Universität Ulm

Institut für Allgemeine Physiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Paul Dietl

Identifikation mechanosensitiver Kanäle in Epithelzellen der Lunge

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

Hauke Ecklundt, Niebüll

2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Dietl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Huber-Lang

Tag der Promotion: 12.02.2015

Für K.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis i
Abkürzungsverzeichnis iii
1. Einleitung 1
1.1 Zelluläre Mechanotransduktion 4
1.2 Zellmodelle 5
1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit 7
2. Material und Methoden 8
2.1 Chemikalien 8
2.2 Verbrauchsmaterialien 9
2.3 Lösungen und Medien Zellkulturen 10
2.4 Zelllinien 10
2.5 Laborgeräte 11
2.5.1 Geräte Zellkultur 11
2.5.2 Mikroskopisches Setup 11
2.5.3 Dehnungsapparatur (Strain Device) 12
2.5.4 Membrankammer und Membrane 13
2.6 Software 14
2.7 Zellkultivierung: Präparation der Membrane, Zellisolation, Plattierung und Inkubation 15
2.8 Calcium-Signal-Messung 16
2.9 Zellschädigungsuntersuchung 17
2.10 Datenanalyse und Bildverarbeitung 18
2.11 Statistische Analyse 20
3. Ergebnisse 21
3.1 Zellscreening 21
3.2 Zellschädigung durch Dehnung 24
3.3 Charakterisierung des Calciumsignals 26
3.4 Untersuchung möglicher Signalwege des Calciumsignals 31
4. Diskussion 37
4.1 Zellscreening und methodische Aspekte 37
4.2 Zellschädigung durch Dehnung 38
4.3 Charakterisierung des Calciumsignals 39
4.4 Untersuchung möglicher Signalwege des Calciumsignals 41
5. Zusammenfassung 44

6. Literaturverzeichnis 45
Anhang 52
Danksagung 55
Lebenslauf 56

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollständige Bezeichnung
$[Ca^{2+}]_c$	Cytoplasmatische Calciumkonzentration
2-APB	2-Aminoethyldiphenylborinat
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ALI	Air Liquid Interface
AM	Acetoxymethylester
aPLC	Aktivierte Phospholipase C
ATII	Alveoläre Typ-2-Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA-AM	Bi-aminophenoxyethan-Acetoxymethylester
CICR	Calcium-abhängige Calcium-Freisetzung (engl. Calcium-induced Calcium-release)
CO_2	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix (engl. Extracellular Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EH-1	Ethidium-Homodimer-1
FACE	Fusion activated Calcium Entry
FBS	Fetales Kälberserum (engl. Fetal Bovine Serum)
Fura-2 AM	Fura-2 Acetoxymethylester
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP3-(R)	Inositoltriphosphat-(Rezeptor)
IRDS	Infant Respiratory Distress Syndrome (Atemnotsyndrom des Frühgeborenen)
M	Mittelwert
MEM	Minimum Essential Medium
mM	Millimolar
NEAA	Non-essential Amino-Acids
Nm	Nanometer
nM	Nanomolar
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline)
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol3-Kinase

PP1	4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo-d-3,4-pyrimidine
PLC	Phospholipase C
RGB	Rot-Grün-Blau
ROI	Region of Interest
RyR	Ryanodinrezeptor
SEM	Standard Error of the Mean
SOCE	Store Operated Channel Entry
STIM1	Stromal interaction molecule 1
TRP	Transient Receptor Potential
TRPV2	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 2
U	Units
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolet

1. Einleitung

Die terminalen Bereiche der Lunge werden von den respiratorischen Atemwegen gebildet, die von den Alveolen terminiert werden. Dies sind die Bereiche, in denen der Gasaustausch zwischen dem Organismus und der Atmosphäre stattfindet. Während der Ventilation vergrößern und verringern sich die Volumina und damit auch die Oberflächen der Atemwege und Alveoli. Die Oberfläche der Alveoli werden durch eine Zellschicht, dem alveolärem Epithel gebildet. Es besteht aus den alveolären Typ 1- und Typ 2-Zellen. Zusammen mit den Endothelzellen der Lungenkapillaren bildet es die Blut-Gas-Schranke Der Aufbau der terminalen Bronchiolen sowie die schematische Darstellung der Alveolenwand (Blut-Luft-Schranke) findet sich in Abbildung 1 (Schünke et al. 2005).

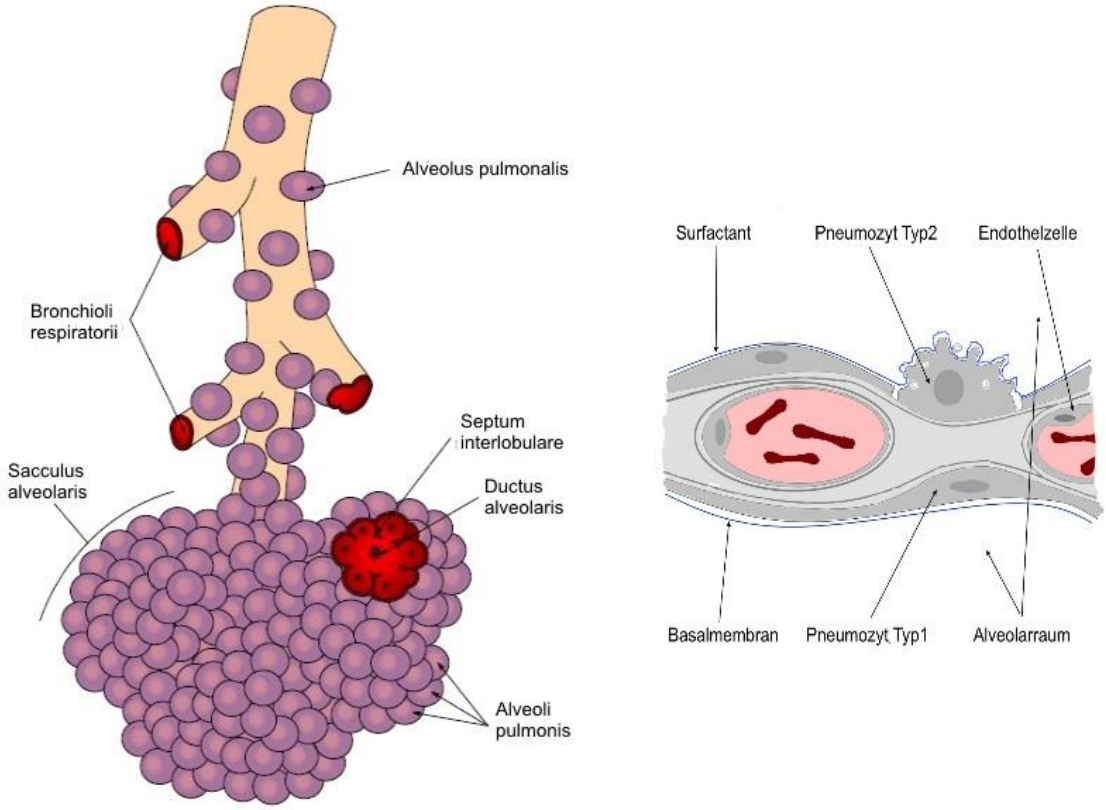


Abb. 1: Anatomischer Aufbau des unteren Respirationstraktes. A: terminale Aufzweigung des Bronchialbaumes (Alveolen), B: schematische Aufbau der Alveolenwand mit verschiedenen Zelltypen (Graphiken angelehnt an Prometheus, 2005, S. 87 und 88)

Die innere Oberfläche der Alveolen ist von einem Flüssigkeitsfilm bedeckt und bildet so eine Grenzfläche zur Atemluft (auch ALI genannt, kurz für Air Liquid Interface). Die Oberflächenspannung der alveolären Oberflächenflüssigkeit wird von einem Gemisch oberflächenaktiver Substanzen, dem Surfactant, reduziert, um ein Kollabieren in vivo zu

verhindern. Das Vorhandensein von Surfactant ist somit Voraussetzung für die korrekte mechanische Funktion der Lunge. Dies wird bei Erkrankungen der Lunge deutlich, bei denen ein Mangel an Surfactant vorliegt. Beim sogenannten Atemnotsyndrom des Frühgeborenen (IRDS) wird Surfactant nicht ausreichend produziert und stellt eine lebensbedrohliche Erkrankung für das Neugeborene da. In den entwickelten Ländern stellt dies die Hauptursache der Morbidität und Mortalität von Frühgeborenen dar (Clements et al. 1998; Engle 2008).

Surfactant wird von den alveolären Typ 2-Zellen (auch ATII genannt) gebildet und gespeichert (Dietl et al. 2012; Ochs 2009). Dazu besitzt die Zelle spezialisierte Organellen, die so genannten Lamellarkörper (engl. lamellar bodies). Von den Lamellarkörpern wird das Surfactant durch Exozytose in den Alveolarraum sezerniert (Clements 1997; Dietl et al. 2004).

Bereits Ende der 80er Jahre wurde ein Anstieg von $[Ca^{2+}]_c$ als Stimulus dieser Surfactant-Exozytose identifiziert (Pian et al. 1988). Neben chemischen Stimuli (purinerge Substanzen wie ATP und UTP) wurden vor allem mechanische Reize (Zelldehnung, Kontakt der Zellen zu einer Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht) als Initiatoren des Anstiegs von $[Ca^{2+}]_c$ entdeckt (Dietl et al. 2005; Frick et al. 2004; Ramsingh et al. 2011; Ravasio et al. 2011). Dabei sind die molekularen Mechanismen des mechanisch induzierten Ca^{2+}-Signals bei der Surfactant-Sekretion bis heute weitestgehend ungeklärt. Es wird angenommen, dass der Ursprung des Anstiegs von $[Ca^{2+}]_c$ in der Typ 2-Zelle extrazellulär, in internen Speichern oder in der Kopplung von beidem, im Sinne einer Ca^{2+}-induzierten Ca^{2+}-Freisetzung (CICR) oder eines Speicherabhängigen Calciumeinstroms (SOCE), liegt (Dietl et al. 2012) (siehe Abbildung 2).

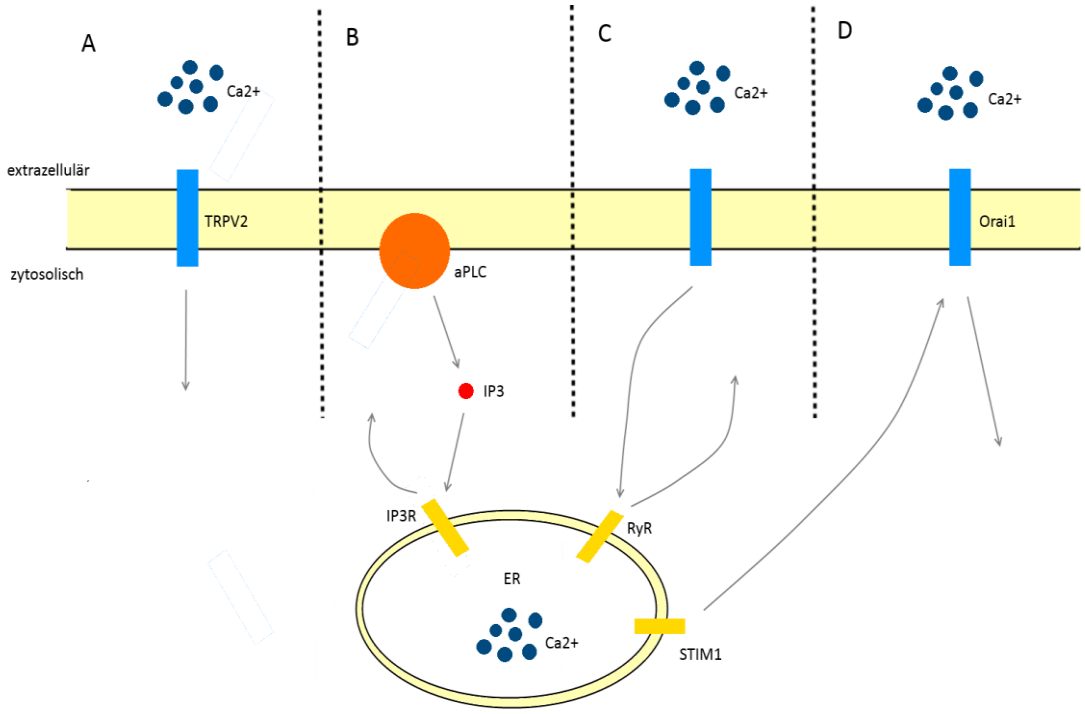


Abb. 2: Schematische Darstellung möglicher Ursprünge des Anstiegs von $[Ca^{2+}]_c$ nach Dehnung in der alveolären Typ 2-Zelle. Zusätzlich wurden einige identifizierte Kandidaten der verschiedenen Transduktionswege mitaufgeführt. Die Pfeile zeigen jeweils den Weg des Calciums ins Zytolasma. A = extrazellulär, B = aus internen Speichern, C = Calcium-abhängige Calcium-Freisetzung (CICR), D = Speicherabhängiger Calcium-Einstrom (SOCE), ER = Endoplasmatisches Retikulum, aPLC = aktivierte Phospholipase C, IP3R = Inositoltriphosphat-Rezeptor, RyR = Ryanodinrezeptor, STIM1 = Stromal interaction molecul 1

Basierend auf generellen Calciumsignal-Modellen in eukaryotischen Zellen konnten verschiedene Moleküle (Rezeptoren, Enzyme, Kanäle) identifiziert werden, welche zur Entstehung beitragen. Abbildung 2 gibt eine Übersicht über die bisher bekannten Calcium-Signalwege bei der Freisetzung von Surfactant in alveolären Typ 2-Zellen. Mögliche Akteure des mechanisch induzierten Anstiegs von $[Ca^{2+}]_c$ in der präfusionalen Phase wurden in Abbildung 2 gekennzeichnet. Ryanodinrezeptor-Inhibitoren führten zu einer Teilinhibition des dehnungsabhängigen Ca^{2+}-Signals und werden als Kandidat für CICR angesehen (Fois et al. 2012). IP-3-Rezeptoren können in einem nicht gut verstandenen Prozess sowohl direkt über eine Phospholipase-C-Aktivierung, als auch parakrin mittels ATP über den purinergen P2Y2-Rezeptor aktiviert werden und so zum dehnungsinduzierten Calciumsignal beitragen (Dietl et al. 2012). Hervorzuheben ist TRPV2, ein mechanosensitiver Kanal der TRP-Familie. Dieser wurde erstmals als spezifischer Kanal, verantwortlich für das dehnungsinduzierte Ca^{2+}-Signal in primär

kultivierten Typ-2-Zellen, identifiziert (Fois et al. 2012). Es wird angenommen, dass dieser Kanal Teil eines Focal-Adhesion-Kompexes ist und durch diesen reguliert wird. Erste Hinweise gibt es auch für die Rolle von stromal interaction molecule 1 (STIM1) und Orai1, beides Komponenten von SOCE (Dietl et al. 2012).

1.1 Zelluläre Mechanotransduktion

Eine Zelle in einem multizellularen Organismus ist einer Fülle von mechanischen Stimuli ausgesetzt. Mechanotransduktion beschreibt die Umwandlung dieser mechanischen Kräfte in ein biochemisches Signal (Huang et al. 2004). Es gibt eine Vielzahl von beteiligten Strukturen innerhalb und außerhalb der Zelle (siehe Abbildung 3). Zusammen bilden sie ein integratives System, welches die Kräfte auf Makroebene in eine biologisch adäquate Antwort auf Nanoebene überführt. So können zellspezifische Prozesse wie Differenzierung, Morphogenese, Proliferation oder Exozytose initiiert werden. Besondere Bedeutung bei der Mechanotransduktion wird dem Zytoskelett der Zelle und dessen Verbindung zur ECM über Verbindungsstellen in der Plasmamembran (u.a. Integrine, Fokaladhäsionen) zugeschrieben (Felder et al. 2008; Ingber 2003). Es wird angenommen, dass dieses System eine Art Ausgangsspannung besitzt und dessen Veränderung durch mechanische Stimuli eine Antwort auf Zellebene, übermittelt durch mechanosensitive Moleküle, induziert (Tensegrity Modell nach (Ingber 2003, 2006)). Solche mechanosensitiven Moleküle können zum Beispiel Ionenkanäle sein. Sie werden über das Zytoskelett in indirekter Weise oder direkt über Spannung in der Plasmamembran geöffnet (Hayakawa et al. 2008). Dies führt zu einem Einstrom von Calcium ins Zytoplasma.

Lungenepithelien sind durch ihre anatomische Lage im Kontext der Atemmechanik vielen mechanischen Stimuli ausgesetzt. Dazu gehören Scherkräfte, Dehnung und Verformungen durch Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenzfläche. Zelldehnung ist dabei ein besonders relevanter physiologischer Stimulus in der Lunge (Edwards 2001). In dieser Arbeit wird dieser Teilaspekt, nämlich die Zelldehnung, als physiologisch relevanter mechanischer Stimulus der Lunge und die konsekutiven Veränderungen von $[Ca^{2+}]_c$ untersucht.

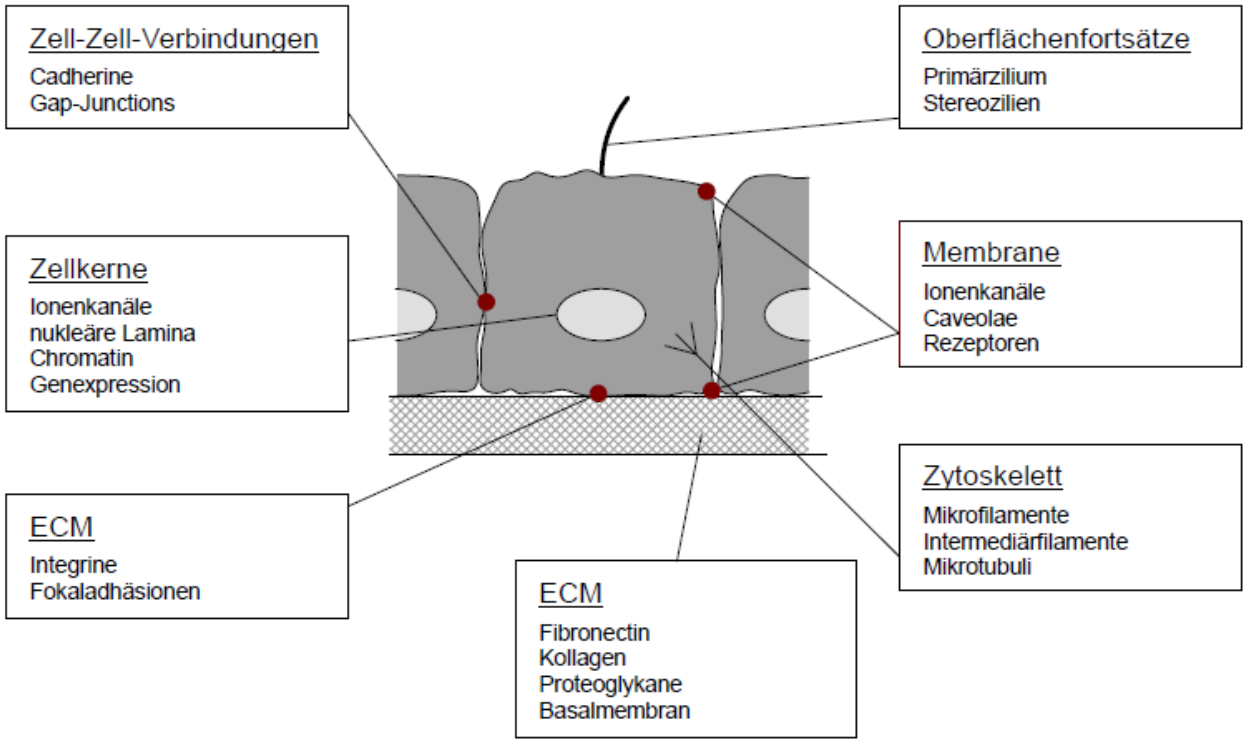


Abb. 3: Mediatoren der Mechanotransduktion in einer eukariotischen Zelle (Graphik angelehnt an Ingber et al., 2006). ECM = Extra Cellular Matrix (deutsch: extrazelluläre Matrix)

1.2 Zellmodelle

Die mechanisch induzierte Ca^{2+}-Freisetzung wurde bisher in erster Linie an ATII Zellen der Ratte untersucht (Bertocchi et al. 2005; Dietl et al. 2012; Fois et al. 2012; Frick et al. 2004; Ravasio et al. 2011). Diese Zellen stellen ein anerkanntes Modell für humane ATII Zellen dar. Fois und Kollegen konnten wie bereits oben beschrieben einen mechanosensitiven Kanal (TRPV2) in diesen Zellen nachweisen, der wesentlich für das dehnungsabhängige Calciumsignal ist (Fois et al. 2012). Weiterhin wurden auch die Mechanismen zur Surfactant-Sekretion bei diesen Zellen ausführlich untersucht (Albrecht et al. 2010; Haller et al. 1998, 1999, 2001; Miklavc et al. 2009, 2011). Problematisch an primärkultivierten Typ 2-Zellen der Ratte ist ihr Progenitor-Zellcharakter, der in mehreren Studien nachgewiesen werden konnte (Barkauskas et al. 2013; Rock et al. 2011). Das heißt, die Zellen differenzieren sich nach Entnahme weiter aus, so dass sie Merkmale ihres alveolären Typ 2-Phänotyps verlieren. Damit müssen die funktionellen Eigenschaften kultivierter ATII Zellen nicht unbedingt repräsentativ für ATII in vivo sein. Gerade diese heterogene Differenzierung kultivierter ATII Zellen führt zu funktionell sehr

unterschiedlichen Zelltypen. Die Interpretation experimenteller Ergebnisse, die an diesen Zellpopulationen gewonnen wurden ist dementsprechend schwierig.

Neuere Studien versuchen deswegen, Zellmodelle zu entwickeln, die nicht ganzheitlichen Charakter der primär kultivierten Typ 2-Zellen umfassen, jedoch spezifische Funktionen der humanen Typ 2-Zellen abbilden. Im Nachfolgenden sollen einige potentielle Kandidaten aufgeführt werden.

A549-Zellen gehören zu den alveolären Epithelzellen und sind humane Lungenkarzinomzellen. Diese Zellen beinhalten Organellen mit einer zu den Typ 2-Zellen vergleichbaren Lamellarstruktur. Eine Freisetzung von Surfactant-ähnlichen Lipiden konnten für A549 nachgewiesen werden (Komori et al. 2008; Mason et al. 1980; Nardone et al. 1979). Es kann nicht abschließend beurteilt werden, ob dieser Freisetzung eine Exozytose zugrunde liegt (Shapiro et al. 1978). Die Fähigkeit zur Synthese von Surfactant unterscheidet für die verschiedenen Subgruppen (Balis et al. 1984). In aktuellen Studien wurde diese Zelllinie eingesetzt, um den Einfluss von mechanischer Stimulierung auf das Surfactant-System (Pantazi et al. 2013) und ATP-Freisetzung (Grygorczyk et al. 2013; Ramsingh et al. 2011) zu untersuchen.

H441-Zellen entstammen einer Zelllinie eines kleinzelligen Karzinoms. Es ist bekannt, dass diese Zellen die Surfactant-assoziierten Proteine SP-A und SP-B exprimieren (O'Reilly et al. 1989; Wispé et al. 1990). Die H441-Zellen weisen morphologische Eigenschaften von Epithelzellen auf, unter anderem lamelläre intrazelluläre Organellen (Reilly et al. 1988).

In einer aktuellen Studie konnte für H292-Zellen eine Lipogenese induziert werden. Dieser Prozess wird in Betracht gezogen, die Surfactant-Produktion in alveolären Typ 2-Zellen zu simulieren. H292-Zellen entstammen einem mukoepidermoiden Karzinom (Qiao et al. 2008).

Calu-3-Zellen dienten bislang vor allem zur Studie der zystischen Fibrose aufgrund ihrer Expression von CFTR-Chloridkanälen (Shen et al. 1994). Des Weiteren wurden zur Untersuchung des transepithelialen Transports von Chlorid, Bicarbonat und Wasser eingesetzt (Ramesh Babu et al. 2004; Shan et al. 2012). Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet dieser Zelllinie ist die Erforschung der Mucus-Produktion, da diese Zellen, Mucine sowohl produzieren als auch sekretieren (Berger et al. 1999). Die Calu-3-Zellen

entstammen einem Adenokarzinom. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um eine Lungenepithelzelle. Calu-3-Zellen gelten am ehesten als Zellmodell für bronchiale Epithelzellen (Mathias et al. 2002). Neuere Studien weisen hier auf einen Zusammenhang zwischen mechanischer Stimulierung, insbesondere Dehnung, und immunologischen Funktionen (IL-8-Produktion) hin (Thomas et al. 2006).

1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, Zelllinien zu identifizieren, die wesentliche Funktionen der humanen Typ 2-Zellen abbilden. Einen wesentlichen Aspekt stellt dabei die dehnungsabhängige Entstehung eines Anstiegs von $[Ca^{2+}]_c$ dar. Dieser Prozess ist bislang nur unzureichend verstanden. Ziel dieser Arbeit ist eine differenzierte Analyse der zugrundeliegenden Prozesse. Hierzu wurden verschiedene humane Zelllinien-basierte Modelle herangezogen, die eine detaillierte Identifikation mechanosensitiver Kanäle in Epithelzellen der Lunge ermöglichen. Das Vorgehen der Studien hat somit einen explorativen Charakter mit der Absicht, durch Einsatz verschiedener Dehnungsprotokolle und Calcium-Modulatoren Mechanismen zu identifizieren, die das dehnungsinduzierte Calciumsignal erklären.

2. Material und Methoden

Nachfolgend werden die für die durchgeführten Studien erforderlichen Materialen aufgeführt. Im Anschluss an diese Auflistung erfolgt eine kurze Übersicht über den Studienablauf.

2.1 Chemikalien

Tab. 1: Übersicht verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller (Ort)
0,25% Trypsin-EDTA Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
2-Aminoethyldiphenylborinat (2-APB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Bacillol®	BODE Chemie GmbH & Co. KG (Hamburg, Deutschland)
BAPTA-AM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutsclnad)
$CaCl_2$	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
DMEM high Glucose (4,5 mg/l D-Glucose)	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
DMSO	Fluka Chemika (Buchs, Schweiz)
Ethanol	Universität Ulm, Klinik Apotheke (Ulm, Deutschland)
Ethidium Homodimer-1	Invitrogen Molecular Probes (Karlsruhe, Deutschland)
FBS (fetal bovine serum)	Hyclone/Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Fibronectin 0,1%-Lösung von Rinderplasma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Fura-2 AM	Invitrogen Molecular Probes (Karlsruhe, Deutschland)
Gadolinium	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glucose	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Hoechst 33342	Invitrogen Molecular Probes (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Universität Ulm, Klinik Apotheke (Ulm, Deutschland)

KCl	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Lanthan	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
MEM with earle`s salts (+L-Glutamin)	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland)
MEM Non-Essential Amino Acids (NEA) 100x	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
$MgCl_2$	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
NaCl	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
PBS	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen Molecular Probes (Karlsruhe, Deutschland)
PP1	Calbiochem (Lajolla, USA)
RPMI 1640 (+L-Glutamin, +2 g/l NaHCO3)	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Ryanodin	Calbiochem (Lajolla, USA)
Thapsigargin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
U73122	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
U73343	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Wortmannin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

AM = Acetoxymethylester, BAPTA-AM = Bi-aminophenoxyethan-Acetoxymethylester, DMEM = Dulbecco's Minimal Essential Medium, DMSO = Dimethylsulfoxid, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, FBS = Fetales Kälberserum (Fetal bovine serum), HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, PP1 = 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo-d-3,4-pyrimidine

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Übersicht verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	**Hersteller (Ort)**
Falcon Tubes	SARSTEDT AG und Co (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen mit Filtereinsatz: Biosphere ® Filter Tips	SARSTEDT AG und Co (Nümbrecht, Deutschland)
Petrischalen Nunclon ™ Δ	Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden, Deutschland)
Silastische Membranen (Glanz, Hochglanz, 127 µm)	Specialty Manufacturing, Inc. (Saginaw, MI, USA)
Unsterile Pipettenspitzen	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zellkulturflaschen (Tissue Culture Flask), 25cm²	SARSTEDT AG und Co (Nümbrecht, Deutschland)
Silikon Fugenmasse, lebensmittelecht	Henkel AG und Co. KGaA (Düsseldorf, Deutschland)
Untersuchungshandschuhe	Ansell LTD (Tamworth, UK)
Händedesindefktionsmittel	Ecolab GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Waschlotion	Bode Chemie GmbH (Hamburg, Deutschland)

2.3 Lösungen und Medien Zellkulturen

Tab. 3: Übersicht verwendete Lösungen und Medien der Zellkulturen

Beschreibung	**Inhalt**
Kontrolllösung	140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CACl_2$; tiltriert auf pH 7,4
Kontrolllösung ohne Calcium (Ca^{2+}-freie Lösung)	140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EGTA; tiltriert auf pH 7,4
Zellmedium Calu-3-Zelllinie	MEM with earle's salts, 1% Streptomycin/Penicillin (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin), 10% FBS, 1% MEM NEAA 100x
Zellmedium NCI-H292-Zelllinie	RPMI 1640, 10% FBS, 1% Streptomycin/Penicillin (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)
Zellmedium NCI-H441-Zelllinie	RPMI 1640, 10% FBS, 1% Streptomycin/Penicillin (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)
Zellmedium A549-Zelllinie	Dulbeccos`s MEM high Glucose, 10 % FBS, 1% Streptomycin/Penicillin (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)

EGTA = Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, FBS = Fetales Kälberserum (Fetal bovine serum), HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, MEM = Minimum Essential Medium, NEAA = Non-essential Amino Acids

2.4 Zelllinien

Tab. 4: Übersicht verwendete Zelllinien

Name	**Hersteller (Ort)**
NCI-H441 (human, Charakteristik: Lungenepithel)	ATCC® (Wesel, Deutschland)
A549 (human, Charakteristik: Lungenepithel)	ATCC® (Wesel, Deutschland)
NCI-H292 (human, Charakteristik: Lungenepithel)	ATCC® (Wesel, Deutschland)
Calu-3 (human, Charakteristik: Lungenepithel)	ATCC®(Wesel, Deutschland)

2.5 Laborgeräte

2.5.1 Geräte Zellkultur

Tab. 5: Übersicht verwendete Geräte zur Aufbereitung und Bearbeitung der Zellkulturen

Gerät	Hersteller (Ort)
Absaugstation MINI-VAC EC	Axon Lab (Reichenbach/Stuttgart)
Gas Profi1SCS	WLD-Tec GmbH (Göttingen)
Heizplatten-Magnetrührer	Bibby Scintific LTD (Staffordshire, UK)
HERAcell® 150 CO_2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
HERAsafe® HS 15 Sicherheitswerkbank (S1)	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Labofuge 400e Function Line	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Kühl/Gefrierkombination C392	Liebherr (Biberach)
Kryokonservierer GT-40	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH (Düsseldorf)
Membranvakuumpumpe	Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen)
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH (München)
pH-Meter CG 822	SCHOTT Instruments GmbH (Mainz)
Präzisionswaage	Sartorius AG (Göttingen)
REAX 2000 Vibrationsmixer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
S@feflow1.2 Sicherheitswerkbank (S2)	NuncTM Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co., Inc. (Edison, NJ, USA)
Tiefkühlschrank Forma 900s	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Varioklav 300 Autoklav (S1)	H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim)

UV = ultraviolett

2.5.2 Mikroskopisches Setup

In der vorliegenden Arbeit wurde für die allgemeine und Fluoreszenzmikroskopie ein Aufbau von Visitron Systems (München, Deutschland) verwendet, welches folgende Komponenten enthielt:

- Zeiss Observer Z1 invertiertes Mikroskop
- Hoch-auflösender Z-Fokus
- Prior Scientific H117E2X2 ProScan Inverted Stage
- VisiChrome Polychromator System für Fura-2 Messungen
- Photometrics CoolSNAP EZ hochauflösende Kamera
- 40x Öl-Immersionsobjektiv von Zeiss
- PC-Arbeitsplatz
- Metamorph-Software

Die verwendeten optischen Einstellungen (Filter) sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Filter

Fluochrom	Anregungsfilter	Beamsplitter	Emissionsfilter
Hoechst	365nm	395nm	445nm
EH-1	546nm	560nm	607nm
Fura-2	340/380nm	409nm	510nm

EH-1 = Ethidium-Homodimer-1, Hoechst = Hoechst33342, genauere Spezifikationen der Filtereigenschaften wurden übersichtshalber nicht aufgeführt

2.5.3 Dehnungsapparatur (Strain Device)

Zur Dehnung der Zellen wurde ein motorisierter Zelldehnungsapparat der advancedLAB Singer&Frick OEG (Innsbruck, Österreich) verwendet, welcher von der Innerbichler GmbH (Kundl, Österreich) hergestellt und von der Wissenschaftlichen Werkstatt Feinwerktechnik der Universität Ulm für die Studie angepasst wurde. Abbildung 4 gibt einen schematischen Überblick über die Dehnungsapparatur.

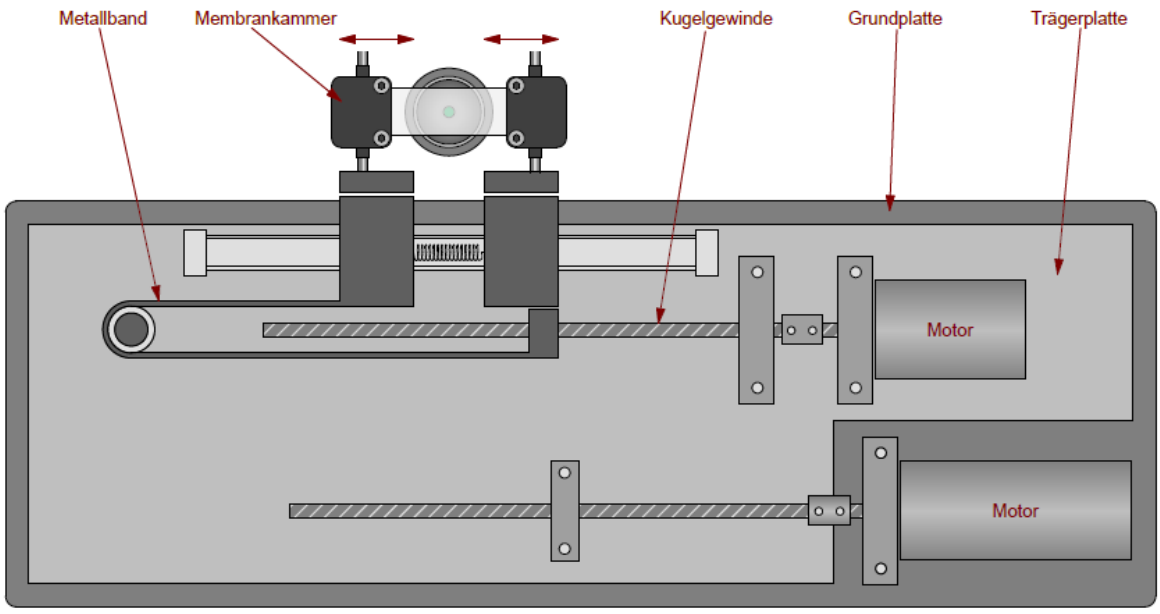


Abb. 4: Übersicht Dehnungsapparatur (Graphik angelehnt an Gerstmair, 2008)

Der Apparat besteht aus zwei unabhängig voneinander arbeitenden Einheiten: der *Grundplatte* und der *Trägerplatte*. Über die Trägerplatte ist es möglich, Spannung auf die montierte Membrankammer auszuüben oder die vorgedehnte Membrankammer wieder

zu kontrahieren. Dazu dienen zwei bewegbare Blöcke, an denen die Membrankammer befestigt ist. Durch gegenläufige Bewegung der Blöcke lässt sich so die Membran dehnen oder komprimieren. Die Steuerung der Grundplatte ermöglicht die Nachführung des Dehnungselements während des Experiments. So kann ein gewählter Bildausschnitt auch während der Dehnung im Detektionsfeld des Mikroskops gehalten werden. Eine Software (siehe 2.6) ermöglicht über Verbindung mit einer Steuerungseinheit die Manipulation der Motoren des Dehnungsapparates.

Zur Kalibrierung der Dehnungsapparatur dient eine Metallplatte, deren Abmessung der Membrankammer in ungedehntem Zustand entspricht. Dadurch wird die Position für null Prozent Dehnung festgelegt.

2.5.4 Membrankammer und Membrane

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Membrankammern der so genannten dritten Generation verwendet (Gerstmair 2008). Als Membran wurde ein Silikonelastomer mit einer Dicke von 127 µm verwendet. Dieses Elastomer besitzt eine homogene Dehnbarkeit, ausreichend gute optische Eigenschaften und eignet sich als Wachstumssubstrat für Zellen (Frick et al. 2004). Um Unterschiede in der Membranvorspannung zu vermeiden, wurde ein Kalibrierungsstück mit fixierten Abständen bei der Herstellung der Membrankammern verwendet, so dass alle Membrankammern eine einheitliche Größe aufwiesen. Die Membrane wurden in der Membranhalterung durch vier Schrauben fixiert und anschließend mittels eines lebensmittelechten Silikons abgedichtet. So war es möglich eine ca. 1 ml Volumen fassende Membrankammer zu bilden.

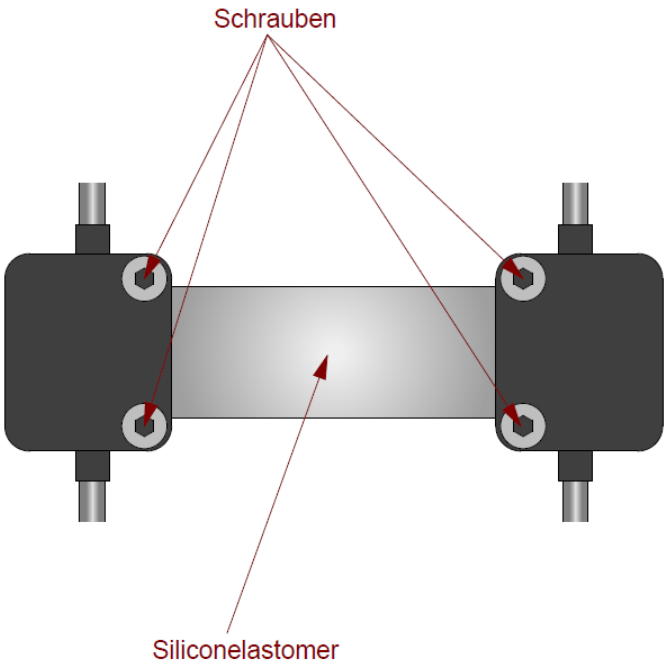


Abb. 5: Übersicht Membrankammer (Graphik angelehnt an Gerstmair, 2008)

2.6 Software

Zur Steuerung der Dehnungsapparatur wurde eine von Gerstmair (Gerstmair et al. 2009) entwickelte Software verwendet, die es ermöglicht individuelle Dehnungsprotokolle zu erstellen. Die in dieser Arbeit verwendeten Dehnungsprotokolle sind im Anhang A aufgeführt. Die Dehnungsgeschwindigkeit betrug bei allen Dehnungsprotokollen 10% Dehnungsamplitude pro Sekunde. Abbildung 6 zeigt dabei diesen Dehnungsvorgang exemplarisch.

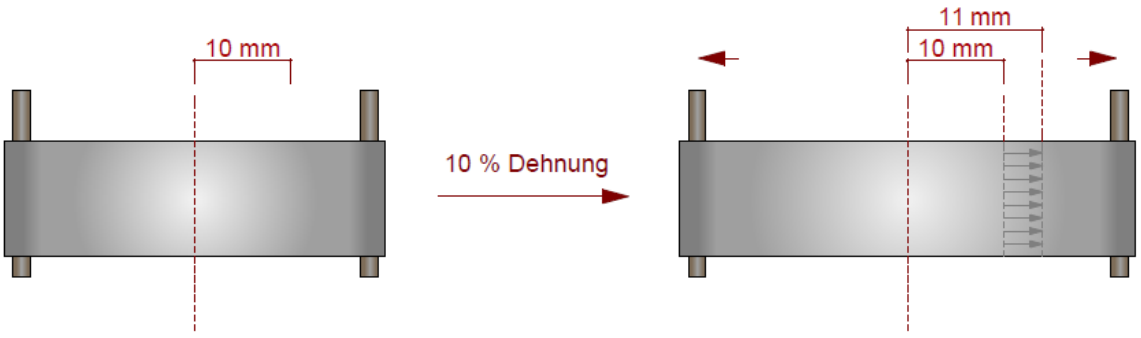


Abb. 6: Die Dehnung, die während einer Sekunde durchgeführt wurde, beispielhaft dargestellt (Graphik angelehnt an Gerstmair, 2008)

Zu den Eigenschaften der Software gehört die Möglichkeit, eine Vordehnung der Membranen vorzunehmen, so dass eine homogene und glatte Membranoberfläche vor

dem Aufbringen der Zellen erzielt werden konnte. In dieser Studie wurde eine Vordehnung von 20% vorgenommen. Die Software lief auf einem Dell Latitude D520 Laptop und war über eine RS-232-Schnittstelle mit dem Bewegungscontroller der Dehnungsapparatur verbunden.

Zusammenfassend hat Software hauptsächlich die folgenden drei Funktionen inne:

- Eine präzise Definition der zu verwendenden Dehnungsprotokolle vorzunehmen und diese abzuspeichern
- Bewegungskompensation (hier nicht relevant)
- Eine exakte Festlegung der Vordehnung der Membrane

2.7 Zellkultivierung: Präparation der Membrane, Zellisolation, Plattierung und Inkubation

Für die Versuchsreihen wurden *Calu-3-, H292-, H441-* und *A549-Zelllinien* verwendet. Zur Proliferation wurden ca. $1x10^6$ kryokonservierte Zellen bei 37°C aufgetaut und in 10 ml Kulturmedium suspendiert. Die verwendeten Medien sind für die einzelnen Zelllinien in Tabelle 4 aufgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (Tissue Culture Flask [25 cm^2], Sarstedt) bei 37°C, 10% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit bis zu einer Zelldichte von etwa $5x10^5$ Zellen/ml (entspricht einem etwa 80%-igen konfluenten Wachstum). Zur Passagierung wurden die adhärent gewachsenen Zellen mit PBS-Puffer gewaschen, mit 1 ml Trypsin überschichtet und bei 37°C, 10% CO_2 und 95% Luftfeuchte inkubiert. Sobald die Zellen sich von der Plastikoberfläche lösten, wurde die Inkubation durch Suspension in 4 ml Kulturmedium gestoppt. Die Inkubationszeiten variierten zwischen den einzelnen Zelllinien (H441: 2 min, H292: 2 min, A549: 4 min, Calu-3: 20 min). Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, in 20 ml Kulturmedium resuspendiert und $5x10^5$ Zellen in 25 cm^2 Kulturflaschen gegeben. Das Kulturmedium wurde auf 10 ml aufgefüllt.

Vorbereitung der Membran. Vor der Verwendung im Experiment wurden die Membrankammern zunächst gesäubert und autoklaviert. Die Membranen wurden dafür wiederholt mit 70% Isopropanol benetzt und anschließend vorsichtig mechanisch gesäubert. Als zweiter Säuberungsschritt erfolgte eine Spülung mit destilliertem Wasser. Die so gereinigten Membranen wurden schließlich autoklaviert.

Zellkultur auf den Membranen. Um ein adhärentes Wachstum der eingesetzten Zelllinien auf der Membran zu erreichen, musste eine Beschichtung der Membran mit Fibronectin durchgeführt werden. Fibnronectin ist ein Glykoprotein der ECM, welches an der Regulation der Zelladhäsion, Migration, Differenzierung und Proliferation beteiligt ist (Dallas et al. 2006). Hierfür wurde die Ausgangslösung (1 mg/ml) mit PBS auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt. Anschließend wurde 1 ml der verdünnten Lösung auf die Membran gegeben und dort für 4 Stunden bei 4°C belassen. Unmittelbar vor dem Ausplattieren der Zellen wurde die Fibronectinlösung abgesaugt und die Membran mit PBS gespült. Anschließend wurde 1 ml Zellsuspension ($5x10^4$ Zellen/ml) auf die Membran gegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit für ca. 40-50 Stunden.

2.8 Calcium-Signal-Messung

Vor den Untersuchungen wurden die auf den Membranen adhärent kultivierten Zellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fura-2 (siehe 2.9) für 45 Minuten bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit in 1 ml vorgewärmtem Medium ohne Zusätze vorinkubiert. Anschließend wurde das Medium gegen Kontrolllösung ersetzt. Schließlich erfolgte der Transfer der präparierten Membrane auf die Dehnungsapparatur und deren Positionierung auf dem Mikroskop. Die Zelldehnung erfolgte bei Raumtemperatur gemäß den in Anhang A aufgeführten Protokollen. Ca^{2+} Modulatoren wurden verwendet, um die pharmakologischen Eigenschaften des Ca^{2+}-Signals zu charakterisieren. Bei allen durchgeführten Experimenten, außer den Calcium-Addback-Experimenten, wurden die Zellen mit nachfolgend in Tabelle 7 aufgeführten Modulatoren 20 Minuten vorinkubiert.

Tab. 7: Übersicht Modulatoren Vorinkubation

Modulator	**Konzentration**
BAPTA-AM	100 µM
U73122	10 µM
U73343	10 µM
2-APB	100 µM
PP1	500 nM
Wortmannin	1 µM
Thapsigargin	1 µM
Ryanodin	50 µM
Lanthan	100 µM
Gadolinium	50 µM

BAPTA-AM = Bi-aminophenoxyethan-Acetoxymethylester, 2-APB = 2-Aminoethyldiphenylborinat, PP1 = 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo-d-3,4-pyrimidine

Lediglich für das Calcium-Addback-Experiment wurden während des Versuches unmittelbar während des Dehnungsexperiments als postitve Kontrolle 1 µM Thapsigargin zugegeben.

Um Veränderungen der zytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration ($[Ca^{2+}]_c$) zu ermitteln, erfolgte die Messung der Fura-2-Intensitäten (Grynkiewicz et al. 1985; Roe et al. 1990; Rudolf et al. 2003) mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie. Fura-2-beladene Zellen wurden sequentiell mit einer Wellenlänge von 340 nm und 380 nm angeregt und die Intensität des emittierten Lichts bei einer Wellenlänge von 510 nm gemessen. Das Fura-2-Signal wurde dabei für beide Wellenlängen mit einer Expositionszeit von 150 ms und einer Rate von 3 Bildern pro Minute bzw. 5 Bilder pro Minute bei den Ca^{2+}-Addback-Experimenten erfasst.

2.9 Zellschädigungsuntersuchung

Für die Zellschädigungsexperimente wurden die Zellkerne der auf den Membranen adhärent kultivierten Zellen zunächst durch Vorinkubation mit 1 µM Hoechst33342 10 Minuten gefärbt. Nach dem Austausch des Kulturmediums durch Kontrolllösung erfolgte die Zugabe von 1 µM Ethidium-Homodimer-1. Die so vorbereiteten Membranen wurden analog zu 2.8 auf das Mikroskop transferiert und gedehnt. Anschließend wurden die Fluoreszenzsignale für Hoechst33342 (Anregungswellenlänge 365nm/

Emissionswellenlänge 445nm / Belichtungszeit 10ms) und Ethidium-Homodimer-1 (Anregungswellenlänge 546nm / Emissionswellenlänge 607nm / Belichtungszeit 20ms) gemessen.

2.10 Datenanalyse und Bildverarbeitung

Die Analyse der experimentellen Daten beinhaltet Bildverarbeitung, Extraktion bestimmter Bildmerkmale und Ermittlung des Signals.

Bildverarbeitung. Für die Bildverarbeitung wurde die Software ImageJ verwendet (Rasband 2008). Die Bilder eines Untersuchungszeitraums, das heißt ein Bildersatz pro aufgenommene Wellenlänge über die verschiedenen Messzeitpunkte hinweg, wurden in die Software geladen. Es wurden nur Bilder ausgewertet, bei denen die zu analysierenden Zellen für beide Anregungswellenlängen (340 nm und 380 nm) deckungsgleich abgebildet waren. Die Bildbearbeitung sah folgende Schritte vor: Zunächst wurden die in Graustufen aufgenommenen Bildersätze aller Messzeitpunkte einer Versuchsreihe für beide zu vergleichenden Wellenlängen (340 nm und 380 nm Wellenlänge) zu einem RGB-Bildersatz kombiniert. Anschließend wurde eine Angleichung mittels des Plug-In Image Stabilizer (Baker et al. 2004; Li 2008; Lucas et al. 1981) durchgeführt. Image Stabilizer berechnet hierfür die beste Übereinstimmung aller Bilder eines Bildersatzes mit einem vorher festgelegten Ausgangsbild. Entstehende Kanten werden vom Programm mit schwarz aufgefüllt. Die Umwandlung zu einem RGB-Bildersatz ist nötig, da diese eine differenziertere und exaktere Angleichung der beiden Bildersätze (die Bilder aller Messzeitpunkte für 340 nm bzw. 380 nm) aneinander ermöglicht. Nach diesem Verarbeitungsschritt wurde der RGB-Bildersatz wieder nach ihren Wellenlängen in zwei Graustufen-Bildersätze zurücküberführt, um eine separate Bildanalyse je Wellenlänge zu gewährleisten. Ein weiterer wichtiger Verarbeitungsschritt sah die Festlegung eines Hintergrundwertes vor. Hierzu wurde eine bestimmte Region als Hintergrund festgelegt und aus den dort befindlichen Grauwerten ein Mittelwert berechnet, der von den Grauwerten der Zellen subtrahiert wurde.

Die Bildverarbeitung der Zellschädigungsuntersuchungen erfolgte analog zu den Ca^{2+}-Signal-Messungen mit ImageJ. Im Gegensatz zum obig beschriebenen Vorgehen, bei dem die beiden Anregungswellen des Fura-2 analysiert wurden, wurden hierbei die

Intensitäten der Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst33342 und Ethidium Homodimer-1 untersucht.

Extraktion bestimmter Bildmerkmale. Für jede Zelle eines Experiments wurde nach der Bildverarbeitung manuell ein definierter Messbereich (ROI: Region of Interest) festgelegt. Zellen ohne erkennbare Zellgrenzen wurden von den nachfolgenden Analysen ausgeschlossen. Die gemittelten Werte für die Intensität aller Bildpunkte eines Messbereichs (ROI) ergaben jeweils einen Intensitätswert pro Bild und Zelle für alle Zeitpunkte und beide Wellenlängen. Die so erhaltenen Daten wurden tabellarisch dargestellt und mit Microsoft® Excel weiterverarbeitet. Dieses Vorgehen wurde sowohl bei den Studien zur Calcium-Signal-Messung als auch den Experimenten zur Zellschädigung angewandt.

Berechnung des Calcium-Signals. Die vorverarbeiteten Daten aus ImageJ wurden mit Hilfe von Microsoft® Excel analysiert. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Fluoreszenz-Intensitäten jeder Zelle vor der Dehnung mit dem Wert 1 definiert. Durch Bildung des Verhältnisses der Intensität des emittierten Lichts bei einer Anregung mit 340 nm und 380 nm (= I_{340}/I_{380}) lässt sich auf die Ca^{2+}-Konzentration schließen. Eine größeres I_{340}/I_{380} entspricht einer erhöhten Ca^{2+}-Konzentration, ein geringes I340/I380 einer erniedrigten Ca^{2+}-Konzentration. Durch die ratiometrische Messung ist das Signal nur von der Ca^{2+}-Konzentration und nicht von der Farbstoffkonzentration oder dem Zellvolumen abhängig.

Ein Calcium-Peak wurde definiert als Steigerung von I_{340}/I_{380} um mindestens 20% der Ausgangsintensität, gemittelt aus allen Werten vor Ausführung der Dehnung. Diese Schwelle wurde festgelegt, um Störvariablen wie beispielsweise Hintergrundrauschen oder Artefakte zu minimieren. Zudem wurde der Zeitpunkt für die Bestimmung der maximalen Intensität nach dem Dehnungsmanöver bei allen Protokollen auf 15 s nach Beginn der Dehnung festgelegt, um Artefakte durch das Dehnungsmanöver zu umgehen.

Analyse der Zellschädigung. Voraussetzung zur Identifizierung einzelner Zellen war eine Einfärbung der Zellkerne mittels Hoechst33342. Dies ermöglichte in einem zweiten Schritt zu erkennen, wie viele Zellen geschädigt wurden. Dies wurde dadurch angezeigt, dass Ethidium-Homodimer-1 einströmen konnte.

2.11 Statistische Analyse

Wenn nicht anders erwähnt sind alle Ergebnisse als Mittelwert ± Standardfehler (Standard Error of the Mean, SEM) angegeben. Um die experimentellen Gruppen auf Verschiedenheit zu überprüfen, wurden zweiseitige ungepaarte Student‘s t-Tests, beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Bonferorni-adjustierten Post hoc-Tests angewandt. Zusammenhänge wurden über Korrelationen (Pearson) bzw. lineare Regressionen verifiziert. Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant bewertet. Die jeweiligen Signifikanzniveaus sind folgendermaßen definiert: * = $p<0,5$, ** = $p<0,01$, *** = $p<0,001$.

Zur Zusammenfassung und Gruppierung der Daten und grundlegenden statistischen Analyse wurden Excel 2010 (Microsoft® Deutschland GmbH, Unterschleißheim) sowie IBM SPSS (Version 20) verwendet.

3. Ergebnisse

Für sekretorische Freisetzung von Surfactant bei Dehnung spielt die Calciumkonzentration in der Zelle eine wesentliche Rolle. Bisherige Untersuchungen haben sich auf primärkultivierte alveoläre Typ 2-Zellen konzentriert. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie ein neues Zellmodell entwickelt, welches mehr Möglichkeiten zu molekulartechnischen Untersuchungen bietet. Die verwendeten Zellen sollten außerdem lungenspezifisch sein und dem Anspruch einer homogenen und reproduzierbaren Zellpopulation genügen. Des Weiteren wurde angestrebt, erste Hinweise auf die genaueren Calciumsignalwege bei Dehnung der Zellen zu erlangen.

3.1 Zellscreening

Ziel des Screenings war es, eine Lungenepithelzellinie zu identifizieren, die auf mechanische Dehnung mit einem Ca^{2+}-Signal reagiert. Die Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration wurden in Zeitserienexperimenten untersucht. Dazu wurde ein einmaliger Dehnungsimpuls (50%) auf die Zellen ausgeübt (siehe Anhang A). Die Stärke der Dehnung wurde dabei gewählt, um ein möglichst maximales Calciumsignal zu induzieren, ohne größere Zellschädigungen hervorzurufen. Die Visualisierung der intrazellularen Calciumkonzentration wurde durch das fluoreszierende Fura-2-AM umgesetzt (siehe 2.9).

Die Auswertung der Calciumsignale für die verschiedenen Zelllinien ergab, dass lediglich für die Calu-3-Zellen ein transienter Calcium-Peak nach Dehnung beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 7 bzw. 8).

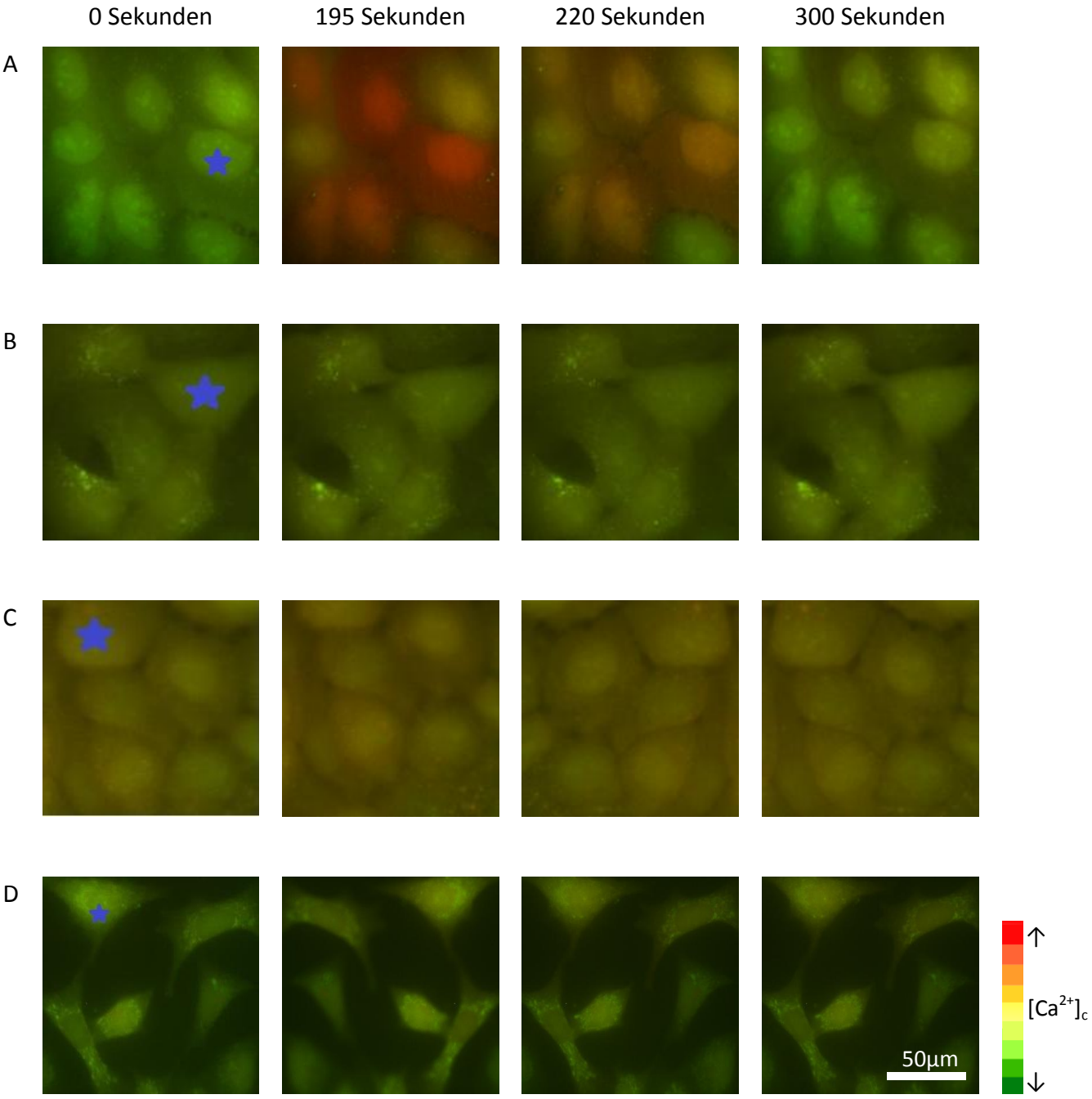
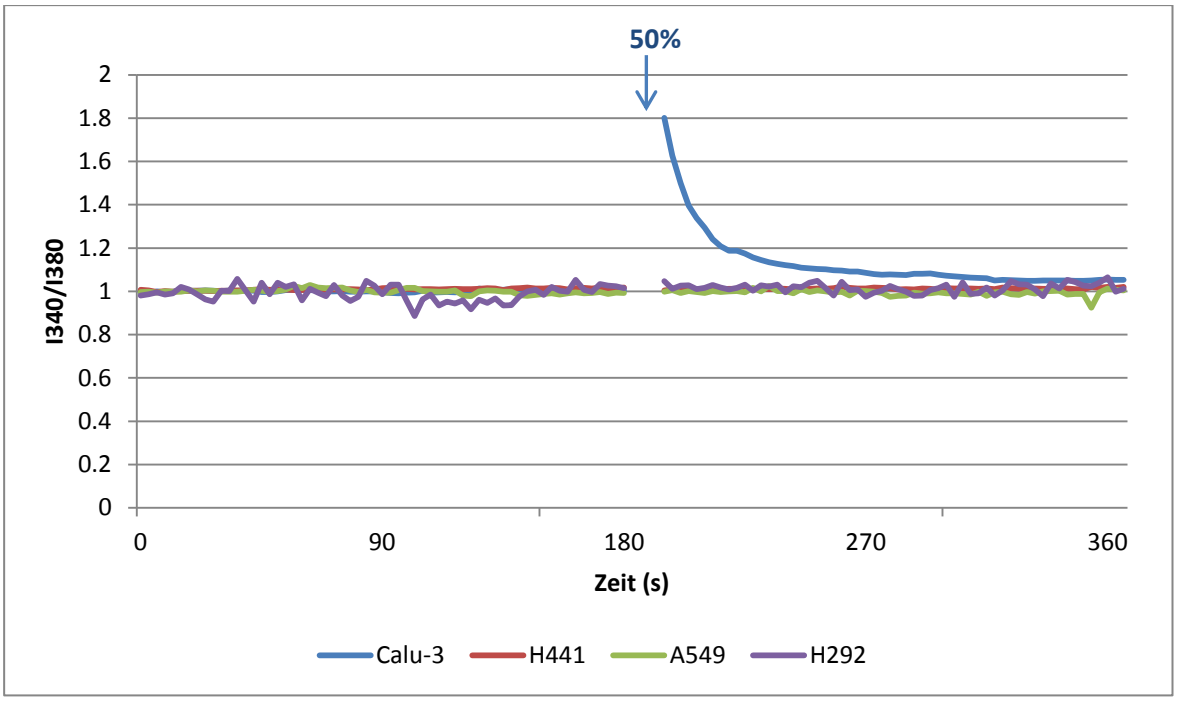


Abb. 7: Calciumsignal in den verwendeten Zelllinien mit einmaligem Dehnungsimpuls nach 180 Sekunden. Rote Fluoreszenz bedeutet eine Erhöhung von [Ca2+]c.

A = Calu-3-Zellen, B = H441-Zellen, C = H292-Zellen, D = A549-Zellen

A



B

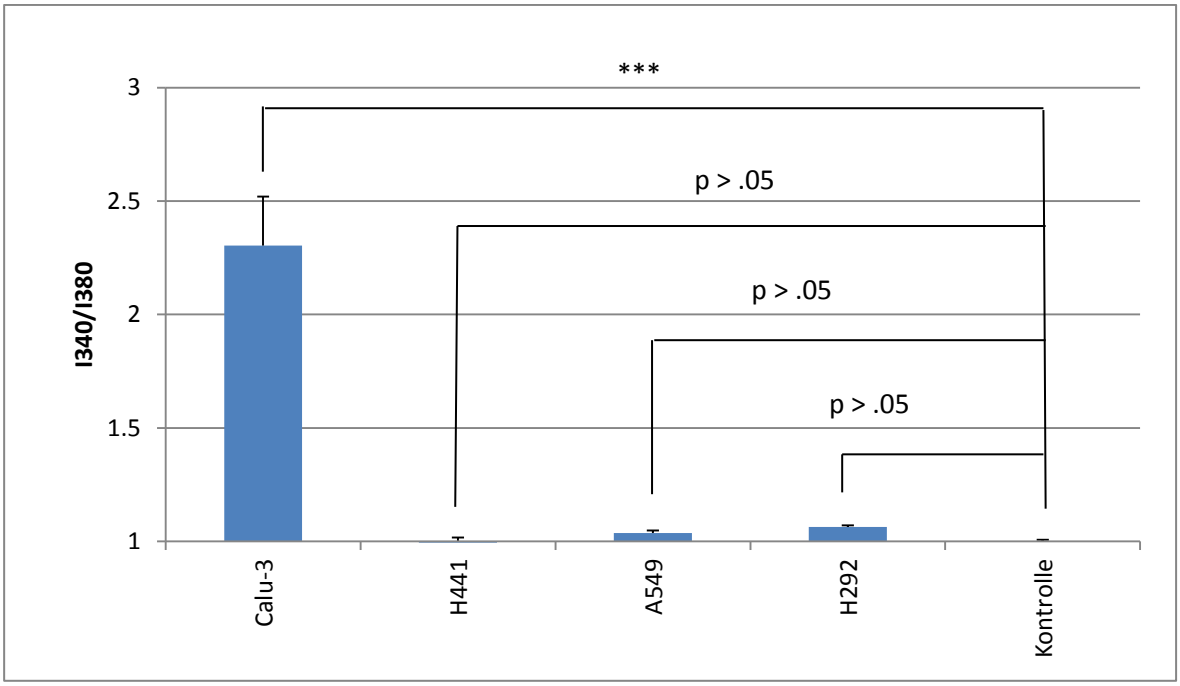


Abb. 8: Übersicht Zeitserienexperimente zu Untersuchung des Calciumsignals nach Dehnung der verschiedenen Zelllinien. Abbildung A zeigt den graphischen Verlauf der Calciumkonzentration bespielhaft an einer Zelle (blaue Markierung in Abbildung 7) der jeweiligen Zelllinie. Die Zuordnung der Zellen erfolgte analog zu Abbildung 7. Abbildung B zeigt ein Säulendiagramm mit alle gemittelten Werten unmittelbar nach Dehnung für alle untersuchten Zelllinien.

Daher wurden nur Calu-3-Zellen für die weiteren Experimente verwendet. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass alle untersuchten Zellen der Calu-3- Zelllinie einen Calcium-Peak nach

obiger Definition zeigten. Somit konnten alle Zellen in die Auswertung eingeschlossen werden.

In Abbildung 7 (B) ist eine Übersicht gegeben, die alle Versuche und beobachteten Zellen mit einschließt. Eine einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-adjustierten Post hoc-Kontrasten ergab signifikante Unterschiede zwischen der intrazellulären Calciumkonzentration nach Dehnung zwischen Calu-3-Zellen und allen anderen Zellen ($p < .001$). Als Kontrollgruppe dienten nicht gedehnte Calu-3 Zellen. Diese unterschieden sich lediglich signifikant von den gedehnten Calu-3-Zellen ($p < .001$), zu den anderen Zelllinien ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p > .05$).

Die Anzahl der untersuchten Zellen, Mittelwerte und Standardfehler (SEM) sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tab. 8: N, M und SEM der in 3.1 untersuchten Zelllinien

Zelllinie	**N**	**M**	**SEM**
A549	14	1.0370	0.0116
H441	24	0.9940	0.0231
H292	18	1.0630	0.0075
Calu3	78	2.3035	0.2166
Kontrolle	84	0.9987	0.0084

3.2 Zellschädigung durch Dehnung

In diesem Abschnitt wurde der Zellschädigende Effekt der Dehnung untersucht. Als geschädigte Zellen wurden diejenigen angesehen, bei denen durch eine Schädigung der Zellmembran der Membranimpermeable, rot fluoreszierende Farbstoff Ethidium-Homodimer-1 in die Zelle eindringen konnte. Um den Zellkern sichtbar zu machen, wurde der DNA-bindende, zellpermeable Farbstoff Hoechst33342 eingesetzt. Zur Quantifizierung wurden nach jedem Dehnungsimpuls die Zellen mit einem Anstieg der roten Fluoreszenz (siehe Abbildung 9) als geschädigt angesehen und ausgezählt.

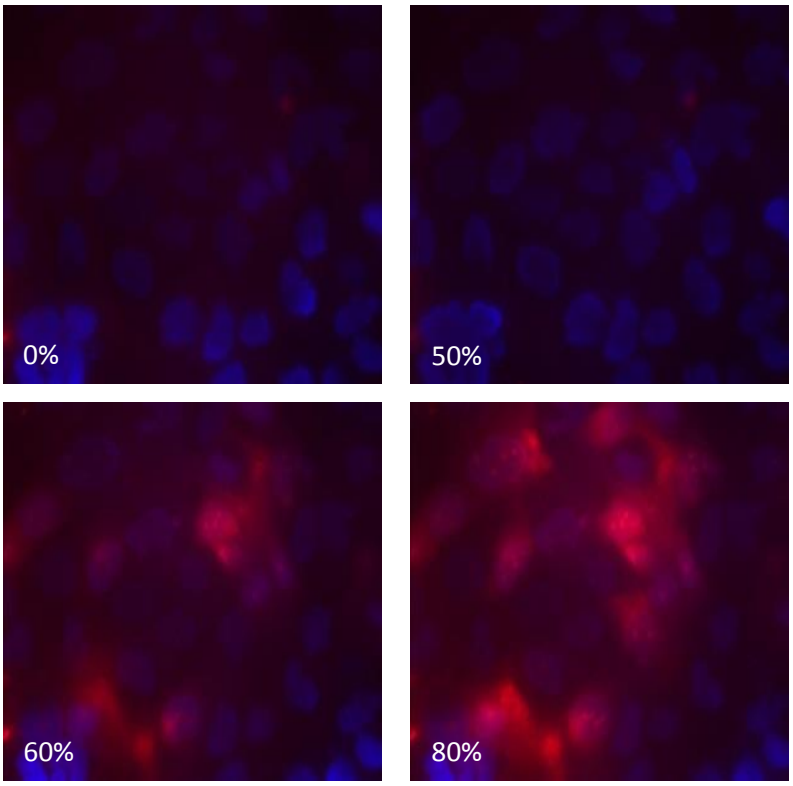


Abb. 9: Ausschnitte aus einem Zeitserienexperiment zur Darstellung der Zellschädigung durch steigende Dehnungsamplitude. Abgebildet wird die Überlagerung von Ethidium-Homodimer-1- und Hoechst33343-Färbung bei Calu-3-Zellen 60 Sekunden nach dem entsprechenden Dehnungsimpuls. Die Prozentwerte geben die Stärke der Dehnung zum jeweiligen Bild an.

In Abbildung 9 ist die Anzahl der geschädigten Zellen bei repetitiver (also gleichbleibender) Dehnung und steigender Dehnungsamplitude aufgeführt. Die jeweiligen Dehnungsprotokolle sind Anhang A zu entnehmen.

Bei 0% bis 40% Dehnung betrug der relative Anteil geschädigter Zellen 0.06 ± 0.0142, bei 50% war der relative Anteil 0.08 ± 0.0072, bei 60% 0.35 ± 0.0072, bei 70% 0.50 ± 0.0573 und bei 80% 0.79 ± 0.0228. Die Anzahl der verwendeten Zellen in der Gesamtpopulation betrug $N_{Zellen} = 61$ auf insgesamt $N_{Membranen} = 4$ ausgezählten Membranen.

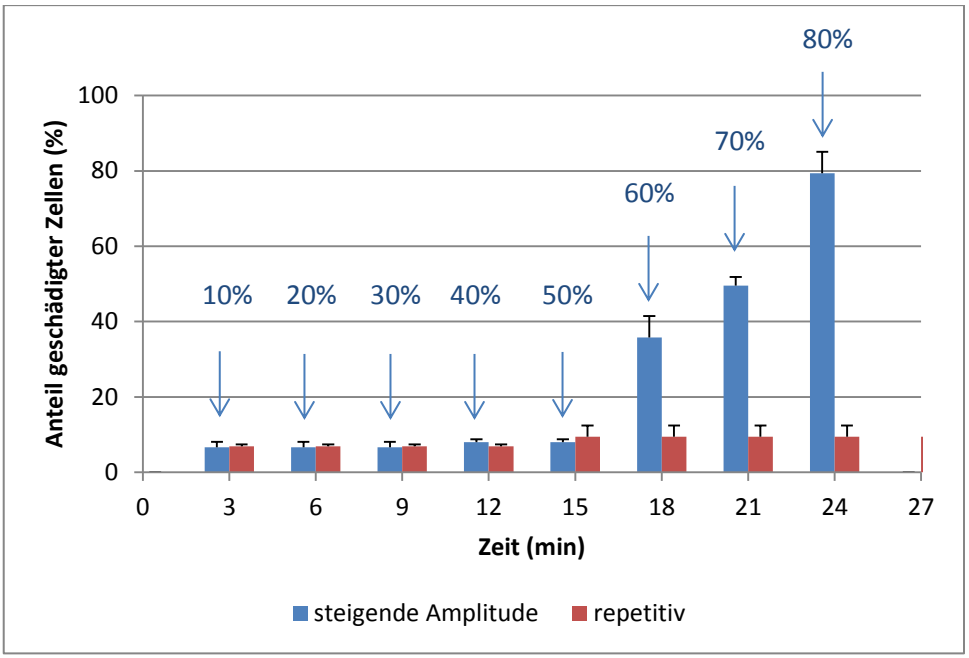


Abb. 10: Übersicht Zeitserienexperimente der Zellschädigungsexperimente. Die Abbildung zeigt den relativen Anteil geschädigter Zellen an der Gesamtpopulation über die Zeit nach Ausführung des Dehnungsprotokolls mit steigender Amplitude (blaue Säulen) bzw. repetitiver Dehnung mit 50% Intensität (rote Säulen). Die Prozentwerte kennzeichnen die jeweilig ausgeübte Dehnungsintensität bei steigender Amplitude.

Die Ergebnisse zeigen, dass ab einer Dehnung von 60% der Ausgangslage eine Schädigung der Zellmembran der bis dahin vitalen Zellen einsetzte. Repetitive Dehnung mit 50% der Ausgangslage hatte keinen Einfluss auf die Integrität der Zellmembran und führen zu keiner Zellschädigung. Zur Untersuchung der Mechanismen der Calcium-Freisetzung konnte somit ein Dehnungsimpuls von bis zu 50% Amplitude im Vergleich zur Ausgangslage eingesetzt werden.

3.3 Charakterisierung des Calciumsignals

Im nächsten Analyseschritt sollte nun eine Charakterisierung des detektierten Calciumsignals bei Calu-3-Zellen erfolgen. Hierzu sollte zunächst die Verbindung zwischen der Veränderung von $[Ca^{2+}]_c$ und der Dehnungsamplitude untersucht werden. Wie Anhang A zu entnehmen ist, wurde hierfür in einer ersten Analyse die Dehnungsamplitude systematisch variiert (von 0% bis 50% in 10%-Schritten) und das Calciumsignal gemessen. Die Berechnung einer Korrelation ergab einen deutlichen und signifikant positiven Zusammenhang zwischen Calciumsignal und Dehnungsamplitude ($r = .601$, $p < .001$). Das heißt: Je größer die Dehnung desto höher der Anstieg von $[Ca^{2+}]_c$. In

Abbildung 11 (A-C) wird dieser Zusammenhang grafisch an einer Zelle verdeutlicht. Eine nicht-lineare Regressionsanalyse, in der eine exponentieller Zusammenhang angenommen wurde, ergab eine signifikante Vorhersage der Kriteriumsvariablen (Anstieg $[Ca^{2+}]_c$) durch die Prädiktorvariable (Dehnungsintensität), $F_{155} = 166{,}39$; $p < .001$; $R^2 = .516$.

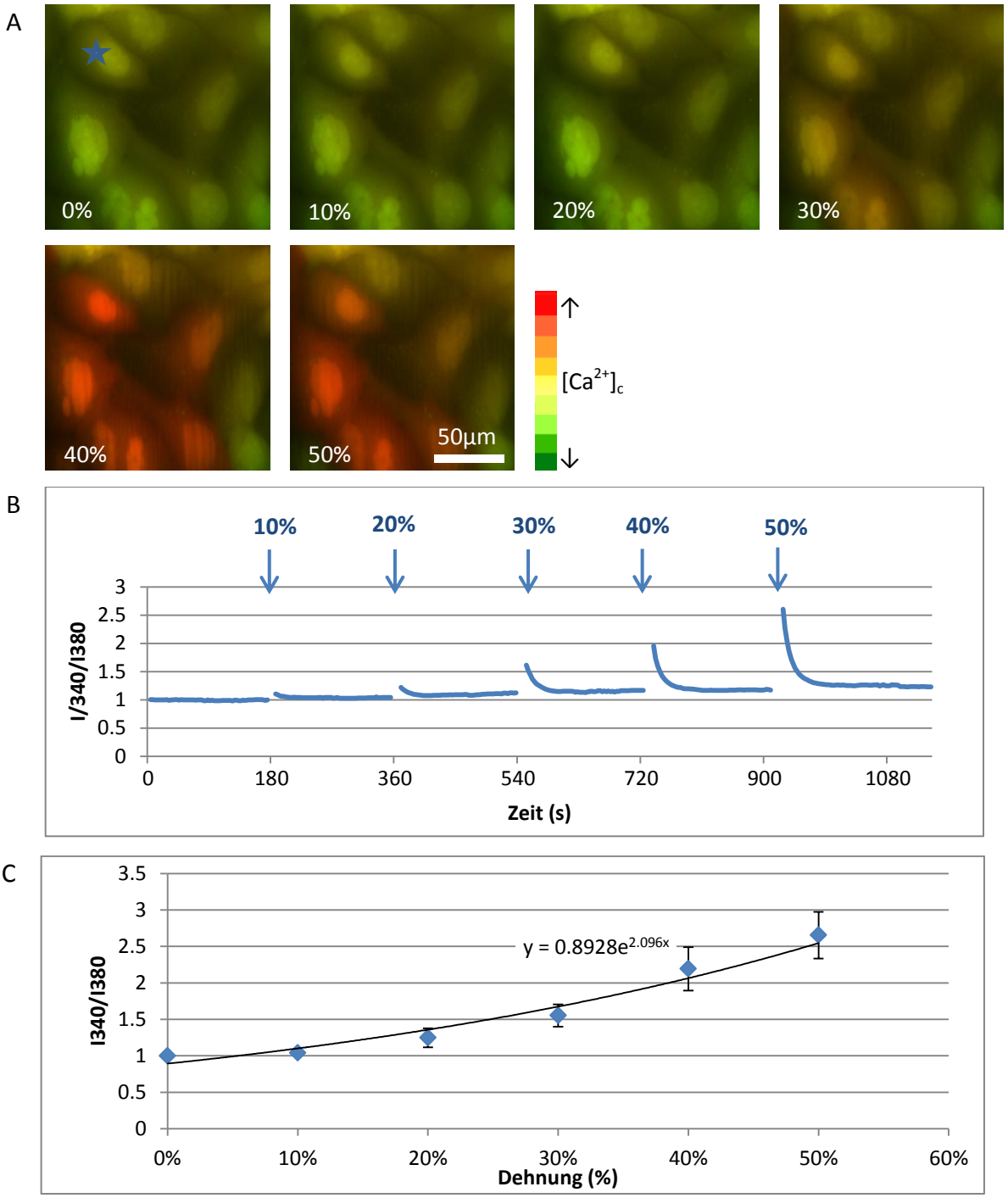


Abb. 11: Übersicht Zeitserienexperimente bei steigenden Dehnungsamplituden. Abbildung A:Calcium-Signal für Fura-2 beladene Zellen unmittelbar nach der Dehnung bzw. den Ursprungszustand vor der Dehnung im ersten Bild. Die Rotfärbung bedeutet eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration. Die Prozentzahlen geben die Stärke der Dehnung an. Die mit blauem Stern markierten Zellen werden in Abbildung B abgetragen. Die Pfeile mit den Prozentangaben geben die ausgeführte Dehnungsintensität zum jeweiligen Zeitpunkt wider. Abbildung C: Zusammenhang zwischen Dehnungsintensität und Calcium-Signal. Die Regressionsgerade verdeutlicht den exponentiellen Zusammenhang.

Parallel zu dieser Untersuchung wurde der Anteil der Zellen bestimmt, der auf Dehnung mit einem Ca^{2+}-Signal reagiert. Ab 40% Dehnungsamplitude war der relative Anteil 1.0 ± 0.0 bei $N_{Membranen}$ = 4 und N_{Zellen} = 54, das heißt, dass alle Zellen im Beobachtungsfeld einen Calcium-Peak zeigten (siehe Abbildung 12).

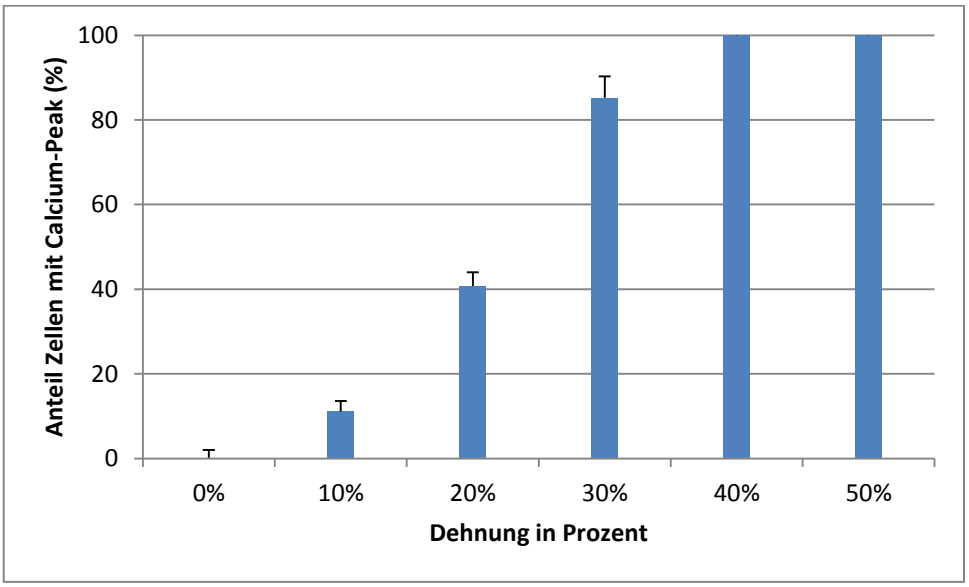


Abb. 12: Übersicht Zeitserienexperimente bei steigender Dehnungsamplitude. Die Säulen zeigen die Anzahl der Calcium-Peaks im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Zellen. Ab 40% Dehnungsamplitude zeigten 100% der Zellen einen Calcium-Peak. Als Calcium-Peak wurde eine Steigerung des Fura-2 Fluoreszenzniveaus um 10% unmittelbar nach dem Dehnungsmanöver definiert. N_{Zellen} = 54, $N_{Membrane}$ = 4.

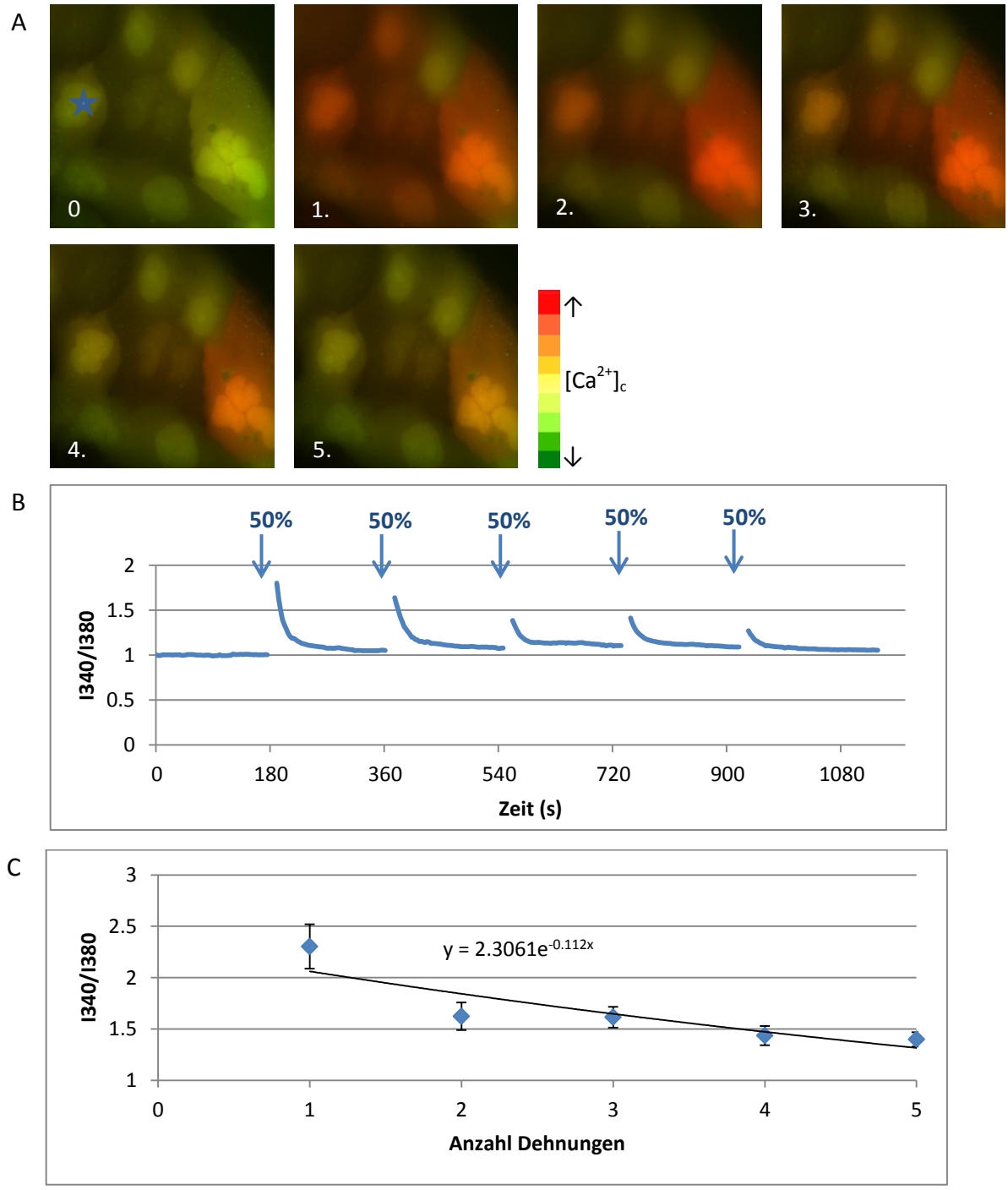


Abb. 13: Übersicht Zeitserienexperimente bei repetitiver Dehnung mit 50 % Amplitude. Abbildung A zeigt den bildlichen Verlauf eines Experimentes. Zu sehen ist das ratiometrische Fluoreszenz-Signal der Anregungsintensitäten (340nm und 380nm) für Fura-2 beladene Zellen unmittelbar nach einem Dehnungsimpuls. Die Nummerierung gibt einen Hinweis auf die Anzahl der durchgeführten Dehnungsimpulse (0 bis 5). Eine Rotfärbung der Zellen bedeutet eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration. Die mit blauem Stern markierten Zellen werden unten in Abb. 13 (B) abgetragen. Abbildung B zeigt den zeitlichen Verlauf des Calciumsignals graphisch dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Dehnungsmanöver markiert. Abbildung C zeigt ein Säulendiagramm aller gemittelten Werte jeweils zum Zeitpunkt unmittelbar nach der Dehnung.

Eine zweite Analyse erfolgte mit repetitiver Dehnung bei gleichbleibender Amplitude (50%). Die berechnete Korrelation ergibt einen signifikanten negativen Zusammenhang ($r = -.262$; $p < .001$). Dies bedeutet, dass sich mit zunehmender Anzahl der Dehnungen eine Erniedrigung des Anstiegs von $[Ca^{2+}]_c$ zeigt. In Abbildung 13 (A-C) wird dieser Zusammenhang grafisch an einer Zelle verdeutlicht. Eine nicht-lineare Regressionsanalyse, in der eine exponentieller Zusammenhang angenommen wurde, ergab eine signifikante Vorhersage der Kriteriumsvariablen (Abnahme $[Ca^{2+}]_c$) durch die Prädiktorvariable (Anzahl Dehnungen), $F_{378} = 24{,}99$; $p < .001$; $R^2 = .06$.

Die Anzahl der untersuchten Zellen, Mittelwerte und der Standard Error of Mean für die beiden in 3.3 aufgeführten Experimente sind Tabelle 9 bzw. 10 zu entnehmen.

Tab. 9: N (Anzahl), M (Mittelwert) und SEM bei ansteigender Dehnungsamplitude

Dehnungsamplitude	**N**	**M**	**SEM**
0%	27	0,9972	0.0255
10%	27	1.0409	0.0176
20%	27	1.2475	0.1313
30%	27	1.5529	0.1529
40%	27	2.1938	0.2881
50%	27	2.6549	0.2950

Tab. 10: N, M und SEM bei gleichbleibender Dehnung

Anzahl der Dehnungen	**N**	**M**	**SEM**
0	84	1.0107	0.0073
1	84	2.3035	0.2166
2	84	1.6237	0.1342
3	84	1.6155	0.1014
4	84	1.4369	0.0931
5	84	1.3982	0.0700

3.4 Untersuchung möglicher Signalwege des Calciumsignals

Um Hinweise auf den Ursprung des oben gezeigten transienten Calciumsignals zu erhalten, wurden im Folgenden verschiedene Modulatoren zur systematischen Untersuchung der Calciumsignalwege eingesetzt. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 11.

Tab. 11: eingesetzte Modulatoren zur systematischen Untersuchung der Calciumsignalwege

	Intrazellulläre	Extrazellulär	Wirkung
Schritt 1			
Thapsigargin	X		Inhibitor Calcium-ATPase
Ca2+-freie Lösung		X	Verhindert Ca^{2+}-Einstrom
Schritt 2			
2-APB	X		Inhibitor von IP3-Rezeptor
PP1	X		Tyrosinkinase SRC-Kinase-Inhibitor
Ryanodin	X		Inhibitor des Ryanodin-Rezeptors
U73122	X		PLC-Inhibitor
U73343			Inaktives Analogon von U73122
Wortmannin	X		PI3-Kinase-Inhibitor
Schritt 3			
Lanthan		X	Blockade TRP-Kanäle
Gadolinuim		X	Blockade TRP-Kanäle

2-APB = 2-Aminoethyldiphenylborinat , IP3 = Inositoltriphosphat, PP1 = 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo-d-3,4-pyrimidine, PLC = Phospholipase C, PI3 = Phosphatidylinositol3-Kinase, TRP = Transient Receptor Potential

U73433 wurde als inaktive Form von U73122 als Kontrolle eingesetzt.

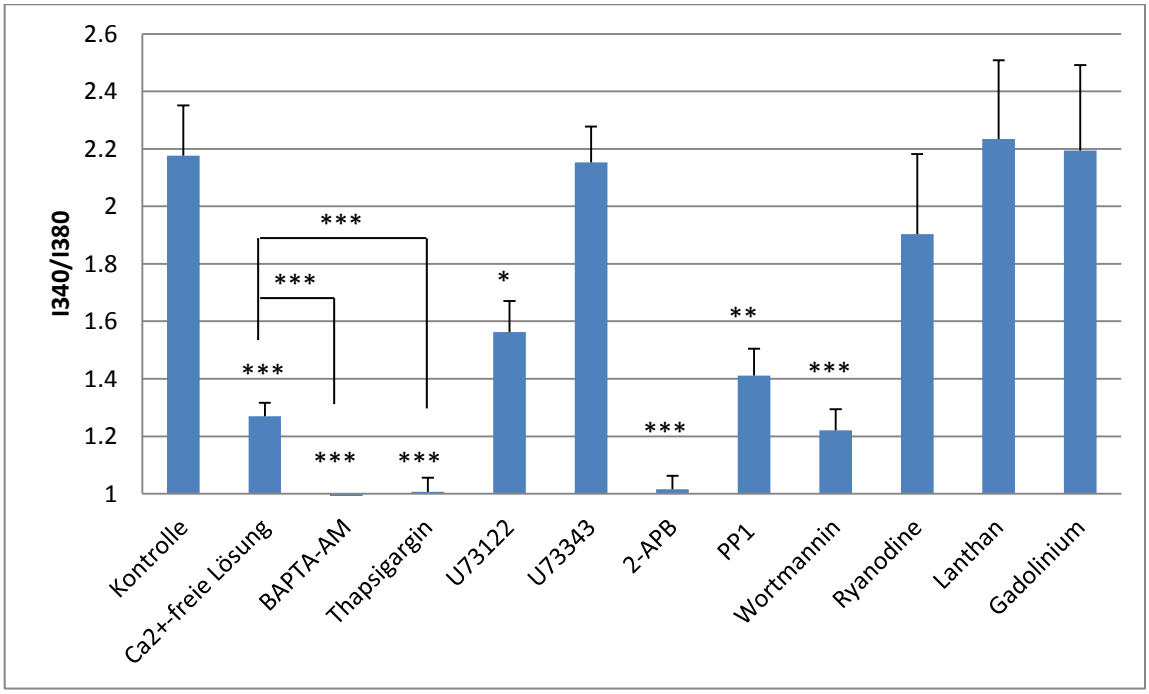


Abb. 14: Übersicht des Ca^{2+}-Signals unmittelbar nach Dehnung mit 50% Amplitude (Protokoll Anhang A) unter Einfluss verschiedener Modulatoren im Vergleich zu ungedehnten Zellen.

Signifikanzen: * p < .05; ** p < .01; *** p < .001

2-APB = 2-Aminoethyldiphenylborinat, BAPTA-AM = Bi-aminophenoxyethan-Acetoxymethylester, PP1 = 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo-d-3,4-pyrimidine

In einem ersten Schritt sollten Hinweise darauf gesammelt werden, ob das Calciumsignal intra- oder extrazellulären Ursprungs ist. Diese Zuordnung erfolgte anhand der in Tabelle 11 aufgeführten Modulatoren (Schritt 1).

Die Abhängigkeit des intrazellulären Ca^{2+}-Signals von den Modulatoren wurde untersucht, indem ein einzelner Dehnungsimpuls (50%) ausgeübt wurde (siehe auch 3.1), um die Höhe eines einzelnen transienten Calciumpeaks über die verschiedenen Modulatoren hinweg vergleichen zu können.

Die ANOVA mit post hoc-Tests ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Ca^{2+}-freier Lösung (N = 62), BAPTA-AM (N = 25) und Thapsigargin (N = 29) zur Kontrolle ($p < .001$). Außerdem ergaben die Mittelwertsvergleiche einen signifikanten Unterschied zwischen Ca^{2+}-freie Lösung zu BAPTA-AM ($p < .001$) und Thapsigargin ($p < .001$), so dass von einem robusten Calciumsignal unter Ca^{2+}-freier Lösung ausgegangen werden kann. Bei den Versuchen mit Thapsigargin (Inhibition der Endoplasmatischen-Reticulum- Ca^{2+}-ATPase) und BAPTA-AM (Calciumkomplex-Bildner) konnten keine Calcium-Peaks mehr nachgewiesen werden, so dass davon auszugehen ist, dass das komplette Signal unterdrückt wurde. Die Analysen ergaben somit eine erniedrigte Amplitude mit Ca^{2+}-freie Lösung unter kompletter Aufhebung des Signals bei BAPTA-AM und Thapsigargin. Dies zeigt die Abhängigkeit des Signals von intrazellulären Speichern. Eine extrazelluläre Komponente des Signals muss angenommen werden, da die Amplitude bei Ca^{2+}-freie Lösung signifikant unterschiedlich war von der Kontrolle.

Um die intrazelluläre Komponente des Ca^{2+}-Signals näher zu charakterisieren, wurden Modulatoren eingesetzt, die wesentliche Schritte zur Entleerung der intrazellulären Speicher hemmen. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 11 (Schritt 2).

Die Signifikanzprüfung mittels ANOVA und anschließenden post hoc-Tests ergab für alle Modulatoren außer Ryanodin (N = 22, $p > .05$) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (2-APB, N = 28: $p < .001$; PP1, N = 42: $p = .003$; U73122: N = 56: $p = .015$; Wortmannin, N = 47: $p < .001$). Das bedeutet: ein Ryanodin-abhängiges Calcium-Signal kann ausgeschlossen werden. In Betracht kommen ein Tyrosinkinase-abhängiger und ein IP3-vermittelter Signalweg.

Da wie oben beschrieben eine extrazelluläre Komponente des Calciumsignals nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden im Folgenden die bereits bekannten dehnungsabhängigen Kanäle untersucht (siehe Tabelle 11, Schritt 3). Hierzu wurden Lanthan und Gadolinium als wirksame Inhibitoren von TRP-Kanälen eingesetzt. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Lanthan und Kontrolle ($N = 34$, $p > .05$) sowie Gadolinium und Kontrolle ($N = 32$, $p > .05$). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese Art der dehnungsabhängigen Kanäle vermutlich keine Rolle spielen.

Eine Übersicht aller eingesetzten Modulatoren hinsichtlich der Stärke des Calciumsignals unmittelbar nach Dehnung ist Abbildung 14 zu entnehmen.

Da die vorherigen Ergebnisse gezeigt haben, dass sowohl eine intrazelluläre als auch eine extrazelluläre Komponente für das Calciumsignal verantwortlich sind und das Signal vollständig abhängig ist von der intrazellulären Komponente, wurde überprüft, ob SOCE (Store Operated Channel Entry) die Befunde erklären kann. Hierzu wurde ein Ca^{2+}-Addback-Versuch durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde Thapsigargin in Ca^{2+}-freier Lösung eingesetzt, um die intrazellulären Speicher komplett zu entleeren. Dies führte zu einer transienten Erhöhung des $[Ca^{2+}]c$ (siehe Abbildung 15, A). In einem zweiten Schritt wurde Calcium wieder zur extrazellulären Lösung zugeführt, was zu einem intrazellulären Anstieg von $[Ca^{2+}]_c$ geführt hat (siehe Abbildung 15, A). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, deutet dies auf einen STIM1/Orai-1-abhängigen Calciumeinstrom hin. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass dieser SOCE-Mechanismus in diesen Zellen prinzipiell aktivierbar ist. Um zu untersuchen, ob dieser Mechanismus auch durch eine mögliche Entleerung der Speicher durch Dehnung gezeigt werden kann, wurde in Ca^{2+}-freier Lösung eine repetitive Dehnung (50%) durchgeführt (siehe Abbildung 15, B). Auch hier wurde in einem zweiten Schritt Calcium zugeführt. Der vermutete Anstieg von $[Ca^{2+}]_c$ konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 15, B).

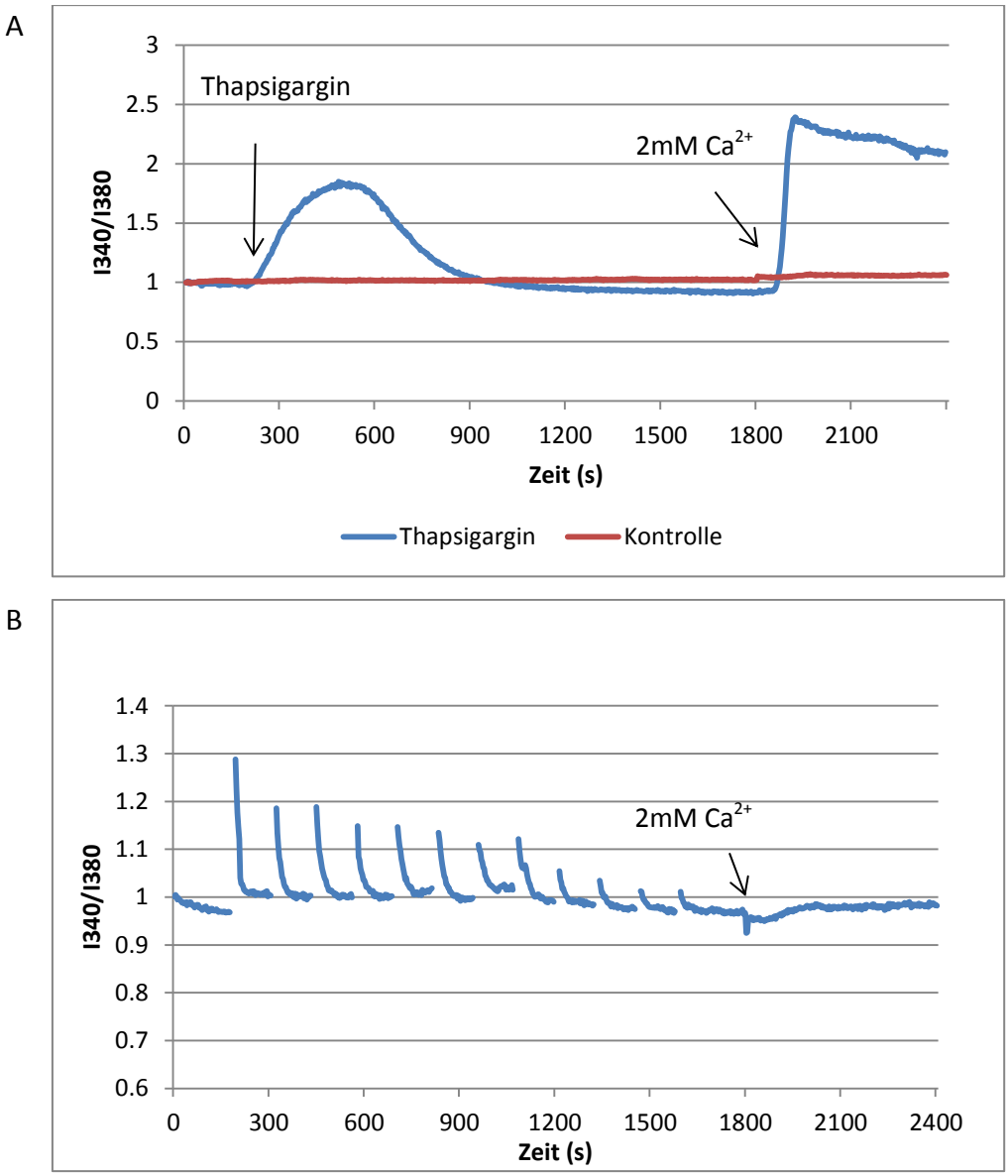


Abb. 15: Darstellung repräsentativer Zeitserienexperimente zum Nachweis von SOCE in Calu-3-Zellen generell (A) und nach Dehnung (B). Zur Entleerung des endoplasmatischen Retikulums wurde Thapsigargin (1µM; A) und eine repetitive Dehnung mit 50% Intensität (B) in calciumfreier Lösung eingesetzt. Nach 1800ms erfolgte jeweils die Zugabe von Calcium (2mM). Unbehandelte Zellen dienten in A als Kontrolle.

Die Ergebnisse zeigen, dass SOCE nicht am Zustandekommen eines dehnungsabhängigen Ca^{2+}-Signals beteiligt ist.

Um den Einfluss der repetitiven Dehnung auf thapsigarginsensititve Calcium-Speicher weiter zu differenzieren, wurde nun in einem ähnlichen Versuchsansatz zu den Calcium-Addback-Versuchen eine repetitive Dehnung in Calcium-freier Badlösung durchgeführt. Statt der Zugabe von Calcium erfolgte der Zusatz von 1 mM Thapsigargin nach Beendigung des Dehnungsmanövers. Es zeigte sich, dass trotz Erschöpfung des

dehnungsabhängigen Calcium-Signals, ein deutlicher Wiederanstieg des Signals mit Thapsigargin erreicht werden konnte (siehe Abbildung 16). In Zusammenschau mit den pharmakologischen Untersuchen lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass es unterschiedliche Thapsigarginsensitive Calcium-Speicher in Calu-3 Zellen gibt. Jene die für das Zustandekommen des SOCE verantwortlich sind, können dabei für das dehnungsabhängige Calcium-Signal ausgeschlossen werden.

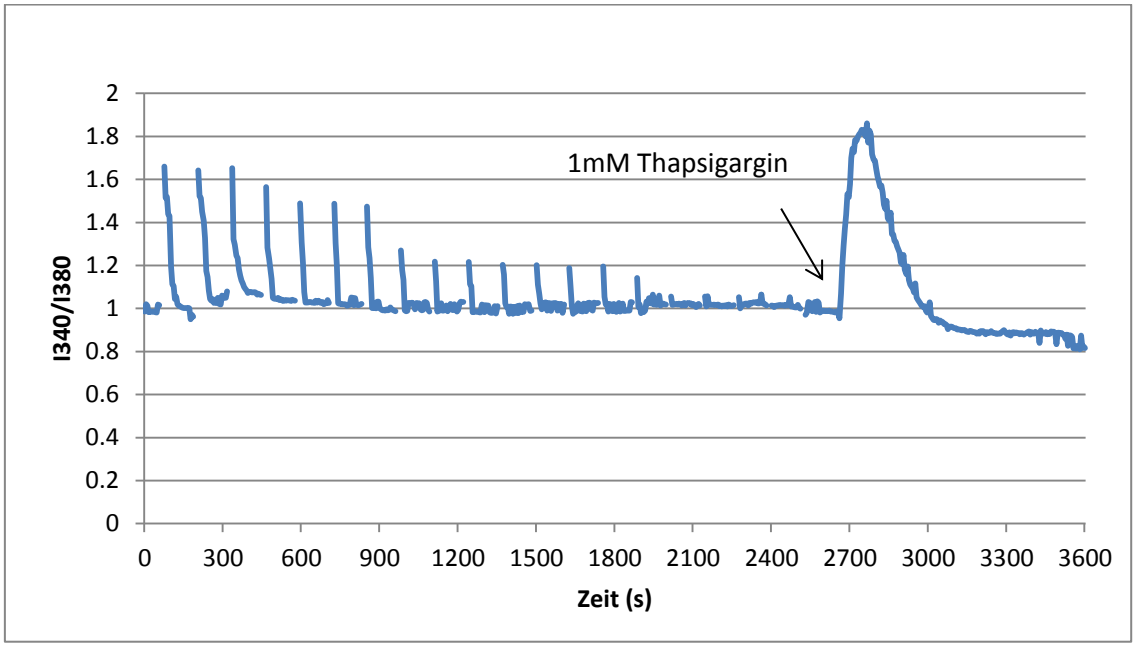


Abb. 16: Exemplarische Darstellung des Fura-2 Signals einer Zelle nach repetitiver Dehnung und Zugabe von Thapsigargin in Calcium-freier Badlösung. Trotz der Erschöpfung des dehnungsabhängigen Calcium-Signals, konnte mit Thapsigargin ein deutlicher Anstieg von $[Ca^{2+}]_c$ erreicht werden

Calu-3-Zellen reagieren auf Zelldehnung mit einem Ca^{2+}-Signal. Das Signal ist abhängig von der Dehnungsamplitude und unterliegt einer Desensitisierung bei repetetiver Dehnung. Die Experimente zeigen, dass für das dehnungsabhängige Ca^{2+}-Signal in Calu-3-Zellen sowohl ein Ca^{2+}-Einstrom, als auch eine Ca^{2+}-Ausstrom aus intrazellulären thapsigarginsensitiven Ca^{2+}-Speichern verantwortlich sind. Eindeutig ausgeschlossen werden konnten TRP-Kanäle, als auch SOCE, der von STIM1/ORAI1-Kanälen vermittelt wird.

4. Diskussion

Mechanische Stimuli beeinflussen Zellsysteme in ihrer Physiologie in vielfältiger Weise. Ein besonders exponiertes Zellsystem stellen dabei epitheliale Lungenzellen dar, die während der Ventilation ständig mechanischen Stimuli, insbesondere Dehnung und Kompression, ausgesetzt sind. Früh wurde dabei Calcium als wesentlicher Vermittler der Mechanotransduktion bei Dehnung identifiziert. Bisherige Studien zur Erforschung der genaueren Mechanismen dehnungsabhängiger Calciumsignalwege hatten dabei den Anspruch, ein Zellsystem zu verwenden, dass humane alveoläre Typ-2-Zellen in vivo möglichst gut in ihrer gesamten Zellphysiologie nachbildet (Dietl et al. 2012; Dobbs et al. 1985; Frick et al. 2004). Diese Arbeit hatte zum Ziel, auf der Basis einer Zelllinie, ein Modell zu etablieren, das die wesentlichen Mechanismen des dehnungsabhängigen Ca2+-Signals der ATII Zellen aufweist.

4.1 Zellscreening und methodische Aspekte

Um eine geeignetes Modell für das dehnungsabhängige Calciumsignal in epithelialen Lungenzellen zu finden, wurden in einem ersten Schritt die gut etablierten Zelllinien A549, NCI-H441, Calu3, NCI-H292 auf ihr dehnungsabhängiges Calcium-Signal hin untersucht. Dazu wurde ein einmaliger Dehnungsimpuls mit 50% Amplitude und einer Geschwindigkeit von 10%/s auf die zu untersuchenden Zellen ausgeübt. Bei der ausgeübten Dehnung handelte es sich um eine uniaxiale Dehnung, das heißt, dass der mechanische Stimulus nur entlang einer Raumachse ausgeübt wurde. Andere Studien nutzten biaxiale Verfahren, die die Stärke des Stimulus in der Veränderung der Zelloberfläche maßen. Beide Herangehensweisen sind gut etabliert und eine Vergleichbarkeit der Dehnungsamplituden gegeben (Gerstmair 2008). Eine Übersichtsarbeit zu Dehnungsamplituden in Alveolen in vivo berichtet für eine physiologisch relevante Lungenexpansion von ca. 40–80% der totalen Lungenkapazität, von einer lineare Dehnung der Alveolen um 10 bis 33% (Roan et al. 2011). Der Autor gibt jedoch zu bedenken, dass die Dehnungsamplituden innerhalb der Alveolen stark variieren und auch höhere Werte, insbesondere bei erkrankten Lungen, annehmen könnten. Direkte Verfahren zur Untersuchungen der Dehnungsvariabilität in vivo sind nötig, um diese Frage befriedigend zu klären. Es kann somit nicht abschließend gesagt werden, ob die verwendete Dehnungsamplitude in der vorliegenden Arbeit physiologische beziehungsweise pathologische Relevanz besitzt. Die Stärke des Dehnungsimpulses wurde

letztlich so gewählt, dass es zu keiner Zellschädigung kam, aber dennoch ein möglichst großes Ca^{2+}-Signal induzierte. So wurde der Anteil der auf Dehnung reagierenden Zellen maximiert.

Von den getesteten Zelllinien, konnte nur bei Calu-3 Zellen ein dehnungsinduziertes Calciumsignal beobachtet werden. Calu-3 Zellen wurde bisher primär zur Erforschung von CFTR-CL^--Kanälen eingesetzt. Ihre Eigenschaften ähneln denen bronchialer Epithelzellen (B. Q. Shen et al. 1994; Wu et al. 2001; Zhang et al. 2010). Dementsprechend produzieren Calu-3 Zellen Mucine (Berger et al. 1999). Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit konnte in einer Studie auch für A549 ein dehnungsabhängiges Calcium-Signal identifiziert werden. Die Autoren merken jedoch kritisch, dass in ihrer Arbeit nur etwa 1-1,5% der Zellen durch Dehnung aktiviert werden konnten, unabhängig von der Stärke der Dehnung (Grygorczyk et al. 2013).

4.2 Zellschädigung durch Dehnung

Mechanische Stimuli haben je nach Ausmaß nicht nur physiologische Effekte auf epitheliale Lungenzellen, sondern können auch eine Zellschädigung hervorrufen (Hammerschmidt et al. 2004; Tschumperlin et al. 1998, 2000; Vlahakis et al. 2000). Um auszuschließen, dass die gemessenen Veränderungen von [Ca2+]c nach Dehnung nicht durch eine Schädigung der Zellen hervorgerufen wird, wurde in einem nächsten Validierungsschritt die Zellschädigung nach Dehnung untersucht. Dazu wurde der zellimpermeable Indikator Ethidium-Homodimer-1 eingesetzt, der bei Desintegration der Zellmembran ein Anstieg der Fluoreszenz in der Zelle bewirkt (Tschumperlin et al. 1998). Erst ab einer uniaxialen Dehnung von 60 % konnte eine Zellschädigung nachgewiesen werden. Der Anteil geschädigter Zellen stieg mit Zunahme der Dehnungsamplitude. Zellschädigungsversuche bei primär kultivierten Typ 2-Zellen der Ratte zeigten eine Schädigung ab 30% uniaxialer Dehnung (Gerstmair 2008; Tschumperlin et al. 1998) bei gleicher Dehnungsgeschwindigkeit. Offensichtlich sind primärkultivierte ATII Zellen sensitiver gegenüber der Zelldehnung. In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen mit einem repetitiven Dehnungsprotokoll bei gleicher Amplitude auf ihre Schädigung hin untersucht. Es zeigte sich, dass Repetition gleich hoher Dehnungsamplituden (50%) keine Schädigung bei Calu-3-Zellen hervorruft. Demnach ist die Dehnungsamplitude und nicht die Repetition der Mechanischen Dehnung ausschlaggebend für die Zellschädigung.

4.3 Charakterisierung des Calciumsignals

In einem ersten Schritt wurde die Abhängigkeit des Ca^{2+}-Signals von der Dehnungsamplitude untersucht. Dazu wurde die Amplitude systematisch erhöht (von 0% bis 50% in 10%-Schritten). Es zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Dehnungsstärke und dem Anstieg von $[Ca^{2+}]_c$. Dieses Ergebnis ist gut vereinbar mit vorherigen Studien zum dehnungsabhängigen Calcium-Signal an primär kultivierten Lungenzellen. Auch hier konnte eine „Dosis-Wirkungsbeziehung“ in Bezug auf dem Anstieg von $[Ca^{2+}]_c$ und der Dehnungsamplitude nachgewiesen werden (Fois et al. 2012; Frick et al. 2004). Dieses System könnte als Teil einer graduierten Mechanosensitivität angesehen werden, in der Calcium als wesentlicher Botenstoff fungiert. Zudem wird angenommen, dass diese Art der Antwort ein Hinweis auf den Ursprung des Calciums in der Plasmamembran, im Sinne von dehnungsabhängigen Kanälen, gibt. (Frick et al. 2004) Verschiedene Studien konnten aber auch Hinweise auf andere Mechanismen geben. So sind im Prinzip vier Mechanismen denkbar (siehe Abbildung 2) (Dietl et al. 2012):

1. Calcium-Einstrom über dehnungsabhängige Ionenkanäle
2. Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern über einen rezeptorvermittelten und/oder IP3-abhängigen Weg.
3. Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern (CICR)
4. Speicherabhängiger Einstrom von Calcium (SOCE)

Fois et al. konnten dabei auch Hinweise auf eine Beteiligung des zytoskelettalen Systems und Adhäsionspunkten (Fokaladhäsionen) am Zustandekommen des Calciumsignals (Fois et al. 2012) sammeln. Vermutlich werden mechanische Stimuli über das Zytoskelett weitergeleitet, um an anderer Stelle in der Zelle ein Calcium-Signal auszulösen. Dieses Modell lässt im Prinzip auch auf ein komplexes System vieler Mechanismen der Calcium-Freisetzung schließen, die schlussendlich in einem „Dosis-Wirkungs-Prinzip“ mit Calcium als zentralen Botenstoff münden (Tensegrity Modell, Ingber 2003). Basierend auf diesem Modell konnte in dieser Arbeit zudem eine Beteiligung der SRC-Kinase, einer im Zytosol vorliegenden Tyrosinkinase, gezeigt werden. Sie kann durch Integrine aktiviert werden und führt ihrerseits zur Aktivierung von Phospholipase C und letztlich zur IP3-abhängigen Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER (S. M. Thomas et al. 1997). Weitere Studien zur Beteiligung des Zytoskeletts am dehnungsabhängigen Calciumsignal in Calu-3 Zellen sind

notwendig, um diese Frage abschließend zu klären. Dehnungsexperimente mit Zellgiften wie Nocodazol oder Cytochalasin D, die zur Depolymerisierung von Aktin beziehungsweise der Mikrotubuli führen, könnten als Nachweis der Beteiligung dieser Strukturen dienen.

In einem zweiten Schritt wurde die Abhängigkeit des Calcium-Signals einer repetitive Dehnung mit gleichbleibender Amplitude untersucht. Hier zeigte sich ein signifikant negativer Zusammenhang zwischen $[Ca^{2+}]_c$ und der Dehnungshäufigkeit. Zu ähnlichen Ergebnissen konnten auch Grygorczyk und Kollegen bei repetitiver Dehnung von A549-Zellen kommen (Grygorczyk et al. 2013). Auch in vaskulären endothelialen Zellen, die repetitivem Shear Stress ausgesetzt waren, konnte dieses Phänomen gezeigt werden (J. Shen et al. 1992; Wong et al. 1995). Es lässt sich vermuten, dass es hier zu einer partiellen Desensitisierung der Zellen kommt. Die Mechanismen und die physiologische Relevanz sind bisher gänzlich unbekannt. Vermutlich liegt dieser Desensitierung die Erschöpfung intrazellulärer Ca2+ Speicher zugrunde (Wong et al. 1995).

In dieser Arbeit konnte für Calu-3 Zellen gezeigt werden, dass durch Stimulation mit Thapsigargin nach einer erschöpfenden repetitiven Stimulation in Ca^{2+}-freier Lösung ein signifikanter Anstieg der $[Ca^{2+}]_c$ ausgelöst werden konnte. Offensichtlich führt eine erschöpfende Dehnungsstimulation nicht zur vollständigen Entleerung Thapsigargin-sensitiver Ca^{2+}-Speicher. Demgegenüber steht die Beobachtung, dass Thapsigargin das dehnungsabhängige Ca^{2+}-Signal annähernd komplett inhibiert. Thapsigargin-sensitive intrazelluläre Ca^{2+}-Speicher sind damit für das Ca^{2+}-Signal notwendig.

Diese Beobachtung lässt sich auf zweierlei Weise erklären. 1) es werden Thapsigargin-sensitive Speicher nur teilweise durch Dehnung mobilisiert. 2) es liegen mehrere Thapsigargin-sensitive Ca^{2+}-Speicher vor, von denen nur eine Untergruppe spezifisch durch Dehnung aktiviert wird.

Physiologisch könnte die Desensitierung der Zelle als eine Art Schutzmechanismus vor Überstimulierung dienen, auch um zellphysiologisch „passende“ Reaktionen auszulösen. Frick et al. kamen zu dem Schluss dass in alveolären Typ 2-Zellen nicht die Anzahl der Calcium-Peaks die zellphysiologische Antwort (hier Surfactant Sekretion) auslösen, sondern vielmehr das Integral dieser Peaks (Frick et al. 2004). Eine Desensitierung des

mechanisch induzierten Ca^{2+}-Signalweges könnte damit auch ein überschießendes integratives Signal verhindern.

4.4 Untersuchung möglicher Signalwege des Calciumsignals

Die Pharmakologischen Eigenschaften des Ca^{2+}-Signals wurden untersucht. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das dehnungsabhängige Calcium-Signal sowohl eine extra- als auch eine intra-zelluläre Komponente aufweist. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch Frick et al., die das dehnungsabhängige primär kultivierter Zellen der Ratte untersuchten (Frick et al. 2004). Im Gegensatz zu den primär kultivierten Zellen der Ratte, wo ein Calcium-abhängiger Calcium-Einstrom (CICR) nachgewiesen werden konnte, ist bei den Calu-3-Zellen die extrazelluläre Komponente des Calcium-Signals abhängig von der intrazellulären Komponente, da Thapsigargin zu einer vollständigen Signalreduktion führte (Fois et al. 2012; Frick et al. 2004). Der Ryanodin-Rezeptor als Kandidat für dehnungsabhängigen CICR (Fois et al. 2012) konnte in Calu-3 Zellen zudem identifiziert werden.

Bis heute bleibt die Identifizierung dehnungsabhängiger Ca^{2+}-Kanäle herausfordernd. Neben der TRP-Subfamilie, die teils eine sehr heterogene Reaktion auf chemische Inhibitoren zeigen (Ramsey et al. 2006), konnten in letzter Zeit auch einige zuvor als streng Liganden-gesteuerte oder Spannungs-abhängige angesehene Kanäle, als mechanosensitiv identifiziert werden (Arnadottir et al. 2010). Das zeigt, dass es noch weiterer Forschung bedarf geeignete Kandidaten für einen extrazellulären, dehnungsabhängigen Ca2+-Einstrom zu finden. Nichtsdestotrotz geben die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise auf mechanosensitive Kanäle in Calu-3-Zellen, die jedoch streng speicherabhängig sind (Calcium release activated channels). Diese Art der Kanäle ist bisher nicht gut charakterisiert. Es wird angenommen, dass die TRPC und TRPV Subfamilie solche Kanäle darstellen oder wenigstens Teil dieses Mechanismus sein könnten (Ducret et al. 2006). Studien an ATII Zellen zeigten, dass möglicherweise TRPV2 Kanäle als mechanosensitive Ca^{2+}-Kanäle beteiligt sein können (Fois et al. 2012). Diese Möglichkeit kann für Calu-3 Zellen weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Lanthanoide La^{3+} und Gd^{3+} keinen Einfluss auf das Ca^{2+}-Signal zeigten (Gunthorpe et al. 2002; Ramsey et al. 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Thapsigargin das Ca^{2+}-Signal vollständig inhibiert. Durch Thapsigargin kommt es zu einer Entleerung intrazellulärer Ca^{2+}-Speicher durch Hemmung Ca^{2+}-ATPase im ER. Dadurch können diese Ca^{2+}-Speicher anschließend

durch Dehnung nicht mehr aktiviert werden. Demnach sind Thapsigargin-sensitive Ca^{2+}-Speicher an dem Signal beteiligt. Zudem inhibierten Modulatoren des IP3-abhängigen Ca^{2+}-Signalweges den dehnungsinduzierten Anstieg von $[Ca^{2+}]_c$.

Der IP3-abhängige Ca^{2+}-Signalweg ist unter anderem Bestandteil eines kapazitiven Ca^{2+}-Einstroms, der durch Entleerung von Thapsigargin-sensitiven Ca^{2+}-Speichern aktiviert wird, und als store operated calcium entry (SOCE) beschrieben ist (Cahalan 2009). SOCE zeigt Gemeinsamkeiten mit dem hier beobachteten dehnungsabhängigen Ca^{2+}-Signal, wie Thapsigargin-Sensitivität, Sensitivität zu Modulatoren des IP3-abhängigen Signalweges und Sensitivität zu IP3-Rezeptor-Inhibitoren. Der Ca^{2+}-Einstrom wird durch einen heteromeren Ca^{2+}-Kanal vermittelt, der sich aus STIM1 und Orai1 Untereinheiten zusammensetzt. STIM1 registriert die Ca^{2+}-Leerung des ER über seine Ca^{2+}-affine EF-Hand/SAM-Domäne, was zu einer Konformationsänderung von STIM1 führt. Als Folge oligomerisiert STIM1 zu Homodimeren und Tetrameren und wandert in die Nähe der Plasmamembran in sogenannte Punctae-Formationen, wo es Orai1 rekrutiert und als Folge Ca^{2+}-Einstrom ausgelöst wird (Lewis 2007; Liou et al. 2007). Dieser heteromere Ca^{2+}-Kanal ist allerdings La^{3+}- und Gd^{3+}-sensitiv, was im Widerspruch zu dem Ca^{2+} Einstrom in Calu-3 Zellen nach Zelldehnung steht. Studien zur Pharmakologie von SOCE zeigten jedoch, dass Lanthanoide nur in geringeren Konzentrationen als hier eingesetzt einen inhibitorischen Effekt hatten (Broad et al. 1999; Putney 2010; Trebak et al. 2002). Da der dehnungsabhängige Ca^{2+}-Kanal in Calu-3-Zellen bisher und auch in dieser Arbeit nicht identifiziert wurde, lässt sich dessen Pharmakologie nicht vorhersagen. Daher ist die Beobachtung, dass Gd^{3+} und La^{3+} trotz der eingesetzten hohen Konzentrationen zu keiner Inhibition führten, kein abschließendes Kriterium für den Ausschluss von SOCE.

Hingegen wird die Beteiligung eines SOCE am dehnungsabhängigen Ca^{2+}-Signal durch folgende Beobachtungen gestützt: Für 2-APB als IP-3 Rezeptor Inhibitor und Modulator plasmamembranständiger Ca^{2+}-Kanäle und Wortmannin als PI3-Kinase Inhibitor ist neben der Beeinflussung des IP-3 Signalwegs auch eine Inhibition von SOCE in den hier verwendeten Konzentrationen nachgewiesen worden (Balghi et al. 2011; Prakriya et al. 2001). SOCE kann eindeutig in sog. Ca^{2+} Add-back Experimenten nachgewiesen werden. In diesen Experimenten werden in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} die Calciumspeicher entleert. Anschließend lässt sich ein Ca^{2+}-Signal durch Zugabe von Ca^{2+} zur extrazellulären Lösung induzieren. Dieses Experiment gilt als eindeutiger Nachweis für

die Aktivierung des SOCE. Ob SOCE auch durch mechanische Stimuli aktiviert werden kann, ist bisher nicht bekannt. Einige Gruppen konnten Mitglieder der mechanosensitiven TRPC Kanalfamilie identifizieren, die funktionell mit Orai1/STIM1 interagieren (Liao et al. 2008; Yuan et al. 2007). So wäre eine mechanische Aktivierung dieser Kanalfamilie zumindest denkbar. Zudem konnte zuletzt SOCE in Lungenepithelzellen nachgewiesen werden (Balghi et al. 2011; Hou et al. 2011; Usmani et al. 2012). In Calu-3 Zellen konnte SOCE durch Zugabe von Thapsigargin in Ca^{2+} Add-back Experimenten induziert werden, nicht aber durch eine erschöpfende repetitive Dehnung. Dies schließt eindeutig SOCE als grundlegenden Mechanismus für das dehnungsabhängige Ca^{2+}-Signal in diesen Zellen aus. Widersprüchlich erscheinen die hierin gezeigten Beobachtungen bezüglich des Einflusses von Thapsigargin auf das Ca^{2+}-Signal. Zum einen führte die Inkubation von Thapsigargin zu einer vollständigen Blockierung des dehnungsinduzierten Signals, was als Hinweis gewertet werden muss, dass Thapsigargin-sensitive intrazelluläre Ca^{2+}-Speicher essentiell für das Ca^{2+}-Signal sind. Andererseits lässt sich nach erschöpfender repetitiver Dehnung durch Zugabe von Thapsigargin ein Ca^{2+}-Ausstrom aus intrazellulären Speichern aktivieren. Erklärbar sind diese Beobachtungen mit einem Mechanismus, der von unterschiedlichen Thapsigargin-sensitiven Ca^{2+}-Speichern ausgeht. Zum einen von solchen, die für die Aktivierung des SOCE verantwortlich sind. Diese Speicher werden durch Dehnung nicht beeinflusst. Der andere Speichertyp ist ein Thapsigargin-sensitiver Ca^{2+}-Speicher, der mittels IP3 aktiviert werden kann, aber einen SOCE-unabhängigen Ca^{2+}-Einstrom aktiviert. Diese Ca^{2+}-Speicher werden durch Dehnung aktiviert. Neben dem endoplasmatischen Retikulum sind vor allem Mitochondrien, der Golgi-Apparat, Lysosomen und der Nukleus als weitere Calcium-Speicher in der Zelle bekannt (Bootman et al. 2009) und als potentielle Kandidaten des dehnungsabhängigen Calcium-Signals in Calu-3 Zellen in Zukunft näher zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Einleitung: Alveoläre Typ-2-Zellen synthetisieren und sekretieren dehnungsabhängig ein Gemisch oberflächenaktiver Substanzen, das Surfactant, wodurch die mechanischen Eigenschaften der Lunge eingestellt werden. Als Stimulus der Surfactant-Exozytose konnte ein Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration identifiziert werden, die durch chemische Stimuli und mechanische Reize induzierbar ist.

Fragestellung: In dieser Studie sollte ein neues lungenspezifisches Zellmodell entwickelt werden, welches mehr Möglichkeiten zu molekulartechnischen Untersuchungen bietet. Es wurde angestrebt, erste Hinweise auf die genaueren Calciumsignalwege bei Dehnung der Zellen zu erlangen.

Material und Methoden: Hierzu wurden vier verschiedene humane zelllinien-basierte Modelle herangezogen, die eine detaillierte Identifikation mechanosensitiver Kanäle in Epithelzellen der Lunge ermöglichen sollten.

Ergebnisse: Nur in den untersuchten Calu-3-Zellen (kurz für: Cultured Human Airway Epithelial Cells) konnte ein dehnungsabhängiges Calciumsignal ausgelöst werden. Die Ergebnisse ergaben, dass ab einer Dehnung von 60% der Ausgangslage eine Schädigung der Zellmembran der bis dahin vitalen Zellen einsetzte. Eine Charakterisierung des detektierten Calciumsignals bei Calu-3-Zellen ergab einen deutlichen und signifikant positiven Zusammenhang zwischen Calciumsignal und Dehnungsamplitude. Die repetitive Dehnung der Zellen ergab, dass sich mit zunehmender Anzahl der Dehnungen eine Erniedrigung des Anstiegs der cytoplasmatischen Calciumkonzentration zeigte. Durch repetitive Dehnungen ließen sich Thapsigargin-sensitive Calcium-Speicher nicht erschöpfend entleeren. Dennoch ließ sich das Calciumsignal auf einen Calcium-Einstrom zurückführen, der von der Mobilisierung intrazellulärer Thapsigargin-sensitiver Calcium-Speicher abhängig war.

Diskussion: Die Komponente des Signals, die durch den Calcium-Einstrom vermittelt wurde, konnte nicht auf einen klassischen Stim1/Orai1 vermittelten kapazitativen Calcium-Einstrom (auch Store operated Channel Entry = SOCE) zurückgeführt werden. Offensichtlich wird nur ein Teil der Thapsigargin-sensitiven Calcium-Speicher in Calu-3-Zellen durch Dehnung mobilisiert, der nicht zur Aktivierung des klassischen SOCE beitragen kann. Weitere Untersuchungen müssen klären, um welche Speicher es sich dabei handelt.

6. Literaturverzeichnis

1. Albrecht S, Usmani SM, Dietl P, Wittekindt OH: Plasma Membrane Trafficking in Alveolar Type II Cells Cell Physiol Biochem 25: 81–90 (2010)

2. Arnadottir J, Chalfie M: Eukaryotic Mechanosensitive Channels Annu Rev Biophys 39: 111–37 (2010)

3. Baker S, Matthews I: Lucas-Kanade 20 Years on: A Unifying Framework Int J Comput Vis 56: 221–55 (2004)

4. Balghi H, Robert R, Rappaz B, Zhang X, Wohlhuter-Haddad A, Evagelidis A, Luo Y, Goepp J, Ferraro P, Roméo P, Trebak M, Wiseman PW, Thomas DY, Hanrahan JW: Enhanced Ca2+ Entry Due to Orai1 Plasma Membrane Insertion Increases IL-8 Secretion by Cystic Fibrosis Airways FASEB J 25: 4274–91 (2011)

5. Balis JU, Bumgarner SD, Paciga JE, Paterson JF, Shelley SA: Synthesis of Lung Surfactant-Associated Glycoproteins by A549 Cells: Description of an in Vitro Model for Human Type II Cell Dysfunction Exp Lung Res 6: 197–213 (1984)

6. Barkauskas CE, Cronce MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp DR, Randell SH, Noble PW, Hogan BLM: Type 2 Alveolar Cells Are Stem Cells in Adult Lung J Clin Invest 123: 3025–36 (2013)

7. Berger J, Voynow JA, Peters KW, Rose MC: Respiratory Carcinoma Cell Lines. MUC Genes and Glycoconjugates Am J Respir Cell Mol Biol 20: 500–510 (1999)

8. Bertocchi C, Ravasio A, Bernet S, Putz G, Dietl P, Haller T: Optical Measurement of Surface Tension in a Miniaturized Air-Liquid Interface and Its Application in Lung Physiology Biophys J 89: 1353–61 (2005)

9. Bootman M, Fearnley C: An Update on Nuclear Calcium Signalling J Cell … 122: 2337–50 http://jcs.biologists.org/content/122/14/2337.short (January 28, 2014). (2009)

10. Broad LM, Cannon TR, Taylor CW: A Non-Capacitative Pathway Activated by Arachidonic Acid Is the Major Ca ¥ Entry Mechanism in Rat A7r5 Smooth Muscle Cells Stimulated with Low Concentrations of Vasopressin 517: 121–34 (1999)

11. Cahalan MD: STIMulating Store-Operated Ca(2+) Entry Nat Cell Biol 11: 669–77 (2009)

12. Clements JA: Lung Surfactant: A Personal Perspective Annu Rev Physiol 59: 1–21 (1997)

13. Clements JA, Avery ME: Lung Surfactant and Neonatal Respiratory Distress Syndrome Am J Respir Crit Care Med 157: 559–66 (1998)

14. Dallas SL, Chen Q, Sivakumar P: Dynamics of Assembly and Reorganization of Extracellular Matrix Proteins Curr Top Dev Biol 75: 1–24 (2006)

15. Dietl P, Frick M, Mair N, Bertocchi C, Haller T: Pulmonary Consequences of a Deep Breath Revisited Biol Neonate 85: 299–304 (2004)

16. Dietl P, Haller T: Exocytosis of Lung Surfactant: From the Secretory Vesicle to the Air-Liquid Interface Annu Rev Physiol 67: 595–621 (2005)

17. Dietl P, Haller T, Frick M: Spatio-Temporal Aspects, Pathways and Actions of Ca(2+) in Surfactant Secreting Pulmonary Alveolar Type II Pneumocytes Cell Calcium 52: 296–302 (2012)

18. Dobbs LG, Williams MC, Brandt AE: Changes in Biochemical Characteristics and Pattern of Lectin Binding of Alveolar Type II Cells with Time in Culture Biochim Biophys Acta 846: 155–66 (1985)

19. Ducret T, Vandebrouck C, Cao M, Lebacq J, Gailly P: Functional Role of Store-Operated and Stretch-Activated Channels in Murine Adult Skeletal Muscle Fibres J Physiol 575: 913–24 (2006)

20. Edwards YS: Stretch Stimulation: Its Effects on Alveolar Type II Cell Function in the Lung Comp Biochem Physiol Part A 129: 245–60 (2001)

21. Engle WA: Surfactant-Replacement Therapy for Respiratory Distress in the Preterm and Term Neonate Pediatrics 121: 419–32 (2008)

22. Felder E, Siebenbrunner M, Busch T, Fois G, Miklavc P, Walther P, Dietl P: Mechanical Strain of Alveolar Type II Cells in Culture: Changes in the Transcellular Cytokeratin Network and Adaptations Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol 295: 849–57 (2008)

23. Fois G, Wittekindt O, Zheng X, Felder ET, Miklavc P, Frick M, Dietl P, Felder E: An Ultra Fast Detection Method Reveals Strain-Induced Ca(2+) Entry via TRPV2 in Alveolar Type II Cells Biomech Model Mechanobiol 11: 959–71 (2012)

24. Frick M, Bertocchi C, Jennings P, Haller T, Mair N, Singer W, Pfaller W, Ritsch-Marte M, Dietl P: Ca2+ Entry Is Essential for Cell Strain-Induced Lamellar Body Fusion in Isolated Rat Type II Pneumocytes Am J Physiol 286: 210–20 (2004)

25. Gerstmair A: A New Tool for Live Cell Imaging During Uni-Axial Stretch or Compression and Its Application on Single Pneumocytes. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin. Universität Ulm (2008)

26. Gerstmair A, Fois G, Innerbichler S, Dietl P, Felder E: A Device for Simultaneous Live Cell Imaging During Uni-Axial Mechanical Strain or Compression J Appl Physiol 107: 613–20 (2009)

27. Grygorczyk R, Furuya K, Sokabe M: Imaging and Characterization of Stretch-Induced ATP Release from Alveolar A549 Cells J Physiol 591: 1195–1215 (2013)

28. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY: A New Generation of Ca2+ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties J Biol Chem 260: 3440–50 (1985)

29. Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB: The Diversity in the Vanilloid (TRPV) Receptor Family of Ion Channels 23: 183–91 (2002)

30. Haller T, Auktor K, Frick M, Mair N, Dietl P: Threshold Calcium Levels for Lamellar Body Exocytosis in Type II Pneumocytes Pneumocytes Am J Physiol 277: 893–900 (1999)

31. Haller T, Ortmayr J, Friedrich F, Völkl H, Dietl P: Dynamics of Surfactant Release in Alveolar Type II Cells Proc Natl Acad Sci U S A 95: 1579–84 (1998)

32. Haller T, Pfaller K, Dietl P: The Conception of Fusion Pores as Rate-Limiting Structures for Surfactant Secretion Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 129: 227–31 (2001)

33. Hammerschmidt S, Kuhn H, Grasenack T, Gessner C, Wirtz H: Apoptosis and Necrosis Induced by Cyclic Mechanical Stretching in Alveolar Type II Cells Am J Respir Cell Mol Biol 30: 396–402 (2004)

34. Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M: Actin Stress Fibers Transmit and Focus Force to Activate Mechanosensitive Channels J Cell Sci 121: 496–503 (2008)

35. Hou M-F, Kuo H-C, Li J-H, Wang Y-S, Chang C-C, Chen K-C, Chen W-C, Chiu C-C, Yang S, Chang W-C: Orai1/CRACM1 Overexpression Suppresses Cell Proliferation via Attenuation of the Store-Operated Calcium Influx-Mediated Signalling Pathway in A549 Lung Cancer Cells Biochim Biophys Acta 1810: 1278–84 (2011)

36. Huang H, Kamm RD, Lee RT: Cell Mechanics and Mechanotransduction: Pathways, Probes, and Physiology Am J Physiol Cell Physiol 287: 1–11 (2004)

37. Ingber DE: Tensegrity II. How Structural Networks Influence Cellular Information Processing Networks J Cell Sci 116: 1397–1408 (2003)

38. Ingber DE: Cellular Mechanotransduction: Putting All the Pieces Together Again FASEB J 20: 811–27 (2006)

39. Komori K, Murai K, Miyajima S, Fujii T, Mohri S, Ono Y, Sakai Y: Development of an in Vitro Batch-Type Closed Gas Exposure Device with an Alveolar Epithelial Cell Line, A549, for Toxicity Evaluations of Gaseous Compounds Anal Sci 24: 957–62 (2008)

40. Lewis RS: The Molecular Choreographiy of a Store-Operated Calcium Channel 446: 23–25 (2007)

41. Li K: The Image Stabilizer Plugin for ImageJ http://www.cs.cmu.edu/~kangli/code/Image_Stabilizer.html (2008)

42. Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, Flockerzi V, Zhu MX, Armstrong DL, Birnbaumer L: STIM1 Suggest a STIM-Regulated Heteromeric Orai / TRPC Model for SOCE / Icrac Channels 105: 2895–2900 (2008)

43. Liou J, Fivaz M, Inoue T, Meyer T: Live-Cell Imaging Reveals Sequential Oligomerization and Local Plasma Membrane Targeting of Stromal Interaction Molecule 1 after Ca2+ Store Depletion. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 9301–6 (2007)

44. Lucas BD, Kanade T: An Iterative Image Registration Technique with an Application to Stereo Vision. In Proc. 7th Int. Jt. Conf. Artif. Intell. (IJCAI '81) : 674–79 (1981)

45. Mason RJ, Williams MC: Phospholipid Composition and Ultrastructure of A549 Cells and Other Cultured Pulmonary Epithelial Cells of Presumed Type II Cell Origin Biochim Biophys Acta 617: 36–50 (1980)

46. Mathias NR, Timoszyk J, Stetsko PI, Megill JR, Smith RL, Wall DA: Permeability Characteristics of Calu-3 Human Bronchial Epithelial Cells: In Vitro-in Vivo Correlation to Predict Lung Absorption in Rats J Drug Target 10: 31–40 (2002)

47. Miklavc P, Albrecht S, Wittekindt O: Existence of Exocytotic Hemifusion Intermediates with a Lifetime of up to Seconds in Type II Pneumocytes Biochem J 424: 7–14 (2009)

48. Miklavc P, Mair N, Wittekindt OH, Haller T, Dietl P, Felder E, Timmler M, Frick M: Fusion-Activated Ca2+ Entry via Vesicular P2X4 Receptors Promotes Fusion Pore Opening and Exocytotic Content Release in Pneumocytes Proc Natl Acad Sci U S A 108: 14503–8 (2011)

49. Nardone LL, Andrews SB: Cell Line A549 as a Model of the Type II Pneumocyte. Phospholipid Biosynthesis from Native and Organometallic Precursors Biochim Biophys Acta 573: 276–95 (1979)

50. O'Reilly MA, Weaver TE, Pilot-Matias TJ, Sarin VK, Gazdar AF, Whitsett JA: In Vitro Translation, Post-Translational Processing and Secretion of Pulmonary Surfactant Protein B Precursors Biochim Biophys Acta 1011: 140–48 (1989)

51. Ochs M: The Closer We Look the More We See? Quantitative Microscopic Analysis of the Pulmonary Surfactant System Cell Physiol Biochem 25: 27–40 (2009)

52. Pantazi D, Kitsiouli E, Karkabounas A, Trangas T, Nakos G, Lekka ME: Dipalmitoyl-Phosphatidylcholine Biosynthesis Is Induced by Non-Injurious Mechanical Stretch in a Model of Alveolar Type II Cells Lipids 48: 827–38 (2013)

53. Pian MS, Dobbs LG, Duzgunes N: Positive Correlation Between Cytosolic Free Calcium and Surfactant Secretidn in Cultured Rat Alveolar Type II Cells Biochim Biophys Acta 960: 43–53 (1988)

54. Prakriya M, Lewis RS: Potentiation and Inhibition of Ca(2+) Release-Activated Ca(2+) Channels by 2-Aminoethyldiphenyl Borate (2-APB) Occurs Independently of IP(3) Receptors J Physiol 536: 3–19 (2001)

55. Putney JW: Pharmacology of Store-Operated Calcium Channels 10: 209–18 (2010)

56. Qiao R, Yan W, Clavijo C, Mehrian-Shai R, Zhong Q, Kim K-J, Ann D, Crandall ED, Borok Z: Effects of KGF on Alveolar Epithelial Cell Transdifferentiation Are Mediated by JNK Signaling Am J Respir Cell Mol Biol 38: 239–46 (2008)

57. Ramesh Babu PB, Chidekel A, Utidjian L, Shaffer TH: Regulation of Apical Surface Fluid and Protein Secretion in Human Airway Epithelial Cell Line Calu-3 Biochem Biophys Res Commun 319: 1132–37 (2004)

58. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE: An Introduction to TRP Channels 68: 619–47 (2006)

59. Ramsingh R, Grygorczyk A, Solecki A, Cherkaoui LS, Berthiaume Y, Grygorczyk R: Cell Deformation at the Air-Liquid Interface Induces Ca2+-Dependent ATP Release from Lung Epithelial Cells Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol 300: 587–95 (2011)

60. Rasband W: ImageJ - Image Processing and Analysis in Java http://rsb.info.nic.gov/ij/iindex.html (2008)

61. Ravasio A, Hobi N, Bertocchi C, Jesacher A, Dietl P, Haller T: Interfacial Sensing by Alveolar Type II Cells: a New Concept in Lung Physiology? Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol 300: 1456–65 (2011)

62. Reilly MAO, Gazdar AF, Morxi RE, Whitsett JA: Differential Effects of Glucocorticoid on Expression of Surfactant Proteins in a Human Lung Adenocarcinoma Cell Line Biochim Biophys Acta 970: 194–204 (1988)

63. Roan E, Waters CM: What Do We Know About Mechanical Strain in Lung Alveoli? Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol 301: 625–35 (2011)

64. Rock JR, Barkauskas CE, Cronce MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, Noble PW, Hogan BLM: Multiple Stromal Populations Contribute to Pulmonary Fibrosis Without Evidence for Epithelial to Mesenchymal Transition Proc Natl Acad Sci U S A 108: 1475–83 (2011)

65. Roe MW, Lemasters JJ, Herman B: Assessment of Fura-2 for Measurements of Cytosolic Free Calcium Cell Calcium 11: 63–73 (1990)

66. Rudolf R, Mongillo M, Rizzuto R, Pozzan T: Looking Forward to Seeing Calcium Nat Rev Mol Cell Biol 4: 579–86 (2003)

67. Schünke M, Schulte E, Schumacher U: Prometheus - LernAtlas Anatomie. Hals Und Innere Organe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG (2005)

68. Shan J, Liao J, Huang J, Robert R, Palmer ML, Fahrenkrug SC, O'Grady SM, Hanrahan JW: Bicarbonate-Dependent Chloride Transport Drives Fluid Secretion by the Human Airway Epithelial Cell Line Calu-3 J Physiol 590: 5273–97 (2012)

69. Shapiro DL, Nardone LL, Rooney SA, Motoyama EK, Munoz JL: Phospholipid Biosynthesis and Secretion by a Cell Line (A549) Which Resembles Type II Alveolar Epithelial Cells Biochim Biophys Acta 530: 197–207 (1978)

70. Shen BQ, Finkbeiner WE, Wine JJ, Mrsny RJ, Widdicombe JH: Calu-3: a Human Airway Epithelial Cell Line That Shows cAMP-Dependent Cl- Secretion Am J Physiol 266: 493–501 (1994)

71. Shen J, Connolly A, Luscinskas FW, Dewey CF, Gimbrone Jr MA: Fluid Shear Stress Modulates Cytosolic Free Calcium in Vascular Endothelial Cells 262: 384–90 (1992)

72. Thomas RA, Norman JC, Huynh TT, Williams B, Bolton SJ, Wardlaw AJ: Mechanical Stretch Has Contrasting Effects on Mediator Release from Bronchial Epithelial Cells, with a Rho-Kinase-Dependent Component to the Mechanotransduction Pathway Respir Med 100: 1588–97 (2006)

73. Thomas SM, Brugge JS: Cellular Functions Regulated by Src Family Kinases Annu Rev Cell Dev Biol 13: 513–609 (1997)

74. Trebak M, Bird GSJ, Richard R, Putney JW, Mckay RR: Comparison of Human TRPC3 Channels in Receptor-Activated and Store-Operated Modes 277: 21617–23 (2002)

75. Tschumperlin DJ, Margulies SS: Equibiaxial Deformation-Induced Injury of Alveolar Epithelial Cells in Vitro Am J Physiol 275: 1173–83 (1998)

76. Tschumperlin DJ, Oswari J, Margulies AS: Deformation-Induced Injury of Alveolar Epithelial Cells. Effect of Frequency, Duration, and Amplitude Am J Respir Crit Care Med 162: 357–62 (2000)

77. 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 Cell Microbiol 14: 299–315 (2012)

78. Vlahakis NE, Hubmayr RD: Invited Review: Plasma Membrane Stress Failure in Alveolar Epithelial Cells J Appl Physiol 89: 2490–97 (2000)

79. Wispé JR, Clark JC, Warner BB, Fajardo D, Hull WE, Holtzman RB, Whitsett JA: Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibits Expression of Pulmonary Surfactant Protein. J Clin Invest 86: 1954–60 (1990)

80. Wong AYK, Klassen GA: A Model of Electrical Activity and Cytosolic Calcium Dynamics in Vascular Endothelial Cells in Response to Fluid Shear Stress 23: 822–32 (1995)

81. Wu JV, Joo NS, Krouse ME, Wine JJ: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gating Requires Cytosolic Electrolytes J Biol Chem 276: 6473–78 (2001)

82. Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S: STIM1 Heteromultimerizes TRPC Channels to Determine Their Function as Store-Operated Channels 9: 636–45 (2007)

83. Zhang WK, Wang D, Duan Y, Loy MMT, Chan HC, Huang P: Mechanosensitive Gating of CFTR Nat Cell Biol 12: 507–12 (2010)

Anhang

Anhang A: Übersicht Dehnungsprofile

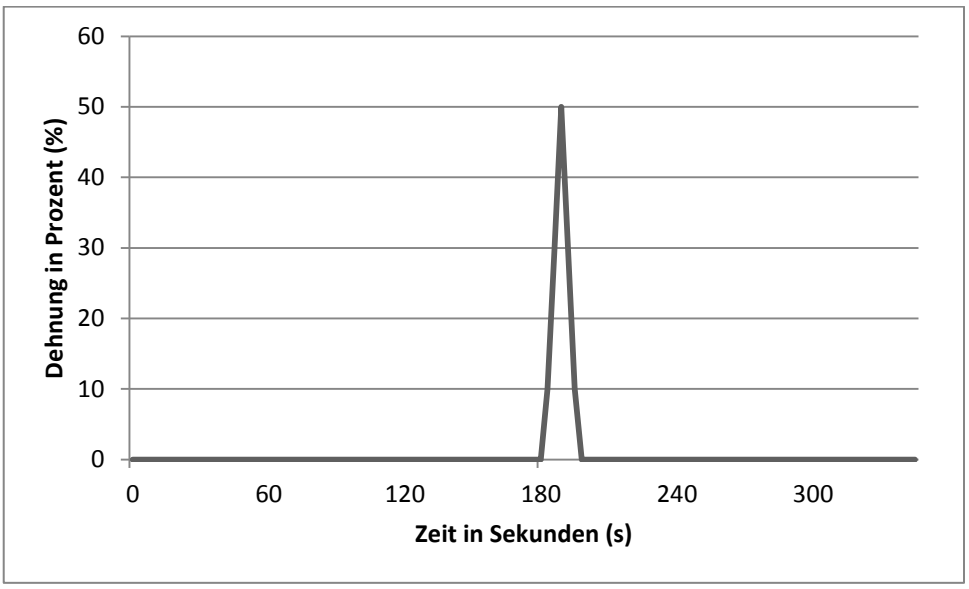


Abb. 17: Dehnungsprofil Zellscreening und Herkunftsnachweis des Ca^{2+}-Signals

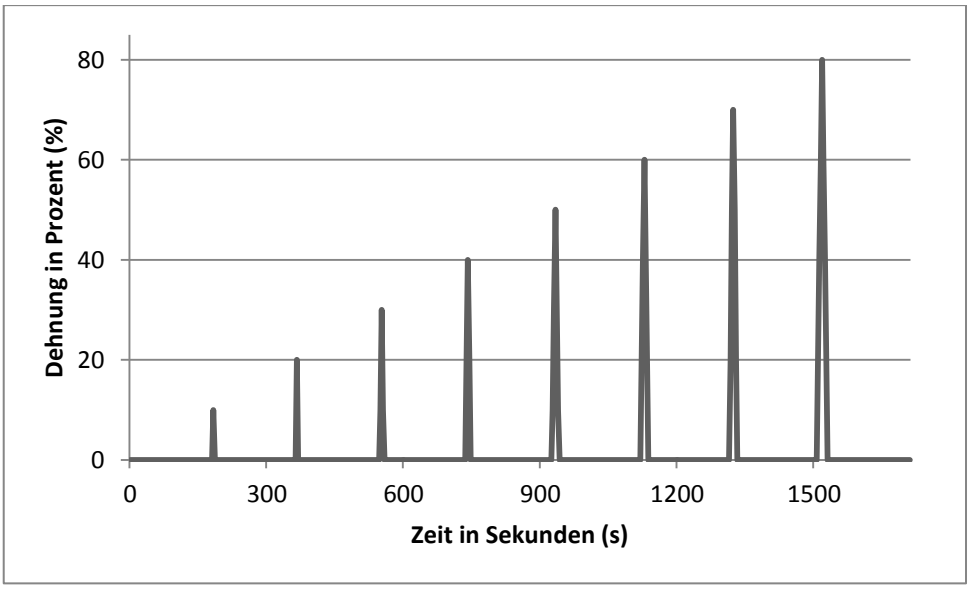


Abb. 18: Dehnungsprofil A Zellschädigung

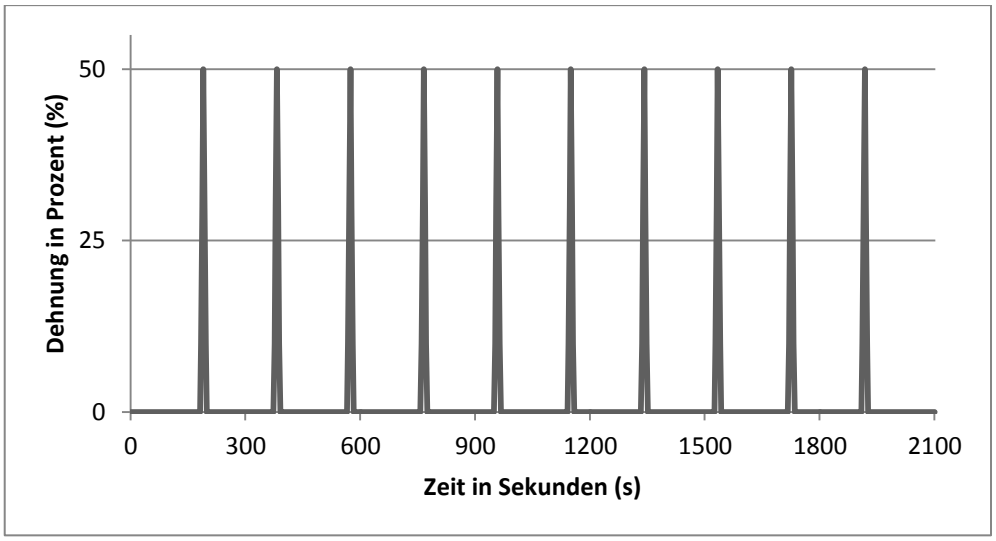


Abb. 19: Dehnungsprofil B Zellschädigung

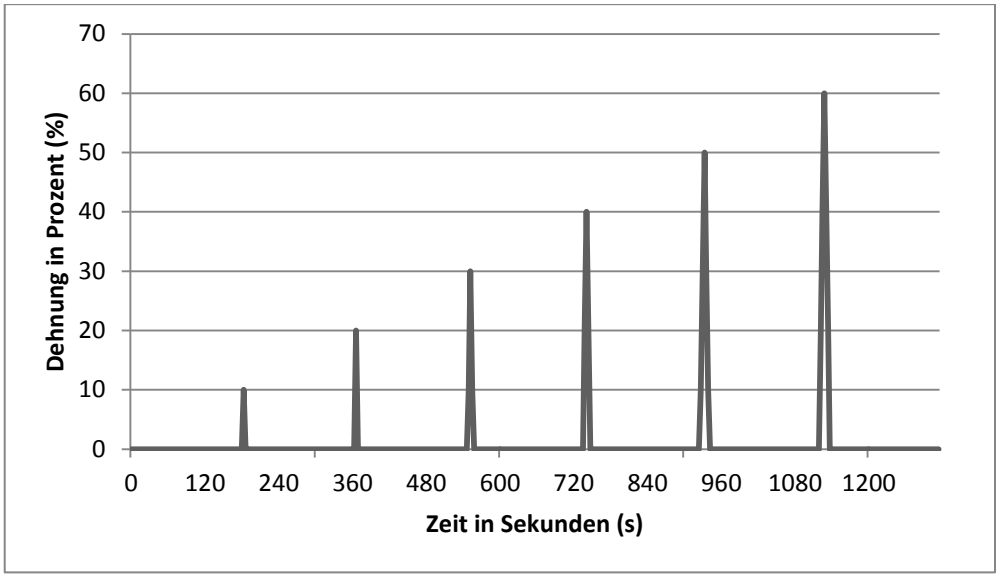


Abb. 20: Dehnungsprofil zum Nachweis Amplitudenabhängigkeit des Ca^{2+}-Signals

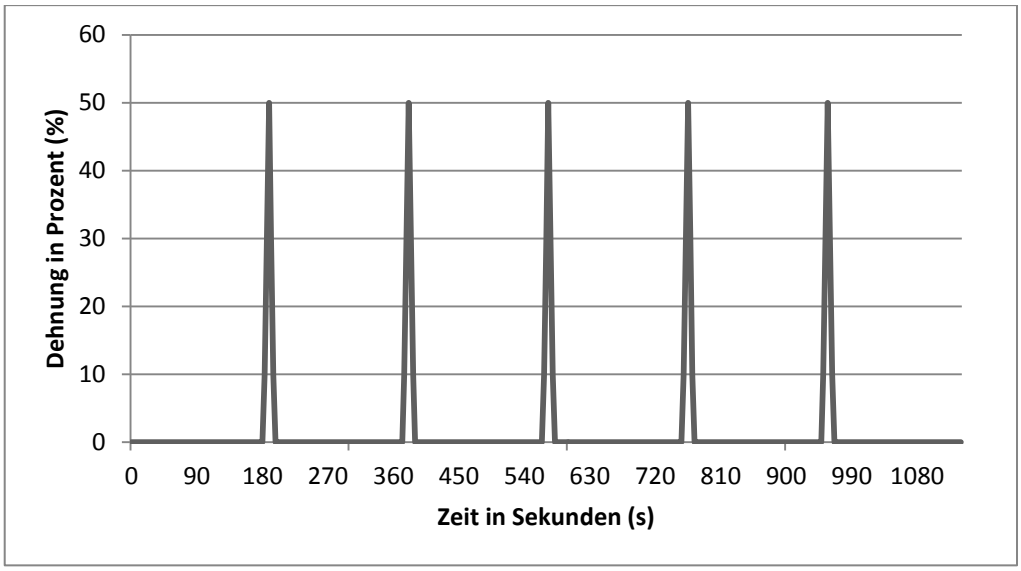


Abb. 21: Dehnungsprofil zum Nachweis des Ca^{2+}-Signals bei einer repetitiven Sequenz

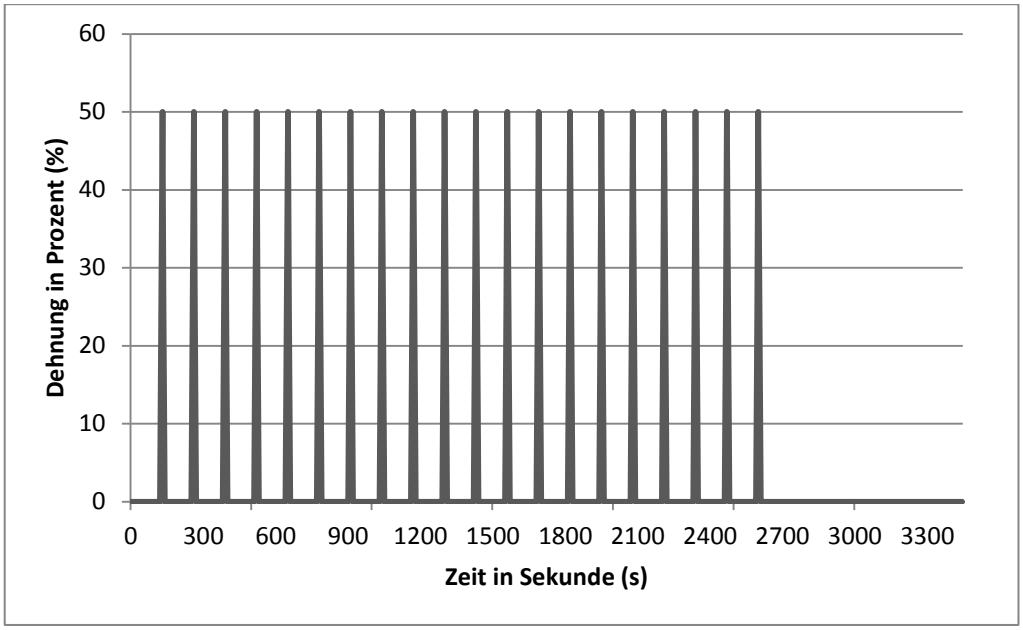


Abb. 22 : Dehnungsprofil der Ca^{2+}-Addback-Experimente

Danksagung

Die Erstellung dieser Arbeit und die Mitarbeit am Institut für Allgemeine Physiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Paul Dietl war für mich eine prägende und wichtige Erfahrung. Für den Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten, die freundliche Aufnahme am Institut und die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung meiner Studien möchte ich mich bei Prof. Dr. Dietl ausdrücklich bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt jedoch Dr. Oliver Wittekindt, der mich während der gesamten Dissertation begleitet hat. Ohne seine kompetente und freundliche Unterstützung wäre die Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Auf diesem Wege danke ich auch der gesamten Abteilung für die freundliche und stützende Atmosphäre im Labor. Der fachliche und menschliche Austausch und die gegenseitige Unterstützung waren für mich eine tolle Erfahrung.

Dem Dekanat der Medizinischen Fakultät der Uni Ulm danke ich für die Bereitstellung eines Promotionsstipendiums. Außerdem bedanke ich mich bei den anderen Promotionsstipendiaten sowie Prof. Barth und Prof. Wirth für die wichtigen Anregungen und Diskussionen.

Ganz zum Schluss möchte ich meinen Freunden und meiner Familie für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung danken.

Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.