Zusatz von Dexamethason kultivierte H441-Zellen. Amilorid wurde in steigender Konzentrationen ($3*10^{-8}$ M; 10^{-7} M; $3*10^{-7}$ M, 10^{-6} M, $3*10^{-6}$ M; 10^{-5} M) an den markierten Zeitpunkten (rote Marker) dem apikalen Kompartiment zugegeben. I_{SC}: Kurzschlussstrom.

Die inhibitorische Potenz der getesteten Substanzen konnte nach Ermittlung der IC_{50} (Inhibitorische Konzentration$_{50}$) quantifiziert werden. Es zeigte sich folgende inhibitorische Sequenz: Benzamil > Phenamil > Amilorid >> EIPA (siehe Abbildung 6). Diese Sequenz ist typisch für die Sensitivität von ENaC für Amiloridderivate.

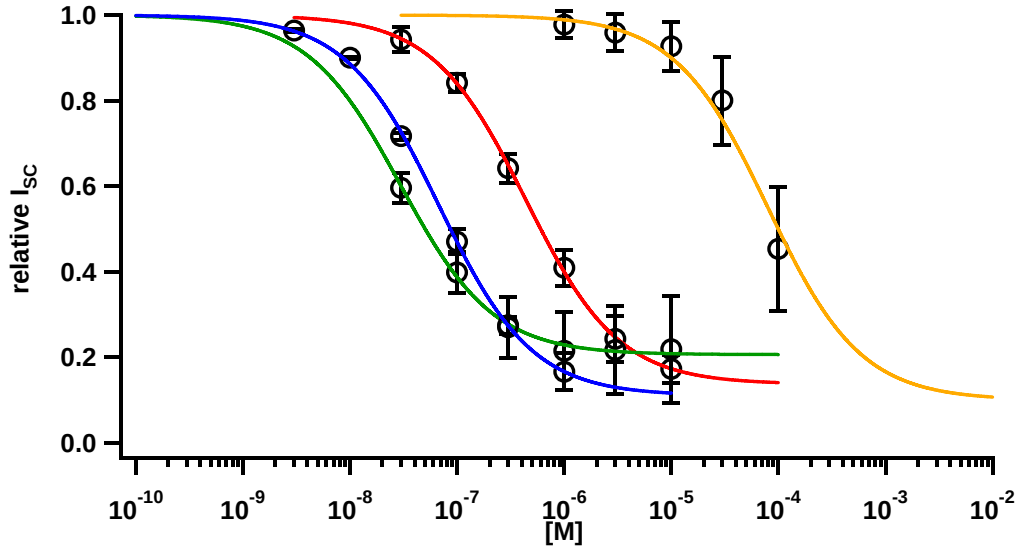
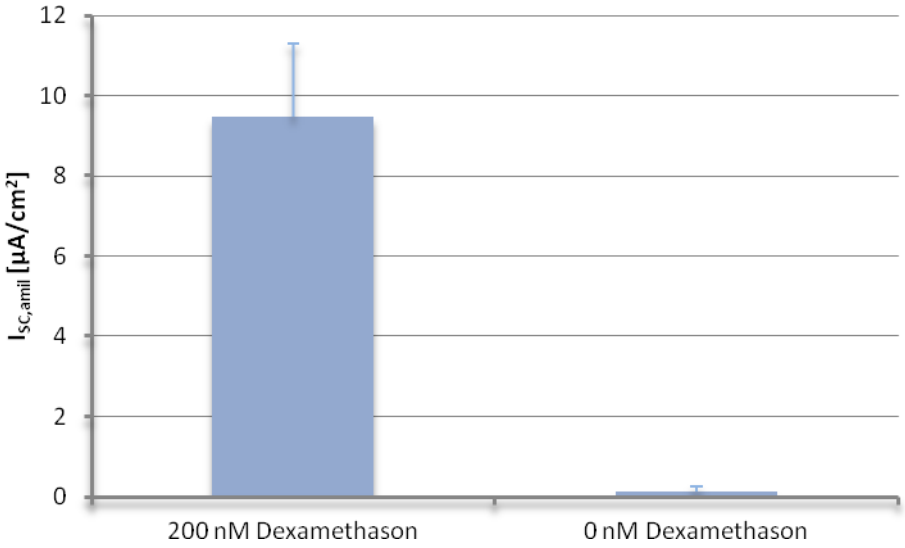


Abbildung 6: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Amiloridderivaten auf den relativen I_{SC} von H441-Zellen. $IC_{50,Benzamil}$=2,9*10^{-8} M, $IC_{50,Phenamil}$=6,8*10^{-8} M, $IC_{50,Amilorid}$=4,4*10^{-7}M, $IC_{50,EIPA}$=7,9*10^{-5} M. I_{SC}: Kurzschlussstrom, IC_{50}: Inhibitorische Konzentration$_{50}$.

3.1.2 Einfluss von Dexamethason auf I_{SC}

Die Kultur von H441-Zellen unter air-liquid-Bedingungen mit Zusatz von 200 nM Dexamethason zum basolateralen Kulturmedium führte zur Ausbildung von einschichtigen Zellverbänden mit stabilen Kurzschlussströmen und ausgeprägter Amilorid-Sensitivität (siehe Abbildung 5). Zellen, die in Abwesenheit von Dexamethason kultiviert wurden, zeigten in der Ussing-Kammer einen signifikant geringeren I_{SC} (siehe Abbildung 7 A und Abbildung 8) und eignen sich, um kleinere Effekte durch zugesetzte Substanzen auf den I_{SC} zu detektieren. Allerdings bereitete die Kultur ohne Dexamethason Schwierigkeiten. In vielen Fällen gelang kein experimenteller Einsatz in der Ussing-Kammer, da die Epithelien keinen stabilen Transportstrom aufrecht erhalten konnten.

A



B

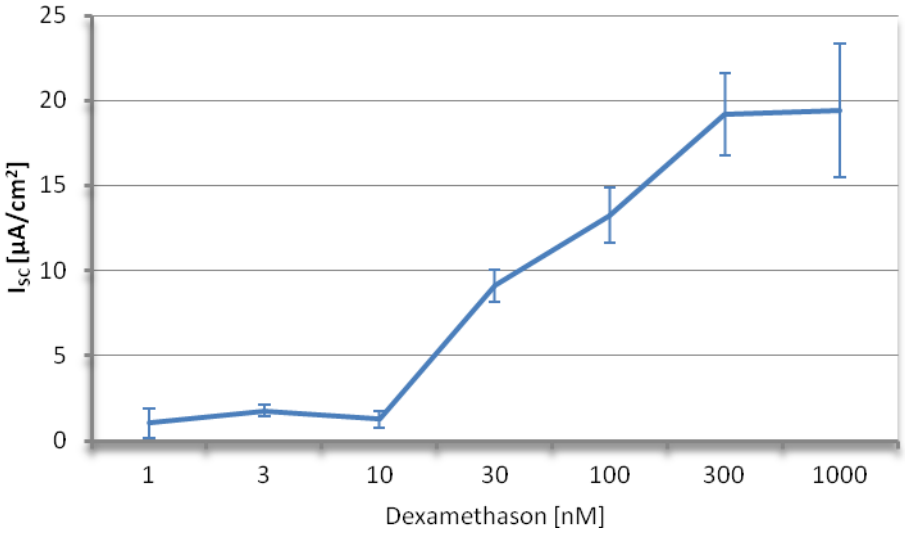


Abbildung 7: Einfluss von Dexamethason auf den Kurzschlussstrom. A) Durch Zusatz von Dexamethason zum Kulturmedium wird der amiloridsensitive Kurzschlussstrom signifikant erhöht. B) Dexamethason steigert konzentrationsabhängig den I_{SC} in H441-Zellkulturen. $I_{SC,amil}$: Amilorid-sensitiver Kurzschlussstrom, I_{SC}: Kurzschlussstrom.

In der Ussing-Kammer zeigten dexamethasonfrei kultivierte H441-Zellen nach Zugabe von 10^{-5} M Amilorid einen amiloridsensitiven Kurzschlussstrom von 0,13 ±0,13 µA/cm^2. Im Vergleich hierzu zeigte sich bei der Kultur mit Zusatz von 200 nM Dexamethason ein $I_{SC,amil}$ von 9,5 ± 1,8 µA/cm^2 (siehe Abbildung 7 A). Der positive Effekt von Dexamethason auf den Kurzschlussstrom von H441-Zellkulturen zeigt eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit (siehe Abbildung 7 B). Schon geringe Dexamethasonkonzentrationen ab 30 nM führten zu einem signifikanten Anstieg des I_{SC}; ab einer Konzentration von 300 nM konnte durch Steigerung der De-

xamethasonkonzentration keine weitere I_{SC}-Erhöhung mehr induziert werden. Im Vergleich zu dexamethasonfrei kultivierten Zellen kann der I_{SC} auf das etwa 20-fache gesteigert werden.

Die Permeabilisierung der apikalen Membran durch $2*10^{-5}$ M Amphotericin B führte zu einer Zunahme des I_{SC}. Unter diesen Bedingungen hängt der I_{SC} ausschließlich von der der basolateral lokalisierten Na^+K^+ATPase ab. Deren Aktivität kann durch Inhibition mit 10^{-3} M Ouabain als Reduktion des I_{SC} quantifiziert werden (siehe Abbildung 8).

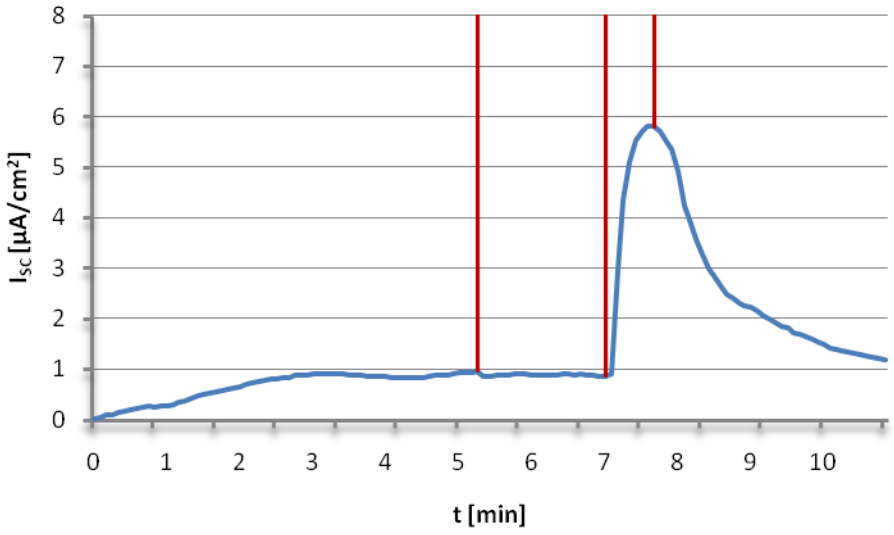


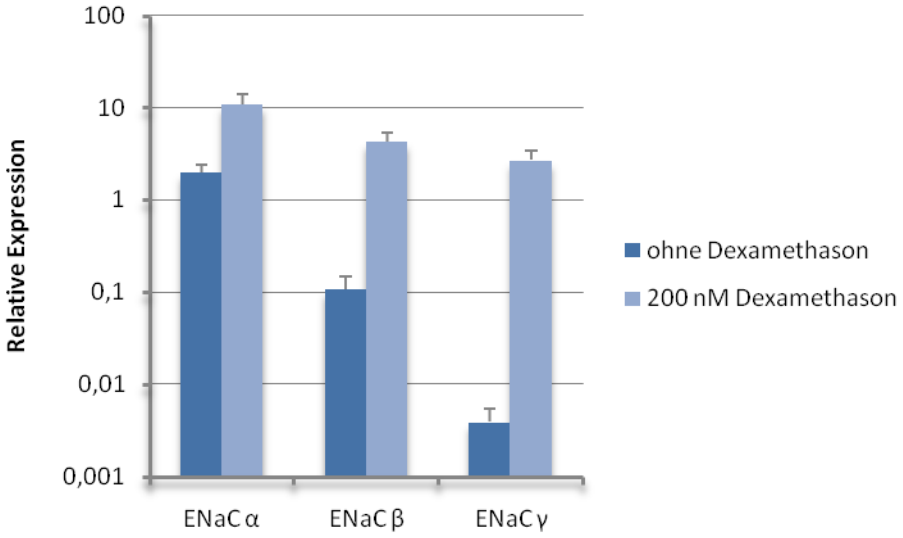
Abbildung 8: Verlauf des I_{SC} von dexamethasonfrei kultivierten H441-Zellen. An den markierten Stellen (rote Marker) erfolgte in der angegebenen Reihenfolge die Zugabe von 10^{-5} M Amilorid, $2*10^{-5}$ M Amphotericin B und 10^{-3} M Ouabain. Ein amiloridsensitiver Kurzschlussstrom ist bei Kultur ohne Dexamethason kaum detektierbar. I_{SC}: Kurzschlussstrom.

3.1.3 Einfluss von Dexamethason auf die Expression der ENaC-Untereinheiten in H441-Zellen

Durch Zusatz von Dexamethason wurde eine Erhöhung des Kurzschlussstroms und des amiloridsensitiven Kurzschlussstroms beobachtet. An dessen Erzeugung ist der Epitheliale Natriumkanal maßgeblich beteiligt. Daher wurde mittels PCR der Effekt von Dexamethason auf die Expression der ENaC-Untereinheiten untersucht. In H441-Kontrollzellkulturen ohne Zusatz von Dexamethason wurden die mRNAs der ENaC-Untereinheiten unterschiedlich stark exprimiert: ENaC α wurde fast 20 mal so hoch exprimiert wie ENaC β und über 500 mal so hoch wie ENaC γ. Die δ-Untereinheit wurde wie erwartet in H441-Zellen nicht exprimiert. Dexamethason hatte einen aktivierenden Effekt auf die Expression der ENaC-

Untereinheiten (α, -β und -γ-ENaC) (siehe Abbildung 9 A). Im Vergleich mit unbehandelten Zellen zeigte sich eine signifikante ($p<0,05$) Hochregulation der Genexpression für ENaC α, -β und -γ bei Zusatz von 200 nM Dexamethason zum basolateralen Kulturmedium. Die γ-ENaC-Expression wurde durch Dexamethason am stärksten (Faktor 690) gesteigert. Die Expression der ENaC β-Untereinheit wies eine mittlere Potenzierbarkeit auf (Faktor 40). Die Expression von ENaC α zeigte die mit Abstand geringste Dexamethason-Abhängigkeit (Faktor 5). Obwohl sich die Potenzierbarkeit der ENaC-Untereinheiten um Zehnerpotenzen unterschied, wurden alle drei Untereinheiten in Anwesenheit von 200 nM Dexamethason quantitativ ähnlich stark exprimiert (siehe Abbildung 9 A).

A



B

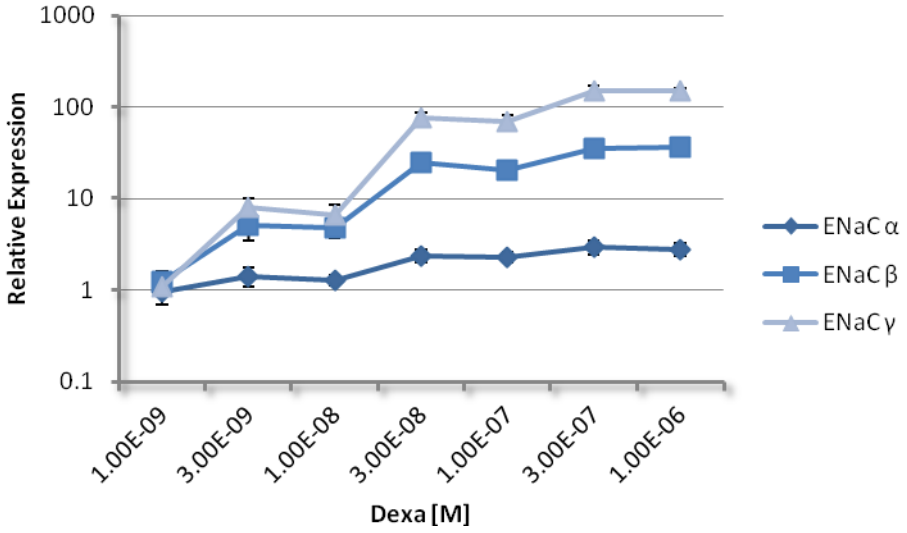


Abbildung 9: A) Expression der ENaC-Untereinheiten in H441-Zellen. Kultur mit Zugabe von Dexamethason erhöht signifikant die Expression aller ENaC-Untereinheiten. ENaC δ wurde nicht exprimiert. Expression relativ zum Mittelwert dreier Housekeeping-Gene. B) Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Expression der ENaC-Untereinheiten in Abhängigkeit von der Dexamethasonkonzentration. Expression relativ zu Zellen in Kontrollmedium ohne Dexamethason-zusatz. ENaC: Epithelialer Natriumkanal, Dexa: Dexamethason.

Des Weiteren wurden mittels Zusatz von Dexamethason in Konzentrationen von 1 nM bis 1 µM zum basolateralen Kulturmedium Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt (siehe Abbildung 9 B). Diese verdeutlichten, dass bereits Dexamethason-konzentrationen ab 3 nM die Expression der ENaC-Untereinheiten erhöhten, wobei ENaC γ und ENaC β eine deutlich stärkere Hochregulation als ENaC α erfuhren. Bereits ab einer Konzentration von 30 nM erreichte die Expression aller

Untereinheiten einen Sättigungsbereich. Auch durch Inkubation mit noch höheren Konzentrationen ließ sich die Expression nicht weiter steigern.

3.2 Primärkultur von Zellen der oberen Atemwege aus humanem polypoidem Gewebe

3.2.1 Charakterisierung der polypoiden Zellkulturen

Als weiteres Zellmodell sollte ein Epithel auf Basis primärer humaner polypoider Zellen etabliert werden.

Durch Anwendung des in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Protokolls gelang die Kultur von humanen Atemwegszellen aus polypoidem Gewebe. Aus wenigen Anfangszellen ließen sich konfluente Zellverbände kultivieren.

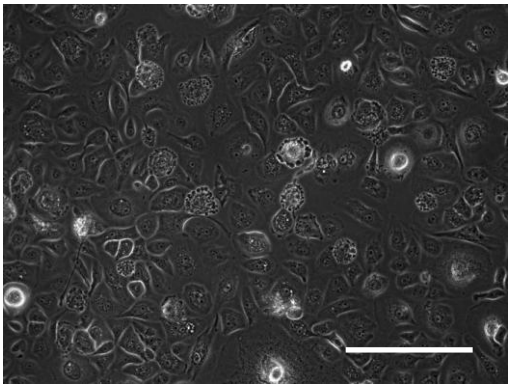


Abbildung 10: Phasenkontrastmikroskopische Übersichtsaufnahme eines konfluenten Zellrasens. Polypenzellen der Passage 2 wurden hierfür unter liquid-liquid-Bedingungen 20 Tage kultiviert. Deutlich zu erkennen sind die unterschiedlichen Zelltypen. Skalierungsbalken entspricht 100 µm.

Es gelang, polypoide Zellen bis zu einer Anzahl von mindestens 7 Passagen zu kultivieren. Die Passagezeit betrug aufgrund des langsamen Wachstums 7 bis 10 Tage. Dabei zeigten sich auch bei höheren Passagen lichtmikroskopisch keine Veränderungen von Zellmorphologie oder Wachstumsverhalten.

Polypoide Zellen bildeten einen konfluenten Zellrasen. Phasenkontrastmikroskopisch konnten kontrastreiche Zellgrenzen beobachtet werden (siehe Abbildung 10), die das mikroskopische Korrelat enger Zell-Zell-Kontakte darstellen. Beide Eigenschaften sind typisch für epitheliale Zellen. Auffallend war, dass die Zellpopulationen Zellen mit unterschiedlicher Morphologie aufwiesen und damit aus unterschiedlichen Zelltypen bestanden (siehe Abbildung 11). Die beschriebenen Eigenschaften konnten sowohl für Zellen beobachtet werden, die auf nicht-

porösen Oberflächen (Kulturflaschen, Ibidi-dishes) als auch auf porösen Oberflächen (Transwell-Filtern) als air-liquid oder liquid-liquid-Interface kultiviert wurden.

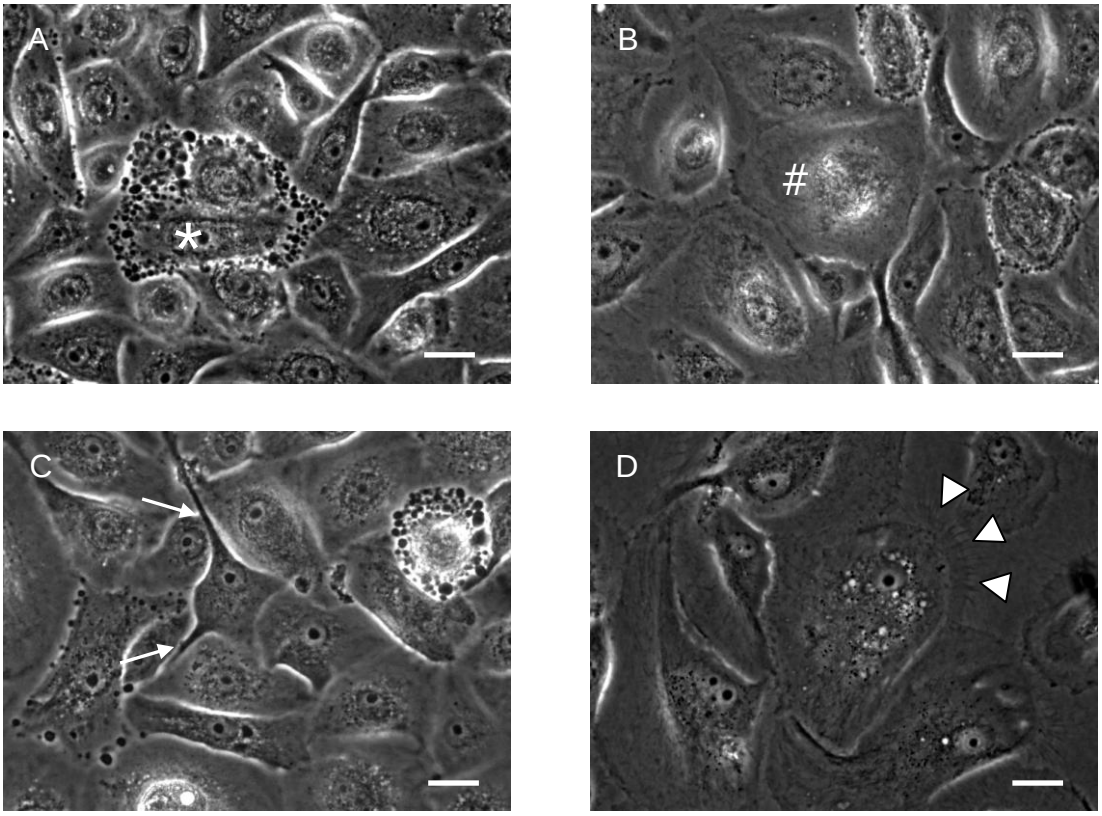


Abbildung 11: Phasenkontrastmikroskopische Detailaufnahmen von unter liquid-liquid-Bedingungen kultivierten Polypenzellen. A) stark granulierte Zelle (*), B) große, zytoplasmareiche Zellen (#), C) Zelle mit langen Ausläufern (→), D) Zellen mit ausgeprägten Lamellopodien (▲). Skalierungsbalken entspricht 10 µm.

3.2.2 Abhängigkeit des TEER von den Kulturbedingungen der Polypenzellkulturen

Um die Ausbildung eines funktionellen Epithels aus primärkultivierten Polypenzellen zu untersuchen, wurden Zellen auf Transwell-Filtern mit poröser Wachstumsoberfläche kultiviert. Hierbei zeigte sich, dass mit Erreichen von Konfluenz ab Tag 5 der TEER von etwa 150 Ω/0,33 cm^2 auf etwa 260 Ω/0,33 cm^2 anstieg. Unter liquid-liquid-Bedingungen blieb der TEER konstant auf diesem Niveau. Unter realitätsnahen air-liquid-Bedingungen erfolgt um Tag 12 ein weiterer Anstieg auf über 900 Ω/0,33 cm^2. Das Maximum wurde hierbei an Kulturtag 24 erreicht. Dieser zweite Anstieg spricht für die Ausbildung von dichten Zellkontakten. Dexamethason hatte keinen Einfluss auf den TEER.

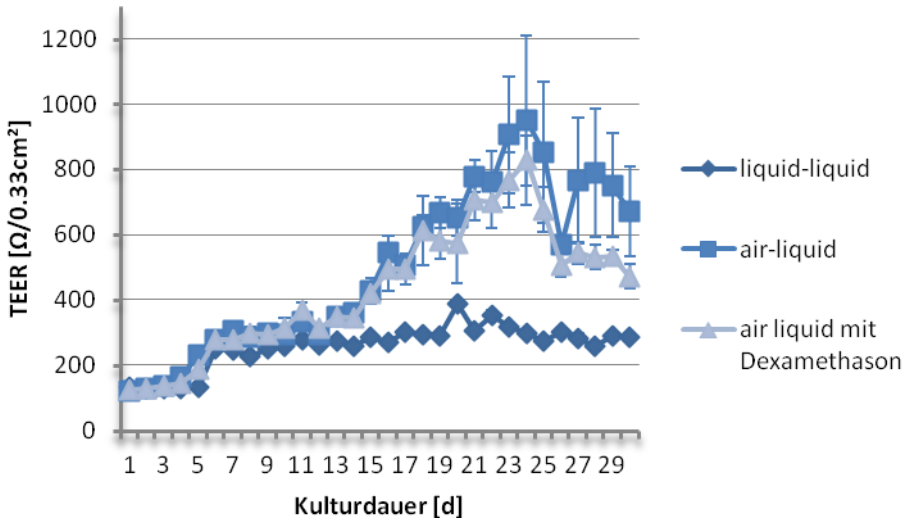


Abbildung 12: Verlauf des Widerstands primärkultivierter Polypenzellen. Zellen der Passage 2 wurden für 30 Tage unter liquid-liquid- oder air-liquid-Bedingungen kultiviert. Zudem wurden Zellen mit Zusatz von 200 nM Dexamethason kultiviert. Angaben als Mittelwert ± SEM, N=8. TEER: Transepithelialer elektrischer Widerstand.

Der Vergleich von Kulturen verschiedener Passagen derselben Isolation zeigte einen Verlust der Fähigkeit, unter air-liquid-Bedingungen einen zweiten Anstieg des TEER zu erreichen.

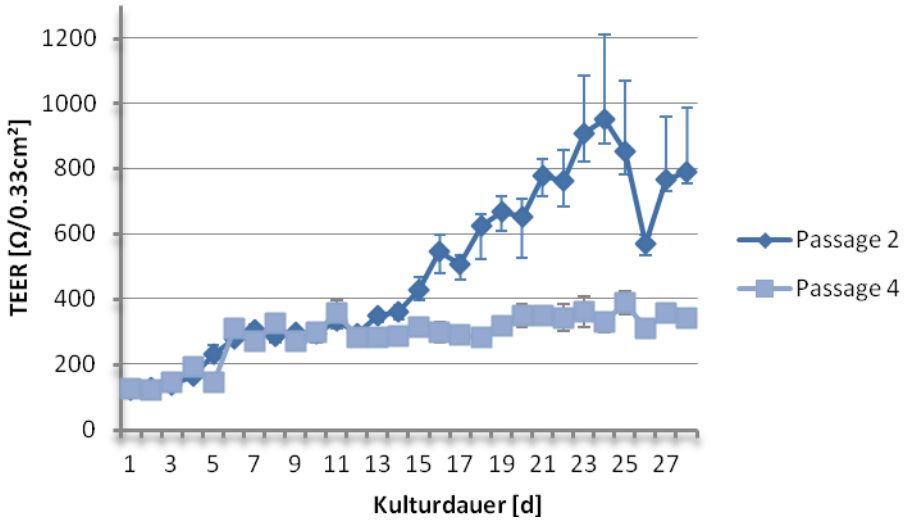


Abbildung 13: Vergleich der Widerstandsverläufe verschiedener Passagen. Zellkulturen derselben Isolation aus Passage 2 und 4 wurden unter air-liquid-Bedingungen kultiviert. Es zeigte sich ein Verlust der Fähigkeit zum Aufbau eines stabilen TEER. Angaben als Mittelwert ± SEM, N=8. TEER: Transepithelialer elektrischer Widerstand.

Um den Widerstand der Polypenzellkulturen zu optimieren und somit für weitere Experimente ausreichende Bedingungen zu schaffen, wurden die Kulturbedingungen modifiziert. Es wurde versucht, bei 30 Tage kultivierten Polypenzellen mit

konstant niedrigem Widerstand das Kulturmedium gegen RPMI 1640 + 5 % L-Glutamin + ITS media supplement auszutauschen, mit dem bei H441-Zellen stabile transepitheliale Widerstände erzeugt werden konnten. Dieser Mediumwechsel führte zur Ablösung der Polypenzellen. Auch die Verwendung von Matrigel™ als o Substrat zur Ausbildung stabiler epithelialer Strukturen führte nicht zum gewünschten Anstieg des TEER. Ebenso wenig konnten im basolateralen Kompartiment cokultivierte Fibroblasten oder der Zusatz von aus Kulturflaschen mit Fibroblasten entnommenem Kulturmedium zur Polypenkultur die gewünschten stabilisierenden Wachstumsfaktoren liefern.

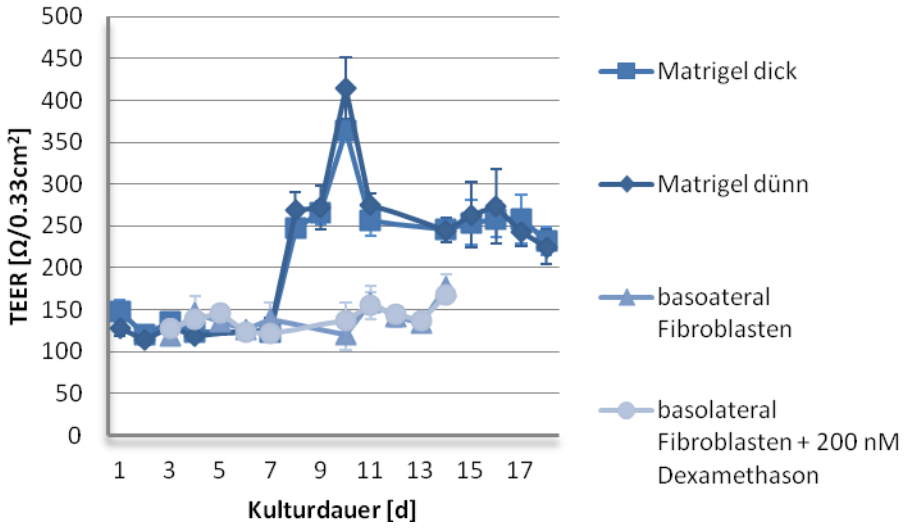


Abbildung 14: Einfluss von Modifikationen der Kulturbedingungen auf den Verlauf des TEER von Polypenkulturen der Passage 2. TEER: Transepithelialer elektrischer Widerstand.

3.2.3 Genexpression in primärkultivierten polypoiden Zellen

Die Polypenzellkulturen wurden mittels semiquantitativer PCR charakterisiert. Alle Genexpressionen wurden in Relation zum Mittelwert dreier Housekeeping-Gene (siehe Tabelle 18) bestimmt.

Unter air-liquid-Bedingungen kultivierte Polypenzellen der Passage 3 exprimierten die ENaC-Untereinheiten α, β und γ. Die δ-Untereinheit wurde wie erwartet nicht exprimiert. Ebenfalls exprimiert wurde der CFTR, ein membranintegraler Chloridkanal, der wie ENaC in Epithelzellen vorkommt.

Die Gene für sekretorische Muzine MUC 2, MUC 5AC und MUC 5B wurden in der Kultur nicht exprimiert.

Occludin, ein Bestandteil der Tight junctions in Epithelien, wurde ebenso wie die für respiratorische Epithelien charakteristischen Cytokeratine CK 8 und CK 18 exprimiert. Außerdem wurde in hohem Maße Vimentin exprimiert, ein Intermediärfilament welches als Marker für Zellen mesenchymaler Herkunft dient.

Forkhead box J1 (FOX J1), ein Transkriptionsfaktor der die Produktion von beweglichen Zilien kontrolliert, sowie Tubulin β4 (TUB β4), ein Bestandteil der Mikrotubuli, wurden nicht exprimiert, was mit der Beobachtung, dass die kultivierten Zellen keine Zilien ausbildeten, korrelierte.

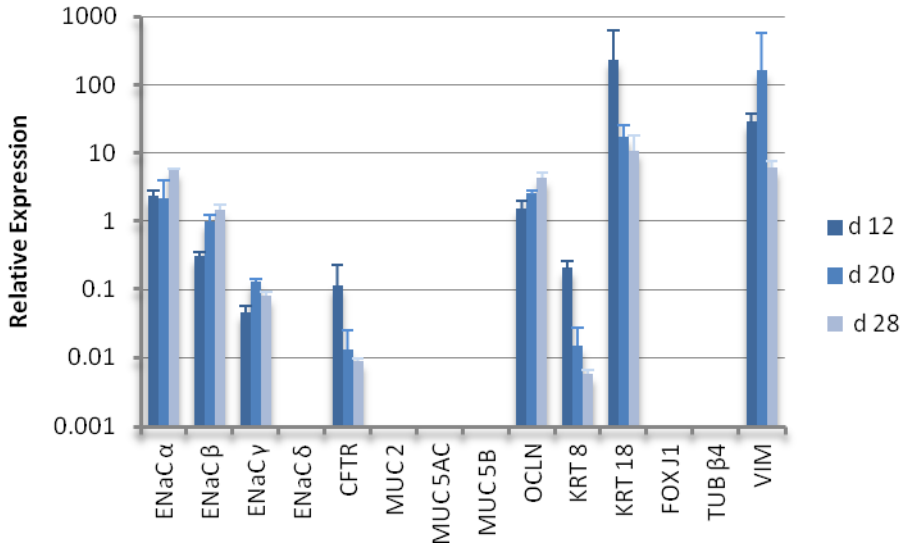


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Expression von mRNA von Struktur- und Funktionproteinen in primärkultivierten Polypenzellen der Passage 3 auf Transwellfiltern. ENaC δ-, MUC 2-, MUC 5AC-, MUC 5B-, FOX J1- sowie TUB β4-mRNA wurde nicht exprimiert. ENaC: Epithelialer Natriumkanal, CFTR: Cystische Fibrose Transmembranregulator, MUC: Mucin, OCLN: Occludin, KRT: Cytokeratin, FOX: Forkhead box, TUB: Tubulin, VIM: Vimentin, mRNA: Messenger Ribonukleinsäure.

Im Vergleich von Zellkulturen unter air-liquid-Bedingungen auf semipermeablen Filtern und auf nicht-permeablen Kunststoffoberflächen zeigte sich die Expression derselben RNAs in ähnlicher Ausprägung. Einzig CFTR wurde unter air-liquid-Bedingungen deutlich geringer exprimiert.

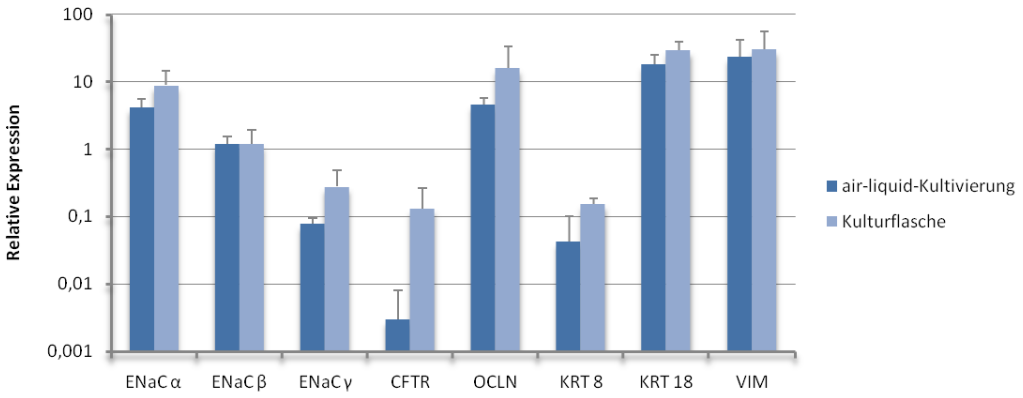


Abbildung 16: Vergleich der Genexpressionen zwischen 28 Tage kultivierten Polypenzellen in air-liquid-Kultur und Kulturflasche. ENaC: Epithelialer Natriumkanal, CFTR: Cystische Fibrose Transmembranregulator, OCLN: Occludin, KRT: Cytokeratin, VIM: Vimentin.

In der PCR von Polypenzellkulturen, die unter air-liquid-Bedingungen unter Zusatz oder Abwesenheit von 200 nM Dexamethason kultiviert wurden, wurde deutlich, dass Dexamethason keinen Einfluss auf die Expression der ENaC-Untereinheiten hat (siehe Abbildung 17). Dies steht im Kontrast zur Kultur von H441-Zellen, bei denen Dexamethason zu einer signifikanten Hochregulation aller ENaC-Untereinheiten führte (siehe Abschnitt 3.1.3).

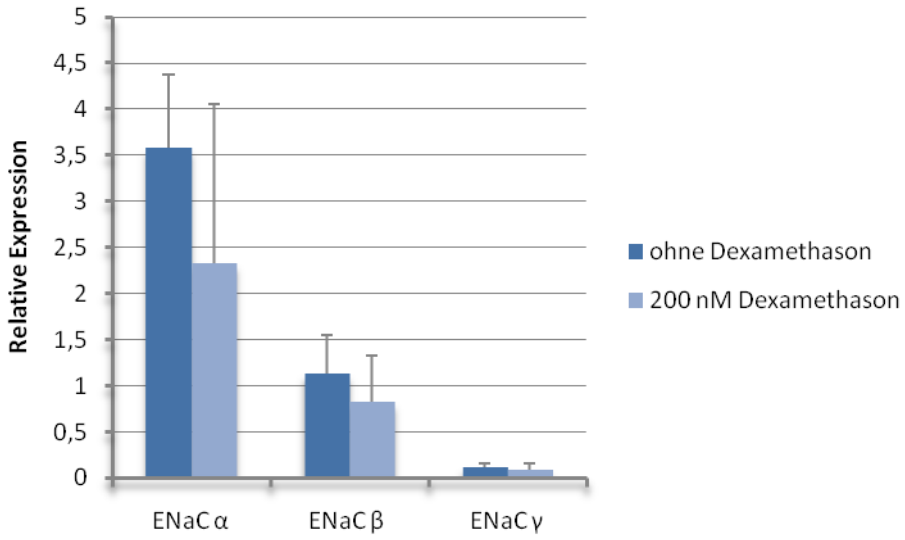


Abbildung 17: Expression der mRNA der ENaC-Untereinheiten in Polypenzellen. Zusatz von Dexamethason hat keinen Einfluss auf die Expression. ENaC δ wurde nicht exprimiert. mRNA: Messenger Ribonukleinsäure, ENaC: Epithelialer Natriumkanal.

Als Grundlage für weitere Experimente wurden die Expressionen von inflammatorischen Proteinen in Polypenzellkulturen bestimmt. Es konnte in 28 d kultivierten Zellen die Expression von Toll like Rezeptor 1 und 2 (TLR 1und 2), Cyclooxygena-

se 2 (COX 2) und Chemokin Ligand 5 (CCL 5) nachgewiesen werden. Die Chemokinrezeptoren 3 und 4 (CXCR 3, CCR 4) wurden nicht exprimiert.

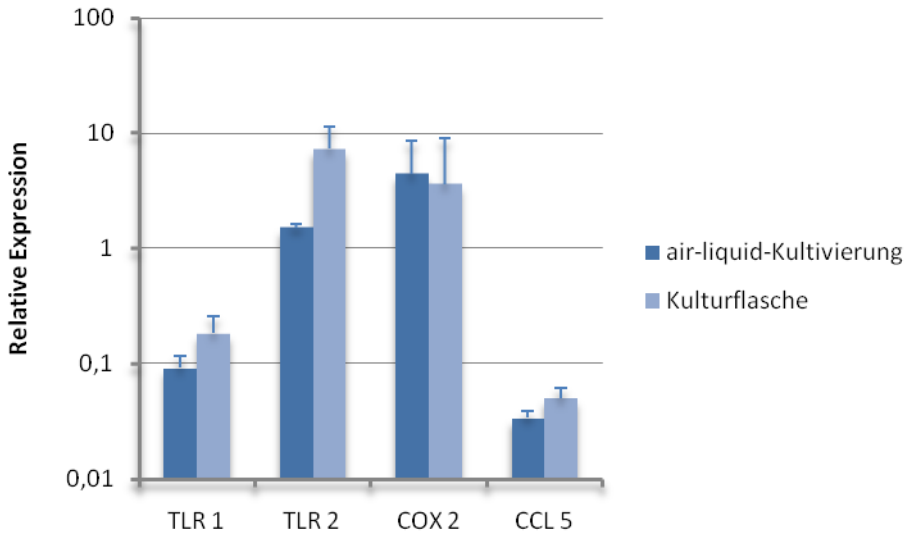


Abbildung 18: Expression von Genen des Immunsystems in 28 d kultivierten Polypenzellen. CXCR 3 und CCR 4 konnten nicht nachgewiesen werden. TLR: Toll-like Rezeptor, COX: Cyclooxygenase, CCL: Chemokin Ligand.

3.3 SLO-Effekte auf epitheliale Zellkulturen

3.3.1 Zellschädigung durch SLO

Zur Quantifizierung des zellschädigenden Effekts von SLO und zur Bestimmung von sublytischen, das heißt die Zellmembran-Integrität nicht zerstörenden, Konzentrationen, wurden H441-Zellen mit SLO in Kontrollmedium sowie in calciumfreiem Kontrollmedium inkubiert. Daraufhin erfolgten die Fixierung der Zellen und die Färbung der Zellen. Im Epifluoreszenzmikroskop konnten die Färbungen als verschiedene Wellenlängen dargestellt (siehe Abbildung 19) und nachträglich mit Falschfarben visualisiert werden.

Bei Inkubation mit SLO in Kontrolllösung war ein Anstieg der Anzahl geschädigter Zellen ab einer Konzentration von 1000 ng/ml zu beobachten (siehe Abbildung 20 C).

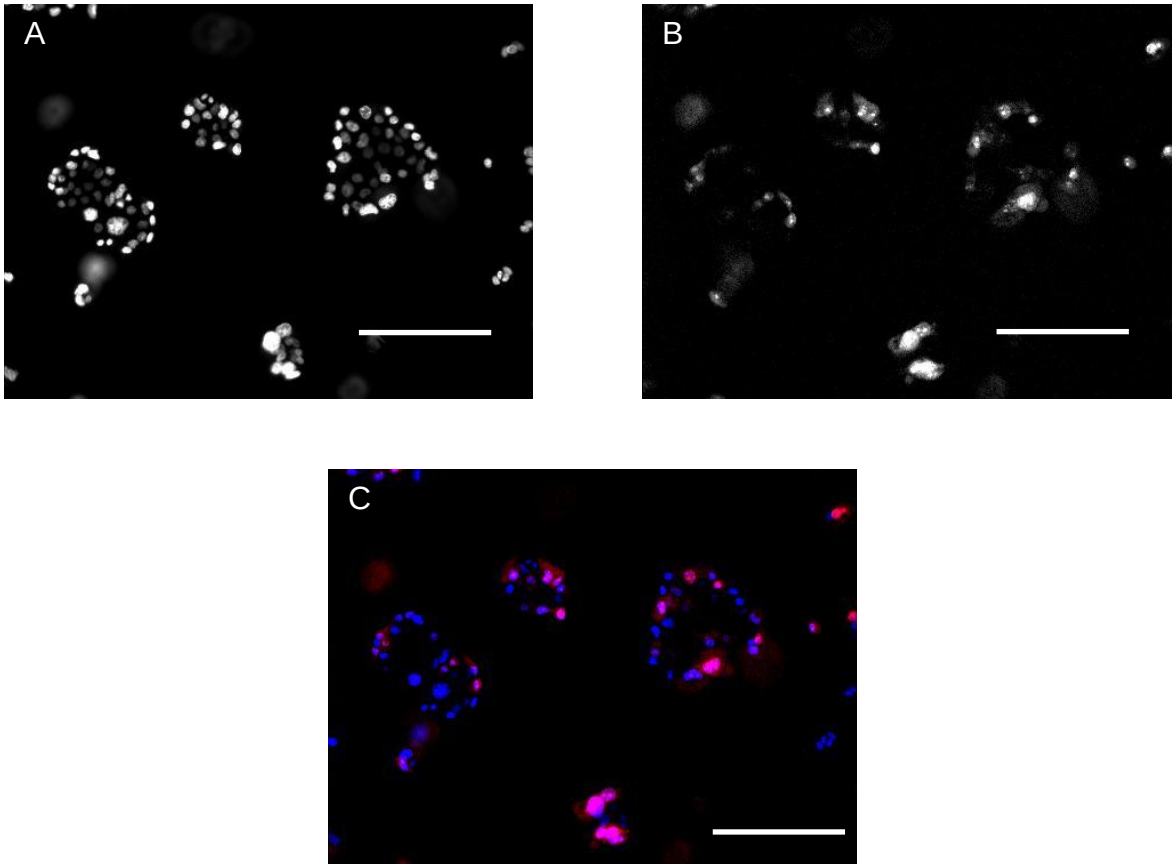


Abbildung 19: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme von H441-Zellen nach 20-minütiger Inkubation mit Streptolysin O (10000 ng/ml). A) Färbung der Zellkerne aller Zellen n_{total}. B) Färbung der Zellen mit zerstörter Zellmembranintegrität $n_{geschädigt}$. C) Visualisierung der beiden Fluoreszenzwellenlängen mit Falschfarben. Skalierungsbalken entspricht 100 µm.

In Abwesenheit von extrazellulärem Calcium zeigte sich eine Zellschädigung bereits ab einer SLO-Konzentration von 30 ng/ml. Die Sensitivität der Zellen für SLO-Konzentrationen >300 ng/ml nahm in calciumfreier Kontrolllösung signifikant ($p<0,05$) zu (siehe Abbildung 20).

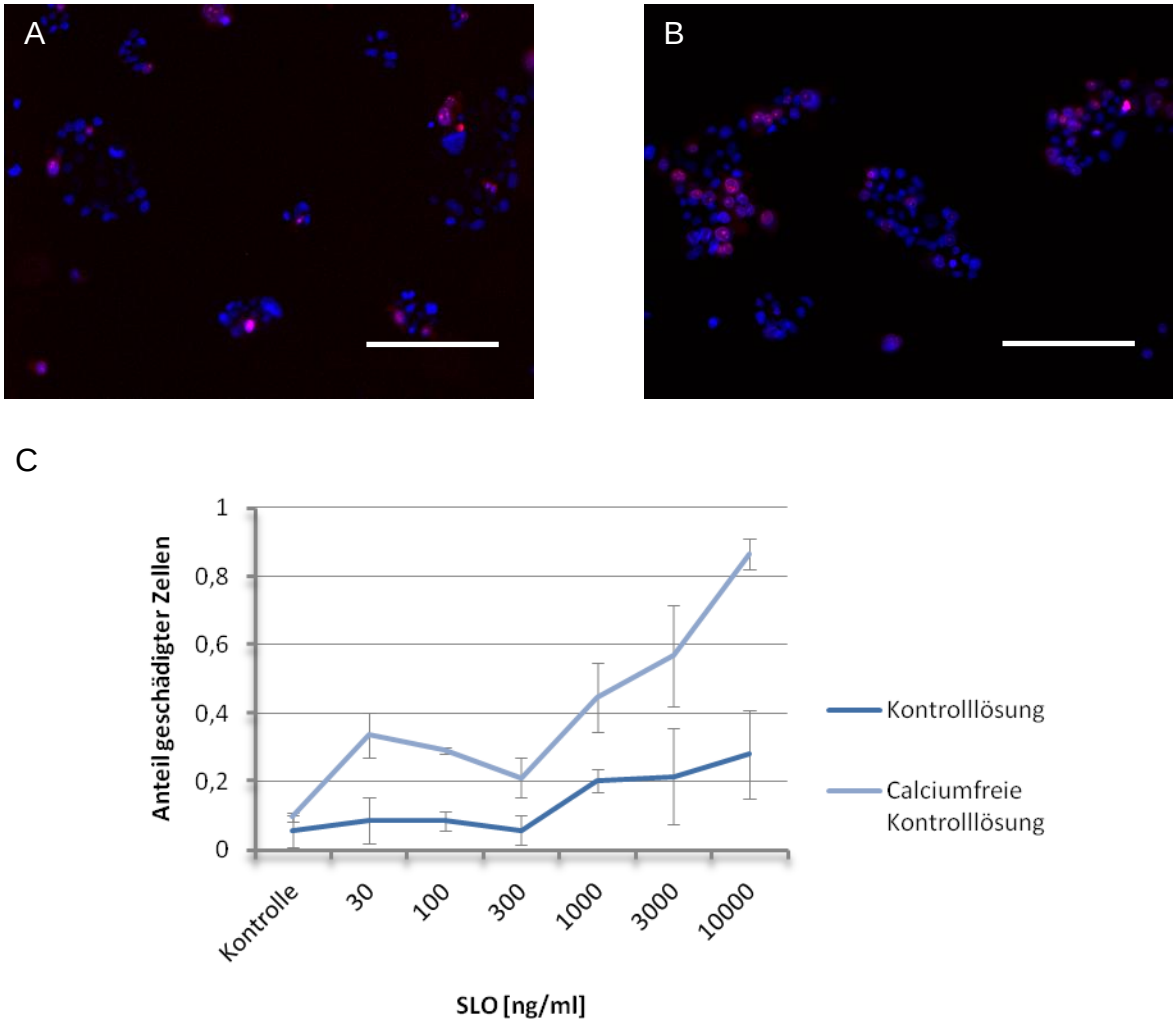


Abbildung 20: A) und B) Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme von H441-Zellen nach 20-minütiger Inkubation mit SLO (3000 ng/ml). Markierung entspricht 100 µm. A) Inkubation mit SLO in Kontrolllösung. B) Inkubation mit SLO in calciumfreier Kontrolllösung. Es sind deutlich mehr geschädigte Zellen zu erkennen. C) Konzentrations-Wirkung-Beziehung. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Vulnerabilität bei Inkubation mit Ca^{2+}-freier Kontrolllösung. SLO: Streptolysin O.

Zur Validierung der verwendeten fluoreszenzmikroskopischen Methode wurde ein Chemolumineszenz-Assay durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei Kulturen von H441-Zellen sowie Polypenzellen ebenfalls eine konzentrationsabhängige Zellschädigung bei Inkubation mit SLO. Die Schädigung begann ab einer SLO-Konzentration von 1000 ng/ml; geringere Konzentrationen führten zu keiner Zellschädigung und wurden somit als sublytisch bezeichnet. Die höchste eingesetzte SLO-Konzentration von 10000 ng/ml schädigte 28,9 ± 3,1% der Zellen. Da sich die Messwerte aus dem mikroskopischen Propidium-Iodid-Assay und dem Chemolumineszenz-Assay weitestgehend entsprachen (siehe Abbildung 21), wurde für die weiteren Experimente die Chemolumineszenz-Methode angewandt.

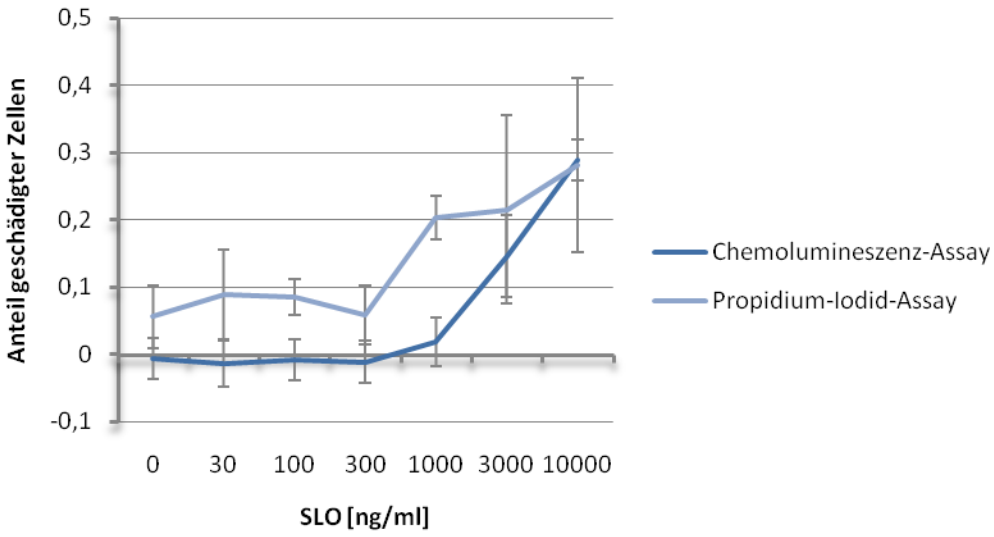
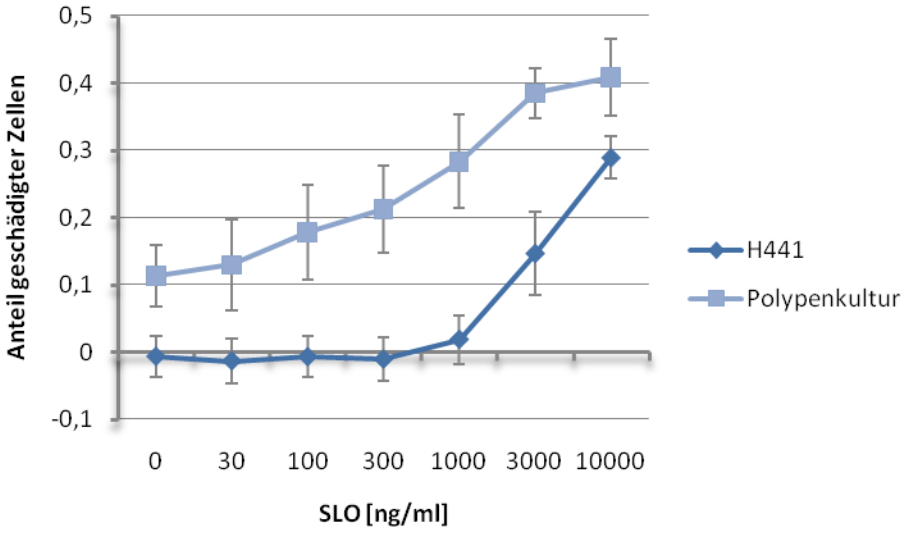


Abbildung 21: Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus Chemolumineszenz- und fluoreszenzmikroskopischem Propidium-Iodid-Assay. Die Methoden zeigten weitestgehend einander entsprechende Ergebnisse. SLO: Streptolysin O.

Kulturen von Polypenzellen zeigten eine signifikant höhere Sensitivität als H441-Zellen. Bereits die Kontrollinkubation mit Medium und die Durchführung der Messung führte zu einer Schädigung von 11,3 ± 4,6% der Zellen. SLO-Konzentrationen ab 30 ng/ml führten zu einem Anstieg des Anteils geschädigter Zellen, bei 10000 ng/ml wurde ein Anteil geschädigter Zellen von 40,9 ± 5,7 % erreicht. Der Anteil geschädigter Zellen nach Inkubation mit 600 ng/ml SLO entsprach dem Anteil geschädigter H441-Zellen nach Inkubation mit 3000 ng/ml SLO (siehe Abbildung 22 B).

A



B

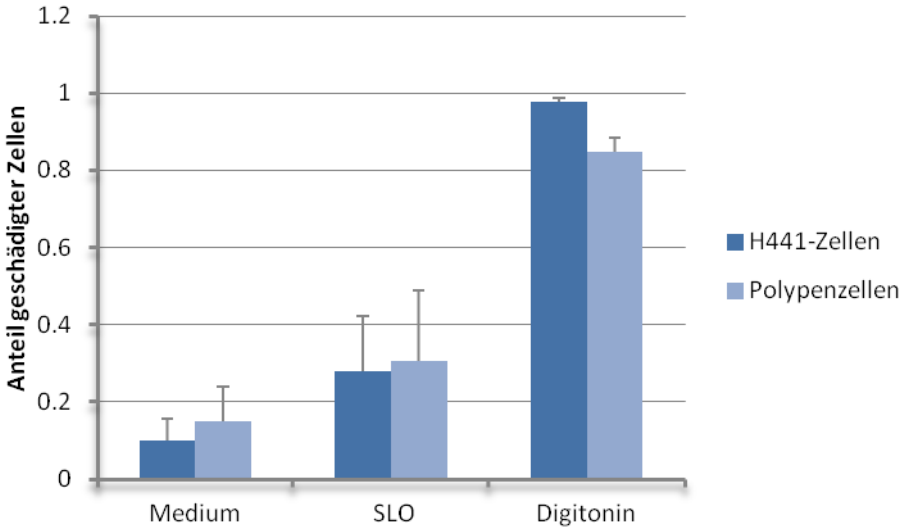


Abbildung 22: A) Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für SLO auf H441- bzw. Polypenzellkulturen. Polypenzellen reagierten signifikant empfindlicher auf Inkubation mit SLO. B) Anteil geschädigter Zellen nach fünfstündiger Inkubation. H441-Zellen wurden mit 3000 ng/ml SLO inkubiert; für Polypenzellen wurde eine Konzentration von 600 ng/ml SLO verwendet. SLO: Streptolysin O.

3.3.2 Einfluss von Kinase-Inhibitoren auf die SLO-induzierte Zellschädigung

Um den protektiven oder schädigenden Effekt von Kinase-Inhibitoren auf SLO-inkubierte H441-Zellen zu untersuchen, erfolgte eine Coinkubation der jeweiligen Substanz zusätzlich zur Inkubation mit 3000 ng/ml SLO. Als Referenzwerte ergab sich für Kontrollzellen (Mediuminkubation) ein Anteil geschädigter Zellen von 9,9 ± 5,7% und für SLO-inkubierte Zellen ohne Zusatz von Kinase-Inhibitoren 28,0 ± 14,4%. Die Positivkontrolle mit Digitonin, welche zur Berechnung des Korrekturfaktors verwendet wurde, zeigte eine Schädigung von 97,8 ± 1,2% der Zellen (siehe Abbildung 22) Die Differenz im Anteil geschädigter Zellen, die der SLO-

Wirkung zugeschrieben werden kann, beträgt für die Kontrolle somit 18,1 ± 14,4% für H441-Zellen.

Da sich bei einigen Kinase-Inhibitoren bereits bei der Kontrollinkubation ohne SLO eine Erhöhung oder Verringerung des Anteils geschädigter Zellen zeigte, wurde die Differenz zwischen SLO-inkubierten Zellen und Kontrollwerten (alleinige Inkubation mit Kinase-Inhibitor) berechnet, um den SLO-Effekt auf die Zellschädigung darstellen zu können.

In den eingesetzten Konzentrationen wirkten die inhibitorischen Substanzen spezifisch auf die in Tabelle 22 aufgeführten Kinasen.

Tabelle 22: Effektorproteine der Kinase-Inhibitoren.CDK: Cyclinabhängige Kinase, MAPK: Mitogenaktivierte Proteinkinase, RTK: Rezeptor Tyrosinkinase, PK: Proteinkinase, Cyc: Cyclin, MEK: Mitogenaktivierte Proteinkinase Kinase, JNK: c-Jun N-terminale Kinase, IGFR: Insulinähnlicher Wachstumsfaktor Rezeptor, EGFR: Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor, VEGFR: Gefäßendothel Wachstumsfaktor Rezeptor, FGFR: Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor.

Substanzklasse	Substanz	Konzentration	Inhibierte Kinasen
CDK-Inhibitoren	Kenpaullone	7,5 µM	CDK1/CycB, CDK2/CycA, CDK5/p38
	Purvanolol	75 nM	CDK2/CycB, CDK2/CycE
	Purvanolol	1 µM	CDK2/CycA, CDK2/CycB, CDK2/CycE, CDK5/p35, CDK4/CycD1
	Roscovitine	0,7 µM	CDK5/p35
MAPK-Inhibitoren	SL 327	20 µM	MEK1, MEK2
	SP 600125	1,5 µM	JNK
	SB 203580	5 µM	p38
RTK-Inhibitoren	Picropodophyllin	10 nM	IGFR
	PD 153035	0,25 nM	EGFR
	Tyrphostin	1,5 µM	ErB2/HER2
	SU 11274	20 µM	VEGFR,FGFR
PK-Inhibitoren	HA 1077	20 µM	PKA, PKG
	Staurosporine	100 nM	PKA, PKG, PKC
	H 8	0,5 µM	PKG
	H 89	35 nM	PKG, PKA

Signifikante Verringerungen des Anteils durch SLO geschädigter Zellen ($p<0,05$) zeigten sich für den Cyclin-dependent Kinase-Inhibitor Purvanolol (75 nM), die Mitogen-activated Protein Kinasen SL 327 (20 µM) und SB 203580 (5 µM) und den Rezeptor Tyrosinkinase-Inhibitor PD 153035 (0,25 µM) (siehe Abbildung 23).

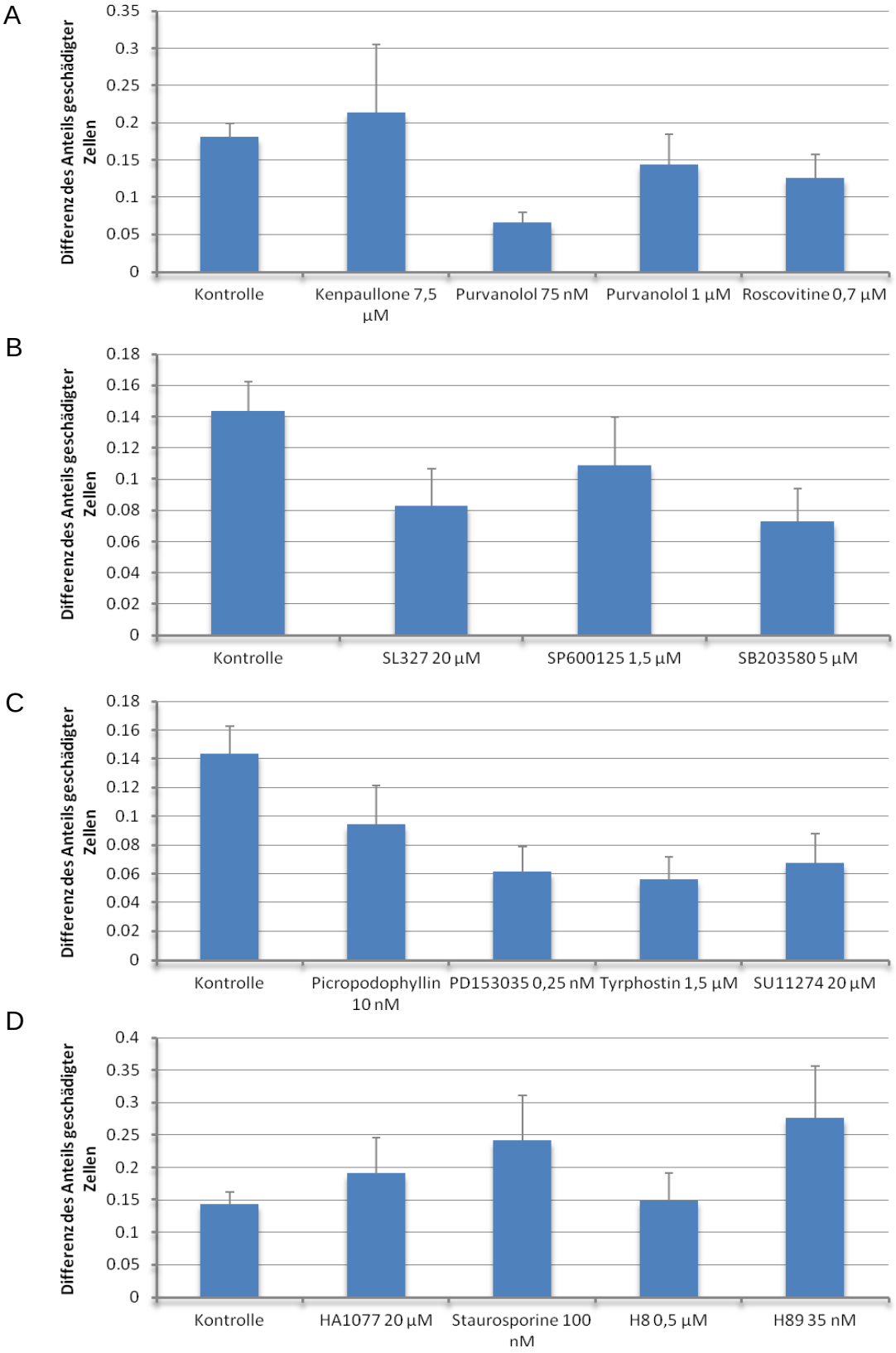


Abbildung 23: Angegeben ist die Differenz des Anteils toter Zellen zwischen mit Kinase-Inhibitor inkubierten Zellen und Zellen, die zusätzlich mit 3000 ng/ml Streptolysin O inkubiert wurden. A) Cyclin-dependent-Kinase-Inhibitoren B) Mitogen-activated Protein Kinase-Inhibitoren C) Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren D) Proteinkinase-Inhibitoren. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion für Purvanolol, SL 327, SB 203580 und PD 153035. Angabe als Mittelwert ± SEM, N=12.

Unter Kontrollbedingungen (Mediuminkubation) waren ca. 10% der Zellen geschädigt. Der Anteil geschädigter Zellen wurde durch Purvanolol und SB 203580 nicht beeinflusst. Zellen, welche mit PD 153035 inkubiert wurden, zeigten einen signifikant verringerten Anteil geschädigter Zellen, während die Inkubation mit SL 327 den Anteil geschädigter Zellen in Abwesenheit von SLO signifikant erhöhte (siehe Abbildung 24). Bei Coinkubation von SL 327 und SLO erreichte die Zellschädigung dasselbe Niveau wie ohne Zusatz des Inhibitors.

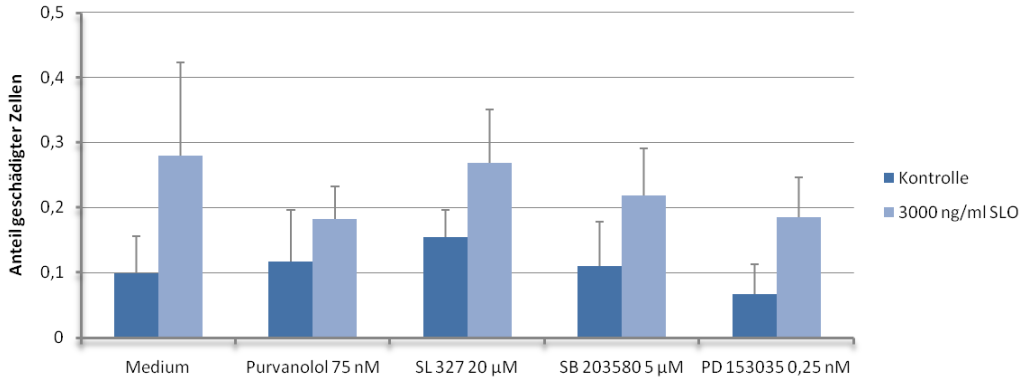


Abbildung 24: Einfluss von Kinase-Inhibitoren auf die Vulnerabilität von H441-Zellen durch SLO. SLO: Streptolysin O.

3.3.3 Einfluss von Makrolid-Antibiotika auf die SLO-induzierte Zellschädigung

Wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, wurden Zellkulturen zusätzlich zur Inkubation mit SLO (H441-Zellen: 3000 ng/ml) nun mit Makrolidantibiotika behandelt, um deren Einfluss auf die Zellschädigung durch SLO abzubilden. Hierbei ergab sich bei Coinkubation von Roxithromycin mit SLO auf H441-Zellen im Chemolumineszenz-Assay eine signifikante Reduktion des Anteils durch SLO geschädigter Zellen von 17,7 ± 14,9% auf 8,7 ± 15,0%. Der Ausgangswert geschädigter Zellen ohne SLO-Behandlung blieb bei Zugabe aller Makrolide konstant.

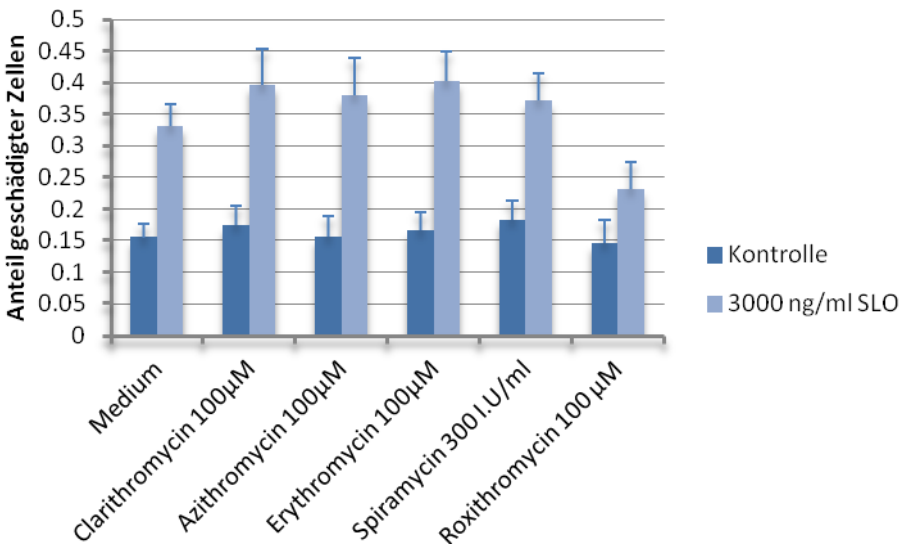


Abbildung 25: Chemolumineszenz-Assay: Einfluss von Makroliden auf die Vulnerabilität von H441-Zellen. Signifikante Reduktion der SLO-induzierten Zellschädigung durch Coinkubation mit Roxithromycin. Angabe als Mittelwert ± SEM, N=12. SLO: Streptolysin O, I.U.: Internationale Einheiten.

Auch in der Färbung mit Propidium-Iodid zeigte sich der protektive Effekt von Roxithromycin. Die Anzahl geschädigter Zellen konnte von 50,1 ± 31,6% bei Inkubation mit 3000 ng/ml SLO auf 21,9 ± 11,6 % bei gleichzeitiger Inkubation mit 100 µM Roxithromycin gesenkt werden. Eine signifikante ($p<0,05$) Verminderung der Zellvulnerabilität zeigte sich auch für die Inkubation mit 100 µM Azithromycin.

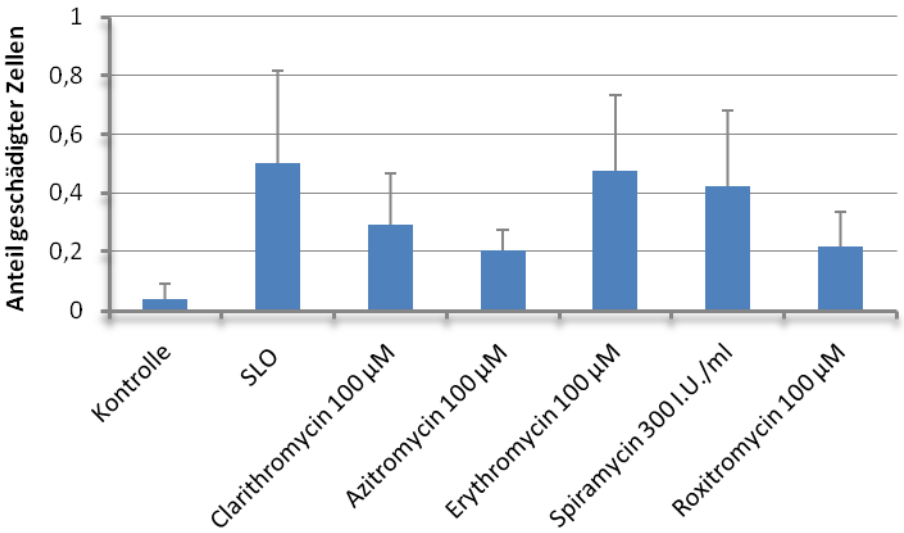


Abbildung 26: Mikroskopischer Propidium-Iodid-Assay: H441-Zellen wurden 20 min mit SLO mit oder ohne Zusatz von Makroliden inkubiert. Durch Azithromycin und Roxithromycin wurde der Anteil geschädigter Zellen signifikant reduziert. SLO: Streptolysin O, I.U.: Internationale Einheiten.

Der protektive Effekt von Roxithromycin, der auf H441-Zellen gezeigt werden konnte, ließ sich auch im Experiment mit Polypenzellkulturen bestätigen. Die SLO-

induzierte Zellschädigung (Polypenzellen: Inkubation mit 600 ng/ml SLO) konnte von 15,7 ± 18,2% auf 3,1 ± 11,2 % gesenkt werden. Allerdings wurde aufgrund der ausgeprägten Heterogenität der Polypenzellkulturen das Signifikanzniveau nicht erreicht.

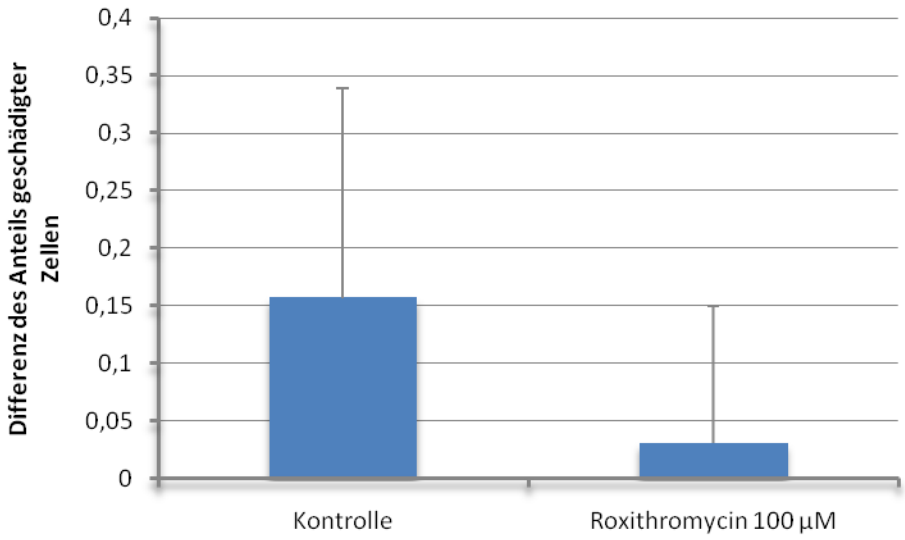


Abbildung 27: Anteil der durch Inkubation mit 600 ng/ml SLO geschädigten Polypenzellen. Coinkubation mit 100 µM Roxithromycin verringert den Anteil der durch SLO geschädigten Zellen.

3.3.4 Einfluss von sublytischen SLO-Konzentrationen auf die Expression der mRNA inflammatorischer Proteine

Der Einfluss sublytischer SLO-Konzentrationen (300 ng/ml) wurde durch semi-quantitative PCR von H441-Zellkulturen bestimmt. Es wurden die inflammatorischen Marker IL 8, SP-B, TLR 1 und 2, COX 2, c-FOS sowie die Chemokin Rezeptoren 3 und 4 untersucht. Die Zeitpunkte für die RNA-Extraktion betrugen für alle Marker außer c-FOS 0 h, 1 h, 2 h, 3 h ,4 h ,6 h,8 h und 24 h nach einer 30-minütigen Inkubation. Für c-FOS erfolgten RNA-Extraktionen nach 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min und 90 min.

COX 2 und CXCR 3 zeigten den stärksten Anstieg mit einer Verdreifachung der Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen nach 2 Stunden. Surfactant Protein B erfuhr eine Verdoppelung der Expression mit einem Maximum nach 4 Stunden. Die Expression von Interleukin 8 stieg nach 3 h auf das 2,5 fache des Ausgangswerts. Die Expression der genannten mRNAs fällt nach spätestens 6 Stunden unter das Ausgangsniveau zurück und bleibt auch 24 h nach SLO-Inkubation niedriger als der Ausgangswert.

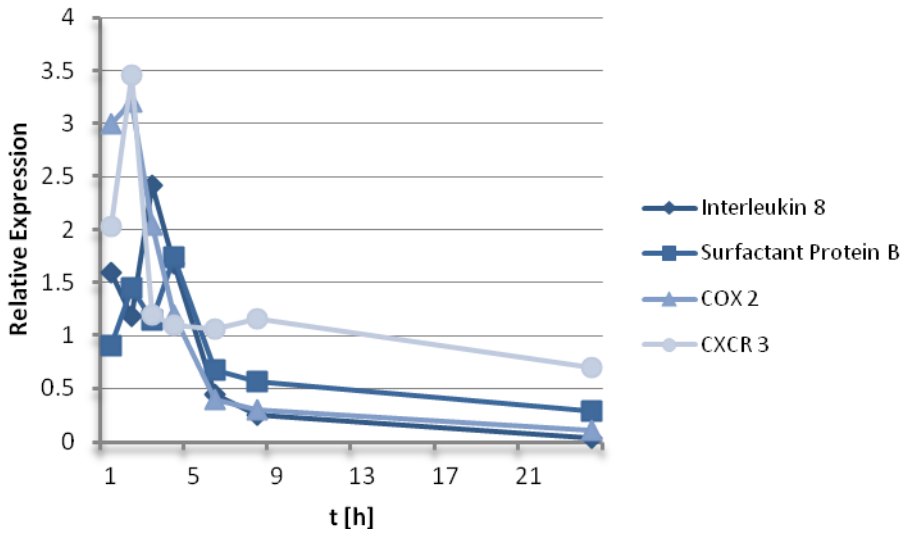


Abbildung 28: Expression inflammatorischer Gene (IL 8, SP-B, COX 2, CXCR 3) in H441-Zellen nach Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen (300 ng/ml). Die Expression ist relativ zu unbehandelten Zellen angegeben. COX 2: Cyclooxygenase 2, CXCR: CXC-Motiv-Chemokin Rezeptor.

Der Transkriptionsfaktor c-FOS erreichte das Maximum seiner Expression, das etwa 2,5 fache des Ausgangswerts, 30 Minuten nach Inkubation mit 300 ng/ml SLO. Danach fiel der Wert wieder signifikant ab und erreichte nach 60 Minuten einen konstanten Level von etwa einem Viertel des Ausgangswerts.

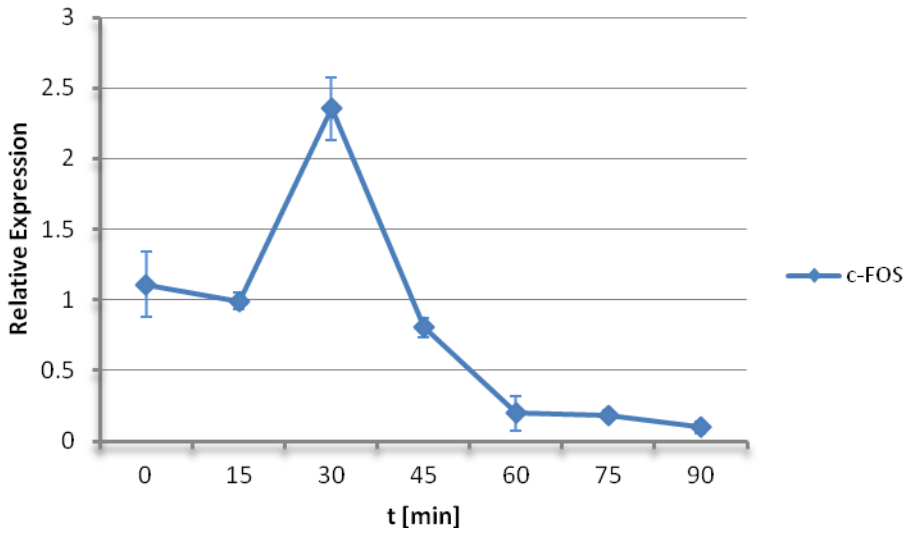


Abbildung 29: Verlauf der Expression von c-FOS nach Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen. Expression ist relativ zu unbehandelten Zellen angegeben.

Die Expression von Toll like Rezeptor 1 (TLR 1) blieb in den ersten 2 h nach Inkubation mit SLO auf dem Ausgangsniveau und fiel danach auf etwa ein Viertel des Ausgangswerts ab. Die Expression des TLR 2 schwankte während des Experi-

ments um den Ausgangswert und ließ keinen Zusammenhang mit der SLO-Inkubation erkennen. Der Chemokin Rezeptor 4 zeigte zu Beginn einen Abfall seiner Expression, um nach 2 h wieder den Ausgangswert zu erreichen. Danach kam es zu einer weiteren Abnahme der Expression, welcher ein erneuter Anstieg zum Ausgangswert nach 6 Stunden folgte.

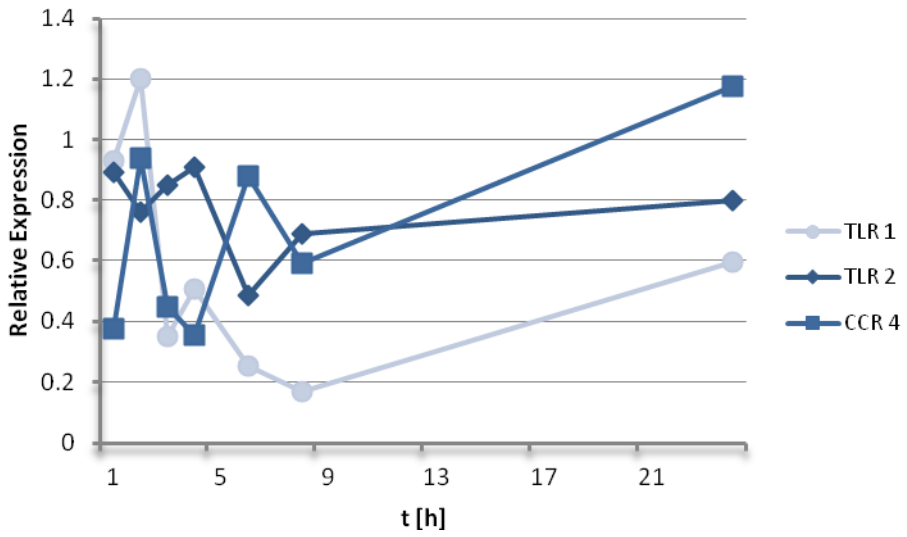


Abbildung 30: Expression inflammatorischer Gene (TLR1 und 2, CCR 4) in H441-Zellen nach Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen (300 ng/ml). Die Expression ist relativ zu unbehandelten Zellen angegeben. SLO: Streptolysin O, TLR: Toll-like Rezeptor, CCR: Chemokin Rezeptor.

3.3.5 Einfluss von SLO auf den TEER von H441-Zellen

Epithelien, die in Abwesenheit von Dexamethason kultiviert wurden, reagierten auf eine kurzfristige apikale SLO-Exposition (300 ng/ml für 30 min) mit einer signifikanten ($p<0,05$) Zunahme des TEER um 14,2%.

Ein SLO-induzierter TEER-Anstieg konnte in Epithelien, die in Anwesenheit von 200 nM Dexamethason kultiviert wurden, nicht beobachtet werden.

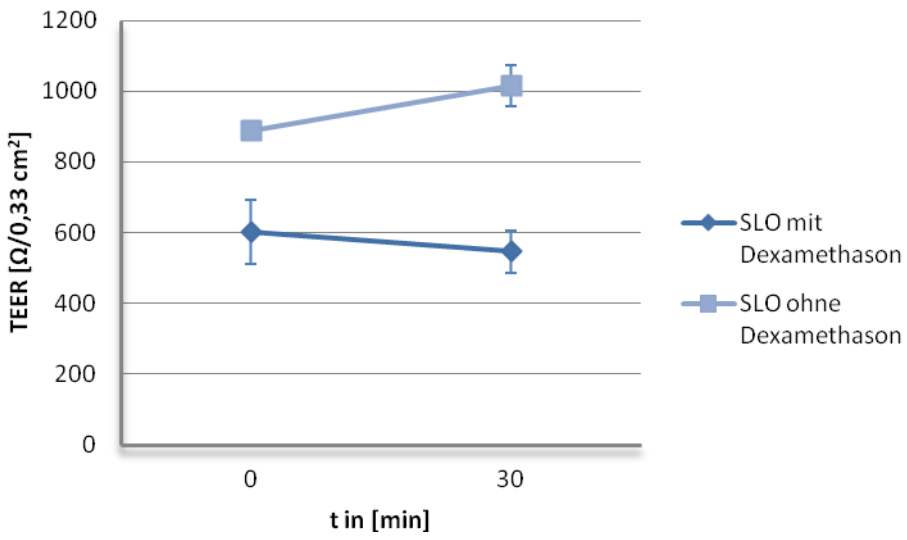


Abbildung 31: Kurzfristige Änderung des TEER durch Inkubation mit SLO. Vor und nach 30 minütiger Inkubation mit 300 ng/ml SLO wurde der TEER bestimmt. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme des TEER bei dexamethasonfrei kultivierten Zellen. TEER: Transepithelialer elektrischer Widerstand, SLO: Streptolysin O.

Der langfristige Einfluss von sublytischen SLO-Konzentrationen auf Atemwegsepithelien wurde untersucht. Hierzu wurden H441-Zellen unter air-liquid Bedingungen kultiviert und die apikale Seite wiederholt mit SLO (300 ng/ml) inkubiert (siehe Abbildung 32). Als Kontrolle wurden Epithelien mit Medium ohne SLO überschichtet.

Zellen, die ohne Dexamethason kultiviert wurden, reagierten mit einer Zunahme des TEER. Dieser Anstieg war unabhängig von SLO. H441-Epithelien, die in Anwesenheit von Dexamethason kultiviert wurden, zeigten einen signifikanten Anstieg des TEER nur bei Überschichtung mit SLO-haltigem Medium.

Nach den Inkubationen blieb der TEER von dexamethasonfrei kultivierten Epithelien auf einem signifikant höheren Niveau ($p<0,05$) als der TEER von Zellen mit Dexamethason. Dies zeigte sich unabhängig von der Inkubation mit SLO oder Medium.

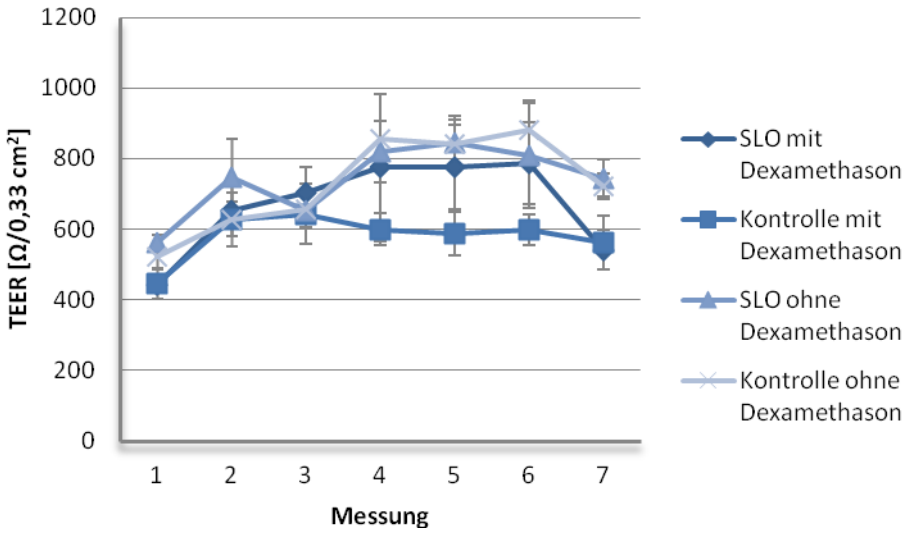


Abbildung 32: Abhängigkeit des TEER von Dexamethason und SLO. 11 Tage unter air-liquid-Bedingungen mit oder ohne Zusatz von 200 nM Dexamethason kultivierte H441-Zellen wurden dreimal täglich für 30 min mit Kulturmedium (=Kontrolle) oder Kulturmedium mit Zusatz von 300 ng/ml SLO inkubiert. TEER: Transepithelialer elektrischer Widerstand, SLO: Streptolysin O.

3.3.6 Einfluss von SLO auf die Expression der ENaC-Untereinheiten

Um den Einfluss von sublytischen SLO-Konzentrationen auf die Genexpression der ENaC-Untereinheiten zu untersuchen, wurden unter air-liquid-Bedingungen kultivierte H441-Zellen auf Transwell-Filtern über maximal vier Tage hinweg dreimal täglich (8.00 Uhr, 12.00 Uhr und 16.00 Uhr) für 30 min mit 300 ng/ml SLO in Medium bzw. als Negativkontrolle mit Kulturmedium inkubiert. Außerdem wurde RNA von unbehandelten Kulturen isoliert. Die RNA-Isolationen erfolgten nach 2, 24, 48 und 96 h.

In unbehandelten H441-Epithelien veränderte sich die Expression der ENaC-Untereinheiten während des Beobachtungszeitraums von 4 Tagen nicht. Ein transienter Anstieg der Expression konnte für alle Untereinheiten durch wiederholte Überschichtung der Epithelien mit Medium induziert werden (siehe Abbildung 33). Dieser vorübergehende Anstieg der Expression war SLO-unabhängig. Wurden die Zellen apikal mit SLO-haltigem Medium überschichtet, konnte für die ENaC γ-Untereinheit eine stabile Erhöhung der Expression beobachtet werden. Dies war für die α- und β-Untereinheit nicht der Fall. An den 2 h, 48 h und 96 h Messungen war die Expressionserhöhung von ENaC γ durch SLO signifikant höher als durch Medium alleine. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnte SLO nach 96 h die Expression um etwa 120% steigern.

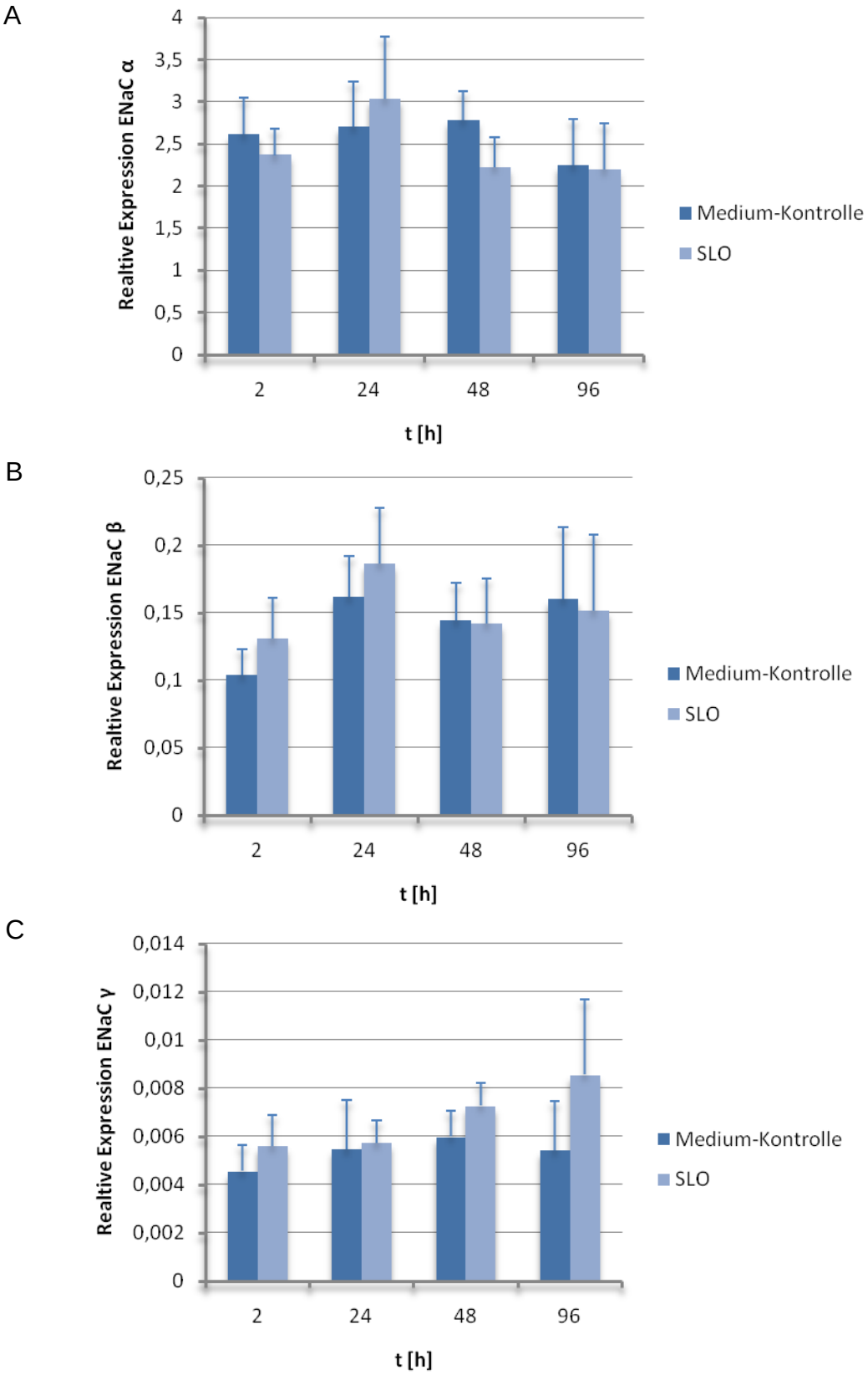


Abbildung 33: Zeitlicher Verlauf der ENaC-Expression in H441-Zellen. A) ENaC α B) ENaC β C) ENaC γ. Die Inkubation erfolgte mit Medium oder sublytischen SLO-Konzentrationen. Transienter, SLO-unabhängiger Anstieg der α-, β- und γ-Expression. Statistisch signifikante Hochregulation des ENaC γ-Gens nach Inkubation mit SLO im Vergleich zur Medium-Kontrolle nach 96 h. ENaC: Epithelialer Natriumkanal, SLO: Streptolysin O.

In der Darstellung der Expression in Relation zu unbehandelten Kontrollzellen (rel. Expression=1) wird der stetige Anstieg durch wiederholte Inkubation mit SLO für ENaC γ deutlich. Die Expression von ENaC α und β erreichte nach 24 h ihren höchsten Wert, der sich allerdings bei SLO-Inkubation nicht signifikant von der Medium-Kontrolle unterschied.

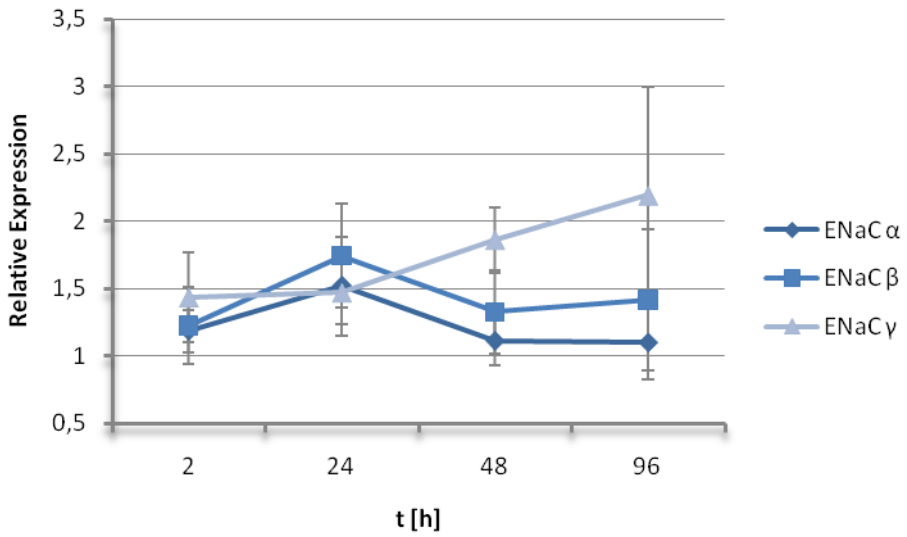


Abbildung 34: Verlauf der Expressionen der ENaC-Untereinheiten bei Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen in Relation zu unbehandelten Kontrollzellen. ENaC: Epithelialer Natriumkanal, SLO: Streptolysin O.

3.3.7 Einfluss von SLO auf den I_{SC} von H441-Zellen

Die Expression der ENaC γ-Untereinheit ist entscheidend für die Ionenselektivität und Einzelkanalleitfähigkeit des Epithelialen Natriumkanals. Daher sollte der Effekt von SLO auf die Ionentransportkapazität der Epithelien in Ussing-Kammer-Experimenten untersucht werden. Hierfür wurden H441-Zellen unter air-liquid-Bedingungen ohne Zusatz von Dexamethason kultiviert. Die Epithelien wurden über 48 h 6 mal für jeweils 30 min mit SLO in sublytischer Konzentration (c=300 ng/ml) oder als Kontrolle mit Medium überschichtet. Daraufhin erfolgte die Messung in der Ussing-Kammer mit Zugabe von Amilorid, Amphotericin B und Ouabain wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Vergleichskulturen (siehe Abbildung 8) und Epithelien, die nach einmaliger Inkubation nach 2 h in der Ussing-Kammer untersucht wurden, ein signifikanter Anstieg des amiloridsensitiven Kurzschlussstroms.

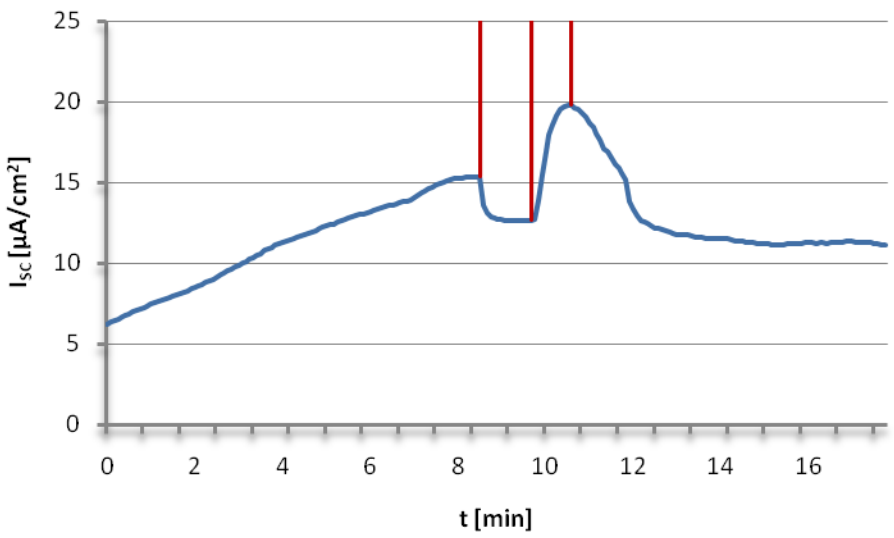


Abbildung 35: Verlauf des I_{SC} von dexamethasonfrei kultivierten H441-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen. Signifikante Erhöhung des $I_{SC,amil}$ im Vergleich zu unbehandelten Kulturen. An den markierten Stellen erfolgte die Zugabe von 10^{-5} M Amilorid, $2*10^{-5}$ M Amphotericin B und 10^{-3} M Ouabain. I_{SC}: Kurzschlussstrom, SLO: Streptolysin O.

Allerdings erfolgte durch alleinige Inkubation mit Medium ebenfalls ein signifikanter Anstieg des $I_{SC,amil}$ in derselben Größenordnung wie nach SLO-Inkubation.

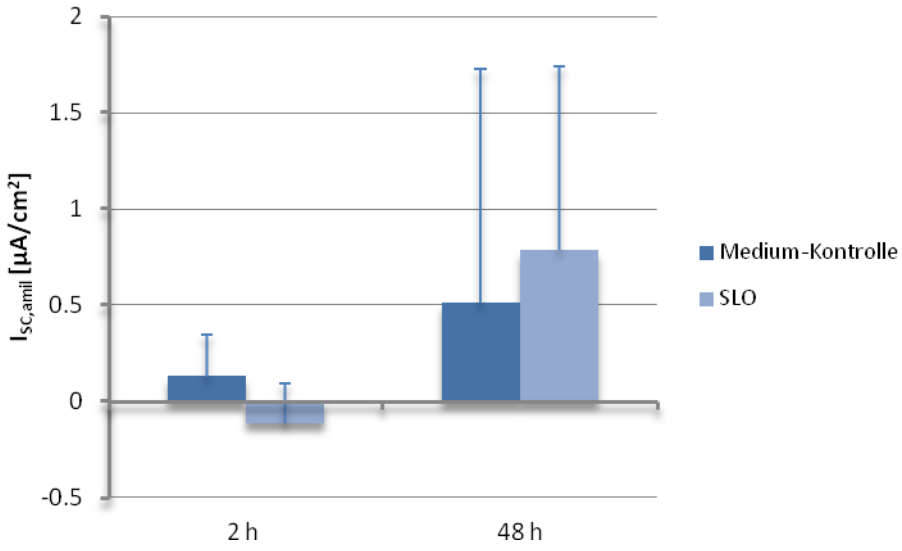


Abbildung 36: Einfluss von Inkubation mit Medium oder sublytischen SLO-Konzentrationen auf den amiloridsensitiven Kurzschlussstrom $I_{SC,amil}$ von dexamethasonfrei kultivierten H441-Zellen. $I_{SC,amil}$: Amiloridsensitiver Kurzschlussstrom, SLO: Streptolysin O.

3.3.8 Einfluss von Kinase-Inhibitoren auf Hochregulation der ENaC γ Expression nach Inkubation mit SLO

Der Effekt von Kinase-Inhibitoren auf die durch sublytische SLO-Konzentrationen induzierte ENaC γ-Hochregulation in H441-Zellen wurde mittels semiquantitativer

PCR untersucht. Hierfür wurden unter air-liquid-Bedingungen kultivierte Epithelien über 4 Tage dreimal täglich für 30 min mit 300 ng/ml SLO und Kinase-Inhibitoren (Konzentrationen siehe Tabelle 12) überschichtet. Zur Kontrolle wurden Zellkulturen mit dem Kinase-Inhibitor in Kulturmedium inkubiert. Nach 96-stündiger Behandlung der Kulturen erfolgten RNA-Isolation und PCR. Die Expression der ENaC γ-RNA wurde in Relation zum Mittelwert dreier Housekeeping-Gene (siehe Tabelle 18) ermittelt.

Einzig durch Coinkubation mit 1,5 µM Tyrphostin konnte die SLO-induzierte Hochregulation der ENaC γ-mRNA signifikant verhindert werden. Der Ausgangswert durch alleinige Inkubation mit Tyrphostin unterschied sich nicht zur Kontrollinkubation mit Medium.

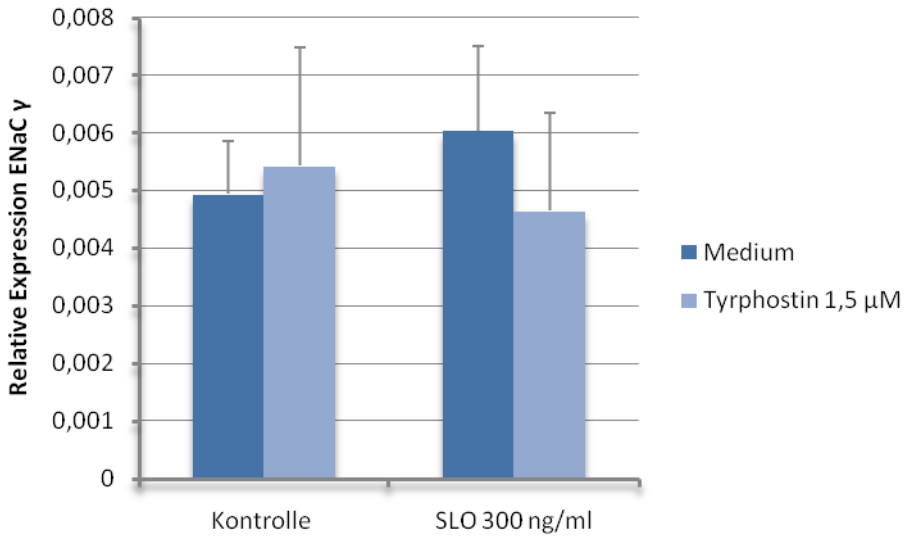


Abbildung 37: Tyrphostin verringert signifikant die SLO-induzierte Hochregulation der ENaC γ-Untereinheit. ENaC: Epithelialer Natriumkanal, SLO: Streptolysin O.

4 Diskussion

4.1 Zellkulturen

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den Effekt von SLO auf Atemwegsepithelien verschiedener Abschnitte des Respirationstrakts zu untersuchen.

Als Modell für die Untersuchung von Transportprozessen der distalen Atemwege verwendeten wir die gut etablierte NCI-H441-Zelllinie. Diese zeigt typische Eigenschaften des distalen Atemwegsepithels wie polares Wachstum, Ausbildung eines stabilen TEERs (>500 Ω/0,33 cm^2, siehe Abbildung 32) und die Fähigkeit zum Ionen- und Flüssigkeitstransport [104]. Die Eigenschaften der Zellkultur hängen stark von den Kulturbedingungen ab [61, 103]. Wir wählten für unsere Experimente realitätsnahe air-liquid-Interface-Kulturbedingungen, welche dem physiologischen Milieu der unteren Atemwege entsprechen.

Als Zellmodell für die proximalen Atemwege gelang es, polypoide Zellen zu kultivieren. Voraussetzung für die Kultur unter air-liquid-Bedingungen ist die Ausbildung stabiler Zellkontakte und die Aufrechterhaltung der Flüssigkeitshomöostase im apikalen Kompartiment. Tatsächlich exprimierten primärkultivierte polypoide Zellen Occludin, was als molekularbiologischer Marker für epitheltypische Tight junctions gilt. Die Expression weiterer epitheltypischer mRNA weist auf epitheliale Eigenschaften hin. Auch die für das Atemwegsepithel typischen Ionenkanäle konnten auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Damit schienen die wichtigsten Kriterien für die Aufrechterhaltung der Flüssigkeitshomöostase erfüllt zu sein, was sich auch in der Einstellung einer Kultur mit stabilem TEER wiederspiegelt (siehe Abbildung 12). Anders als für verschiedene Epithelien wie z.B. H441-Zellen gezeigt, hatte der Zusatz von Dexamethason zum Medium keinen Einfluss auf den TEER. Überraschenderweise ließ sich die Expression der ENaC-Untereinheiten mittels Dexamethason nicht steigern (siehe Abschnitt 4.3.1) - eine für Atemwegsepithelien untypische Eigenschaft. Zudem ging die Fähigkeit zur Ausbildung eines stabilen TEER-Anstiegs bei nachfolgenden Passagen verloren (siehe Abbildung 13), obwohl sich morphologische Merkmale während der Kulturdauer nicht veränderten. Wir beobachteten jedoch über die Kulturdauer eine Veränderung der für Epithelien charakteristische Genexpression, z.B. einen Abfall der mRNA von

CK 8 und 18 (siehe Abbildung 15). Hierfür bieten sich zwei Erklärungsmöglichkeiten: Mesenchymale Zellen, welche Bestandteil der Zellkultur sind (Marker: Vimentin, siehe Abbildung 16), könnten stärker proliferieren als epitheliale Zellen und somit einen größeren Anteil am Gesamtzellpool einnehmen. Dies könnte den epithelialen Zellverband stören und die Ausbildung einer stabilen Zellschicht verhindern. Zweitens käme eine Veränderung der Epithelzellen im Sinne einer Dedifferenzierung in Betracht. Die Zellen verlieren über die Kulturdauer zunehmend ihre epithelialen Eigenschaften und gewinnen mesenchymale Eigenschaften hinzu. Eine Störung der Epithelstruktur wäre die Folge. Ein Beispiel von Dedifferenzierung mit funktioneller Veränderung bei Zellen der distalen Atemwege ist die Umwandlung von Alveolaren Typ 2 Zellen, zu deren Aufgaben u.a. die Surfactant Produktion gehört, in Alveolare Typ 1 Zellen, welche die Blut-Luft-Schranke ausbilden [32, 75].

4.2 Streptolysin O

4.2.1 Membranschädigung durch SLO

Um die Auswirkungen des Streptokokken-Virulenzfaktors SLO auf Epithelien des Respirationstrakts zu untersuchen, behandelten wir H441- und polypoide Zellkulturen mit ansteigenden SLO-Konzentrationen. Dabei zeigte sich für beide Zellmodelle eine konzentrationsabhängige Zellschädigung (siehe Abbildung 22 A). Wir beobachteten eine unterschiedliche Empfindlichkeit der verwendeten Zellkulturen. Die Schädigung der polypoiden Zellen begann bereits bei Inkubation mit 30 ng/ml SLO. H441-Zellen zeigten sich deutlich resistenter; erst bei SLO-Konzentrationen ab 1 µg/ml wurde ein lytischer Effekt nachgewiesen. Es ist bekannt, dass große Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber SLO bestehen können. Dies konnte zwischen Zellen verschiedener Spezies und zwischen verschiedenen Zellarten gezeigt werden. Beispielsweise sind kernlose Zellen wie Erythrozyten weitaus empfindlicher als kernhaltige Zellen [139]. Differenzierte Zellen zeigen im Vergleich zu undifferenzierten Zellen unterschiedliche Resistenz gegenüber porenbildenden Toxinen [48, 128]. Als ursächlich für die unterschiedliche Vulnerabilität, werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert: Bei Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen bleibt ein Großteil des Toxins in der monomeren Form. Diese Monomere könnten von den Zelloberflächen abgestoßen werden [139]. Zudem könnten verschiedene Zellarten die Fähigkeit haben, eine limitierte Anzahl von

SLO-Oligomeren zu tolerieren und die erzeugten Poren sogar wieder zu verschließen [137]. Beschriebene Möglichkeiten der Membranreparatur nach SLO-Exposition sind die Versiegelung von Poren durch Exozytose eines Membranpatches [8, 57, 76, 77] und die Endozytose von beschädigten Membranbestandteilen [57, 58], möglicherweise auch in Kombination [57]. Auch die Abschnürung von Poren enthaltenden Mikropartikeln wurde beschrieben [58], allerdings vor allem für Zellschädigungen durch den von Complementfaktoren erzeugten Membran-Attack-Komplex, der ebenfalls zu Porenbildung in der Zellmembran führt [83, 98].

Den zentralen Schalter, welcher das Zellschicksal Richtung Reparatur oder Zelltod lenkt, stellt das intrazelluläre Calciumsignal dar [6, 76]. Es leitet zelluläre Abläufe sowohl in Richtung des Zellüberlebens [8] als auch zu apoptotischen Prozessen [90]. Solange die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration unter einer kritischen Schwelle gehalten werden kann, werden durch Ca^{2+}-Einstrom Reparaturmechanismen stimuliert [82, 83]. Es kommt zu intrazellulären Ca^{2+}-Oszillationen [134], welche zu einer Zellproliferation und -differenzierung führen könnten. Das Signal aktiviert den zentralen Transkriptionsfaktor NF-κB und stimuliert in Folge davon die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8 [8, 82, 83, 138]. Erst ein überschießender Calciumeinstrom bei ausgeprägten Membranschäden induziert die Apoptose [82, 90]. Wir konnten bestätigen, dass extrazelluläres Calcium Zellen vor der Zerstörung durch SLO schützt [6, 21, 81]. In calciumfreier Kontrolllösung inkubierte Zellen zeigten eine deutlich erhöhte Vulnerabilität gegenüber SLO (siehe Abbildung 20). Dies erklären wir uns durch ein verringertes Reparaturpotential der Membranschäden aufgrund fehlender Initiation durch Ca^{2+}-Einstrom [58, 106]. Demgegenüber steht die Beobachtung, dass eine entgleiste intrazelluläre Ca^{2+}-Homöostase zu einer irreversiblen Zellschädigung führt [82, 90]. Daher könnte ein weiterer Grund für die unterschiedliche Sensitivität gegenüber SLO in einer verschieden stark ausgeprägter Ca^{2+}-Pufferkapazität liegen.

4.3 Regulation des Epithelialen Natriumkanals

Die Flüssigkeitshomöostase der distalen Atemwege ist Voraussetzung für eine funktionierende mucociliäre Clearance sowie für die Aufrechterhaltung des Gasaustauschs. Wir untersuchten den Einfluss des Streptokokkentoxins SLO auf die epithelialen Transporteigenschaften, welche maßgeblich durch ENaC bestimmt

werden. Eine Zusammenfassung der möglichen Mechanismen der Beeinflussung des Ionen- und Wassertransports mittels Modulation der Expression oder Funktion von ENaC stellt Tabelle 23 dar.

Tabelle 23: Faktoren, die den Flüssigkeitstransport an respiratorischen Epithelien beeinflussen. TNF: Tumornekrosefaktor, EGF: Epithelialer Wachstumsfaktor, TGF: Tumor Wachstumsfaktor. Angaben aus [12, 19, 28, 32, 33, 38, 43, 80, 87, 100, 125, 135, 143–145, 147].

	Stimulation	Inhibition
transkriptionell	Glucocorticoide Catecholamine Streptolysin	Hypoxie TNFα Cytokine Oxidativer Stress
posttranskriptionell	EGF, TGFα bakterielle Endo- und Exotoxine TNFα Proteasen Catecholamine	Stickstoffmonoxid Atriales natriuretisches Peptid Cytokine Proteaseinhibitoren

ENaC in Epithelien des Respirationtrakts setzt sich aus drei Untereinheiten, ENaC α, -β, und -γ zusammen [18]. Diese werden prä-, peri- und postnatal sowie unter pathologischen Bedingungen getrennt reguliert [131]. Eine weitere Untereinheit, ENaC δ, wird in den Keimdrüsen, im Pankreas und im Gehirn, aber nicht in den distalen Atemwegen exprimiert [136]. Dies konnten wir durch PCR-Analysen der H441- und polypoiden Zellkulturen bestätigen (siehe Abbildung 9 und Abbildung 17).

4.3.1 Transkriptionelle Effekte

Alle ENaC-Untereinheiten erfahren durch Inkubation mit Glucocorticoiden eine ausgeprägte Hochregulation [19]. Besonders stark zeigte sich in unseren Experimenten an H441-Kulturen der Effekt auf die β- und γ-Untereinheiten (siehe Abbildung 9), was sich mit den Ergebnissen von Lazrak et al. an A549-Zellen (humane, alveoläre Epithelien) [64] und den Resultaten von Dagenais et al. (alveoläre Epithelien der Ratte) [24] deckt. Wir konnten die Angleichung der Absolutwerte der ENaC α, -β und -γ-RNA-Menge nachweisen (siehe Abbildung 9 A). Erstaunlicherweise zeigten sich primärkultivierte Polypenzellen insensitiv auf Inkubation mit Dexamethason (siehe Abbildung 17).

Die Zusammensetzung des Kanals aus den verschiedenen Untereinheiten bestimmt seine Transporteigenschaften: Zwar ist die α-Untereinheit essentiell für die Funktion des Kanals [54], durch Coexpression der α- mit β- oder γ-Untereinheiten

kann eine weitaus höhere ENaC-Aktivität erzeugt werden. Die maximale Aktivität wird durch Coexpression aller drei Untereinheiten erreicht. Dadurch kann der $I_{SC,amil}$ in Epithelien um das 10- bis 20-fache gesteigert werden [18]. Unsere Beobachtung, dass Dexamethason die Expression der ENaC-Untereinheiten unterschiedlich stark induziert, ist ein Hinweis darauf, dass die Zusammensetzung der funktionellen ENaC-Kanäle und damit auch die funktionellen Eigenschaften des Kanals durch Dexamethason beeinflusst werden.

Wir konnten zeigen, dass sublytische SLO-Konzentrationen die ENaC γ-mRNA-Transkription induzierten (siehe Abbildung 33). Der funktionelle ENaC wird durch Oligomerisierung der Untereinheiten gebildet. Eine erhöhte ENaC-Aktivität kann bereits durch die Überexpression einer einzelnen Untereinheit induziert werden. Daher kann ein solcher Effekt auch durch die von uns beobachtete Hochregulation der ENaC γ-Untereinheit erwartet werden. Diese ging einher mit einer Steigerung des transepithelialen Kurzschlussstroms I_{SC}, welcher mit der Netto-Na^+-Absorption korreliert (siehe Abbildung 35 und Abbildung 36) [75].

Der große Beitrag, den die Hochregulation der ENaC-Untereinheiten zur Steigerung der Flüssigkeits-Clearance der Lunge leistet, wird im ENaC β überexprimierenden Maus-Modell von Mall et al. deutlich: Aufgrund einer Hyperresorption zeigen die transgenen Mäuse einen Cystische Fibrose-ähnlichen Phänotyp [72]. Die Krankheit wird durch Mutation im CFTR-Gen hervorgerufen, führt zur Störung der cAMP-abhängigen Cl^--Sekretion und, aufgrund fehlender Regulation des ENaC durch den defekten CFTR, zu erhöhter Na^+-Absorption [71]. Dasselbe Resultat mit allen nachfolgenden Auswirkungen wird im transgenen Mausmodell einzig durch Überexpression der β-Untereinheit des ENaC erzeugt. Die Tiere zeigen aufgrund der Verlegung der Atemwege durch zähen Mucus eine hohe neonatale Sterblichkeit (siehe Abbildung 38).

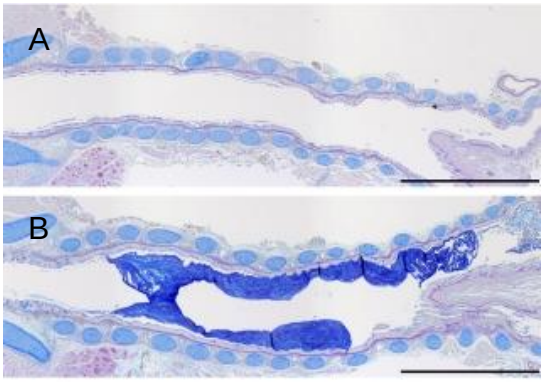


Abbildung 38: Histologie der Trachea von A) Wildtyp-Maus, B) ENaC β überexprimierender Maus, die am 3. Lebenstag getötet wurde. Alzianblau-Färbung. Die Verlegung des Atemwegs durch Mucus ist in Abbildung B) deutlich sichtbar. ENaC: Epithelialer Natriumkanal. Abbildung modifiziert nach [70].

Überlebende Tiere entwickeln Lungenerkrankungen wie chronische Bronchitiden und Lungenemphysem [70]. Ursächlich stehen die Verringerung des Airway surface liquid-Volumens und die daraus resultierende Konzentrierung des Mucus im Vordergrund. Die folgende Anhaftung des Mucus an die Epitheloberflächen und die herabgesetzte Mucociliäre Clearance führt zur Obstruktion der Atemwege, chronischer Inflammation mit Einwanderung neutrophiler Granulozyten und Becherzellmetaplasie. Es kommt zu einem Teufelskreis, da die Inflammation den Sauerstoffbedarf erhöht, die -Zufuhr allerdings vermindert ist. Die sich entwickelnde Epitheldegeneration wiederum fördert die Entzündungsreaktion. Die gereizten Atemwege bilden vermehrt Mucus, der die Obstruktion verschlimmert [70, 72]. In der Bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit können erhöhte Konzentrationen von Inflammationsmarkern wie TNFα und Interleukine nachgewiesen werden. Jedoch erwies sich die antiinflammatorische Behandlung mit Glucocorticoiden hinsichtlich Mucus-Obstruktion, Entzündungsreaktion und Neutrophilie als unwirksam [66]. Der therapeutischer Ansatz, die ursächliche Na^+-Hyperabsorption durch Amilorid zu inhibieren (siehe Abbildung 5), kann im Maus-Modell bei präventivem Einsatz die ASL-Hydratation verbessern. Dadurch können die Atemwegsobstruktion durch Mucus und die chronische Inflammation verhindert und die Mortalität gesenkt werden [149]. Eine weitere Folge der Überexpression von ENaC β ist die Verschlechterung der Clearance bakterieller Pathogene [72].

Hier sehen wir eine Verbindung zu den von uns aufgezeigten Streptolysineffekten: Die Pathogenität des SLO-sezernierenden Erregers kann durch seine Fähigkeit, die Expression der ENaC γ-Untereinheit hochzuregulieren (siehe Abbildung 33) und die Resorption über Steigerung des I_{SC} zu vergrößern (siehe Abbildung 35),

gesteigert werden. Durch die verstärkte Absorption von Flüssigkeit würde der Mucus konzentriert, haftete stärker an den Atemwegen und bildete einen optimalen Nährboden für die Bakterien. Diese können sich von im Mucus enthaltenen Kohlenhydraten ernähren und sind vor der Phagozytose durch Neutrophile geschützt [13]. Die herabgesetzte Clearance schwächt die natürliche Immunabwehr (siehe Abbildung 1) und könnte die Gefahr einer invasiven Streptokokkenerkrankung erhöhen.

4.3.2 Posttranskriptionelle Effekte

Unsere Beobachtung der $I_{SC,amil}$-Zunahme sowohl durch Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen als auch bei alleiniger Kontrollinkubation mit Medium (siehe Abbildung 36) kann dadurch erklärt werden, dass der epitheliale Na^+-Transport nicht nur über die Anzahl der Kanäle in der Plasmamembran, sondern auch über deren Offenheitswahrscheinlichkeit reguliert werden kann. Dabei spielt die proteolytische Spaltung von regulatorischen Untereinheiten des ENaC eine wichtige Rolle [38, 87]. Die ENaC-Aktivierung erfolgt durch Spaltung mittels intrazellulärer Furintyp-Proteasen [51, 52] oder extrazellulärer membranständiger Serin-Proteasen wie CAP1/Prostasin (Channel-activating protease, entspricht Prostasin) [27, 101, 110, 135]. Eine weitere Möglichkeit ist die Spaltung durch lösliche Proteasen wie z.B. Trypsin [26, 135] oder durch von Neutrophilen freigesetzte Elastase [17]. Extrazelluläre Proteaseinhibitoren wie Kunitztyp Inhibitoren, z.B. Aprotinin [135], Serpine (=Serin-Protease Inhibitoren), welche Prostasin binden und dadurch inhibieren [88] oder das autokrin/parakrin sezernierte SPLUNC1 (short palate lung and nasal epithelial clone 1), das ENaC bindet und durch Komplexbildung und Internalisierung dessen Proteolyse verhindert [43], senken die ENaC-Aktivität. Das Verhältnis von zellgebundenen bzw. intrazellulären Proteasen und löslichen Proteaseinhibitoren trägt zur Konstanthaltung des ASL bei: Ein hohes ASL-Volumen verdünnt die löslichen Protease-Inhibitoren und führt zur Aktivierung des Transports mittels ENaC-Proteolyse [87, 130]. In unserem Experiment wurden durch das wiederholte 30-minütige Überschichten der Kulturen mit Flüssigkeit und anschließende Absaugen lösliche Proteaseinhibitoren entfernt; die zellgebundenen Proteasen blieben erhalten und aktivieren den Transport. Dieser Effekt wurde an H441-Zellkulturen auch durch Tan et al. beschrieben [127]. Myerburg et al. berichten von einer um über 50% gesteigerten

Prostasinkonzentration auf Atemwegsepithel-Kulturen von CF-Patienten gegenüber Kontrollzellen [88]. Diese Dysbalance von Proteasen und Proteaseinhibitoren trägt zur konstitutiven Aktivierung des ENaC bei CF-Patienten bei [86].

Zahlreiche Zytokine, wie z.B. TNFα [147], Interleukin 1β [111], Interleukin 4 [40], Interferon γ [39] und TGF β [35] beeinflussen die ENaC-Aktivität. Da durch Inkubation mit SLO die Inflammationskaskade angestoßen wird (siehe Abbildung 28 bis Abbildung 30), tragen durch Zytokine ausgelöste Effekte sicherlich zur Veränderung der Transportprozesse mit pathophysiologischer Relevanz bei. Fukuda et al. berichten beispielsweise von einer Stimulation des $I_{SC,amil}$ durch TNF α [36].

Weitere Steigerungen der alveolären Clearance werden durch Wachstumsfaktoren wie den Epidermal Growth Factor (EGF) und den Tumor Growth Factor α (TGF α) verursacht, welche den epithelialen Widerstand erhöhen und den amiloridabhängigen Na^+-Transport fördern [12, 33]. Die Freisetzung von TGF α wird durch inflammatorische Mediatoren induziert [67, 68]. Durch Bindung an den EGF-Rezeptor wird eine Steigerung der alveolären Flüssigkeitsclearance von 47% nach einer Stunde und 66% nach 4 Stunden erreicht [33].

4.4 Auswirkung von Pathogenen auf die Flüssigkeitsclearance der Atemwege

Bakterielle Infektionen der Lunge, häufig durch Erreger aus der Familie der Streptokokken, können den Flüssigkeitstransport über Epithelien des Respirationstrakts auf variable Weise beeinflussen: Durch einwandernde Inflammationszellen wie Makrophagen und Neutrophile werden zahlreiche Zytokine und Mediatoren wie Elastase und freie Sauerstoffradikale freigesetzt [42], die, wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, den Netto-Ionen- und Flüssigkeitstransport aus den Alveolen heraus, herabregulieren. Durch Pathogene und deren Toxine, wie in unserem Beispiel SLO, aber auch durch die induzierte Immunreaktion des Körpers, kann die Membranintegrität der die Blut-Gas-Schranke bildenden Endothel- und Alveolarepithelzellen gestört werden. Es kommt zu erhöhter Permeabilität, die bis zur Entwicklung eines Lungenödems fortschreiten kann, wenn Gegenregulations- und Reparaturmechanismen nicht greifen [140]. Ein solcher, der Ausbildung eines Ödems entgegen gerichteter Effekt wird z.B. durch die Ausschüttung endogener

Katecholamine und Glucocorticoide im septischen Schock erzielt, die zu einer erhöhten Expression und Funktion von ENaC führen können [100, 116].

Im Fall bakterieller Infektionen ist ein weiteres Szenario denkbar: Bakterien selbst, bzw. von ihnen freigesetzte Exotoxine wie z.B. *P. aeruginosa*-Exotoxin A oder membranständige Endotoxine wie *E.coli*-Endotoxin induzieren in der Rattenlunge eine erhöhte Ionen- und Wasserresorption [42, 99, 107]. Einen ähnlichen Effekt lassen unsere Experimente für SLO vermuten, da dieses Exotoxin die ENaC γ-Untereinheit und die ENaC-Aktivität erhöht. Diese Reaktion hätte einen reduzierenden Effekt auf die Ödembildung. Die Hochregulation der Flüssigkeitsclearance kann jedoch bei bakteriellen Infektionen auch zur Exazerbation von Erkrankungen wie CF oder COPD beitragen, da durch die ENaC-Aktivierung die mucociliäre Clearance weiter verschlechtert wird [14].

Ob der von uns erstmals gezeigte Effekt einer durch SLO verursachten Steigerung des I_{SC} mittels Hochregulation der ENaC γ-Untereinheit als Gegenmaßnahme des respiratorischen Epithels auf ein drohendes Lungenödem zu sehen ist, ist noch unklar. SLO könnte hierbei als Pathogen associated molecular pattern (PAMP) fungieren, welches durch die epithelialen Zellen erkannt wird und die Gegenreaktion initiiert. Ebenso wäre es auch möglich, dass die Zellen auf die sublethale Schädigung oder die daraufhin autokrin oder parakrin ausgeschütteten Mediatoren (siehe Abbildung 28 bis Abbildung 30) reagieren. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass, wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, die Hochregulation des Transports als Virulenzfaktor der Streptokokken gesehen werden kann, welcher nicht zur Verbesserung der pathologischen Situation beiträgt, sondern diese durch Protektion der Bakterien gegebenenfalls noch verschlimmern kann.

4.5 Immunologische Effekte durch SLO

4.5.1 Inflammationsreaktion

Bisher ist noch nicht bekannt, wie hoch die in vivo Konzentration von SLO in von *Streptoccocus pyogenes* infiziertem Gewebe ist. Man muss davon ausgehen, dass im Gewebe selbst unter pathophysiologischen Bedingungen keine lytischen SLO Konzentrationen erreicht werden [5]. Sublytische Konzentrationen induzieren proinflammatorische Reaktionen, welche gravierend zur Pathogenese der Streptokokkenerkrankungen beitragen können [89, 113, 123]. Das dem SLO-verwandte

Pneumolysin induziert in vitro und in vivo apoptotische und pro-inflammatorische Gewebsschädigungen [44, 74]. Wir konnten bestätigen, dass SLO die Expression von Proteinen verschiedener inflammatorischer Pathways in H441-Zellkulturen erhöht (siehe Abbildung 28 und Abbildung 29). Die durch SLO ausgelöste Inflammationsreaktion läuft also nicht über die Aktivierung eines spezifischen, proinflammatorischen Pathways, sondern über eine Vielzahl sich wechselseitig beeinflussender und stimulierender Wege ab.

Die mRNA der Cyclooxygenase 2, einem zentralen Protein im Arachidonsäuremetabolismus und verantwortlich für die Produktion proinflammatorischer Prostaglandine, wird ebenso hochreguliert wie diejenige von Interleukin 8. Die Induktion von COX 2 wurde bisher bereits an mit Pneumolysin behandelten Makrophagen gezeigt [15]. Interleukin 8 nimmt als wichtiges chemotaktisches Zytokin, eine Schlüsselrolle bei Inflammationsreaktionen der Atemwege ein [7, 46, 117].

Die Expression und Freisetzung von IL-8 und weiteren proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1β und TNFα wird durch porenbildende Toxine auch in Neutrophilen [20], Mastzellen [123] und mononukleären Zellen [50, 109] induziert, welche daraufhin als wichtige Bestandteile des Immunsystems weitere Inflammationsmediatoren freisetzen. In vivo Mausmodelle konnten zeigen, dass ein sich wechselseitig verstärkender Kreislauf zwischen der Rekrutierung polymorphnukleärer Leukozyten und von ihnen freigesetzten Zytokinen besteht [108], der zu einer überschießenden und gewebsschädigenden Immunreaktion führen kann [74]. Die Behandlung von polymorphnukleären Leukozyten mit Pneumolysin führt zur Beeinträchtigung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, verminderter Chemotaxis und Migration [96]. Auch die Funktionen von Lymphozyten, z.B. die Synthese von Immunglobulinen, wird durch Pneumolysin inhibiert [31]. Die Inhibition der p38 MAP-Kinase, welche für die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF-κB nach dessen Translokation in den Nukleus verantwortlich ist [7, 46, 117] führt in den meisten Zellarten zu einer Inhibition der Zytokinproduktion [11]. Wir konnten zeigen, dass die Anzahl geschädigter Zellen bei Inkubation mit lytischen SLO-Konzentrationen durch Coinkubation mit dem MAPK-Inhibitor SB 203580 signifikant verringert wird (Abbildung 24). Ob hierfür die verringerte zellschädigende Freisetzung von Zytokinen oder eine Veränderung

der Interaktion der Kinase mit NF-κB, welcher sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirken kann [34], verantwortlich ist, bleibt bisher ungeklärt.

Es ist bekannt, dass SLO via Toll-like Rezeptor 4 eine Immunreaktion auslösen kann [95]. Dieser Mechanismus ist Bestandteil der angeborenen Immunsystems und schützt den Organismus vor invasiven Streptokokkenerkrankungen [73, 122]. Die NF-κB-Translokation in den Nukleus, welche essentiell für die Zytokinproduktion ist, erfolgt in Makrophagen ebenfalls in Abhängigkeit von Toxinbindung an TLR 4 [7, 73]. Während also SLO durch TLR 4 erkannt wird, induzieren Zellwandkomponenten gram-positiver Bakterien eine inflammatorische Reaktion via TLR 2 [79, 118]. Allerdings konnten wir bei Kontakt mit SLO keine vermehrte Expression von TLR 2 nachweisen, welche denkbar wäre, um die Toxinproduzenten besser erkennen zu können (siehe Abbildung 30).

Zusammengefasst lässt sich herausstellen, dass zahlreiche Komponenten sowohl des zellulären als auch humoralen, des angeborenen als auch erworbenen Immunsystems durch Streptolysin O beeinflusst werden. Dies erhöht die Pathogenität des Erregers bis hin zu einer Steigerung der Mortalität [65]. Die immunologischen Effekte sublytischer SLO-Konzentrationen tragen zur Pathogenese von Streptokokkenerkrankungen bei und sind wahrscheinlich sogar ursächlich für einige Krankheitssymptome [89].

4.5.2 Protektive Effekte von Makroliden

Wir konnten zeigen, dass die anti-zytotoxische Wirksamkeit von Makroliden die durch Streptolysin O induzierte Zellschädigung signifikant vermindern kann. Dieser Effekt kann die in der Praxis bekannte hohe Effektivität bei Atemwegsinfektionen durch *S. pyogenes* erklären: Das Antibiotikum wirkt nicht nur bakteriostatisch sondern mildert darüber hinaus die toxininduzierte und von der eigenen, überschießenden Immunreaktion verursachte Schädigung der Atemwegsepithelien. Dieser „Kollateralschaden“ kann beim immunkompetenten Patienten unter Umständen größere Schäden verursachen als das Pathogen an sich.

In den durchgeführten Experimenten mit H441-Kulturen zeigte sich vor allem Roxithromycin als sehr potente Substanz, um die Zellschädigung durch SLO signifikant zu verringern. Im Propidium-Iodid-Assay wurde durch Azithromycin ein entsprechender Effekt erzielt (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26). Roxithromycin

zeigte einen ähnlichen protektiven Effekt auch auf polypoiden Zellen. Allerdings wurde aufgrund der starken Heterogenität innerhalb der Kulturen das Signifikanzniveau nicht ganz erreicht (siehe Abbildung 27).

Tabelle 24 gibt einen Überblick über die nicht-antibakteriellen Wirkungen von Makroliden, welche bei verschiedenen Derivaten der Substanzklasse unterschiedlich stark ausgeprägt sind.

Tabelle 24: Inflammationsmodulierende Fähigkeiten von Makroliden. Verschiedene Substanzen der Gruppe zeigen teilweise unterschiedliche Effekte. NO: Stickstoffmonoxid.

Stimulation	Degranulation Neutrophiler Granulozyten
	Apoptose von Neutrophilen Granulozyten
Inhibition	Oxidative burst
	Bronchokonstriktion
	Synthese und/oder Freisetzung proinflammatorischer Zytokine
	Leukozytenadhäsion
	Bakterienadhärenz
	Eosinophilie
	Chemotaxis
Modulation	Lymphozytenfunktion
	Proliferation diverser Zelltypen
	NO-Synthese
	Mucociliäre Clearance (Mucusproduktion und Viskosität↓)

Ein Großteil der Effekte wird über die Inhibition der Funktion neutrophiler Granulozyten, welche maßgeblich an Inflammationsvorgängen beteiligt sind, vermittelt: Chemotaxis, Zelladhäsion am Ort der Inflammation sowie Phagozytose und Oxidative burst werden inhibiert [22]. Die Synthese und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wird durch Inhibition der NF-κB-Aktivierung und Hemmung von AP-1 hinabreguliert, was nicht nur für Granulozyten sondern auch für pulmonale und bronchiale Epithelien gezeigt werden konnte [4, 25, 56]. Dadurch wird der Teufelskreis aus Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-8 und TNF α sowie der daraus resultierenden Rekrutierung von Neutrophilen unterbrochen und eine ausufernde Zell- und Gewebsschädigung mittels „friendly fire“ verhindert [2, 22, 25, 114, 124]. Da wir an H441-Zellen die gesteigerte Expression von IL-8 nach Inkubation mit SLO nachweisen konnten (siehe Abbildung 28), ist anzunehmen, dass der protektive Effekt der Makrolide in diesem Zellmodell ebenfalls auf der Suppression proinflammatorischer Zytokine beruht.

Die Immunsuppression mittels Makroliden kann ihren protektiven Effekt in Situationen entfalten, in denen die Zellschädigung sowohl durch direkte Zytotoxizität ei-

nes schädigenden Agens, als auch durch die toxin-induzierte Freisetzung von Oxidantien und Zytokinen verursacht wird. Beispielsweise wirkte Roxitromycin bei Coinkubation mit Senfgas, einem potenten Nukleophil, welches intra- und extrazelluläre Komponenten alkyliert und dadurch komplexe zelluläre Ereignisse wie Zellzyklusarrest, Synthese von Inflammationsmarkern, sowie direkte Zytotoxizität auslöst [3], anti-cytotoxisch auf respiratorische Epithelien. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-8 und TNF α [41] wurde durch Interaktion mit NF-κB [56, 146] inhibiert.

Apoptose und Degranulation Neutrophiler werden durch Makrolide stimuliert [22]. Bei Erkrankungen mit allergischer Komponente wie Asthma oder chronische Sinusitis wird die Anzahl eosinophiler Granulozyten durch Makrolide verringert [120]. Die Atemwegsobstruktion vieler chronischer Erkrankungen des Respirationstrakts wird durch Inhibition der endothelinvermittelten Bronchokonstriktion [126] und Modulation der Mucociliären Clearance durch Inhibition übermäßiger Mucusproduktion, verringerte Viskosität [60] und Verbesserung der Zilienmotilität [47, 112] positiv beeinflusst. Zusammengefasst liegt deutliche Evidenz aus zahlreichen klinischen Studien vor, dass die immunmodulatorischen Effekte der Makrolidantibiotika bei vielen chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie Sinusitiden [124], COPD [47], CF [30, 59, 97], Asthma [120] und der in Ostasien auftretenden, der CF ähnelnden Diffusen Panbronchiolitis (DPB) [112] die Krankheitsaktivität verringern, die Symptome mildern, den Steroidbedarf verringern [45] und, wie im Beispiel der DPB, die Mortalität deutlich senken können [55].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch SLO eine Kaskade von inflammatorischen Vorgängen angestoßen wird, die zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, u.a. dem zentralen IL-8 (siehe Abbildung 28), führt. Die überschießende Immunreaktion trägt zur Zytotoxizität des SLO bei. Sie kann durch Makrolide, welche auf zahlreiche pro-inflammatorische Pathways einwirken, deutlich verringert werden. Eine spezifische Inhibition ausgewählter inflammatorischer Pathways durch Kinase-Inhibitoren ist hingegen nicht ausreichend, um die Zellschädigung durch SLO zu vermindern, was den geringen protektiven Effekt spezifischer Kinaseinhibitoren begründet.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung: Ziel der Arbeit war es, epitheliale Zellmodelle auf Basis von NCI-H441 und polypoiden Zellen zu etablieren. Des Weiteren sollten Einflüsse von Streptolysin O (SLO) auf inflammatorische Pathways und epitheliale Transportprozesse nachgewiesen werden.

Material und Methoden: Der elektrogene Ionentransport an Atemwegsepithelien wurde in Ussing-Kammer Experimenten als Kurzschlussstrom quantifiziert. Die Expression epithelialer Ionenkanäle und inflammatorischer Genen wurde mittels semiquantitativer Polymerase Kettenreaktion, die Zellschädigung durch Quantifizierung freigesetzter Proteaseaktivität durch einen Chemolumineszenz-Assay untersucht.

Ergebnisse: Die generierten Epithelien zeigten ein für Atemwegsepithelien typisches Genexpressionsmuster und zeichneten sich durch polares Wachstum, ausgeprägte Zellkontakte und Ausbildung eines stabilen transepithelialen Widerstandes aus. Die Expression des Epithelialen Natriumkanals (ENaC) konnte durch Dexamethason nur in NCI-H441 Zellen, nicht aber in polypoiden Zellen stimuliert werden. Dexamethason induzierte einen amiloridsensitiven Kurzschlussstrom in NCI-H441 Epithelien. Dieser ging einher mit der Erhöhung und stöchiometrischen Angleichung der α-, β- und γ-Untereinheiten des ENaC. In polypoiden Zellen konnte die Expression von ENaC nicht durch Dexamethason ausgelöst werden. SLO induzierte ebenfalls eine erhöhte Expression der ENaC γ-Untereinheit und aktivierte die Expression verschiedener inflammatorischer Gene.

Diskussion: Atemwegsepithelien stellen eine wichtige Barriere des Immunsystems dar. Möglicherweise wird durch die ENaC γ-Überexpression der transepitheliale Transport gesteigert, was die Mucus-Viskosität erhöht. Dadurch könnte sich die Virulenz SLO-freisetzender Bakterien potenzieren. Die breitgefächerte Aktivierung des Immunsystems durch SLO mit konsekutiver Freisetzung von Zytokinen und Inflammationsmarkern könnte zu einer Epithelschädigung beitragen. Dafür spricht unsere Beobachtung, dass durch Coinkubation mit immunmodulierenden Makrolidantibiotika die Zellschädigung durch SLO signifikant verringert werden konnte.

6 Literaturverzeichnis

1. **Abdel Ghani EM, Weis S, Walev I, Kehoe M, Bhakdi S, Palmer M**. Streptolysin O: inhibition of the conformational change during membrane binding of the monomer prevents oligomerization and pore formation. *Biochemistry* 38: 15204-11, 1999.

2. **Abe S, Nakamura H, Inoue S, Takeda H, Saito H, Kato S, Mukaida N, Matsushima K, Tomoike H**. Interleukin-8 gene repression by clarithromycin is mediated by the activator protein-1 binding site in human bronchial epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 22: 51-60, 2000.

3. **Amir A, Chapman S, Kadar T, Gozes Y, Sahar R, Allon N**. Sulfur mustard toxicity in macrophages: effect of dexamethasone. *Journal of applied toxicology : JAT* 20 Suppl 1: S51-8, 2000.

4. **Aoki Y, Kao PN**. Erythromycin inhibits transcriptional activation of NF-kappaB, but not NFAT, through calcineurin-independent signaling in T cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43: 2678-84, 1999.

5. **Aroian R, van der Goot FG**. Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs). *Current opinion in microbiology* 10: 57-61, 2007.

6. **Babiychuk EB, Monastyrskaya K, Potez S, Draeger a**. Intracellular Ca(2+) operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. *Cell death and differentiation* 16: 1126-34, 2009.

7. **Bernatoniene J, Zhang Q, Dogan S, Mitchell TJ, Paton JC, Finn A**. Induction of CC and CXC chemokines in human antigen-presenting dendritic cells by the pneumococcal proteins pneumolysin and CbpA, and the role played by toll-like receptor 4, NF-kappaB, and mitogen-activated protein kinases. *The Journal of infectious diseases* 198: 1823-33, 2008.

8. **Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL**. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4: 517-29, 2003.

9. **Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Kehoe M, Palmer M**. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Archives of microbiology* 165: 73-9, 1996.

10. **Bhakdi S, Tranum-Jensen J, Sziegoleit a**. Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infection and immunity* 47: 52-60, 1985.

11. **van den Blink B, Juffermans NP, ten Hove T, Schultz MJ, van Deventer SJ, van der Poll T, Peppelenbosch MP**. P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibition Increases Cytokine Release By Macrophages in Vitro and During Infection in Vivo. *Journal of immunology* 166: 582-7, 2001.

12. **Borok Z, Hami a, Danto SI, Lubman RL, Kim KJ, Crandall ED**. Effects of EGF on alveolar epithelial junctional permeability and active sodium transport. *The American journal of physiology* 270: L559-65, 1996.

13. **Boucher RC**. Relationship of airway epithelial ion transport to chronic bronchitis. *Proceedings of the American Thoracic Society* 1: 66-70, 2004.

14. **Boucher RC**. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *European Respiratory Journal* 23: 146-58, 2004.

15. **Braun JS, Novak R, Gao G, Murray PJ, Shenep JL**. Pneumolysin, a protein toxin of Streptococcus pneumoniae, induces nitric oxide production from macrophages. *Infection and immunity* 67: 3750-6, 1999.

16. **Buckingham L, Duncan JL**. Approximate dimensions of membrane lesions produced by streptolysin S and streptolysin O. *Biochimica et biophysica acta* 729: 115-22, 1983.

17. **Caldwell R a, Boucher RC, Stutts MJ**. Neutrophil elastase activates near-silent epithelial Na+ channels and increases airway epithelial Na+ transport. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 288: L813-9, 2005.

18. **Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC**. Amiloride-sensitive epithelial Na+ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367: 463-7, 1994.

19. **Champigny G, Voilley N, Lingueglia E, Friend V, Barbry P, Lazdunski M**. Regulation of expression of the lung amiloride-sensitive Na+ channel by steroid hormones. *The EMBO journal* 13: 2177-81, 1994.

20. **Cockeran R, Durandt C, Feldman C, Mitchell TJ, Anderson R**. Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils in vitro. *The Journal of infectious diseases* 186: 562-5, 2002.

21. **Cockeran R, Theron a J, Steel HC, Matlola NM, Mitchell TJ, Feldman C, Anderson R**. Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils. *The Journal of infectious diseases* 183: 604-11, 2001.

22. **Culić O, Eraković V, Parnham MJ**. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *European journal of pharmacology* 429: 209-29, 2001.

23. **Cunningham MW**. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical microbiology reviews* 13: 470-511, 2000.

24. **Dagenais A, Denis C, Vives MF, Girouard S, Massé C, Nguyen T, Yamagata T, Grygorczyk C, Kothary R, Berthiaume Y**. Modulation of alpha-ENaC and alpha1-Na+-K+-ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 281: L217-30, 2001.

25. **Desaki M, Takizawa H, Ohtoshi T, Kasama T, Kobayashi K, Sunazuka T, Omura S, Yamamoto K, Ito K**. Erythromycin suppresses nuclear factor-kappaB and activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 267: 124-8, 2000.

26. **Diakov A, Bera K, Mokrushina M, Krueger B, Korbmacher C**. Cleavage in the {gamma}-subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) plays an important role in the proteolytic activation of near-silent channels. *The Journal of physiology* 586: 4587-608, 2008.

27. **Donaldson SH, Hirsh A, Li DC, Holloway G, Chao J, Boucher RC, Gabriel SE**. Regulation of the epithelial sodium channel by serine proteases in human airways. *The Journal of biological chemistry* 277: 8338-45, 2002.

28. **Eaton DC, Chen J, Ramosevac S, Matalon S, Jain L**. Regulation of Na+ channels in lung alveolar type II epithelial cells. *Proceedings of the American Thoracic Society* 1: 10-6, 2004.

29. **Eisenhut M**. Changes in ion transport in inflammatory disease. *Journal of inflammation* 3: 5, 2006.

30. **Equi a, Balfour-Lynn IM, Bush a, Rosenthal M**. Long term azithromycin in children with cystic fibrosis: a randomised, placebo-controlled crossover trial. *Lancet* 360: 978-84, 2002.

31. **Ferrante A, Rowan-Kelly B, Paton JC**. Inhibition of in vitro human lymphocyte response by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infection and immunity* 46: 585-9, 1984.

32. **Folkesson HG, Matthay M a**. Alveolar epithelial ion and fluid transport: recent progress. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 35: 10-9, 2006.

33. **Folkesson HG, Pittet JF, Nitenberg G, Matthay MA**. Transforming growth factor-alpha increases alveolar liquid clearance in anesthetized ventilated rats. *The American journal of physiology* 271: L236-44, 1996.

34. **Foo SY, Nolan GP**. NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends in genetics : TIG* 15: 229-35, 1999.

35. **Frank J, Roux J, Kawakatsu H, Su G, Dagenais A, Berthiaume Y, Howard M, Canessa CM, Fang X, Sheppard D, Matthay M a, Pittet J-F**. Transforming growth factor-beta1 decreases expression of the epithelial sodium channel alphaENaC and alveolar epithelial vectorial sodium and fluid transport via an ERK1/2-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 278: 43939-50, 2003.

36. **Fukuda N, Jayr C, Lazrak A, Wang Y, Lucas R, Matalon S, Matthay MA**. Mechanisms of TNF-alpha stimulation of amiloride-sensitive sodium transport across alveolar epithelium. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 280: L1258-65, 2001.

37. **Fuve RM, Alouf JE, Delaunay a, Raynaud M**. Cytotoxic effects in vitro of highly purified streptolysin O on mouse macrophages cultured in a serum-free medium. *Journal of bacteriology* 92: 1150-3, 1966.

38. **Gaillard E a, Kota P, Gentzsch M, Dokholyan NV, Stutts MJ, Tarran R**. Regulation of the epithelial Na+ channel and airway surface liquid volume by serine proteases. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 460: 1-17, 2010.

39. **Galietta LJ, Folli C, Marchetti C, Romano L, Carpani D, Conese M, Zegarra-Moran O**. Modification of transepithelial ion transport in human cultured bronchial epithelial cells by interferon-gamma. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 278: L1186-94, 2000.

40. **Galietta LJV, Pagesy P, Folli C, Caci E, Romio L, Costes B, Nicolis E, Cabrini G, Goossens M, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O**. IL-4 is a potent modulator of ion transport in the human bronchial epithelium in vitro. *Journal of immunology* 168: 839-45, 2002.

41. **Gao X, Ray R, Xiao Y, Barker PE, Ray P**. Inhibition of sulfur mustard-induced cytotoxicity and inflammation by the macrolide antibiotic roxithromycin in human respiratory epithelial cells. *BMC cell biology* 8: 17, 2007.

42. **Garat C, Rezaiguia S, Meignan M, D'Ortho MP, Harf A, Matthay MA, Jayr C**. Alveolar endotoxin increases alveolar liquid clearance in rats. *Journal of applied physiology* 79: 2021-8, 1995.

43. **Garcia-Caballero A, Rasmussen JE, Gaillard E, Watson MJ, Olsen JC, Donaldson SH, Stutts MJ, Tarran R**. SPLUNC1 regulates airway surface liquid volume by protecting ENaC from proteolytic cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 11412-7, 2009.

44. **García-Suárez MDM, Flórez N, Astudillo A, Vázquez F, Villaverde R, Fabrizio K, Pirofski L-A, Méndez FJ**. The role of pneumolysin in mediating lung damage in a lethal pneumococcal pneumonia murine model. *Respiratory research* 8: 3, 2007.

45. **Garey KW**. Long-term Clarithromycin Decreases Prednisone Requirements in Elderly Patients With Prednisone-Dependent Asthma. *Chest* 118: 1826-7, 2000.

46. **Gilmore TD**. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 18: 6842-4, 1999.

47. **Gotfried M**. Macrolides for the Treatment of Chronic Sinusitis, Asthma, and COPD. *Chest* 125: 52S-60S, 2004.

48. **Hirst RA, Yesilkaya H, Clitheroe E, Rutman A, Dufty N, Mitchell TJ, O'Callaghan C, Andrew PW**. Sensitivities of human monocytes and epithelial cells to pneumolysin are different. *Infection and immunity* 70: 1017-22, 2002.

49. **Hof H, Dörries R**. Spezielle Bakteriologie. In: Hof H, Dörries R (Hrsg.) *Medizinische Mikrobiologie*. 3. Auflage, Thieme, Stuttgart: S. 306-19, 2005.

50. **Houldsworth S, Andrew PW, Mitchell TJ**. Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes. *Infection and immunity* 62: 1501-3, 1994.

51. **Hughey RP, Bruns JB, Kinlough CL, Harkleroad KL, Tong Q, Carattino MD, Johnson JP, Stockand JD, Kleyman TR**. Epithelial sodium channels

are activated by furin-dependent proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 279: 18111-4, 2004.

52. **Hughey RP, Carattino MD, Kleyman TR**. Role of proteolysis in the activation of epithelial sodium channels. *Current opinion in nephrology and hypertension* 16: 444-50, 2007.

53. **Hugo F, Reichwein J, Arvand M, Krämer S, Bhakdi S**. Use of a monoclonal antibody to determine the mode of transmembrane pore formation by streptolysin O. *Infection and immunity* 54: 641-5, 1986.

54. **Hummler E, Barker P, Gatzy J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, Boucher R, Rossier BC**. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nature genetics* 12: 325-8, 1996.

55. **Høiby N**. Diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis: East meets West. *Thorax* 49: 531-2, 1994.

56. **Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, Hasegawa S, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S**. Clarithromycin inhibits NF-kappaB activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45: 44-7, 2001.

57. **Idone V, Tam C, Andrews NW**. Two-way traffic on the road to plasma membrane repair. *Trends in cell biology* 18: 552-9, 2008.

58. **Idone V, Tam C, Goss JW, Toomre D, Pypaert M, Andrews NW**. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca2+-dependent endocytosis. *The Journal of cell biology* 180: 905-14, 2008.

59. **Jaffé a, Francis J, Rosenthal M, Bush a**. Long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis. *Lancet* 351: 420, 1998.

60. **Jaffé A, Bush A**. Anti-inflammatory effects of macrolides in lung disease. *Pediatric pulmonology* 31: 464-73, 2001.

61. **Jain L, Chen XJ, Ramosevac S, Brown LA, Eaton DC**. Expression of highly selective sodium channels in alveolar type II cells is determined by culture conditions. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 280: L646-58, 2001.

62. **Kehoe M a, Miller L, Walker J a, Boulnois GJ**. Nucleotide sequence of the streptolysin O (SLO) gene: structural homologies between SLO and other membrane-damaging, thiol-activated toxins. *Infection and immunity* 55: 3228-32, 1987.

63. **Klein JO**. History of macrolide use in pediatrics. *The Pediatric infectious disease journal* 16: 427-31, 1997.

64. **Lazrak A, Samanta A, Venetsanou K, Barbry P, Matalon S**. Modification of biophysical properties of lung epithelial Na+ channels by dexamethasone. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 279: C762–C70, 2000.

65. **Limbago B, Penumalli V, Weinrick B, Scott JR**. Role of streptolysin O in a mouse model of invasive group A streptococcal disease. *Infection and immunity* 68: 6384-90, 2000.

66. **Livraghi A, Grubb BR, Hudson EJ, Wilkinson KJ, Sheehan JK, Mall M a, O'Neal WK, Boucher RC, Randell SH**. Airway and lung pathology due to mucosal surface dehydration in β-epithelial Na^+ channel-overexpressing mice: role of TNF-α and IL-4Rα signaling, influence of neonatal development, and limited efficacy of glucocorticoid treatment. *Journal of immunology* 182: 4357-67, 2009.

67. **Madtes DK, Busby HK, Strandjord TP, Clark JG**. Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor is increased following bleomycin-induced lung injury in rats. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 11: 540-51, 1994.

68. **Madtes DK, Raines EW, Sakariassen KS, Assoian RK, Sporn MB, Bell GI, Ross R**. Induction of transforming growth factor-alpha in activated human alveolar macrophages. *Cell* 53: 285-93, 1988.

69. **Maitra A, Kumar V**. The Lung. In: Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R (Hrsg.) *Robbins Basic Pathology*. 8. Auflage, Saunders, Philadelphia: S. 479-539, 2007.

70. **Mall M a, Harkema JR, Trojanek JB, Treis D, Livraghi A, Schubert S, Zhou Z, Kreda SM, Tilley SL, Hudson EJ, O'Neal WK, Boucher RC**. Development of chronic bronchitis and emphysema in beta-epithelial Na+ channel-overexpressing mice. *American journal of respiratory and critical care medicine* 177: 730-42, 2008.

71. **Mall M a**. Role of the amiloride-sensitive epithelial Na+ channel in the pathogenesis and as a therapeutic target for cystic fibrosis lung disease. *Experimental physiology* 94: 171-4, 2009.

72. **Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC**. Increased airway epithelial Na+ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nature medicine* 10: 487-93, 2004.

73. **Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT**. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 1966-71, 2003.

74. **Marriott HM, Mitchell TJ, Dockrell DH**. Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Current molecular medicine* 8: 497-509, 2008.

75. **Matthay M a, Folkesson HG, Clerici C**. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiological reviews* 82: 569-600, 2002.

76. **McNeil PL, Kirchhausen T**. An emergency response team for membrane repair. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6: 499-505, 2005.

77. **McNeil PL, Steinhardt R a**. Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annual review of cell and developmental biology* 19: 697-731, 2003.

78. **Mendez JL, Hubmayr RD**. New insights into the pathology of acute respiratory failure. *Current opinion in critical care* 11: 29-36, 2005.

79. **Michelsen KS, Aicher a, Mohaupt M, Hartung T, Dimmeler S, Kirschning CJ, Schumann RR**. The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCS). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *The Journal of biological chemistry* 276: 25680-6, 2001.

80. **Minakata Y, Suzuki S, Grygorczyk C, Dagenais A, Berthiaume Y**. Impact of beta-adrenergic agonist on Na+ channel and Na+-K+-ATPase expression in alveolar type II cells. *The American journal of physiology* 275: L414-22, 1998.

81. **Morgan BP, Campbell a K**. The recovery of human polymorphonuclear leucocytes from sublytic complement attack is mediated by changes in intracellular free calcium. *The Biochemical journal* 231: 205-8, 1985.

82. **Morgan BP, Luzio JP, Campbell AK**. Intracellular Ca2+ and cell injury: a paradoxical role of Ca2+ in complement membrane attack. *Cell calcium* 7: 399-411, 1986.

83. **Morgan BP**. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *The Biochemical journal* 264: 1-14, 1989.

84. **Morgan PJ, Hyman SC, Rowe a J, Mitchell TJ, Andrew PW, Saibil HR**. Subunit organisation and symmetry of pore-forming, oligomeric pneumolysin. *FEBS letters* 371: 77-80, 1995.

85. **Musser JM, Hauser a R, Kim MH, Schlievert PM, Nelson K, Selander RK**. Streptococcus pyogenes causing toxic-shock-like syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 2668-72, 1991.

86. **Myerburg MM, Butterworth MB, McKenna EE, Peters KW, Frizzell R a, Kleyman TR, Pilewski JM**. Airway surface liquid volume regulates ENaC by altering the serine protease-protease inhibitor balance: a mechanism for sodium hyperabsorption in cystic fibrosis. *The Journal of biological chemistry* 281: 27942-9, 2006.

87. **Myerburg MM, Harvey PR, Heidrich EM, Pilewski JM, Butterworth MB**. Acute regulation of the epithelial sodium channel in airway epithelia by proteases and trafficking. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 43: 712-9, 2010.

88. **Myerburg MM, McKenna EE, Luke CJ, Frizzell R a, Kleyman TR, Pilewski JM**. Prostasin expression is regulated by airway surface liquid volume and is increased in cystic fibrosis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 294: L932-41, 2008.

89. **Nilsson M, Sørensen OE, Mörgelin M, Weineisen M, Sjöbring U, Herwald H**. Activation of human polymorphonuclear neutrophils by streptolysin O from Streptococcus pyogenes leads to the release of proinflammatory mediators. *Thrombosis and haemostasis* 95: 982-90, 2006.

90. **Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P**. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4: 552-65, 2003.

91. **Palmer M, Harris R, Freytag C, Kehoe M, Tranum-Jensen J, Bhakdi S**. Assembly mechanism of the oligomeric streptolysin O pore: the early membrane lesion is lined by a free edge of the lipid membrane and is extended gradually during oligomerization. *The EMBO journal* 17: 1598-605, 1998.

92. **Palmer M, Valeva a, Kehoe M, Bhakdi S**. Kinetics of streptolysin O self-assembly. *European journal of biochemistry / FEBS* 231: 388-95, 1995.

93. **Palmer M, Vulicevic I, Saweljew P, Valeva a, Kehoe M, Bhakdi S**. Streptolysin O: a proposed model of allosteric interaction between a pore-forming protein and its target lipid bilayer. *Biochemistry* 37: 2378-83, 1998.

94. **Palmer M**. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 39: 1681-9, 2001.

95. **Park JM, Ng VH, Maeda S, Rest RF, Karin M**. Anthrolysin O and other gram-positive cytolysins are toll-like receptor 4 agonists. *The Journal of experimental medicine* 200: 1647-55, 2004.

96. **Paton JC, Ferrante a**. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infection and immunity* 41: 1212-6, 1983.

97. **Peckham DG**. Macrolide antibiotics and cystic fibrosis. *Thorax* 57: 189-90, 2002.

98. **Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli JA, Fishelson Z**. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer seminars in immunopathology* 27: 375-87, 2005.

99. **Pittet JF, Hashimoto S, Pian M, McElroy MC, Nitenberg G, Wiener-Kronish JP**. Exotoxin A stimulates fluid reabsorption from distal airspaces of lung in anesthetized rats. *The American journal of physiology* 270: L232-41, 1996.

100. **Pittet JF, Wiener-Kronish JP, McElroy MC, Folkesson HG, Matthay M a**. Stimulation of lung epithelial liquid clearance by endogenous release of catecholamines in septic shock in anesthetized rats. *The Journal of clinical investigation* 94: 663-71, 1994.

101. **Planès C, Leyvraz C, Uchida T, Angelova MA, Vuagniaux G, Hummler E, Matthay M, Clerici C, Rossier B**. In vitro and in vivo regulation of transepithelial lung alveolar sodium transport by serine proteases. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 288: L1099-109, 2005.

102. **Pérez R, Tupac-Yupanqui I, Dunner S**. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. *BMC molecular biology* 9: 79, 2008.

103. **Ramminger SJ, Baines DL, Olver RE, Wilson SM**. The effects of PO2 upon transepithelial ion transport in fetal rat distal lung epithelial cells. *The Journal of physiology* 524 Pt 2: 539-47, 2000.

104. **Ramminger SJ, Richard K, Inglis SK, Land SC, Olver RE, Wilson SM**. A regulated apical Na(+) conductance in dexamethasone-treated H441 airway epithelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 287: L411-9, 2004.

105. **Ratner AJ, Hippe KR, Aguilar JL, Bender MH, Nelson AL, Weiser JN**. Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *The Journal of biological chemistry* 281: 12994-8, 2006.

106. **Reiter Y, Ciobotariu A, Jones J, Morgan BP, Fishelson Z**. Complement membrane attack complex, perforin, and bacterial exotoxins induce in K562 cells calcium-dependent cross-protection from lysis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 155: 2203-10, 1995.

107. **Rezaiguia S, Garat C, Delclaux C, Meignan M, Fleury J, Legrand P, Matthay M a, Jayr C**. Acute bacterial pneumonia in rats increases alveolar epithelial fluid clearance by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation* 99: 325-35, 1997.

108. **Rijneveld AW, van den Dobbelsteen GP, Florquin S, Standiford TJ, Speelman P, van Alphen L, van der Poll T**. Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice. *The Journal of infectious diseases* 185: 123-6, 2002.

109. **Rogers PD, Thornton J, Barker KS, McDaniel DO, Sacks GS, Swiatlo E, McDaniel LS**. Pneumolysin-dependent and -independent gene expression identified by cDNA microarray analysis of THP-1 human mononuclear cells stimulated by Streptococcus pneumoniae. *Infection and immunity* 71: 2087-94, 2003.

110. **Rossier BC, Stutts MJ**. Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases. *Annual review of physiology* 71: 361-79, 2009.

111. **Roux J, Kawakatsu H, Gartland B, Pespeni M, Sheppard D, Matthay M a, Canessa CM, Pittet J-F**. Interleukin-1beta decreases expression of the epithelial sodium channel alpha-subunit in alveolar epithelial cells via a p38 MAPK-dependent signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 280: 18579-89, 2005.

112. **Rubin BK, Henke MO**. Immunomodulatory activity and effectiveness of macrolides in chronic airway disease. *Chest* 125: 70S-8S, 2004.

113. **Ruiz N, Wang B, Pentland a, Caparon M**. Streptolysin O and adherence synergistically modulate proinflammatory responses of keratinocytes to group A streptococci. *Molecular microbiology* 27: 337-46, 1998.

114. **Sakito O, Kadota J, Kohno S, Abe K, Shirai R, Hara K**. Interleukin 1 beta, tumor necrosis factor alpha, and interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis: a potential mechanism of macrolide therapy. *Respiration; international review of thoracic diseases* 63: 42-8, 1996.

115. **Sartori C, Matthay M a.** Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights. *European Respiratory Journal* 20: 1299-313, 2002.

116. **Schein RM, Sprung CL, Marcial E, Napolitano L, Chernow B**. Plasma cortisol levels in patients with septic shock. *Critical care medicine* 18: 259-63, 1990.

117. **Schmeck B, Zahlten J, Moog K, van Laak V, Huber S, Hocke AC, Opitz B, Hoffmann E, Kracht M, Zerrahn J, Hammerschmidt S, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S**. Streptococcus pneumoniae-induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promotor. *The Journal of biological chemistry* 279: 53241-7, 2004.

118. **Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ**. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *The Journal of biological chemistry* 274: 17406-9, 1999.

119. **Shatursky O, Heuck a P, Shepard L a, Rossjohn J, Parker MW, Johnson a E, Tweten RK**. The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: a novel paradigm for pore-forming toxins. *Cell* 99: 293-9, 1999.

120. **Shoji T, Yoshida S, Sakamoto H, Hasegawa H, Nakagawa H, Amayasu H**. Anti-inflammatory effect of roxithromycin in patients with aspirin-intolerant asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 29: 950-6, 1999.

121. **Sierig G, Cywes C, Wessels MR, Ashbaugh CD**. Cytotoxic effects of streptolysin o and streptolysin s enhance the virulence of poorly encapsulated group a streptococci. *Infection and immunity* 71: 446-55, 2003.

122. **Srivastava A, Henneke P, Visintin A, Morse SC, Martin V, Watkins C, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT, Malley R**. The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infection and immunity* 73: 6479-87, 2005.

123. **Stassen M, Müller C, Richter C, Neudörfl C, Hültner L, Bhakdi S, Walev I, Schmitt E**. The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependent pathways. *Infection and immunity* 71: 6171-7, 2003.

124. **Suzuki H, Shimomura A, Ikeda K, Oshima T, Takasaka T**. Effects of long-term low-dose macrolide administration on neutrophil recruitment and IL-8 in the nasal discharge of chronic sinusitis patients. *The Tohoku journal of experimental medicine* 182: 115-24, 1997.

125. **Suzuki S, Zuege D, Berthiaume Y**. Sodium-independent modulation of Na(+)-K(+)-ATPase activity by beta-adrenergic agonist in alveolar type II cells. *The American journal of physiology* 268: L983-90, 1995.

126. **Takizawa H, Desaki M, Ohtoshi T, Kawasaki S, Kohyama T, Sato M, Nakajima J, Yanagisawa M, Ito K**. Erythromycin and clarithromycin attenuate cytokine-induced endothelin-1 expression in human bronchial epithelial cells. *European Respiratory Journal* 12: 57-63, 1998.

127. **Tan CD, Selvanathar I a, Baines DL**. Cleavage of endogenous γENaC and elevated abundance of αENaC are associated with increased Na^+ transport in response to apical fluid volume expansion in human H441 airway epithelial cells. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 462: 431-41, 2011.

128. **Tanigawa T, Suzuki J, Ueta T, Katsumoto T, Tanaka Y**. Different sensitivity to streptolysin-O of cells in macrophage lineage. *Microbiology and immunology* 40: 81-4, 1996.

129. **Tarran R, Grubb BR, Gatzy JT, Davis CW, Boucher RC**. The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *The Journal of general physiology* 118: 223-36, 2001.

130. **Tarran R, Trout L, Donaldson SH, Boucher RC**. Soluble mediators, not cilia, determine airway surface liquid volume in normal and cystic fibrosis superficial airway epithelia. *The Journal of general physiology* 127: 591-604, 2006.

131. **Tchepichev S, Ueda J, Canessa C, Rossier BC, O'Brodovich H**. Lung epithelial Na channel subunits are differentially regulated during development and by steroids. *The American journal of physiology* 269: C805-12, 1995.

132. **Tilley SJ, Orlova EV, Gilbert RJC, Andrew PW, Saibil HR**. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* 121: 247-56, 2005.

133. **Tweten RK**. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infection and immunity* 73: 6199-209, 2005.

134. **Usmani SM, von Einem J, Frick M, Miklavc P, Mayenburg M, Husmann M, Dietl P, Wittekindt OH**. Molecular basis of early epithelial response to streptococcal exotoxin: role of STIM1 and Orai1 proteins. *Cellular microbiology* 14: 299-315, 2012.

135. **Vallet V, Chraibi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC**. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 389: 607-10, 1997.

136. **Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Voilley N, Lazdunski M**. Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na+ channel. *The Journal of biological chemistry* 270: 27411-4, 1995.

137. **Walev I, Bhakdi SC, Hofmann F, Djonder N, Valeva a, Aktories K, Bhakdi S**. Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 3185-90, 2001.

138. **Walev I, Hombach M, Bobkiewicz W, Fenske D, Bhakdi S, Husmann M**. Resealing of large transmembrane pores produced by streptolysin O in nucleated cells is accompanied by NF-kappaB activation and downstream events. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16: 237-9, 2002.

139. **Walev I, Palmer M, Valeva a, Weller U, Bhakdi S**. Binding, oligomerization, and pore formation by streptolysin O in erythrocytes and fibroblast membranes: detection of nonlytic polymers. *Infection and immunity* 63: 1188-94, 1995.

140. **Ware LB, Matthay MA**. The acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine* 342: 1334-49, 2000.

141. **Washington JA, Wilson WR**. Erythromycin: a microbial and clinical perspective after 30 years of clinical use (1). *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* 60: 189-203, 1985.

142. **Weis S, Palmer M**. Streptolysin O: the C-terminal, tryptophan-rich domain carries functional sites for both membrane binding and self-interaction but not for stable oligomerization. *Biochimica et biophysica acta* 1510: 292-9, 2001.

143. **Xu H, Chu S**. ENaC alpha-subunit variants are expressed in lung epithelial cells and are suppressed by oxidative stress. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 293: L1454-62, 2007.

144. **Xu H, Ferro TJ, Chu S**. Cigarette smoke condensate inhibits ENaC alpha-subunit expression in lung epithelial cells. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 30: 633-42, 2007.

145. **Yamagata T, Yamagata Y, Nishimoto T, Hirano T, Nakanishi M, Minakata Y, Ichinose M, Dagenais A, Berthiaume Y**. The regulation of amiloride-sensitive epithelial sodium channels by tumor necrosis factor-alpha in injured lungs and alveolar type II cells. *Respiratory physiology & neurobiology* 166: 16-23, 2009.

146. **Yang C-M, Hsieh H-L, Lee C-W**. Intracellular signaling mechanisms underlying the expression of pro-inflammatory mediators in airway diseases. *Chang Gung medical journal* 28: 813-23, 2005.

147. **Yang G, Hamacher J, Gorshkov B, White R, Sridhar S, Verin A, Chakraborty T, Lucas R**. The Dual Role of TNF in Pulmonary Edema. *Journal of cardiovascular disease research* 1: 29-36, 2010.

148. **Zhanel GG, Dueck M, Hoban DJ, Vercaigne LM, Embil JM, Gin AS, Karlowsky JA**. Review of macrolides and ketolides: focus on respiratory tract infections. *Drugs* 61: 443-98, 2001.

149. **Zhou Z, Treis D, Schubert SC, Harm M, Schatterny J, Hirtz S, Duerr J, Boucher RC, Mall M a**. Preventive but not late amiloride therapy reduces morbidity and mortality of lung disease in betaENaC-overexpressing mice. *American journal of respiratory and critical care medicine* 178: 1245-56, 2008.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abwehrmechanismen der Atemwege 2
Abbildung 2: Durch SLO lysierte Erythrozyten 4
Abbildung 3: Mucociliäre Clearance 5
Abbildung 4: Strukturformel von Roxithromycin....6
Abbildung 5: Wirkung von Amilorid auf den I_{SC}.. 27
Abbildung 6: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Amiloridderivaten auf den relativen I_{SC}....28
Abbildung 7: Einfluss von Dexamethason auf den Kurzschlussstrom 29
Abbildung 8: Verlauf des I_{SC} von dexamethasonfrei kultivierten H441-Zellen. 30
Abbildung 9: Expression der ENaC-Untereinheiten in H441-Zellen 32
Abbildung 10: Phasenkontrastmikroskopische Übersichtsaufnahme eines konfluenten Zellrasens von Polypenzellen....33
Abbildung 11: Phasenkontrastmikroskopische Detailaufnahmen von unter liquid-liquid-Bedingungen kultivierten Polypenzellen 34
Abbildung 12: Verlauf des Widerstands primärkultivierter Polypenzellen 35
Abbildung 13: Vergleich der Widerstandsverläufe verschiedener Passagen von Polypenzellkulturen....35
Abbildung 14: Einfluss von Modifikationen der Kulturbedingungen auf den Verlauf des TEER von Polypenkulturen....36
Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Expression von mRNA von Struktur- und Funktionproteinen in primärkultivierten Polypenzellen 37
Abbildung 16: Vergleich der Genexpressionen zwischen Polypenzellen in air-liquid-Kultur und Kulturflasche. 38
Abbildung 17: Expression der mRNA der ENaC-Untereinheiten in Polypenzellkulturen....38
Abbildung 18: Expression von Genen des Immunsystems in Polypenzellen. 39
Abbildung 19: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme von H441-Zellen nach Inkubation mit SLO 40
Abbildung 20: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme von H441-Zellen nach Inkubation mit SLO in calciumfreier Kontrolllösung. Konzentrations-Wirkung-Beziehung. 41
Abbildung 21: Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus Chemolumineszenz- und fluoreszenzmikroskopischem Propidium-Iodid-Assay.....42
Abbildung 22: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für SLO auf H441- bzw. Polypenzellkulturen....43
Abbildung 23: Differenz des Anteils toter Zellen zwischen mit Kinase-Inhibitor inkubierten Zellen und Zellen, die zusätzlich mit SLO inkubiert wurden. 45
Abbildung 24: Einfluss von Kinase-Inhibitoren auf die Vulnerabilität von H441-Zellen durch SLO....46

Abbildung 25: Einfluss von Makroliden auf die Vulnerabilität von H441- Zellen ..47
Abbildung 26: Mikroskopischer Propidium-Iodid-Assay: Inkubation von H441-Zellen mit SLO mit oder ohne Zusatz von Makroliden 47
Abbildung 27: Anteil der durch Inkubation mit SLO geschädigten Polypenzellen. Coinkubation mit Roxithromycin 48
Abbildung 28: Expression inflammatorischer Gene in H441-Zellen nach Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen 49
Abbildung 29: Verlauf der Expression von c-FOS nach Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen.....49
Abbildung 30: Expression inflammatorischer Gene in H441-Zellen nach Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen. 50
Abbildung 31: Kurzfristige Änderung des TEER durch Inkubation mit SLO.....51
Abbildung 32: Abhängigkeit des TEER von Dexamethason und SLO.....52
Abbildung 33: Zeitlicher Verlauf der ENaC-Expression in H441-Zellen. Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen 53
Abbildung 34: Verlauf der Expressionen der ENaC-Untereinheiten bei Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen 54
Abbildung 35: Verlauf des I_{SC} von dexamethasonfrei kultivierten H441- Zellen nach Inkubation mit sublytischen SLO-Konzentrationen.....55
Abbildung 36: Einfluss von Inkubation mit Medium oder sublytischen SLO-Konzentrationen auf den amiloridsensitiven Kurzschlussstrom von dexamethasonfrei kultivierten H441-Zellen. 55
Abbildung 37: Tyrphostin verringert signifikant die SLO-induzierte Hochregulation der ENaC γ-Untereinheit. 56
Abbildung 38: Histologie der Trachea von Wildtyp- oder ENaC β überexprimierender Maus. Verlegung des Atemwegs durch Mucus....62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristische Größen von Streptolysin O 3
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien 8
Tabelle 3: Geräte 8
Tabelle 4: Zellkulturmedien 9
Tabelle 5: Chemikalien 9
Tabelle 6: Kits 10
Tabelle 7: Software 10
Tabelle 8: Kontrolllösung 11
Tabelle 9: Kulturmedium der permanenten Zelllinie NCI-H441 11
Tabelle 10: Medien zur Primärkultur polypoider Zellen 12
Tabelle 11: Kulturbedingungen Polypenzellen 15
Tabelle 12: Kinase-Inhibitoren 17
Tabelle 13: Makrolide 18
Tabelle 14: Charakteristika der Epifluoreszenzmikroskopie-Filter 18
Tabelle 15: Ansatz RT-PCR 20
Tabelle 16: Ansatz realtime PCR 20
Tabelle 17: PCR-Programm 20
Tabelle 18: Housekeeping-Gene 2121
Tabelle 19: Primer Polypenzellen 22
Tabelle 20: Zeitpunkte der RNA-Extraktion 23
Tabelle 21: ENaC-Inhibitoren 25
Tabelle 22: Effektorproteine der Kinase-Inhibitoren 44
Tabelle 23: Flüssigkeitstransport-beeinflussende Faktoren 60
Tabelle 24: Inflammationsmodulierende Fähigkeiten von Makroliden 68

Formelverzeichnis

Formel 1: Model der Oligomerisierung von Streptolysin O 3
Formel 2: Anteil geschädigter Zellen, Bestimmung durch Chemolumineszenz 17
Formel 3: Anteil geschädigter Zellen, mikroskopische Bestimmung.....18
Formel 4: Berechnung $ct_{housekeeping}$ 21
Formel 5: Berechnung Δct.....21
Formel 6: Berechnung E_{gen}.....211
Formel 7: Berechnung der Genexpression.....22

Curriculum vitae

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Curriculum vitae

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.