

Aus der Medizinischen Klinik-Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Kalzium-Signaling in trachealen Muskelzellen von T-bet KO- (Asthma-) und Wildtyp-Mäusen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Juliane Günther

aus

Stollberg/Erzg.

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. R.M. Huber
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Griese Prof. Dr. med. A. Wollenberg
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. A. Bergner
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	29.10.2009

Inhalt

Inhalt.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1 Einleitung und Fragestellung	11
1.1 Einleitung	11
1.2 Fragestellung.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.2 Kultivierung der murinen trachealen glatten Muskelzellen	20
2.2.1 Grundlagen zu den Mauslinien	20
2.2.1.1 BALB/c	20
2.2.1.2 T-bet KO	20
2.2.2 Gewinnung der Zellen für die Primärkultur	21
2.2.3 Kulturbedingungen.....	21
2.3 Auszählung des Anteils glatter Muskelzellen in der Kultur	22
2.3.1 Grundlagen zum Aktin	22
2.3.2 Antikörperfärbung.....	24
2.4 Färbung mit Oregon Green.....	25
2.5 Aufzeichnung der Messungen	25
2.6 Methodik der Untersuchungen zur Kalziumhomöostase.....	26
2.6.1 Untersuchung des Acetylcholin-induzierten Kalzium-Signalings	26
2.6.1.1 Grundlagen zu Acetylcholin und Acetylcholinrezeptor.....	26
2.6.1.2 Anwendung von Acetylcholin.....	27
2.6.2 Anwendung von Acetylcholin in kalziumfreiem Medium.....	27
2.6.3 Messungen spontaner Fluoreszenzänderungen in EDTA-Lösung	28
2.6.4 Untersuchung der Beteiligung von IP ₃ -Rezeptoren	28
2.6.4.1 Grundlagen zum IP ₃ -Rezeptor.....	28
2.6.4.2 Grundlagen zum Xestospongine	29
2.6.4.3 Anwendung von Xestospongine D	29

2.6.5	Untersuchung der Beteiligung von Ryanodinerezeptoren.....	30
2.6.5.1	Grundlagen zum Ryanodinerezeptor.....	30
2.6.5.2	Grundlagen zum Ryanodine.....	30
2.6.5.3	Anwendung von Ryanodine.....	30
2.6.6	Untersuchung des Kalziumgehaltes des SR.....	31
2.6.6.1	Grundlagen zum Caffeine.....	31
2.6.6.2	Anwendung von Caffeine.....	31
2.6.6.3	Grundlagen zur SERCA.....	31
2.6.6.4	Grundlagen zum CPA.....	32
2.6.6.5	Anwendung von CPA.....	33
2.6.6.6	Grundlagen zu Thapsigargin.....	33
2.6.6.7	Anwendung von Thapsigargin.....	34
2.7	Auswertung der Bilddateien.....	34
2.8	Ermitteln der Daten für die statistische Auswertung.....	40
2.9	Statistische Auswertung.....	42
2.10	Darstellung der Graphen.....	42
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Auszählung des Anteils glatter Muskelzellen in der Kultur.....	43
3.2	Acetylcholin-induziertes Kalzium-Signaling.....	43
3.2.1	Allgemeines.....	43
3.2.2	Initialer Transient.....	44
3.2.3	Anstiegsgeschwindigkeit des initialen Transienten.....	45
3.2.4	Abfallsgeschwindigkeit des initialen Transienten.....	46
3.2.5	Oszillationen.....	47
3.3	Acetylcholin-induziertes Kalzium-Signaling in kalziumfreiem Medium.....	49
3.4	Spontanes Kalzium-Signaling in kalziumfreiem Medium.....	50
3.4.1	Allgemeines.....	50
3.4.2	Maximale Fluoreszenzänderung.....	51
3.4.3	Anstiegsgeschwindigkeit der maximalen Fluoreszenzänderung.....	52
3.4.4	Abfallsgeschwindigkeit der maximalen Fluoreszenzänderung.....	53
3.4.5	Häufigkeit der Fluoreszenzänderungen.....	54
3.5	Acetylcholin-induziertes versus spontanes Kalzium-Signaling.....	56

3.5.1	Initialer Transient versus maximale Fluoreszenzänderung	56
3.5.1.1	BALB/c	56
3.5.1.2	T-bet KO	56
3.5.2	Anstiegsrate	57
3.5.2.1	BALB/c	57
3.5.2.2	T-bet KO	57
3.5.3	Abfallsrate	59
3.5.4	Anzahl der Oszillationen und Fluoreszenzänderungen	61
3.6	Beteiligung von IP₃-Rezeptoren	65
3.7	Beteiligung von Ryanodinerezeptoren	67
3.8	Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums	69
3.8.1	Untersuchung mit Caffeine	69
3.8.2	Untersuchung mit CPA	69
3.8.3	Untersuchung mit Thapsigargin	69
3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	71
4	Diskussion.....	73
4.1	Diskussion der Materialien und Methoden.....	73
4.1.1	Monolayer-Zellkultur, Gewinnung und Kultivierung	73
4.1.2	Primärkultur aus trachealen glatten Muskelzellen	76
4.1.3	Die T-bet KO-Maus als Asthmamodell	78
4.1.4	Färbung der Zellen und Mikroskopie.....	80
4.1.5	Ermittlung der Messwerte	84
4.2	Diskussion der Ergebnisse	86
4.2.1	Acetylcholin-induziertes Kalzium-Signaling.....	86
4.2.1.1	Allgemeines.....	86
4.2.1.2	Kalziumsignale.....	87
4.2.2	Acetylcholin-induziertes Kalzium-Signaling in kalziumfreiem Medium.....	90
4.2.3	Spontanes Kalzium-Signaling in kalziumfreiem Medium	91
4.2.3.1	Allgemeines.....	91
4.2.3.2	Kalziumsignale.....	92
4.2.4	Beteiligung von IP ₃ -Rezeptoren.....	95

4.2.5	Beteiligung von Ryanodinerezeptoren	96
4.2.6	Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums.....	97
5	Zusammenfassung, Schlußfolgerung, Ausblick	101
	Literaturverzeichnis.....	105
	Anhang.....	111
	Danksagung.....	119
	Lebenslauf	121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Kalziumhomöostase einer glatten Atemwegsmuskelzelle
Abbildung 2	Glatte tracheale Muskelzellen einer BALB/c-Maus
Abbildung 3	Oberfläche zur Auswertung der Fluoreszenzänderung in Matlab
Abbildung 4	Darstellung eines Graphen mit Matlab
Abbildung 5a	Intensitätsverläufe der Kontrollzellen BALB/c
Abbildung 5b	Intensitätsverläufe der Kontrollzellen T-bet KO
Abbildung 6a	Korrigierte Intensitätsverläufe BALB/c
Abbildung 6b	Korrigierte Intensitätsverläufe T-bet KO
Abbildung 7	Verlauf einer Reaktionskurve nach ACh-Zugabe
Abbildung 8	Durch Acetylcholin induzierter Kalziumtransient
Abbildung 9	Anstiegsrate ACh-induzierter Kalziumtransient
Abbildung 10	Abfallsrate ACh-induzierter Kalziumtransient
Abbildung 11	Häufigkeit der Oszillationen nach ACh-Zugabe
Abbildung 12	Prozentsatz der oszillierenden Zellen nach ACh-Zugabe
Abbildung 13	Verlauf einer Reaktionskurve nach ACh-Zugabe in kalziumfreiem Medium
Abbildung 14	Verlauf einer Fluoreszenzänderung nach Zugabe von EDTA-Lösung
Abbildung 15	Maximale Fluoreszenzänderung in EDTA-Lösung
Abbildung 16	Anstiegsrate der maximalen Fluoreszenzänderung in EDTA-Lösung
Abbildung 17	Abfallsrate der maximalen Fluoreszenzänderung in EDTA-Lösung
Abbildung 18	Häufigkeit der Fluoreszenzänderungen in EDTA-Lösung
Abbildung 19	Prozentsatz der Zellen mit mehreren Fluoreszenzänderungen in EDTA-Lösung
Abbildung 20	Vergleich initialer Transient/max. Fluoreszenzänderung bei T-bet KO
Abbildung 21	Vergleich der Anstiegsgeschwindigkeiten ACh-Zugabe/in EDTA-Lösung bei T-bet KO
Abbildung 22a	Vergleich der Abfallsgeschwindigkeiten ACh-Zugabe/in EDTA-Lösung bei BALB/c
Abbildung 22b	Vergleich der Abfallsgeschwindigkeiten ACh-Zugabe/in EDTA-Lösung bei T-bet KO
Abbildung 23a	Vergleich der Anzahl der Oszillationen/Fluoreszenzänderungen bei BALB/c

Abbildung 23b	Vergleich der Anzahl der Oszillationen/Fluoreszenzänderungen bei T-bet KO
Abbildung 24a	Vergleich des Prozentsatzes der oszillierenden Zellen bei BALB/c
Abbildung 24b	Vergleich des Prozentsatzes der oszillierenden Zellen bei T-bet KO
Abbildung 25a	Acetylcholin-induzierter Kalziumtransient mit/ohne 10 μ M Xestospongin D
Abbildung 25b	Acetylcholin-induzierter Kalziumtransient mit/ohne 50 μ M Xestospongin D
Abbildung 25c	Acetylcholin-induzierter Kalziumtransient mit/ohne Xestospongin D
Abbildung 26	Acetylcholin-induzierter Kalziumtransient mit/ohne 1 mM Ryanodine
Abbildung 27	Area under the Curve nach Zugabe von 10 μ M Thapsigargin

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholinrezeptor
AM	Acetoxymethylester
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosine Triphosphate
AUC	Area Under the Curve
BALB/c	Bagg's albino
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate
CICR	Calcium Induced Calcium Release
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPA	Cyclopiazonic Acid
DAG	Diacylglycerol
DBHQ	2,5,-di(t-butyl) hydroquinone
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Fluoreszenzwerte
F/F ₀	Fluoreszenzratio
F ₀	initialer Fluoreszenzwert
FBS	Fetal Bovine Serum
Fl	Fluoreszenzlampe
g	Zentrifugalbeschleunigung
GA	Gentamicin, Amphotericin B
GINA	Global Initiative for Asthma

HAL	Halogenlampe
HBSS	Hanks´ Balanced Salt Solution
hEGF	human Epidermal Growth Factor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
hFGF	human Fibroblast Growth Factor
IFN- γ	Interferon Gamma
IgE	Immunglobulin E
IICR	Inositol Induced Calcium Release
Il	Interleukin
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphat
IP ₃ R	Inositol 1,4,5-trisphosphatrezeptor
Mg ²⁺	Magnesium
ml	Milliliter
mM	Millimolar
n	Anzahl
NCS	Newborn Calf Serum
nm	Nanometer
nma	non muscle actin
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
roi	region of interest
rpmi	rounds per minute
RyR	Ryanodinrezeptor
sec	Sekunde
SERCA	Sarkoplasmatisches Retikulum Kalzium ATPase
sHBSS	supplemented HBSS with 25 mM HEPES
sma	smooth muscle actin
SmBM	Smooth Muscle Basal Medium
SmGM-2	SmBM mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Supplementen
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T-bet KO	T-bet knock out
Th	T-Helfer
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor Alpha
U	Unit
YFP	Yellow Fluorescent Protein

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

„Asthma ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, die durch eine bronchiale Hyperreagibilität und eine variable Atemwegsobstruktion charakterisiert ist.“ So lautet die Definition des Asthma bronchiale der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie in der „Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma“ (Buhl R, et al. 2006). Weltweit sind von Asthma knapp 300 Millionen Menschen betroffen (WHO 2002, GINA 2004). In Westeuropa wird dessen Prävalenz mit 5,9% angegeben. Es wird geschätzt, dass einer von 250 Todesfällen dem Asthma bronchiale zuzuschreiben ist. Viele dieser Todesfälle wären vermeidbar (GINA 2004). Kombiniert man Informationen über Morbidität und Mortalität und drückt diese in der Anzahl der Jahre aus, die man an gesundem Leben verliert, errechneten sich für das Jahr 2002 15 Millionen gesunde Lebensjahre, die weltweit wegen des Asthma bronchiale verloren gingen. Damit steht Asthma auf einer Ebene mit Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Schizophrenie (WHO 2002, Masoli M, et al. 2004). Vor allem bei Kindern ist in den letzten Jahren eine steigende Prävalenz zu verzeichnen gewesen (Eder W, et al. 2006). Sie stieg in den Vereinigten Staaten zwischen 1980 und 2003 von 3,6% auf 5,8%. Asthma ist die dritthäufigste Ursache einer Krankenhauseinweisung in den USA bei unter 18jährigen (NCHS 2007). Es wird als die häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter angegeben (WHO 2006). Im Vereinigten Königreich hat eines von sieben Kindern behandlungsbedürftige Symptome des Asthma bronchiale (ERS 2003).

Doch die Behandlung ist nicht optimal (Rabe KF, et al. 2000, Rabe KF, et al. 2004). In den Richtlinien der GINA (Global Initiative for Asthma) wurden Ziele für die Langzeitbehandlung von Asthma definiert. Diese beinhalten unter anderem das Erreichen und Beibehalten der Symptomkontrolle, keine Einschränkungen bei täglichen Aktivitäten, das Verhindern von Exazerbationen der Krankheit, die Lungenfunktion auf möglichst normalem Niveau zu halten oder möglichst geringe Nebenwirkungen der Medikamente zu erzielen (GINA 2007). Studien zufolge werden diese Ziele bisher kaum erreicht (Rabe KF, et al. 2000, Rabe KF, et al. 2004). Zwar ist die Mortalität in Deutschland gesunken, was vor allem der inhalativen Kortikosteroidtherapie zuzuschreiben ist (Suissa S, Ernst P 2001), jedoch werden Symptomkontrolle, uneingeschränkte Aktivität oder das Vermeiden von Exazerbationen in vielen Fällen welt- und europaweit nicht erreicht (Rabe KF, et al. 2000, Rabe KF, et al. 2004). Natürlich gibt es viele Gründe, warum den Zielen weltweit Grenzen gesetzt sind. Das beginnt

bei der in vielen Ländern vorherrschenden Armut, der Luftverschmutzung, dem Defizit an Informationen über die Erkrankung und deren Folgen und endet bei dem Fehlen von krankheitsbasierten statt symptomorientierten Ansätzen zur Asthmatherapie (Masoli M, et al. 2004). Durch inadäquate Therapie entstehen den Gesundheitssystemen zudem Kosten, die durch bessere Krankheitskontrolle erheblich gesenkt werden könnten (Schramm B, et al. 2003, Masoli M, et al. 2004). Deswegen gibt es vielfältige Ansätze, der Belastung durch Asthma entgegenzuwirken. Einer davon ist laut GINA die Forschung und damit das tiefgreifende Verständnis der Erkrankung als Beitrag zur Entwicklung neuer Therapie- und Interventionsstrategien (Masoli M, et al. 2004). Aus diesem Bestreben ist die hier vorliegende Arbeit entstanden.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen allergischem und nicht-allergischem Asthma, wobei sich das allergische Asthma durch eine genetisch bedingte Bereitschaft auszeichnet, IgE Antikörper gegen Umweltallergene zu produzieren. Beim nicht-allergischem Asthma findet sich diese Bereitschaft nicht. Es tritt oftmals infektgetriggert oder auch als Analgetikaasthma nach Einnahme von ASS oder NSAR auf. Auch Mischformen beider Asthmatypen sind möglich. Zu den Faktoren, die im Allgemeinen einen Einfluss auf Entstehung und Ausprägung der Erkrankung haben, werden in der Literatur unter anderem Umweltfaktoren, d.h. Allergene (Pollen, Schimmelpilze, Hefen, ...), Tabakrauch, Luftverschmutzung oder virale Infektionen der Luftwege und genetische Faktoren gerechnet. Allen Asthmaformen gemein sind Charakteristika auf klinischer, physiologischer und pathologischer Ebene. Da die Pathogenese der Erkrankung noch nicht hinreichend geklärt ist, beschränkt man sich auf die Beschreibung der typischen Merkmale. Hierzu gehören auf klinischer Seite die vom Patienten angegebenen Symptome der anfallsweise auftretenden Atemnot, Husten und Engegefühl in der Brust. Es können ein typischer expiratorischer Stridor in der Auskultation und eine gegebenenfalls durch Provokationstests ermittelte Verminderung von expiratorischem Spitzenfluss und Einsekundenkapazität in der Lungenfunktionsprüfung auftreten. Auf physiologischer und pathologischer Seite finden sich eine episodische Atemwegsobstruktion mit normalerweise reversibler Bronchokonstriktion, eine bronchiale Hyperreagibilität auf inadäquate Stimuli, eine chronische Entzündung mit vermehrter Sekretbildung und Ödem in den Atemwegswänden und letztendlich ein bindegewebiger Umbau der Atemwege durch Kollageneinlagerung unter der Basalmembran und Hypertrophie der glatten Muskelzellen (Buhl R, et al. 2006, GINA 2007).

Die Rolle der glatten Muskelzellen der Luftwege für die Ausprägung von Asthmasymptomen darf nicht unterschätzt werden. Ist ihre Funktion im Gesunden noch weitgehend ungeklärt, so sind sie doch im Krankheitsgeschehen nicht nur für die Kontraktion und damit für die Regulation des Durchmessers der Bronchien verantwortlich, sie sezernieren auch selbst proinflammatorische Zytokine und Chemokine, die eine Entzündung der Luftwege, wie sie beim Asthma vorkommt, aufrechterhalten. Außerdem nimmt ihre Masse im Verlauf dieser Erkrankung zu, was wiederum zur Verdickung der Wände der Luftwege führt. Als einer der Mechanismen der Hyperreagibilität ist ihre Kontraktilität oftmals gesteigert (Amrani Y, Panettieri RA 2003). Asthmasymptome besserten sich außerdem, nachdem mittels bronchialer Thermoplastie die Muskelzellmasse der glatten Luftwegsmuskulatur verringert wurde (Cox G, et al. 2007). Es ist die Bedeutung dieser glatten Atemwegsmuskelzellen, die ein besseres Verständnis der Vorgänge in ihnen notwendig macht, um dort eines Tages gezielt und weniger invasiv therapeutisch ansetzen zu können.

Kalzium spielt eine entscheidende Rolle für die Kontraktion von Muskelzellen. Wenn Kalzium in einer glatten Muskelzelle ausgeschüttet wird und eine bestimmte Konzentration übersteigt, bildet es mit Calmodulin einen Komplex. Dieser aktiviert verschiedene Proteinkinasen, unter anderem die Myosinleichtkettenkinase, welche am Myosinkopf Phosphorylierungen vornimmt. Aktin wird durch Anbinden des Kalzium-Calmodulin-Komplexes an Caldesmon und andere Phosphorylierungen für die Kontraktion verfügbar gemacht, indem auf diese Weise die Bindungsstellen für den Myosinkopf freigegeben werden. Der Myosinkopf legt sich daraufhin an das Aktinfilament, dreht sich und eine Kraft entsteht. Dadurch wird das Aktinfilament in das Myosinfilament gezogen. Dieser Vorgang wiederholt sich mehrfach. Durch eine Verbindung der Aktinfilamente mit dem Sarkolemm verkürzt sich die Muskelzelle. Zum Lösen des Myosinkopfes vom Aktin wird ein ATP verbraucht. Wenn das Kalzium in der Zelle wieder absinkt, vermindert sich die Aktivität der Proteinkinasen und die Proteine werden wieder dephosphoryliert. Die Kontraktion kommt zum Stillstand (Jiang H, Stephens NL 1994, Klinke R, Bauer C 2003).

Auch bei der glatten Atemwegsmuskulatur korreliert die Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration mit dem Einsetzen sowie der Aufrechterhaltung der Kontraktion. Diesen Nachweis erbrachten Versuchsreihen mit Agonisten wie ATP oder Acetylcholin, welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde (Bergner A, Sanderson MJ 2002a, Bergner A, Sanderson MJ 2002b).

In den letzten Jahren wurde auf dieser Grundlage wiederholt die Frage nach einer Beteiligung der Kalziumhomöostase von glatten Atemwegsmuskelzellen für die Pathogenese des Asthma bronchiale gestellt (Amrani Y, Panettieri RA, Jr. 2002, Parameswaran K, et al. 2002, Amrani Y, et al. 2004).

Betrachtet man die Kalziumhomöostase in glatten Atemwegsmuskelzellen findet man prinzipiell drei Mechanismen, die die zytosolische Konzentration regulieren. Einer beinhaltet das Ein- und Ausströmen von Kalzium von und nach außerhalb der Zelle, ein anderer umfasst die Regulation der Speicher, wie Mitochondrien und Sarkoplasmatisches Retikulum (SR), im Zellinneren und ein letzter besteht in der Pufferung von Kalziumionen durch zytoplasmatische Bindungsproteine (Hirota S, et al. 2007).

Zumeist ist es ein Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration, der Veränderungen in der Zelle in Gang setzt. Hauptquelle dafür ist vermutlich das Sarkoplasmatische Retikulum als zellinterner Kalziumspeicher. Um Kalzium aus dem SR zu mobilisieren, gibt es vielfältige Mechanismen und Agonisten. Die beiden kalziumentlassenden Kanäle des SR, die bisher am tiefgründigsten untersucht wurden, sind der Inositol 1,4,5-trisphosphatrezeptor (IP_3R) und der Ryanodinerezeptor (RyR). Ersterer wird durch Inositol 1,4,5-trisphosphat und zahlreiche Kofaktoren reguliert, letzterer primär durch steigendes zytosolisches Kalzium selbst. Um Kalzium aus dem Zytosol wieder zurück in den Speicher zu bringen, besitzt das SR energieabhängige Pumpen, Sarkoplasmatisches Retikulum Kalzium ATPasen (SERCA), die unter ATP-Verbrauch Kalzium zurück ins SR pumpen (Berridge MJ, et al. 2000). Zum besseren Verständnis ist in Abbildung 1 ein vereinfachtes Modell der Kalziumhomöostase einer glatten Muskelzelle mit dem SR und den genannten Kanälen dargestellt.

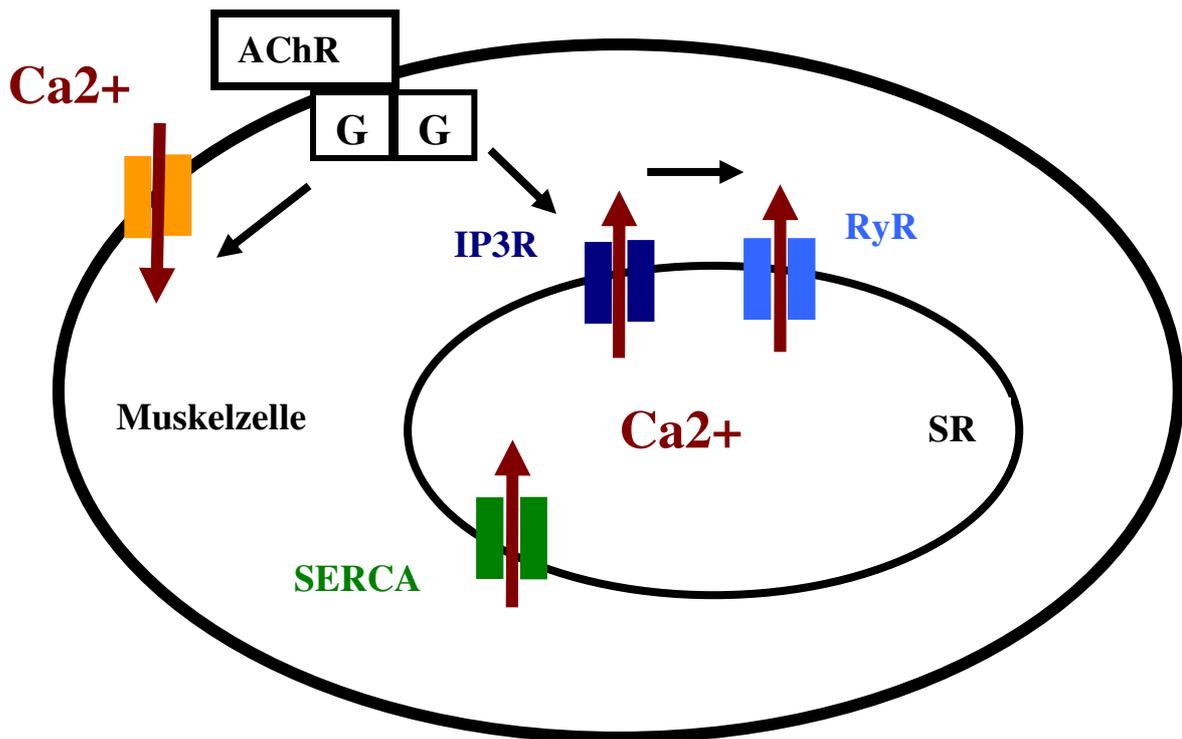


Abbildung 1 zeigt ein vereinfachtes Modell der Kalziumhomöostase in einer glatten Atemwegsmuskelzelle. Beispielsweise bindet Acetylcholin (ACh) an den G-Proteingekoppelten Acetylcholinrezeptor (AChR). Es kommt eine Signaltransduktionskaskade in Gang, die in dem Einstrom von Kalzium (Ca^{2+}) von außen und in dem Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP_3) abhängigen Austritt (über den dazugehörigen Rezeptor, IP_3R) aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in die Zelle endet. Durch den Kalziumanstieg in der Zelle wird auch der Ryanodinerezeptor (RyR) geöffnet und entlässt Kalzium aus dem SR. Die Sarkoplasmatische Retikulum Kalzium ATPase (SERCA) pumpt danach Kalzium wieder in das SR, um es aufzufüllen und Kalzium aus dem Zytosol zu beseitigen.

Die beschriebenen Mechanismen sind natürlich um einiges komplizierter. Verschiedenste Stoffe, Kofaktoren und das Milieu in und in der Umgebung der Zelle beeinflussen die Homöostase (Bootman MD, et al. 2002). So ist es ersichtlich, dass die Zelle auch im Krankheitsfall von vielen Faktoren umgeben wird, die in die Homöostase eingreifen. Beispielsweise können Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ (Amrani Y, et al. 1997) oder Interleukin (IL) 13 und 4 (Madison JM, Ethier MF 2001, Deshpande DA, et al. 2004), die uns aus der Pathogenese des Asthma bekannt sind (Larche M, et al. 2003), Kalziumsignale modulieren. Tatsächlich konnte bei hyperreagiblen Ratten eine Korrelation zwischen bronchialer Hyperreagibilität und gesteigerter Kalziummobilisation gefunden werden (Tao FC, et al. 1999).

Bei Lungenschnitten von T-bet knock out-Mäusen (T-bet KO), die als Tiermodell Hauptmerkmale des Asthma bronchiale, wie bronchiale Hyperreagibilität, einen Umbau der Luftwege, einen Anstieg inflammatorischer Zellen und proinflammatorischer Zytokine in der Bronchoalveolären Lavage, aufweisen (Finotto S, et al. 2002), wurden veränderte Kalziumsignale nach Acetylcholinzugabe gefunden. Dies drückte sich im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beispielsweise in einem erhöhten Grundtonus der glatten Atemwegsmuskelzellen aus, der mit spontanen Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration korreliert war oder in vermehrter bronchialer Hyperreagibilität, die mit höheren durch Acetylcholin induzierten Kalziumtransienten in Zusammenhang stand. Außerdem zeigte das Sarkoplasmatische Retikulum bei diesen Untersuchungen einen höheren Kalziumgehalt bei T-bet KO-Lungenschnitten (Bergner A, et al. 2006b).

Welche Mechanismen aber der veränderten Kalziumhomöostase in den Lungenschnitten der Asthmamodelltiere zugrunde liegen, konnte nicht genau geklärt werden.

Um einen Teil dieser Frage zu beantworten, sollen in der hier vorliegenden Arbeit glatte Muskelzellen der Trachea von T-bet KO-Mäusen und die von Wildtyp- (Rasse: BALB/c) Mäusen untersucht werden. Statt Lungenschnitten wurden hier kultivierte Muskelzellen der Trachea genutzt. Die Zellkultur als konventionelle Kulturmethode wurde verwendet, um Muskelzellen auch proteinbiochemischen Verfahren zur Untersuchung eventueller Veränderungen in Kalziumkanälen, -transportern oder anderen mit der Homöostase in Zusammenhang stehenden Zellbestandteilen zugänglich zu machen.

1.2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, das Acetylcholin-induzierte Kalzium-Signaling in trachealen glatten Muskelzellen von T-bet KO- im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu untersuchen. Der Kalziumgehalt des SR zwischen beiden Maustypen sollte verglichen werden und die Teilhabe von Ryanodine-, IP₃-Rezeptoren und SERCA am Kalzium-Signaling untersucht werden. Der Einfluss des externen Kalziums, des Kalziums außerhalb der Zelle, wurde ebenso, wenn auch nur am Rande, betrachtet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Chemikalien/Flüssigkeiten

- Acetylcholin-Chlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Caffeine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Collagenase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA)
- CPA, Cyclopiazonic Acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- DAB Peroxidase Substrat Kit (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA)
- destilliertes Wasser, Aqua ad iniectabilia Braun (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- DMSO, Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Dulbecco´s PBS, Phosphate Buffered Saline (PAA Laboratories GmbH, Unterm Bornrain, Deutschland)
- EDTA-Lösung, Ethylendiamintetraessigsäure, 0,02% in DPBS (0,5 mM) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Hämalaun (Apotheke Innenstadt Uni München, München, Deutschland)
- HBSS, Hanks´ Balanced Salt Solution (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- HEPES, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, (Invitrogen GIBCO[®], cell culture systems, Carlsbad, USA)
- Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Maus anti- α -sma, anti-alpha-smooth-muscle-Actin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Methanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- NCS, Newborn Calf Serum, (PAA Laboratories GmbH, Unterm Bornrain, Deutschland)
- Oregon Green[®] 488 BAPTA-1, AM (Acetoxymethylester), (BAPTA entspricht 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) (Invitrogen Molecular Probes[®], Eugene, USA)
- Pentobarbital (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Pluronic (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Rattencollagen (Cell Concepts GmbH, Umkirch, Deutschland)
- Ryanodine (biomol, Hamburg, Deutschland)
- SmGM-2, Smooth Muscle Basal Medium mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Supplementen, (Cambrex Corporation, East Rutherford, USA)
- Thapsigargin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

- Trypsin-EDTA, 0,5 mg/ml Trypsin, 0,22 mg/ml EDTA in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺, (PAA Laboratories GmbH, Unterm Bornrain, Deutschland)
- Vecta Stain Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA)
- Wasserstoffperoxid (Otto Fischer GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland)
- Xestospongin D (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Xylol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Geräte

- digitale CCD Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss Vision, München, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M, Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Inkubator (Heraeus[®] HERAcell[®], Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland)
- Laminar Flow (Heraeus[®] HERAsafe[®], Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland)
- Schüttelinkubator (Certomat[®]H, Braun Biotech, Melsungen, Deutschland)
- Vortexer, Vortex-Genie[®] 2 (Scientific Industries Inc., Bohemia, USA)
- Zentrifuge groß (Sepatech Omnifuge, Heraeus[®], München, Deutschland)
- Zentrifuge klein (5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Tiere

- Maus BALB/c (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland)
- Maus T-bet KO (Charles River Breeding Labs, Needham, USA)

Software

- Microsoft[®] Excel 2002 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)
- Matlab (The MathWorks, Inc, Natick, USA)
- Scion Image for Windows Version Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA)
- SigmaPlot 2000 for Windows Version 6.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA)
- SigmaStat für Windows Version 2.03 (Jandel Scientific, Chicago, USA)
- Visual C++ 2005 Express (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

sonstige Materialien

- Eppendorf-Cup (Eppendorf Reaktionsgefäße, Hamburg, Deutschland)
- Kanüle (BD, Bradford, USA)
- Kulturflaschen 25 cm², 75 cm² (BD Falcon, Bedford, USA)
- Neubauer Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm, Brand, Wertheim, Deutschland)
- Objektträger (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Germany)
- Petrischalen (BD Falcon, Bedford, USA)
- Mikropipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen für Mikropipetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Pipetten (BD Falcon, Bedford, USA)
- Pipetus[®] (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland)
- Skalpell (No. 22 Disposable Scalpel FEATHER[®], Produkte für Medizin AG, Köln, Deutschland)

2.2 Kultivierung der murinen trachealen glatten Muskelzellen

2.2.1 Grundlagen zu den Mauslinien

2.2.1.1 BALB/c

Es handelt sich um eine Mauslinie, die erstmals 1913 von H. Bagg gezüchtet wurde. Sie trägt den Namen Balb abgeleitet von „Bagg albino“. Später wurde das „c“ für albino nochmals extra hinzugefügt. Es ist eine in Laboratorien häufig anzutreffende Gattung, die sich für vielfältige Versuchsanordnungen verwenden lässt (Harlan 2007).

2.2.1.2 T-bet KO

T-bet („T-box expressed in T cells“) ist ein Th1 (Th bedeutet T-Helfer) spezifischer Transkriptionsfaktor, welcher eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Th1-Zellen spielt. Er fördert die Produktion von $\text{IFN}\gamma$, des Kennzeichenzytokins für Th1. Zusätzlich hat er die Fähigkeit ausgereifte Th2-Zellen in Th1-Zellen umzuwandeln, was mit verstärkter $\text{IFN}\gamma$ -Produktion und dem Beenden von Il-4- (Kennzeichenzytokin für Th2) und Il-5-Produktion einhergeht. Einfach gesprochen programmiert er sozusagen die Th2-Zellen um und weist die naiven Th-Zellen in Richtung Th1 (Szabo SJ, et al. 2000).

In der Pathogenese des Asthma bronchiale spielen die Th2 spezifischen Zytokine wie Il-4, Il-5 oder Il-13 eine große Rolle. Sie führen unter anderem zur IgE-Synthese, sowie zur Reifung und Aktivierung von Mastzellen und zur Akkumulation eosinophiler Granulozyten (Larche M, et al. 2003). Beispielsweise kann Il-13 in kultivierten murinen Trachealringen eine verstärkte Kontraktion auf Carbachol herbeiführen und das Kalziumsignal in einer menschlichen glatten Muskelzelle der Luftwege erhöhen (Tliba O, et al. 2003).

Wie schon beschrieben, ist T-bet einer der Transkriptionsfaktoren, der den Weg der T-Helfer-Zellen in Richtung Th1 weist. Nun stellte sich die Frage, ob die Expression von T-bet in Lungengewebe bei Patienten mit Asthma bronchiale verändert ist. Finotto und Kollegen stellten fest, dass T-bet in einer Personengruppe mit Asthma, im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe, vermindert exprimiert wird. Daraufhin wurden T-bet knock out-Mäuse (T-bet KO) auf das Vorhandensein von asthmatypischen Veränderungen untersucht. Der Verlust des T-bet resultierte in bronchialer Hyperreagibilität, dem Umbau der Luftwege, was sich in einer verdickten glatten Muskelzellschicht und vermehrter Kollageneinlagerung unter der Basalmembran zeigte, dem Anstieg inflammatorischer Zellen und dem Vorhandensein von proinflammatorischen Zytokinen in der Bronchoalveolären Lavage (Finotto S, et al. 2002).

Aufgrund dieser Eigenschaften werden diese Mäuse nun als in vitro Asthmodell verwendet.

2.2.2 Gewinnung der Zellen für die Primärkultur

Als Versuchstiere wurden Mäuse der Rassen BALB/c und T-bet knock out (T-bet KO) im Alter zwischen 6 und 11 Wochen verwendet. Die Verwendung der Tiere wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt. Sowohl bei den Wildtyp-Mäusen (BALB/c) also auch bei den Asthma-Modell-Mäusen (T-Bet KO) wurde identisch vorgegangen. Zum Töten der Maus wurden 2 ml einer Pentobarbitallösung (60 mg Pentobarbital auf 8 ml 70% Ethanol) ins Abdomen injiziert. Nach Fixation der Maus auf einer Arbeitsplatte und deren Desinfektion mit 70% Isopropanol wurde die Haut am Kinn beginnend bis zur Mitte des Abdomens eröffnet und abpräpariert. Um Reste des zytotoxischen Isopropanols zu entfernen, wurde die Maus mit sHBSS (supplemented Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS mit 25 mM HEPES, pH 7,4) abgespült. Nach Entfernung des Thymus wurde die Trachea in ihrem Verlauf dargestellt und weitestmöglich freipräpariert. Sie wurde in einem Stück entnommen und in sHBSS konserviert. Zur Weiterverarbeitung wurde die Trachea unter der Flow mit Hilfe eines Skalpells von restlichem Bindegewebe und Epithel befreit und in zwei Teilen in 3 mg/ml (720 U/ml) Collagenase für 1 Stunde in je einem Eppendorf-Cup im Schüttelinkubator belassen. Die Reaktion wurde darauffolgend mit NCS (Newborn Calf Serum) gestoppt, die Suspension gut gevortext und die Knorpelspannen mit einer sterilen Kanüle entfernt. Nach 10-minütiger Zentrifugation mit 2000 rpm bei 4°C wurde der Überstand abpipettiert, und die gewonnenen Zellen wurden zweimal mit 1000 µl SmGM-2 (Smooth Muscle Medium-2), bestehend aus SmBM (Smooth Muscle Basal Medium), 5% FBS (Fetal Bovine Serum), Insulin, hFGF (human fibroblast growth factor), hEGF (human epidermal growth factor) und GA (Gentamicin, Amphotericin B), gewaschen. Das Medium-Zell-Gemisch wurde in 25 cm² Kulturflaschen aufgebracht.

2.2.3 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in kollagenbeschichteten 25 cm² Kulturflaschen ausgesät. Zur Beschichtung wurde Rattencollagen 4 mg/ml in 2x sHBSS (doppelt konzentriertes sHBSS) verwendet, welches 3 bis 4 Tage vor Verwendung der Flaschen aufgebracht und bei 4°C getrocknet wurde. Als Nährmedium diente 5 ml SmGM-2, welches in Abhängigkeit von der

Zelldichte alle 2 bis 5 Tage gewechselt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte im Inkubator belassen.

Nach 2 bis 3 Wochen konnte die Kultur bei mindestens 60% Zelldichte erstmals passagiert werden. Dazu wurde unter der Flow das Medium abgesaugt, und die Zellen einmalig mit 5 ml sHBSS gewaschen. Nach Lösen der Zellen mit 2 ml warmem Trypsin-EDTA (0,5 mg/ml Trypsin und 0,22 mg/ml EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) in PBS (Phosphate Buffered Saline ohne Kalzium und Magnesium) wurde die Reaktion mit 2 ml NCS gestoppt und das Gemisch bei 220g, 20°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Zellpellet in 5 ml SmGM-2 erneut gelöst, um die Zellen zu waschen. Wiederum wurde bei 220g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet mit 3 ml Medium suspendiert. Um die gewonnene Zellzahl zu bestimmen, wurden aus jeder Kultur Proben in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Je nach gewonnener Zellzahl wurden 100000 bis 400000 Zellen in beschichtete 75 cm² Kulturflaschen gebracht und mit 12 ml SmGM-2 für 1 bis 3 Wochen im Brutschrank inkubiert. Das Medium musste abhängig von der Zelldichte alle 2 bis 7 Tage gewechselt werden.

Für die Versuche wurden Zellen aus zweiter und dritter Passage verwendet, die auf nicht-kollagenbeschichteten Petrischalen angesät wurden. Für die Passagierung wurde wie bereits beschrieben vorgegangen. In der zweiten Passage wurden für Versuche je 40000 Zellen in unbeschichtete Petrischalen (Durchmesser 35 mm) ausgesät und mit 2,5 ml SmGM-2 für 3 bis 4 Tage inkubiert. Weitere 300000 bis 500000 Zellen wurden in unbeschichtete 75 cm² Kulturflaschen aufgebracht und 1 bis 3 Wochen bebrütet. Bei den Petrischalen war ein täglicher Mediumwechsel nötig. Zur dritten Passage wurden bei genügender Zelldichte (mindestens 70%) für folgende Versuche je 40000 Zellen auf Petrischalen aufgebracht und wiederum bei täglichem Mediumwechsel mit 2,5 ml SmGM-2 für 3 bis 4 Tage bebrütet.

2.3 Auszählung des Anteils glatter Muskelzellen in der Kultur

2.3.1 Grundlagen zum Aktin

Aktin gilt als eine der Hauptkomponenten im Zytoskelett der Zelle. Es scheint sowohl für die Struktur wie auch für die Motilität der Zelle eine Rolle zu spielen. Beispielsweise generiert es Kraft für die Muskelkontraktion durch Interaktionen mit verschiedenen Aktin-Bindungsproteinen wie Tropomyosin, Myosin oder Caldesmon. Es kommt als Monomer (G-Aktin) und Polymer (F-Aktin) in der Zelle vor. Bei den Säugetieren werden bis jetzt 6 Isoformen unterschieden. Sie sind speziesunabhängig, aber spezifisch für verschiedene

Gewebetypen. So werden zwei Typen für quergestreifte Muskulatur (Herz- und Skelettmuskulatur), zwei für glatte Muskulatur (Gefäß- und Visceralmuskulatur) und 2 nicht-muskuläre in allen Geweben vorkommende Typen (β - und γ - non-muscle actin) unterschieden (Kabsch W, Vandekerckhove J 1992).

In glatten Muskelzellen kommen α -smooth-muscle-actin (α -sma), γ -smooth-muscle-actin (γ -sma), β -non-muscle-actin (β -nma), γ -non-muscle-actin (γ -nma) vor. Zellen, die eher kontrahiert sind, wie beispielsweise Muskelzellen arterieller Gefäße, haben einen höheren Gehalt an α -sma, Zellen, die eher relaxiert sind, wie die intestinalen Muskelzellen, exprimieren mehr γ -sma (Fatigati V, Murphy RA 1984). Die Transkription des α -sma Genes und die Regulation des Einbaus dessen in die Aktin-Filamente kann durch mechanische Kraft reguliert werden. So wird α -sma nicht nur in glatten Muskelzellen gefunden, sondern auch in Narbengewebe oder Wunden, wo starke Zugkräfte wirken. Dort herrschen Myofibroblasten vor, die die Matrix modellieren und zur Fibrose beitragen. α -sma scheint mechanische Verbindungen in diesem Gewebe zu unterhalten und als Mediator der Traktionskräfte kontraktile Fibroblasten (Myofibroblasten) einen wichtigen Teil zur Mechanotransduktion beizutragen. In Myofibroblasten ist es in viel geringeren Konzentrationen als in glatten Muskelzellen vorhanden (Wang J, et al. 2006).

In trachealen Muskelzellen von Ratten kann α -sma und γ -sma nachgewiesen werden. Diese beiden Isoformen findet man da auch in kultivierten Zellen. α -sma wird als einer der Marker für die Differenzierung von glatten Muskelzellen herangezogen. In weniger dichten Kulturen fällt die Konzentration von α -sma in der Zelle, bei Konfluenz steigt sie. In proliferierenden Zellen wurde ein Abfall der α -sma Konzentration festgestellt, gleiches, wenn das Kulturmedium Serum enthält. In Kultur wird generell eine Reduktion der kontraktilen und zytoskelettalen Proteine angenommen. α -sma verschwindet nicht vollständig, es ist konstant in glatten Muskelzellen in Kultur vorhanden, wenn auch in niedrigen Konzentrationen (Low RB, White SL 1998, Wong JZ, et al. 1998).

Alpha-smooth-muscle-actin ist bis auf ganz wenige Ausnahmen (z.B. einige Zellen der intestinalen Submucosa bei Ratten) in allen glatten Muskelzellen der Säugetiere enthalten. Fibroblasten dagegen enthalten nur Beta- und Gamma-Actin. So wird α -sma heute als Marker zur Unterscheidung zwischen glatten Muskelzellen und Fibroblasten in Mischkulturen herangezogen. Dazu wurde ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen ein synthetisches Decapeptid des NH₂-terminalen Peptides des α -sma entwickelt. Dieser Antikörper trägt den Namen anti- α -sm-1 (Skalli O, et al. 1986).

2.3.2 Antikörperfärbung

Stichprobenartig (4 Proben T-bet KO, 6 Proben BALB/c) wurden zum Nachweis der glatten Muskelzellen in der Kultur Anti-Alpha-Actin-Färbungen durchgeführt. Dabei kam das Vecta Stain Elite ABC Kit zur Verwendung. Beim Passagieren der ausgewählten Kulturen wurden Proben von jeweils 400 µl Zellsubstrat beiseite gestellt, davon je 100 µl auf Objektträger pipettiert und daraus Zytospins hergestellt. Diese Zytospins mussten mindestens eine Stunde lang getrocknet werden. Sie wurden 5 Minuten in Methanol fixiert, danach mit destilliertem Wasser abgespült und 2 min darin gewaschen.

Darauf folgte 5-minütiges Waschen in Leitungswasser. 3%iges Wasserstoffperoxid wurde mit destilliertem Wasser zu 0,3% verdünnt und auf die Zytospins getropft.

Nach 30 Minuten Inkubation wurden die Objektträger mit Puffer gewaschen und für 5 Minuten in ein zweites Gefäß mit Puffer gehängt. Als Puffer diente 1x Dulbecco's PBS

Die unspezifischen Bindungsstellen wurden dann für 20 Minuten mit Blocklösung inhibiert. Dazu wurde eine Blocklösung aus 20 ml Puffer und 300 µl Blockserum hergestellt, welches im Vecta Stain Elite ABC Kit vorhanden war.

Überschüssiges Serum konnte mit Trocknungspapier vom Objektträger entfernt werden.

An diesem Punkt folgte der erste Antikörper, Maus-anti-Alpha-sma. Er wurde zuerst im Verhältnis 1 zu 1000 mit Blocklösung verdünnt und dann für 30 Minuten auf die Zytospins gegeben.

Nach diesem Schritt wurden die Präparate wieder 5 Minuten in Puffer gewaschen.

Der 2. Antikörper, biotinyliertes Anti-Maus-IgG aus dem Vecta Stain Elite ABC Kit, wurde mit Blocklösung verdünnt (50 µl Antikörper und 10 ml Blocklösung) und für 30 Minuten aufpipettiert. Wiederum erfolgte ein Waschschrift in Puffer.

Danach musste für 30 Minuten mit ABC-Reagenz inkubiert werden. Das ABC-Reagenz musste schon 30 Minuten vor Anwendung hergestellt werden und enthielt 5 ml Puffer und je 100 µl Reagenz A und B aus dem Kit.

Nach einem weiteren Waschen in Puffer schloss sich die Färbung der Präparate an. Dies geschah durch Auftropfen von Peroxidasesubstrat und Inkubation für 2 bis 10 Minuten. Das Peroxidasesubstrat wurde aus dem DAB Peroxidase Substrat Kit der Firma Vector hergestellt. 7,5 ml Wasser wurden mit 50 µl Puffer vermischt, dazu 100 µl DAB Stocklösung und 50 µl Wasserstoffperoxid gegeben.

Die Objektträger wurden nun in Leitungswasser gewaschen und gegengefärbt.

Zur Gegenfärbung wurden sie 5 Minuten in Hämalaun gegeben und danach 15 Minuten unter Leitungswasser gebläut.

Das Ergebnis wurde fixiert, indem die Präparate in einer aufsteigenden Reihe Xylol gebadet wurden. Danach musste nur noch ein Deckglas aufgelegt werden. Nach zweistündigem Trocknen war das Betrachten unter dem Mikroskop in 400facher Vergrößerung möglich, wobei sich Muskelzellen bräunlich gefärbt darstellten. Die Angabe der Anzahl an Muskelzellen erfolgte prozentual.

2.4 Färbung mit Oregon Green

Die Zellen wurden mit dem intrazellulären Kalziumindikator Oregon Green (Oregon Green 488 BAPTA-1, AM (Acetoxymethylester), Anregungs-/Emissionspeak 494 nm/ 523 nm) beladen. Dazu wurden 50 µg 10 µM Oregon Green AM in 40 µl DMSO (Dimethylsulfoxid) und 8 µl Pluronic gelöst und in 4 ml sHBSS gegeben. Zum Schutz des Farbstoffs vor Licht dienten mit Alufolie umwickelte Arbeitsgefäße. Von 4 Petrischalen wurde das Medium abpipettiert und je 1 ml der Lösung hineingegeben und im Dunkeln (Alufolie) unter der Flow für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgesogen und die Zellen einmalig mit 1 ml sHBSS gewaschen. Zum Deesterifizieren wurde 1 ml sHBSS auf die Zellen gegeben und zwischen 30 und 90 min im Dunkeln belassen. Danach konnten die Zellen für die Versuche verwendet werden. Die Fluoreszenz korreliert mit der Kalziumkonzentration.

2.5 Aufzeichnung der Messungen

Zur Beobachtung und Aufzeichnung der Reaktion der Zellen auf das zugegebene Reagenz kam das Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M der Firma Carl Zeiss zum Einsatz. Die Zellen wurden in 200facher Vergrößerung dargestellt. Zum Einstellen eines zur Aufnahme geeigneten Ausschnitts (möglichst viele Muskelzellen, die sich nicht überlagern) wurde die Kultur in Phasenkontrastmikroskopie betrachtet (Abbildung 2). Danach wurde für jenen Ausschnitt die optimale Belichtungszeit für die Fluoreszenzmikroskopie festgehalten und die Parameter am Mikroskop dafür umgestellt (20x Objektiv, Kondensator ph2, Reflektor YFP (Yellow Fluorescent Protein, Anregungs-/Emissionspeak 513 nm/527 nm), HAL off, FL on). Alle 2 Sekunden über einen Zeitraum von 2 Minuten wurde ein Bild aufgezeichnet (0,5 Bilder/sec), so dass am Ende je 60 Bilder zur Auswertung zur Verfügung standen. Zwischen den Aufzeichnungen wurde die Belichtung der Zellen durch einen Shutter unterbrochen. Zur Aufzeichnung diente die digitale CCD Kamera AxioCam MRm der Firma Carl Zeiss. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

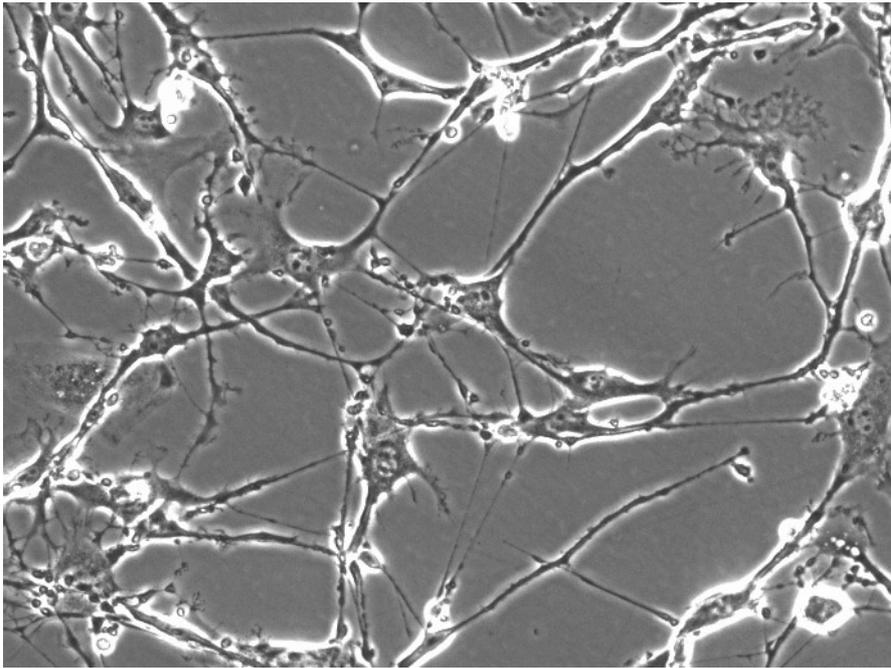


Abbildung 2 zeigt glatte tracheale Muskelzellen einer BALB/c-Maus in Phasenkontrastmikroskopie bei 200facher Vergrößerung nach Färbung mit Oregon Green.

2.6 Methodik der Untersuchungen zur Kalziumhomöostase

2.6.1 Untersuchung des Acetylcholin-induzierten Kalzium-Signalings

2.6.1.1 Grundlagen zu Acetylcholin und Acetylcholinrezeptor

Acetylcholin ist einer der weitverbreitetsten Neurotransmitter im Organismus. Es wird in den Nervenendigungen durch das Enzym Cholinacetyltransferase aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert. In synaptischen Vesikeln verpackt steht es zur Ausschüttung bereit. Es interagiert als Transmitter mit den verschiedensten Zellen im Körper. Die Wirkung wird durch Spaltung in Cholin und Acetat durch die Acetylcholinesterase beendet. Zusätzlich zu seinem altbekannten Vorkommen als Transmitter des Nervensystems, scheint es auch in nicht-neuronalem Gewebe eine Rolle zu spielen (Wessler I, et al. 1998).

Für die vorliegende Arbeit wurde es verwendet, weil es in den Luftwegen vorwiegend über das parasympathische Nervensystem (Dixon WE 1903) als Neurotransmitter für die Bronchokonstriktion wirkt. Prinzipiell wirkt Acetylcholin über nikotinische bzw. muskarinische Acetylcholinrezeptoren. In den Luftwegen finden sich überwiegend muskarinische Rezeptoren der Subtypen M2 und M3. Diese sind G-Protein gekoppelte

Rezeptoren. M2 Rezeptoren stellen den größten Teil dar. Sie spielen keine direkte Rolle bei der Bronchokonstriktion, scheinen jedoch die Relaxation zu inhibieren.

Die eigentliche Konstriktion wird über M3 Rezeptoren vermittelt. Dies geschieht vorwiegend über die Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat zu Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) (Eglen RM, et al. 1996, Racke K, Matthiesen S 2004). In der Zelle wird eine lange Kaskade in Gang gesetzt, die letztendlich zur Erhöhung des intrazellulären Kalziums und zur Kontraktion führt (Berridge MJ, et al. 2000, Hirota S, et al. 2007).

2.6.1.2 Anwendung von Acetylcholin

Zum Messen des Kalziumanstiegs in der Zelle wurde eine Lösung 10 mM Acetylcholin aus 99% Acetylcholin-Chlorid und sHBSS hergestellt. Davon wurden 100 µl in die Petrischale mit dem 1 ml sHBSS gegeben, so dass die Endkonzentration von ACh an den Zellen etwa 1 mM betrug. Um einen mittleren Ausgangswert für die Kalziummessung zu finden und das Ausbleichen des Farbstoffes korrigieren zu können, erfolgte die Zugabe erst nach 14 Sekunden, nach Aufzeichnung des Bildes Nummer 7. Sofern nicht anders angegeben wurde bei allen Versuchen das Reagenz nach Sekunde 14 der Aufnahme zugegeben und für insgesamt 2 Minuten aufgezeichnet.

Für diesen Versuch wurden Zellen aus je 4 BALB/c- und 4 T-bet KO-Mäusen aufgenommen.

2.6.2 Anwendung von Acetylcholin in kalziumfreiem Medium

Um im nächsten Schritt den Einfluß von Kalzium außerhalb der Zelle zu eliminieren, wurden Versuche zum ACh-induzierten Kalzium-Signaling in kalziumfreiem Medium durchgeführt. Die Zellen wurden wie schon beschrieben mit Oregon Green gefärbt. Nach der Deesterifizierung wurde das sHBSS abpipettiert und stattdessen 1 ml 0,02%ige EDTA-Lösung (0,02% in DPBS (0,5 mM) ohne Ca²⁺/Mg²⁺) zugegeben. Die Platzierung der Petrischale unter dem Mikroskop erfolgte direkt nach der Zugabe der EDTA-Lösung. Zur Quantifizierung wurde 1 mM Acetylcholin zugegeben. Es wurden Zellen aus je 2 BALB/c- und 2 T-bet KO-Mäusen aufgenommen.

2.6.3 Messungen spontaner Fluoreszenzänderungen in EDTA-Lösung

Nach dem letzten Schritt der Färbung mit Oregon Green, wurde das sHBSS abpipettiert. Stattdessen wurde 1 ml 0,02%ige EDTA-Lösung in DPBS (ohne Kalzium/Magnesium) zugegeben. Die jeweilige Petrischale wurde sofort unter das Mikroskop gestellt und die Aufnahme schnellstmöglich gestartet. Es wurde kein weiteres Reagenz zugegeben. Hierfür wurden 4 Mäuse BALB/c und 6 Mäuse T-bet KO betrachtet.

In einem weiteren Versuch wurde die Petrischale nach der Färbung mit 100 µl sHBSS versehen und die Aufnahme gestartet. Nach einer Minute wurde 1 ml der EDTA-Lösung hinzupipettiert und die Aufnahme für weitere 2 Minuten fortgeführt.

2.6.4 Untersuchung der Beteiligung von IP₃-Rezeptoren

2.6.4.1 Grundlagen zum IP₃-Rezeptor

Der Inositol 1,4,5-trisphosphatrezeptor (IP₃-Rezeptor) gehört zusammen mit dem Ryanodinerezeptor zur Familie der Kalziumkanäle, die für die Mobilisation von Kalzium aus Speichern innerhalb der Zelle zuständig sind. Es existieren mindestens 3 Isoformen, die von unterschiedlichen Genen codiert werden. Der Rezeptor besteht aus drei Einheiten, einer N-terminalen Bindungsdomäne für Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃), einer regulatorischen Domäne und einem C-terminalen Kalziumkanal (Patel S, et al. 1999). Die Freisetzung von Kalzium über den IP₃-Rezeptor wird als Inositol induzierte Kalziumausschüttung (Inositol induced Calcium release, IICR) bezeichnet. IP₃ bindet an den Rezeptor und führt zu einem Ausstrom von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum. Das IP₃ entsteht nach Stimulation eines Zelloberflächenrezeptors (in der glatten Atemwegsmuskelzelle G-Protein gekoppelt), beispielsweise durch Acetylcholin, aus Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat, eines membrangebundenen Inositollipides, in Diacylglycerol (DAG) und IP₃ (Berridge MJ, Irvine RF 1984).

Der IP₃-Rezeptor wird von vielen Faktoren reguliert, so wirkt beispielsweise ATP konzentrationsabhängig aktivitätssteigernd oder –senkend, Proteine wie FKBP12 und Calmodulin nehmen verschiedenen Einfluss auf die Aktivität (Patel S, et al. 1999) und steigende Konzentrationen von Magnesium inhibieren die Kalziumfreisetzung. Eine entscheidende Rolle aber spielt Kalzium selbst. IP₃ allein ist nicht in der Lage den Kanal zu öffnen, es benötigt dazu eine bestimmte Konzentration von Kalzium in der Zelle, wohingegen höhere Konzentrationen die Öffnung des Kanals verhindern bzw. zur Inaktivierung führen

(Iino M 1990, Hirose K, et al. 1998). Am SR von glatten Muskelzellen finden sich verschiedene Formen von IP₃-Rezeptoren, deren Affinität zu IP₃ zu variieren scheint. Wenn es bindet, kann es zum Kalziumausstrom in Form mehrerer Kalzium-Puffs (Puff = Hauch) kommen, welche Kalziumwellen oder den Kalzium induzierten Kalziumausstrom triggern können. Somit trägt das IICR zum globalen Kalziumanstieg in der Zelle und damit zur Kontraktion bei (Laporte R, et al. 2004).

2.6.4.2 Grundlagen zum Xestospongine

Xestospongine, wie Xestospongine A, B, C und D sind Alkaloide aus dem Australischen Schwamm *Xestopongia exigua*. Ursprünglich wurde ihnen ein einzig vasodilatatorischer Effekt zugeschrieben (Nakagawa M, Mamoru E 1984). Gafni und Kollegen zeigten, dass Xestospongine den IP₃-Rezeptor in Mikrosomen des Cerebellums blockieren und fanden dabei Xestospongine C als stärksten Inhibitor. Dieses konnte auch mit dem Ryanodinerezeptor Typ 1 interagieren, allerdings wesentlich schwächer (Gafni J, et al. 1997). In der Zelllinie A7r5 (Glattmuskelzellen) wurde ein inhibitorischer Effekt des Xestospongins C auf die SERCA festgestellt (De Smet P, et al. 1999). In glatten Muskelzellen des Ileums von Meerschweinchen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Dort wurde herausgearbeitet, dass es den IP₃-Rezeptor und spannungsabhängige Kalzium- und Kaliumkanäle blockiert (Ozaki H, et al. 2002). Für den heutigen Gebrauch in verschiedenen glatten Muskelzellen ist festzustellen, dass Xestospongine als potente Inhibitoren des IP₃-Rezeptors agieren, somit den IP₃-abhängigen Kalziumausstrom aus dem SR blockieren und geringe Effekte am Ryanodinerezeptor haben können (Laporte R, et al. 2004).

2.6.4.3 Anwendung von Xestospongine D

Um die Beteiligung von IP₃-Rezeptoren am Kalzium-Signaling in trachealen glatten Muskelzellen nachzuweisen, wurden Zellen der BALB/c-Zellkultur mit 10 µM bzw. 50 µM Xestospongine D inkubiert. Dazu wurde eine 1 mM Xestospongine D-Stammlösung hergestellt (Xestospongine D in sHBSS und 0,1% DMSO) Nach 15 Minuten des Deesterifizierungsschrittes wurden 10 µl/50 µl der Lösung in die Petrischale mit 1 ml sHBSS pipettiert und für weitere 30 Minuten im Dunkeln unter der Flow belassen. Während der mikroskopischen Aufnahme kam 1 mM ACh hinzu. Für diese Versuche wurden Zellen aus 2 Mäusen BALB/c mit den 4 BALB/c-Mäusen des Acetylcholin-induzierten Kalzium-Signalings verglichen.

2.6.5 Untersuchung der Beteiligung von Ryanodinerezeptoren

2.6.5.1 Grundlagen zum Ryanodinerezeptor

Der Ryanodinerezeptor (RyR) ist ein Kanal, bestehend aus 4 Untereinheiten, die in der Mitte eine kalziumleitende Pore bilden. Es existieren drei Isoformen (RyR 1-3), kodiert von drei verschiedenen Genen. In glatten Muskelzellen finden sich vorwiegend die Formen RyR 2 und RyR 3 (Laporte R, et al. 2004). Sie werden durch verschiedenste Faktoren moduliert. Beispielsweise werden sie von ATP aktiviert und von Magnesium inhibiert. Stoffe wie Ryanodine oder Caffeine agieren am Ryanodinerezeptor und Proteine wie zum Beispiel Calsequestrin sind am Aktivierungsprozess beteiligt (Fill M, Copello JA 2002). Am gängigsten ist die Ansicht, dass das zytosolische Kalzium selbst am Rezeptor wirkt. Niedrige Konzentrationen scheinen ihn zu aktivieren, hohe zu inhibieren. Steigt das zytosolische Kalzium an, wird ab einer bestimmten Konzentration der Kanal geöffnet und Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Diesen Vorgang bezeichnet man als Kalzium induzierte Kalziumfreisetzung (Calcium induced Calcium Release, CICR). Das zytosolische Kalzium, welches dafür benötigt wird, strömt entweder von außen in die Zelle, beispielsweise über L-Typ Kalziumkanäle (Collier ML, et al. 2000), oder aus dem SR über die IP₃-Rezeptoren.

2.6.5.2 Grundlagen zum Ryanodine

Ryanodine, ein Alkaloid, welches in der Pflanze *Ryania speciosa* gefunden wird, bindet mit sehr hoher Affinität an die Ryanodinerezeptorproteine. Die Wirkung auf den RyR ist konzentrationsabhängig. In submikromolaren Konzentrationen steigert es den Kalziumausstrom aus dem SR, in mittleren Konzentrationen hält es den Kanal in einem halbleitenden Zustand offen und in hohen (mikromolaren) Konzentrationen verschließt es die RyR-Kanäle (Fill M, Copello JA 2002, Laporte R, et al. 2004).

2.6.5.3 Anwendung von Ryanodine

Um die Beteiligung der Ryanodinerezeptoren am Kalzium-Signaling in murinen trachealen glatten Muskelzellen zu prüfen, wurden Zellen der BALB/c-Zellkultur mit 1 mM Ryanodine inkubiert. Für den Versuch wurde eine 100 mM Ryanodine-Stammlösung (Ryanodine in sHBSS und 0,1% DMSO) hergestellt. Nach 15 Minuten des Deesterifizierungsschrittes der Oregon Green-Färbung wurden 10 µl der Ryanodinlösung zum sHBSS pipettiert und für 30

bis 45 Minuten bis zum Versuch im Dunkeln inkubiert. Unter dem Mikroskop erfolgte wieder die Zugabe von 1 mM ACh, um einen Kalziumanstieg zu induzieren. Es wurden Zellen von 2 Mäusen BALB/c mit den 4 BALB/c-Mäusen des Acetylcholin-induzierten Kalzium-Signalings verglichen.

2.6.6 Untersuchung des Kalziumgehaltes des SR

2.6.6.1 Grundlagen zum Caffeine

Caffeine ist ein Alkaloid, dass in glatten Muskelzellen vorwiegend am Ryanodinerezeptor agiert. Es selbst hat keinen kalziumausschüttenden Effekt, wird aber vornehmlich dazu verwendet, die Kalziumspeicher in der Zelle zu entleeren (Bazan-Perkins B, et al. 2000, Laporte R, et al. 2004). Dies geschieht durch eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR ohne deren Leitfähigkeit zu verändern, die Sensitivität für den CICR wird vergrößert (Pessah IN, et al. 1987). Es hat weitere unspezifische Effekte, wie die Inhibition von IP₃-Rezeptoren und L-Typ-Kalziumkanälen oder das Öffnen von unselektiven Membrankanälen. Zumeist wird es in millimolaren Konzentrationen in kalziumfreiem Medium verwendet (Laporte R, et al. 2004).

2.6.6.2 Anwendung von Caffeine

Hier wurden die Versuche nicht in kalziumfreiem Medium durchgeführt, sondern in sHBSS. Es wurde eine Stammlösung von 100 mM hergestellt (Caffeine in sHBSS und 1% DMSO). Die Petrischalen mit den Zellen wurden nach Färbung mit Oregon Green unter dem Mikroskop plaziert. Es kamen Konzentrationen von 1 mM, 4 mM, 9 mM, 11 mM und 13 mM Caffeine zum Einsatz. Die Caffeinelösung wurde an Stelle des bis jetzt gebrauchten Acetylcholins verwendet und in gleicher Art zugegeben. Es kamen Zellen von je einer T-bet KO- und einer BALB/c-Maus zum Einsatz.

2.6.6.3 Grundlagen zur SERCA

Die Sarkoplasmatisches Retikulum Kalzium ATPase (SERCA) wird von mindestens 3 Genen codiert, resultierend in SERCA 1 (SERCA 1a und 1b), SERCA 2 (SERCA 2a und 2b) und SERCA 3. Typ 1 findet sich hauptsächlich in Skelettmuskulatur, Typ 3 in blutbildenden Zellen sowie in verschiedenen endothelialen und epithelialen Zellen. Der Typ 2 wird vor allem in langsamen Skelettmuskelzellen, Herzmuskelzellen und auch glatten Muskelzellen

exprimiert. In den glatten Muskelzellen ist zum größten Teil SERCA 2b vorhanden. Jedem Typ wird eine unterschiedliche Affinität und Umsatzrate für Kalzium zugeschrieben (Grover AK, Khan I 1992, Moller JV, et al. 1996). Die SERCAs pumpen Kalzium aus dem Zytosol in das Sarkoplasmatische Retikulum. Sie zählen zur Familie der P-Typ ATPasen. Sie pumpen Kalzium aktiv unter Verbrauch von ATP in das SR. Es scheinen 2 Kalziumionen an der zytoplasmatischen Seite der SERCA zu binden (E1 Formation der SERCA, hohe Affinität für Kalzium). Danach wird ein ATP gebunden und es kommt zur Autophosphorylierung des Enzyms (E1-P). Dabei findet eine Konformationsänderung statt (E2-P) und die Kalziumionen werden in das Lumen des SR entlassen (E2, niedrige Affinität für Kalzium). Das Phosphat wird hydrolysiert und 2 Wasserstoffionen werden im Gegenzug nach draußen transportiert. Durch eine weitere Konformationsänderung wird wieder der Ausgangszustand hergestellt (E1-Formation). Dieser Zyklus wird verkürzt häufig als $E1 \rightarrow E1-P \rightarrow E2-P \rightarrow E2 \rightarrow E1$ ausgedrückt (Moller JV, et al. 1996). Die Aktivität der SERCAs wird unter anderem durch Phospholamban, einem integralen Membranprotein des SR, reguliert. Es inhibiert in unphosphoryliertem Zustand die SERCA. Wenn es durch cAMP- und Calmodulin-abhängige Phosphorylierung von seiner Bindungsstelle entfernt wird, steigt die Kalziumaufnahme in das SR (James P, et al. 1989).

Zusammenfassend ist zur SERCA zu sagen, dass sie ein komplex reguliertes und in verschiedensten Formen exprimiertes Protein ist, dass für die Kalziumhomöostase in der Zelle eine entscheidene Rolle spielt, da sie dazu beiträgt, Kalzium aus dem Zytosol zu entfernen, damit das Lumen des SR auffüllt und so einen großen Beitrag zum Vorhandensein von Kalzium in den Signalwegen der Zelle leistet.

2.6.6.4 Grundlagen zum CPA

Cyclopiazonic Acid (CPA) ist ein Pilzgift, das von verschiedenen Aspergillus- und Penicilliumarten produziert wird. Man findet es als natürlichen Schadstoff an Getreide, Nüssen oder Schimmelkäse. Für Mensch und Tier wird es als gesundheitsschädlich eingestuft. CPA ist ein starker Inhibitor von SERCA-Aktivität und Kalziumtransport in das SR (Goeger DE, et al. 1988). Die Effekte scheinen sehr spezifisch für die SERCA zu sein. Alle Isoformen haben die gleiche Sensitivität zu CPA. CPA interagiert mit den Konformationsänderungen der SERCA, wobei es die SERCA in einer inaktiven Konformation zwischen E1 und E2 zu stabilisieren scheint (Seidler NW, et al. 1989). Die Inhibition ist voll reversibel.

Durch die Inhibition der SERCA kann kein Kalzium mehr in das SR aufgenommen werden. Es besteht aber ein kontinuierlicher Ausstrom von Kalzium aus dem SR (Kalziumleak über

RyR, IP₃R, Konzentrationsgefälle). So entleert sich nach CPA-Zugabe das SR ohne Opposition und der Kalziumgehalt desselben kann gemessen werden. Es wird damit meist verwendet, um die SERCA selektiv zu blockieren und die intrazellulären Kalziumspeicher zu entleeren. Die Ergebnisse sind jedoch wenig einheitlich, da auch von außen Kalzium in die Zelle gelangt und es Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies und Zellkulturmethoden gibt (Ethier MF, et al. 2001).

2.6.6.5 Anwendung von CPA

Es wurde eine CPA-Stammlösung von 100 µM hergestellt (CPA in sHBSS und 10% DMSO). Nach Färbung der Zellen und Einstellung des Mikroskops wurden die Aufnahmen gestartet. Jeweils nach Sekunde 14 wurde CPA in Konzentrationen zwischen 0,5 und 20 µM (0,5/1/2/3/5/10/20 µM) zugegeben. Jeweils 2 Mäuse T-bet KO und BALB/c wurden verglichen.

2.6.6.6 Grundlagen zu Thapsigargin

Thapsigargin, ein Lacton, gewonnen aus einer Gruppe von Pflanzen der Spezies Thapsia, scheint, verglichen mit CPA und 2,5,-di(t-butyl) hydroquinone (DBHQ), der potenteste Inhibitor der SERCA zu sein (Inesi G, Sagara Y 1994). Es interagiert mit allen SERCA-Isoformen, hat aber keine Effekte auf die Plasmamembran-Kalzium-ATPase oder die Na⁺K⁺ATPase. Dies impliziert eine Spezifität für die SERCA. Die Inhibition tritt sehr schnell, schon bei niedrigen Konzentrationen, ein und ist irreversibel (Lytton J, et al. 1991). Wahrscheinlich blockiert es die SERCA in der kalziumfreien E2-Konformation oder in einem unbekanntem Zwischenzustand. Auch die Abhängigkeit der Inhibition von Kalzium wird diskutiert. Ein protektiver Einfluss von freiem Kalzium wurde beschrieben, da die Thapsigarginbindung eher in der kalziumfreien SERCA-Konformation zu finden war (Inesi G, Sagara Y 1992). Jedoch sind die Meinungen diesbezüglich nicht einheitlich, da anderweitig publiziert wurde, dass weder Kalzium noch ATP einen Einfluss auf Thapsigargin haben (Lytton J, et al. 1991).

Trotz fehlender Kenntnis aller Einflußfaktoren inhibiert Thapsigargin selbst selektiv die SERCA und verhindert dadurch den Kalziumtransport in das SR. Durch den kontinuierlichen Kalziumausstrom aus dem SR (leak) entleert es sich. Man kann demnach damit versuchen, den Kalziumgehalt des SR zu messen. Allerdings induziert das steigende intrazelluläre Kalzium auch den Eintritt desselben von extrazellulär. Thapsigargin hat noch einige

unspezifische Effekte in der Zelle wie beispielsweise die Ausschüttung von Relaxations- oder Kontraktionsfaktoren und die Blockade spannungsabhängiger Kalziumkanäle in hohen Konzentrationen. Viele dieser Effekte könnten aber auch auf der Änderung des Kalziumspiegels bei Inhibition der SERCA beruhen (Inesi G, Sagara Y 1994, Laporte R, et al. 2004).

In glatten Muskelzellen wird es oft verwendet, um das SR zu entleeren und die SERCA-Aktivität zu untersuchen (Laporte R, et al. 2004).

2.6.6.7 Anwendung von Thapsigargin

Auch für Thapsigargin wurde eine 100 μM Stammlösung hergestellt. Für die Versuche wurden 100 μl für 10 μM Endkonzentration an den Zellen verwendet. Das Thapsigargin wurde wie schon in den davor beschriebenen Versuchen nach Färbung mit Oregon Green während der Aufnahme zugegeben. Zellen aus je 2 T-bet KO- und BALB/c-Mäusen wurden verglichen.

2.7 Auswertung der Bilddateien

Die Auswertung der Bilddaten erfolgte mit der Bildanalysesoftware „Scion Image for Windows“. Für jede aufgenommene Zelle wurde ein region of interest (roi) von 7x3 Pixel definiert. Dieser wurde möglichst in der Peripherie der Zelle platziert, um die Zellkernregion auszusparen. Für jedes Bild wurde mit Hilfe eines Makros der Mittelwert der Grauwerte (Grauwert entspricht Intensitätswert) innerhalb des roi bestimmt („mean density“).

Für die Auswertung der Intensitätsverläufe kam ein halbautomatisiertes Verfahren zum Einsatz, welches auf einer eigens hierfür entwickelten Benutzeroberfläche (Anhang 4) und teilweise auf Skripten der Software Matlab basiert. Matlab wird in der Industrie und an Hochschulen vor allem für numerische Simulation sowie Datenerfassung, Datenanalyse und -auswertung eingesetzt.

Das Programm bietet gute Möglichkeiten für das Einlesen von Daten aus Excel-Dateien und wurde daher verwendet, um die sequentiell angeordneten Intensitätswerte der auszuwertenden Zellen zu importieren („import_excel.m“, Anhang 2). Desweiteren wurde Gebrauch von den einfach zu verwendenden Visualisierungsfunktionen in Matlab gemacht („plot_cell.m“, Anhang 3), um die charakteristischen Merkmale der Intensitätsverläufe möglichst einfach zu

bestimmen. Die Anzahl der Oszillationen wurde nicht mit diesem Programm, sondern manuell bestimmt.

Die Oberfläche zur Auswertung der Zellen ist in Abbildung 3 zu sehen und wurde mit der Programmierumgebung „Visual C++ 2005 Express“ der Firma Microsoft geschrieben. Die Anwendung greift auf die von Matlab bereitgestellten Funktionen zurück.

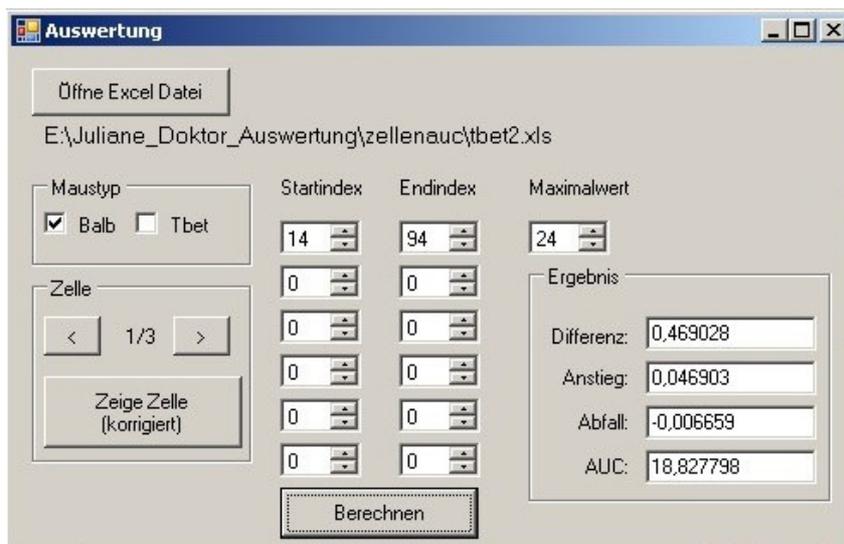


Abbildung 3 stellt die Benutzeroberfläche dar, mit deren Hilfe man einzelne Zellen (Befehl: „Zeige Zelle“) nach Bestimmung der Fluoreszenzänderung aufrufen kann und nach Eingabe der Zeitparameter „Startindex“, „Endindex“ und „Maximalwert“ (z.B. Abbildung 4) die gesuchten Werte „Differenz“ (initialer Kalziumtransient), „Anstieg“ (Anstiegsgeschwindigkeit), „Abfall“ (Abfallsgeschwindigkeit) und „AUC“ (Area under the Curve) angezeigt bekommt. Die Anzahl der Oszillationen und der Prozentsatz oszillierender Zellen wurde manuell bestimmt. Die AUC der Oszillationen ging automatisch in die Berechnung der Gesamt-AUC ein. Dazu wurden die Grenzwerte der Oszillationen in den weiteren Feldern „Startindex“, „Endindex“ eingegeben.

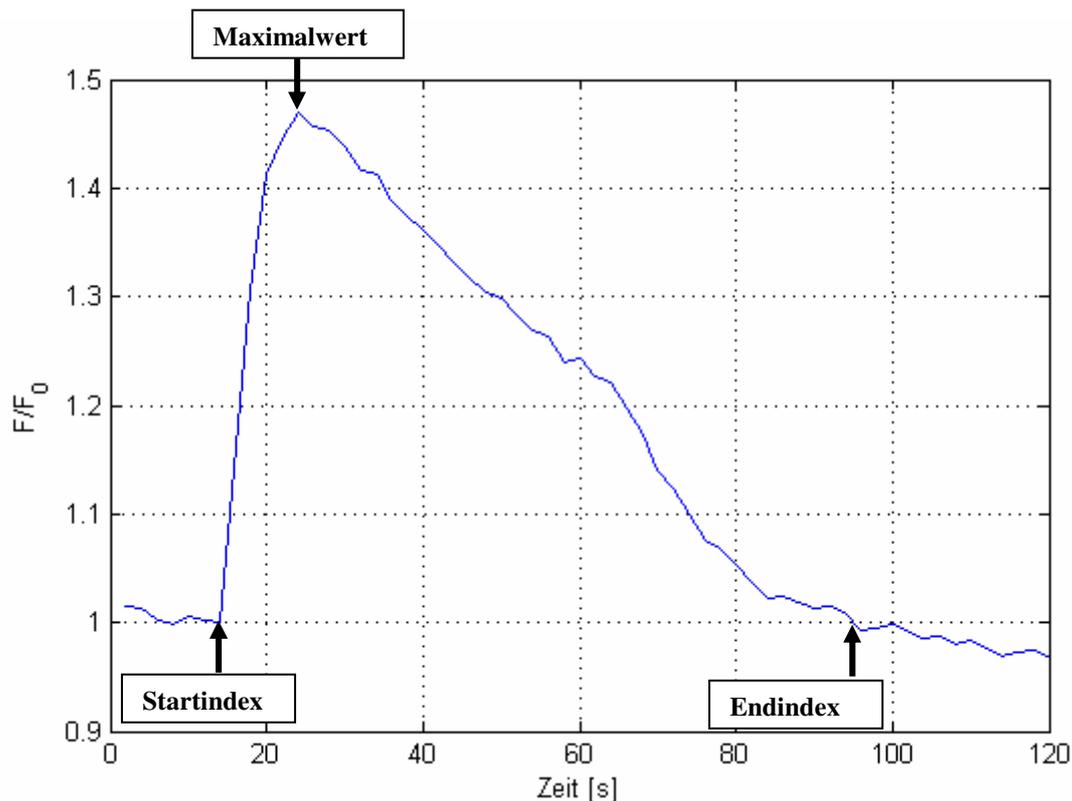


Abbildung 4 zeigt einen von Matlab generierten Graphen, wie er zur Bestimmung der Grenzwerte für die Berechnungen der Messgrößen benutzt wurde. An den markierten Positionen würde für dieses Beispiel $F/F_0 = 1$ als Grenzwert verwendet werden.

Pro Zelle wurde die initiale Fluoreszenz F_0 aus dem Mittelwert über die ersten 5 Intensitätswerte gebildet und diente zur Normalisierung aller Fluoreszenzwerte der Zelle (F/F_0). Der Verlauf dieses Quotienten wurde gegen die Zeit aufgetragen und konnte auf Befehl graphisch dargestellt werden (Abbildung 4).

Da der lichtempfindliche Farbstoff zum Ausbleichen neigt, entstand eine Drift über die Zeit. Diese Drift musste korrigiert werden. Zur Ermittlung der benötigten Korrekturfunktion wurde T-bet KO und BALB/c getrennt betrachtet. Es wurden hierfür je 47 Kontrollzellen von T-bet KO und BALB/c in Scion ausgewertet, wobei diese gefärbten Zellen ohne die Zugabe eines weiteren Stoffes aufgenommen worden waren. Die sich hieraus ergebenden Intensitätsverläufe wurden in einem Diagramm gemeinsam dargestellt (Abbildungen 5a, 5b). Anschließend wurden anhand der exponentiellen Funktion der Form $f(t) = a_1 * \exp(-a_2*t) + a_3 * \exp(-a_4*t)$ die Koeffizienten $a_{1..4}$ derart bestimmt, so dass im Mittel über alle 47 Datensätze die für alle Versuche anzuwendende Ausgleichsfunktion $f(t)$ ermittelt wurde („intensity.m“, Anhang 1). In Abbildung 6a und 6b ist die korrigierte Version der Intensitätswerte bei Verwendung der statischen Ausgleichsfunktion dargestellt.

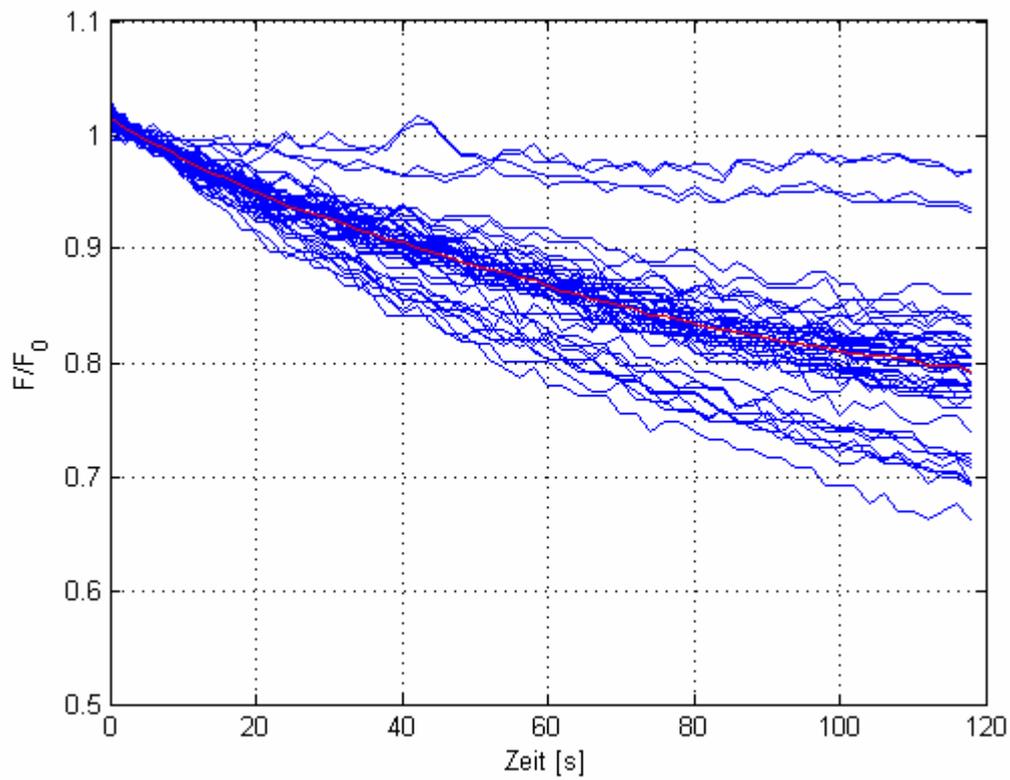


Abbildung 5a stellt das Diagramm der Intensitätsverläufe (blaue Kurven) der zur Korrektur der Drift verwendeten Kontrollen bei BALB/c dar. Die Drift kann man als kontinuierlichen Abfall der Intensität über die Zeit sehen. Die rote Kurve stellt den mittleren Verlauf der Intensität der 47 Kontrollzellen dar.

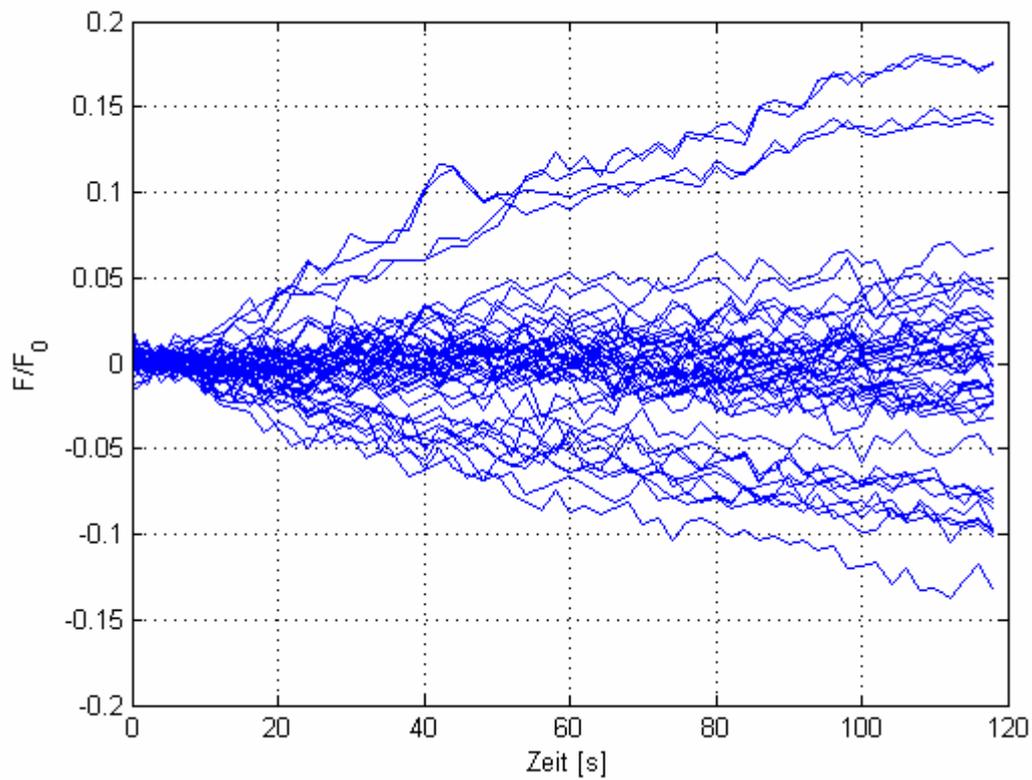


Abbildung 6a zeigt die korrigierte Version der Intensitätsverläufe bei Verwendung der statischen Ausgleichsfunktion $f(t) = 0,2377 * \exp(-0,0131*t) + 0,7742 * \exp(-0,000359*t)$ der 47 Kontrollzellen von BALB/c.

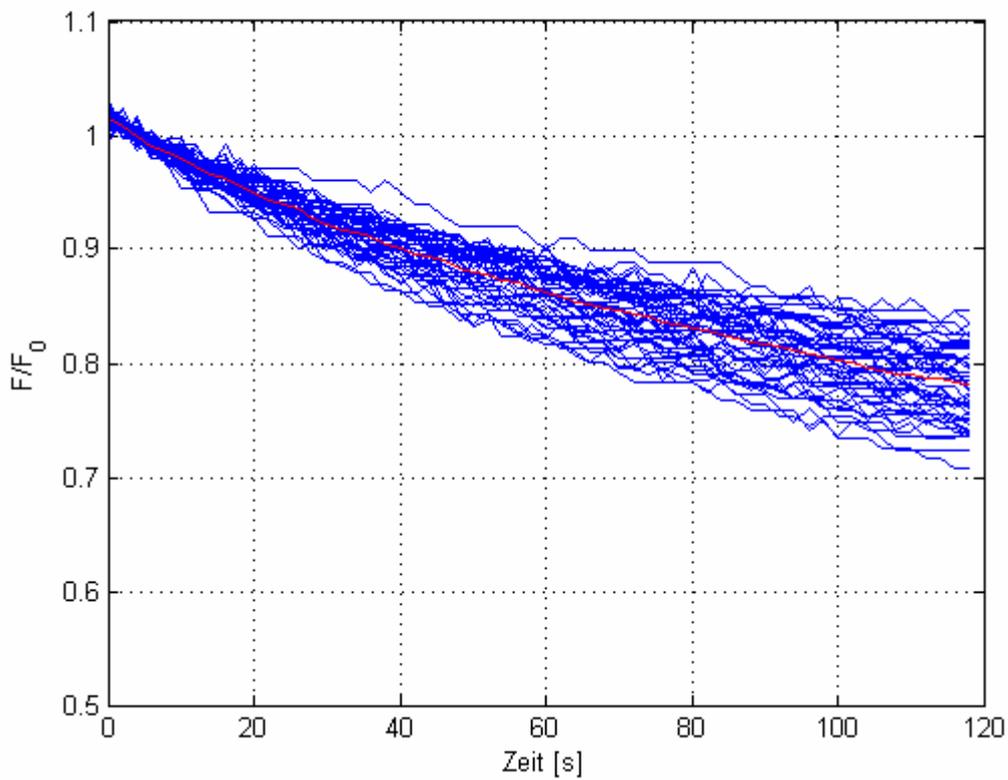


Abbildung 5b stellt das Diagramm der Intensitätsverläufe (blaue Kurven) der zur Korrektur der Drift verwendeten Kontrollen bei T-bet KO dar. Die Drift kann man als kontinuierlichen Abfall der Intensität über die Zeit sehen. Die rote Kurve stellt den mittleren Verlauf der Intensität der 47 Kontrollzellen dar.

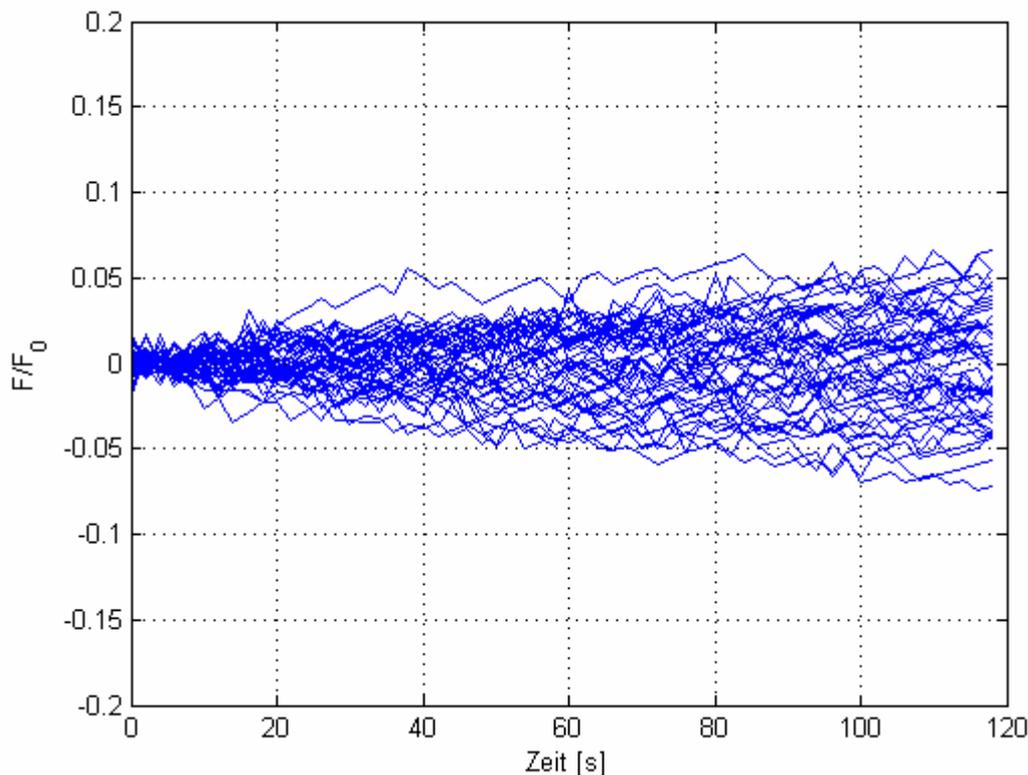


Abbildung 6b zeigt die korrigierte Version der Intensitätsverläufe bei Verwendung der statischen Ausgleichsfunktion $f(t) = 0,1024 * \exp(-0,025*t) + 0,9122 * \exp(-0,00138*t)$ der 47 Kontrollzellen von T-bet KO.

2.8 Ermitteln der Daten für die statistische Auswertung

Bei allen Versuchen außer in 0 externem Kalzium (EDTA-Versuch) wurde der initiale Kalziumtransient als erster Anstieg des Graphen angesehen. Dieser musste um mindestens 10% von dem initialen Verhältnis $F/F_0 = 1$ nach oben abweichen. Das heißt, dass die Differenz zwischen Anfangswert und Maximalwert mindestens 0,1 betragen musste, um gewertet zu werden. Zellen mit initialen Anstiegen von unter 0,1 wurden verworfen und gingen in die Zahl der nicht reagierenden Zellen ein. Anders verhielt es sich bei den Versuchen in kalziumfreiem Medium. Hier wurde der höchste Transient als Vergleich unter den Zellen zur Auswertung herangezogen, da kein initialer Transient durch die Zugabe des EDTA vor Beginn der Aufnahme ermittelt werden konnte.

Aus dem Quotienten des initialen Transienten bzw. höchsten Transienten und der Zeit bis zum Erreichen des höchsten Wertes wurde die Geschwindigkeit des Anstiegs ermittelt, nachfolgend Anstiegsrate genannt.

Der erste Abfall wurde definiert als Differenz des höchsten Wertes bis zum Absinken des Graphen auf den Ausgangswert. Dies sollte gleich dem Anstieg sein. Da nicht alle Zellen bis zum Ende der Aufnahme einen Abfall bis zum Ausgangswert zeigten, wurde die Höhe des Abfalls nicht betrachtet. Sie wurde aber für die Berechnung der Geschwindigkeit des Abfalls herangezogen. Bei Zellen, die also keinen Abfall auf den Ausgangswert zeigten, wurde die Differenz zwischen dem maximalen Wert des ersten Transienten und dem Endwert der Kurve am Ende der Aufnahme (120 sec) als Höhe des Abfalls betrachtet. Die Abfallrate wurde dann aus dem Quotienten der Differenz von F/F_0 und Zeitdauer bis zur Unterschreitung des Ausgangsniveaus bzw. Aufnahmeende berechnet.

Desweiteren wurde die Anzahl der Oszillationen einer Zelle innerhalb 120 sec sowie der Prozentsatz der Zellen mit Oszillationen aus allen reagierenden Zellen ermittelt. Eine Oszillation wurde als Fluoreszenzänderung um 5% definiert, die nach dem höchsten Punkt des initialen Kalziumtransienten auftrat. Fluoreszenzänderungen unter 5% wurden nicht betrachtet.

Das Integral des Intensitätsverlaufs des initialen Anstiegs sowie das Integral der Oszillationen bildeten zusammen die Area under the curve (AUC). Das Integral wurde mit den oben benannten Grenzwerten bestimmt. Die Berechnungen wurden unter manueller Eingabe der Grenzwerte mit dem in Abschnitt 2.7 beschriebenen Auswerteprogramm durchgeführt.

Diese Methode wurde für alle Versuche außer bei Teilen der Thapsigarginreihe durchgeführt, da die Aufnahmen in nicht einheitlicher Weise gespeichert wurden. Bei manchen Bilddateien gingen Farbinformationen verloren. Bei diesen waren die Intensitätswerte nicht in 255 sondern in ca. 10 Stufen darstellbar. Durch farbcodierte Darstellung (Farbtiefe „System“) in Scion Image konnten die Dateien trotzdem ausgewertet werden. Bei diesen wurden die Graphen in Excel dargestellt und die Berechnungen unter Zuhilfenahme des auch in Matlab eingesetzten Makros für das Ermitteln der AUC durchgeführt. Um die geringere Farbtiefe auszugleichen, wurden die Ergebnisse der Berechnungen prozentual angeglichen. Die Korrektur der Drift wurde bei den Messwerten mit 255 Stufen durch die standardisierte Exponentialfunktion vorgenommen und auch die AUC wurde mit dem Auswerteprogramm bestimmt. Eine verlässliche Korrektur der Drift konnte bei den farbdefizienten Bilddateien nicht durchgeführt werden. Die AUC wurde ohne Oszillationen bestimmt, da eine genaue Abgrenzung der Oszillationen bei der vorliegenden geringen Farbtiefe nicht möglich war. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde auch bei den korrekt gespeicherten Bilddateien auf die Berechnung der Oszillationen verzichtet.

2.9 Statistische Auswertung

Für alle Versuche wurden Zellen aus mindestens 2 Mäusen betrachtet.

Alle Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Die Werte für T-bet KO werden in Prozent BALB/c angegeben, wobei BALB/c 100% ist.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm „Sigma Stat für Windows.“ Zum Vergleich der einzelnen Zahlenwerte wurde ein t-test bzw. der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet. Ein p-Wert von unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

2.10 Darstellung der Graphen

Die Blockdiagramme für die Darstellung der Ergebnisse wurden mit „Sigma Plot“ angefertigt. T-bet KO wurde in Prozent BALB/c ausgedrückt.

Die Graphen für einzelne Zellen wurden mit Excel erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Auszählung des Anteils glatter Muskelzellen in der Kultur

Es wurden Zellen aus 4 Proben T-bet KO der Passagen 1 und 2 und 6 Proben BALB/c der Passagen 1 und 3 ausgezählt. Es ergab sich ein durchschnittlicher Wert von 48% α -Actin-positiver Zellen in den T-bet KO-Passagen und 56% α -Actin-positiver Zellen bei BALB/c. Es konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Passagen festgestellt werden.

3.2 Acetylcholin-induziertes Kalzium-Signaling

3.2.1 Allgemeines

Es wurden murine tracheale Muskelzellen mit dem Kalziumindikator Oregon Green beladen und während der Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen. Von den aufgenommenen Zellen zeigten 36% BALB/c- und 33% T-bet KO-Zellen eine Fluoreszenzänderung und damit einen Kalziumanstieg nach Zugabe von Acetylcholin (z.B. Abbildung 7). Die anderen hatten entweder gar keine Reaktion oder lagen unter der definierten 10% Marke der Fluoreszenzänderung.

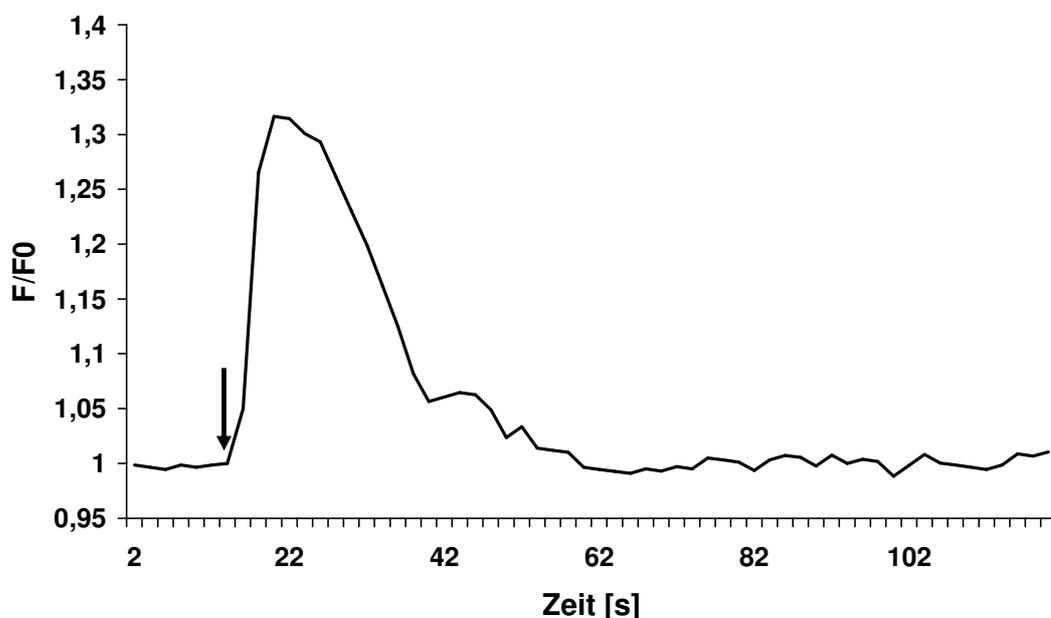


Abbildung 7 zeigt den Verlauf der Fluoreszenzänderung einer repräsentativen murinen trachealen glatten Muskelzelle nach Zugabe von Acetylcholin. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt

der ACh-Zugabe (Sekunde 14). Die Werte sind als Fluoreszenzratio, d.h. Fluoreszenzwerte F normalisiert zur initialen Fluoreszenz F_0 , gegen die Zeit aufgetragen.

3.2.2 Initialer Transient

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem initialen Kalziumtransienten von T-bet KO verglichen mit dem Wildtyp BALB/c ($n = je\ 166, p < 0,001$) (Abbildung 8).

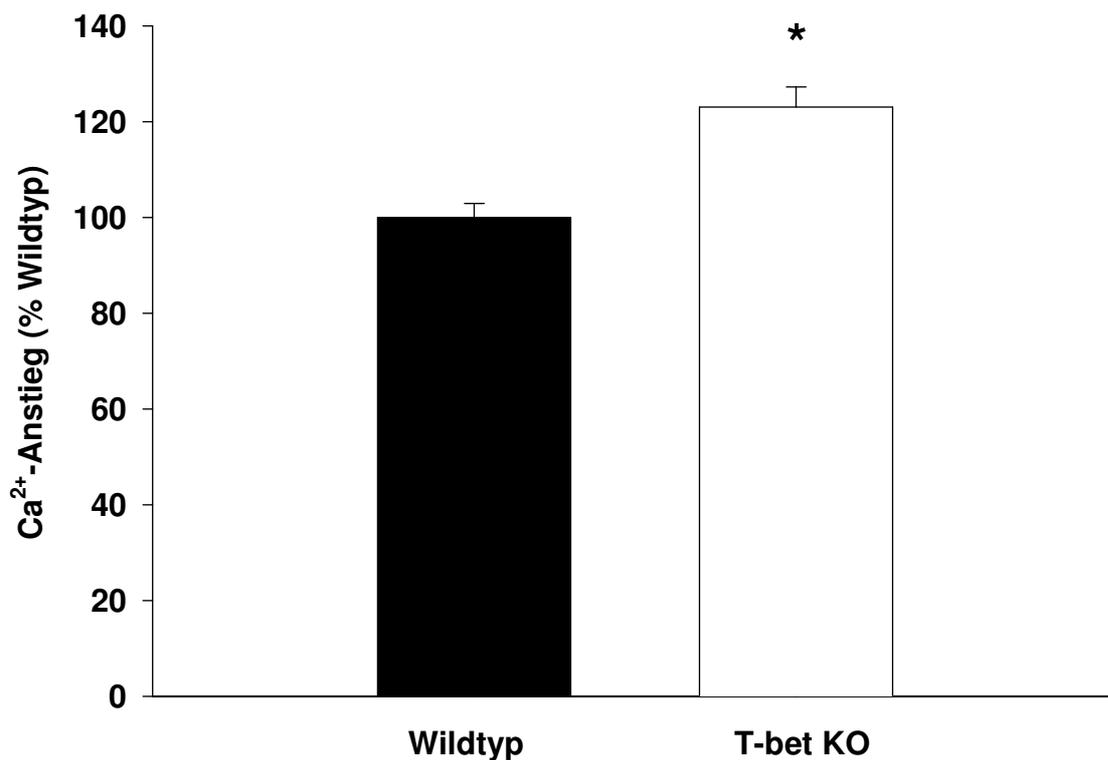


Abbildung 8 zeigt den initialen Kalziumtransienten nach Exposition der Zellen mit 1 mM ACh. Die Zellen von T-bet KO-Mäusen (weißer Balken) haben einen signifikant höheren Transienten verglichen mit dem Wildtyp BALB/c (schwarzer Balken) (123% im Vergleich zu BALB/c, $n = je\ 166, *p < 0,001$). Die Werte sind als Prozentwerte T-bet KO im Vergleich zu BALB/c mit Standardfehler angegeben.

3.2.3 Anstiegsgeschwindigkeit des initialen Transienten

Wenn man die Anstiegsgeschwindigkeit (Größe initialer Transient/Differenz der benötigten Zeit) betrachtet, ergibt sich für T-bet KO ein signifikanter Unterschied zu BALB/c. T-bet KO zeichnet sich durch eine höhere Anstiegsgeschwindigkeit aus (n = je 166, $p < 0,001$) (Abbildung 9).

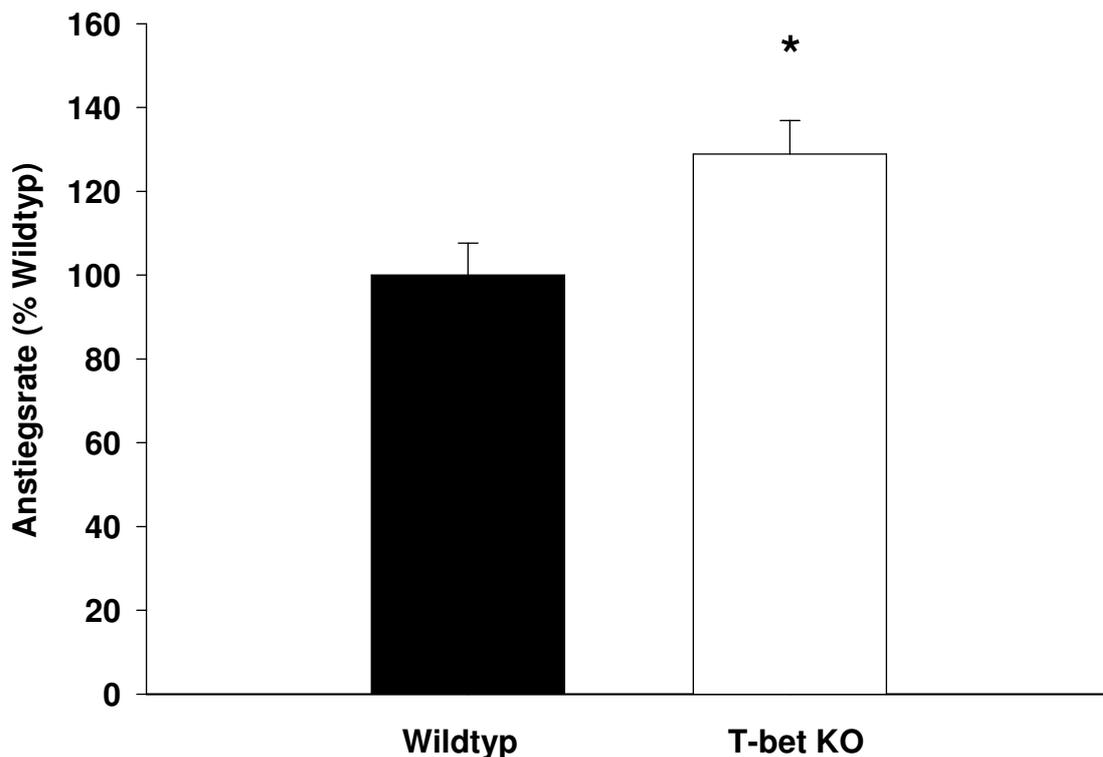


Abbildung 9 zeigt die Anstiegsgeschwindigkeit des initialen ACh-induzierten Kalziumtransienten. Die Zellen von T-bet KO-Mäusen (weißer Balken) zeigen eine signifikant höhere Anstiegsgeschwindigkeit verglichen mit dem Wildtyp BALB/c (schwarzer Balken) (129% im Vergleich zu BALB/c, n = je 166, $*p < 0,001$). Die Werte sind als Prozentwerte T-bet KO im Vergleich zu BALB/c mit Standardfehler angegeben.

3.2.4 Abfallsgeschwindigkeit des initialen Transienten

Wie schon bei den Methoden beschrieben, wurde die Höhe des Abfalls durch Wiedereintritt der Kurve in den Wertebereich des Ausgangspunktes der Fluoreszenzänderung bestimmt. In diesem Fall wäre die Höhe des Abfalls gleich der Höhe des Anstiegs. Wenn der Ausgangswert nicht erreicht wurde, wurde die Höhe des Abfalls bis zum Ende der Aufnahme bestimmt. Die Geschwindigkeit ergibt sich dann aus dem Quotienten Höhe/Zeitdifferenz. Auch bei der Berechnung der Abfallsrate des ACh-induzierten Kalziumtransienten fiel ein signifikanter Unterschied zwischen T-bet KO und BALB/c auf, wobei T-bet KO-Zellen schneller wieder in Richtung Ausgangswert abfielen ($n = je\ 166, p < 0,001$) (Abbildung 10).

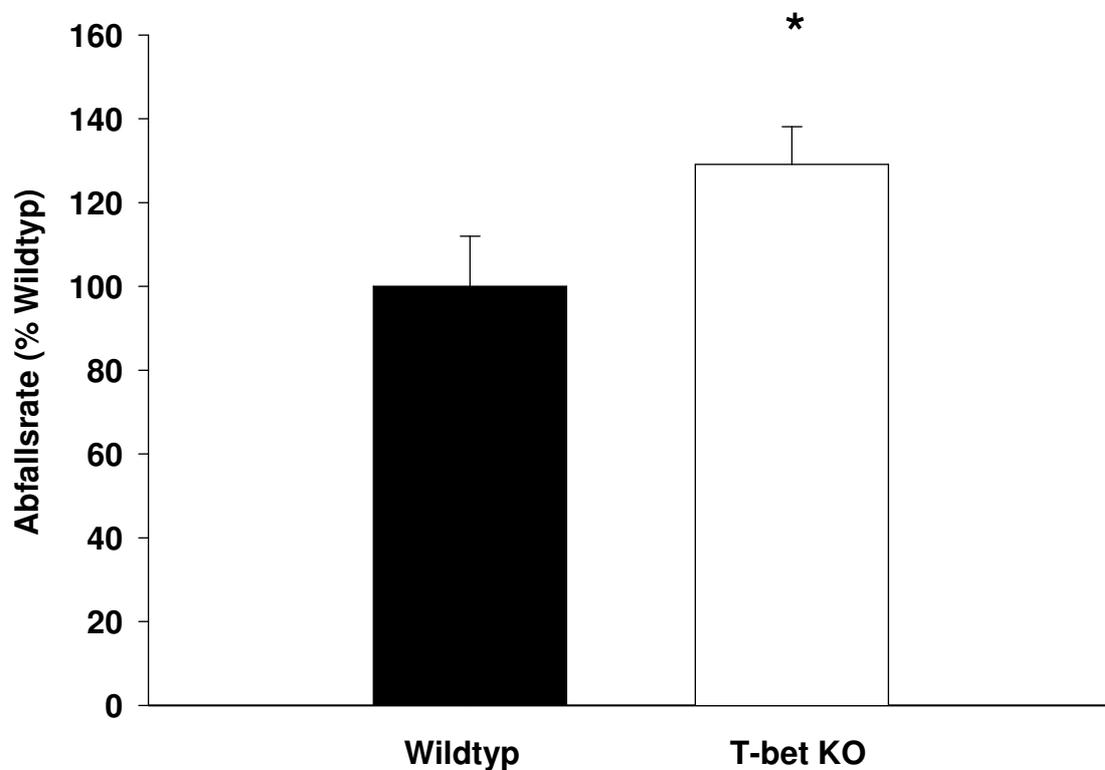


Abbildung 10 zeigt die Geschwindigkeit des Abfalls des ACh-induzierten Kalziumtransienten. Zellen von T-bet KO-Mäusen (weißer Balken) zeigen eine signifikant höhere Abfallsgeschwindigkeit verglichen mit dem Wildtyp BALB/c (schwarzer Balken) (129% im Vergleich zu BALB/c, $n = je\ 166, *p < 0,001$). Die Werte sind als Prozentwerte T-bet KO im Vergleich zu BALB/c mit Standardfehler angegeben.

3.2.5 Oszillationen

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Häufigkeit der Oszillationen beim ACh-induzierten Kalzium-Signaling im Vergleich T-bet KO und BALB/c (n = je 166, p=0,466) (Abbildung 11).

Dabei reagierten 23% der T-bet KO Zellen und 28% der BALB/c Zellen mit Oszillationen. In diesem Prozentsatz der oszillierenden Zellen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (n = je 166, p=0,393) (Abbildung 12).

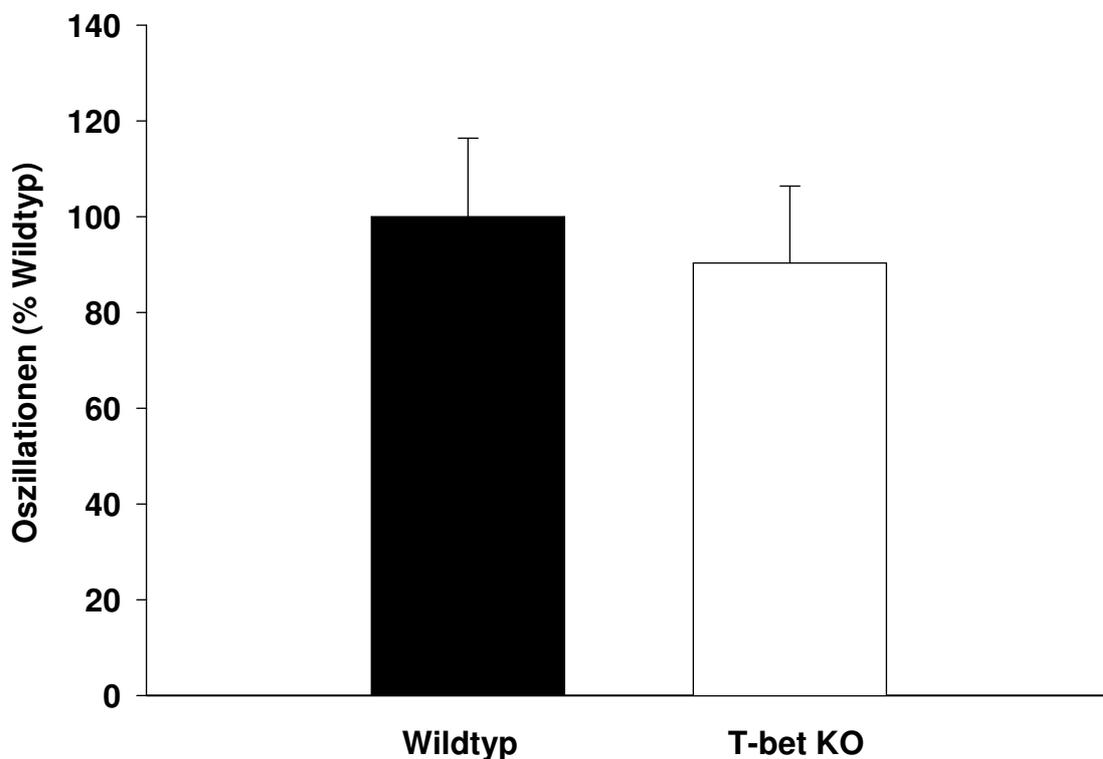


Abbildung 11 zeigt die Anzahl der ACh-induzierten Oszillationen von T-bet KO (weißer Balken) im Vergleich zu BALB/c (schwarzer Balken). T-bet KO-Zellen oszillierten weniger (90% im Vergleich zu BALB/c). Der Unterschied ist nicht signifikant (n = je 166, p=0,466). Die Werte sind als Prozentwerte T-bet KO im Vergleich zu BALB/c mit Standardfehler angegeben.

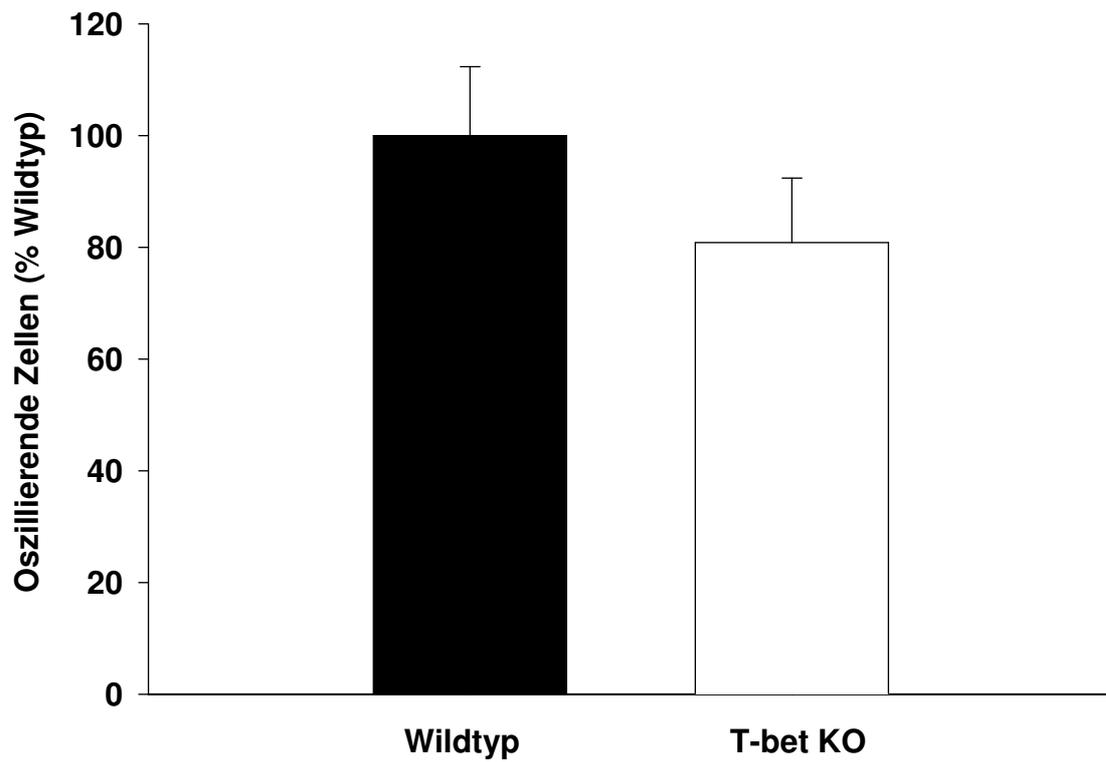


Abbildung 12 zeigt den Prozentsatz der Zellen, die Oszillationen zeigten. T-bet KO-Zellen oszillierten zu einem geringeren Prozentsatz als BALB/c-Zellen (81% im Vergleich zu BALB/c). Der Unterschied ist nicht signifikant ($n = je\ 166$, $p=0,393$). Die Werte sind als Prozentwerte T-bet KO im Vergleich zu BALB/c mit Standardfehler angegeben.

3.3 Acetylcholin-induziertes Kalzium-Signaling in kalziumfreiem Medium

Nach Fertigstellen der Färbung der Zellen mit Oregon Green wurde das sHBSS abpipettiert und durch 1 ml EDTA-Lösung ersetzt. Während der Aufnahme der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde 1 mM Acetylcholin zugeben. Bei der Durchführung und Auswertung der Versuche sah man eine Fluoreszenzänderung vor Zugabe des Acetylcholins (z.B. Abbildung 13). Die Versuchsreihe wurde abgebrochen, da keine genaue Beurteilung des ACh-induzierten Kalziumtransienten möglich war.

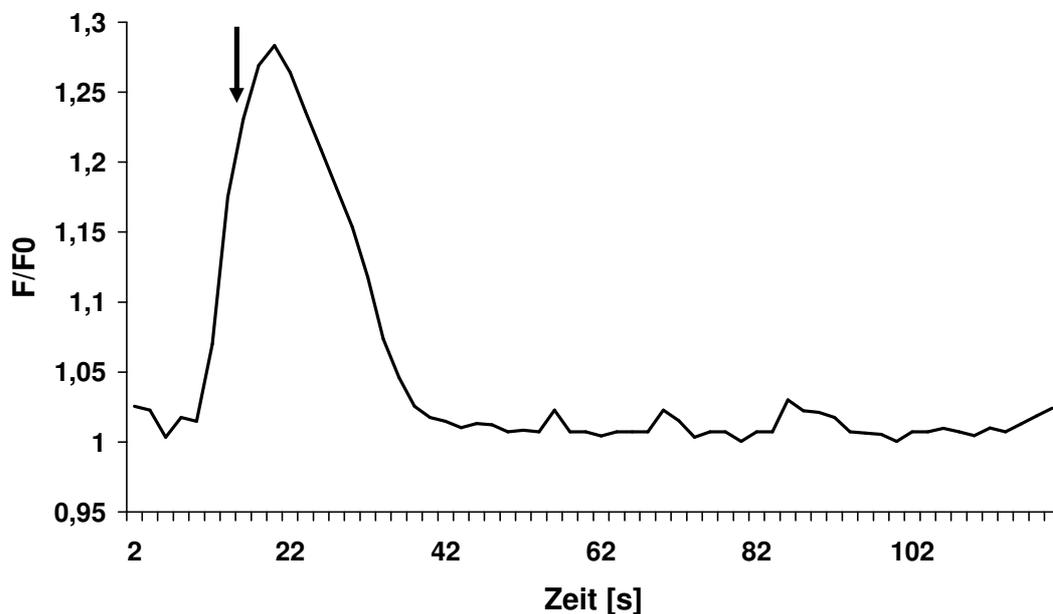


Abbildung 13 stellt eine Fluoreszenzänderung vor Zugabe von Acetylcholin dar (der Pfeil markiert den Zeitpunkt der ACh-Zugabe). Schon bei Sekunde 10 wird Kalzium in der Zelle freigesetzt. Die Werte sind als Fluoreszenzratio, d.h. Fluoreszenzwerte F normalisiert zur initialen Fluoreszenz F_0 gegen die Zeit aufgetragen.

3.4 Spontanes Kalzium-Signaling in kalziumfreiem Medium

3.4.1 Allgemeines

Nachdem bei dem Versuch der Beurteilung des ACh-induzierten Kalziumtransienten in kalziumfreiem Medium festgestellt wurde, dass sich die Fluoreszenz auch ohne Zugabe von ACh ändert, wurde hier der Effekt von kalziumfreiem Medium (EDTA-Lösung) auf das Kalzium-Signaling in trachealen glatten Muskelzellen von Mäusen untersucht. Um als Erstes zu zeigen, dass es bei Wegnahme des externen Kalziums zu einem spontanen Kalzium-Signaling in der Zelle kommt, wurde in einem Versuch EDTA-Lösung während der Mikroskopie zugegeben. Dies ergab eine spontane Änderung der Kalziumkonzentration in den Zellen (Abbildung 14).

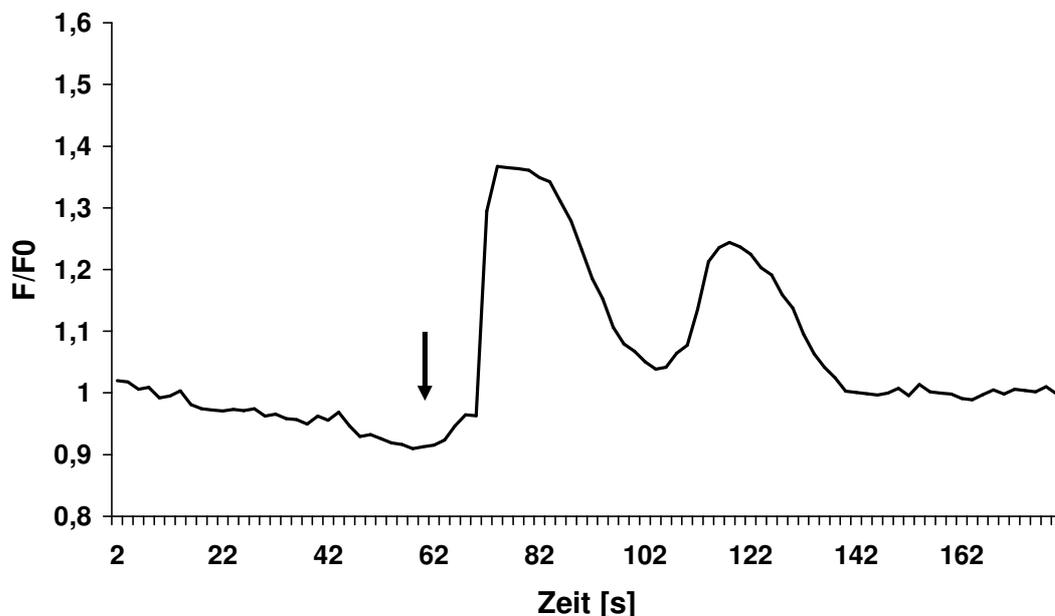


Abbildung 14 zeigt einen Anstieg des Kalziums in der Muskelzelle nach Zugabe von EDTA-Lösung und damit Entzug des externen Kalziums. Der Pfeil markiert die Zugabe von EDTA-Lösung bei Sekunde 60. Die Aufnahme wurde hier über 3 Minuten durchgeführt. Die Werte sind als Fluoreszenzratio, d.h. Fluoreszenzwerte F normalisiert zur initialen Fluoreszenz F_0 gegen die Zeit aufgetragen.

Da die Bildqualität sich durch Zugabe von 1 ml Lösung enorm verschlechterte, wurde bei den folgenden Versuchen die EDTA-Lösung schon vor dem Platzieren unter dem Mikroskop zugegeben. Bei Vergleich der Zellen von T-bet KO und BALB/c kam es zu den folgenden Ergebnissen: Es zeigten 46% der aufgenommenen BALB/c-Zellen und 31% der T-bet KO-

Zellen eine Fluoreszenzänderung um 10% und damit einen Kalziumanstieg nach Zugabe von 1 ml EDTA-Lösung.

3.4.2 Maximale Fluoreszenzänderung

Hier wurde nicht der initiale Transient sondern die maximale Fluoreszenzänderung untersucht, da der initiale Transient durch Reaktionsbeginn vor dem Mikroskopieren nicht zu bestimmen war. Es zeigte sich, bei Vergleich der maximalen sichtbaren Fluoreszenzänderung, ein signifikanter Unterschied zwischen T-bet KO und BALB/c. BALB/c hatte höhere Transienten als T-bet KO ($n = je\ 116, p < 0,001$) (Abbildung 15).

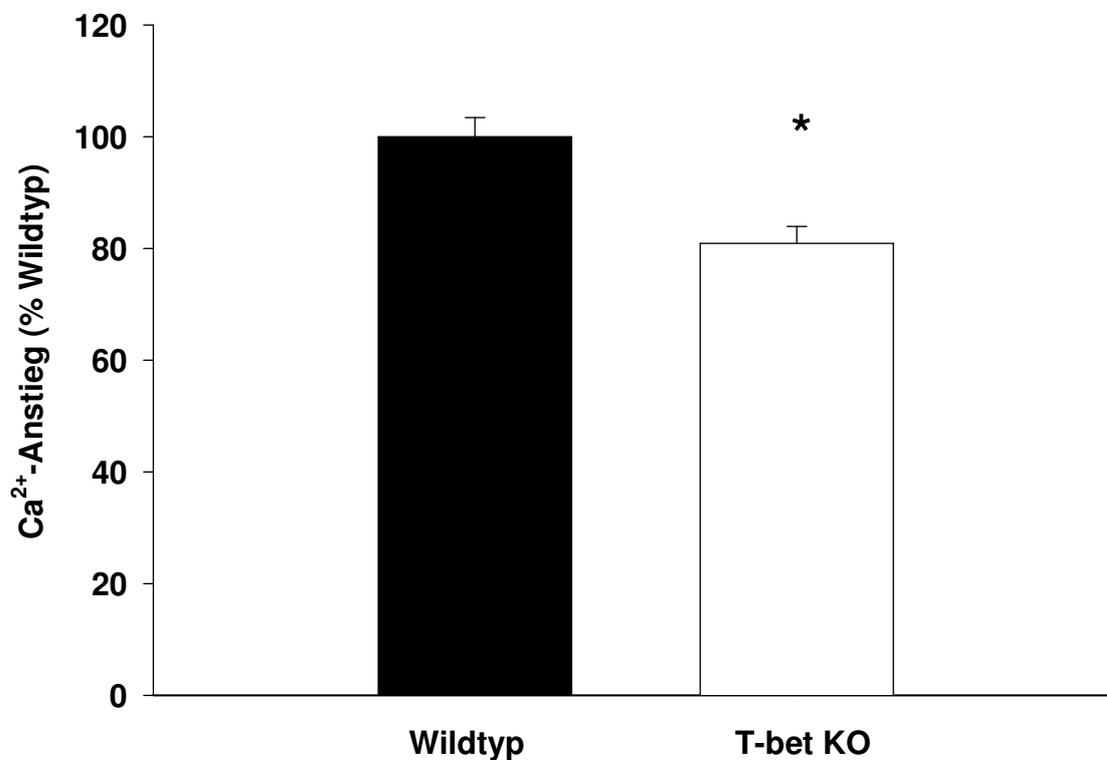


Abbildung 15 zeigt den maximalen Kalziumtransienten nach Entzug des externen Kalziums mit 1 ml EDTA-Lösung. Die Zellen von T-bet KO-Mäusen (weißer Balken) zeigen einen signifikant niedrigeren Transienten verglichen mit dem Wildtyp BALB/c (schwarzer Balken) (81% im Vergleich zu BALB/c, $n = je\ 116, *p < 0,001$). Die Werte sind als Prozentwerte T-bet KO im Vergleich zu BALB/c mit Standardfehler angegeben.

3.4.3 Anstiegsgeschwindigkeit der maximalen Fluoreszenzänderung

Beim Vergleich der Anstiegsgeschwindigkeiten weist BALB/c signifikant höhere Werte als T-bet KO auf (n = je 116, $p < 0,001$) (Abbildung 16).

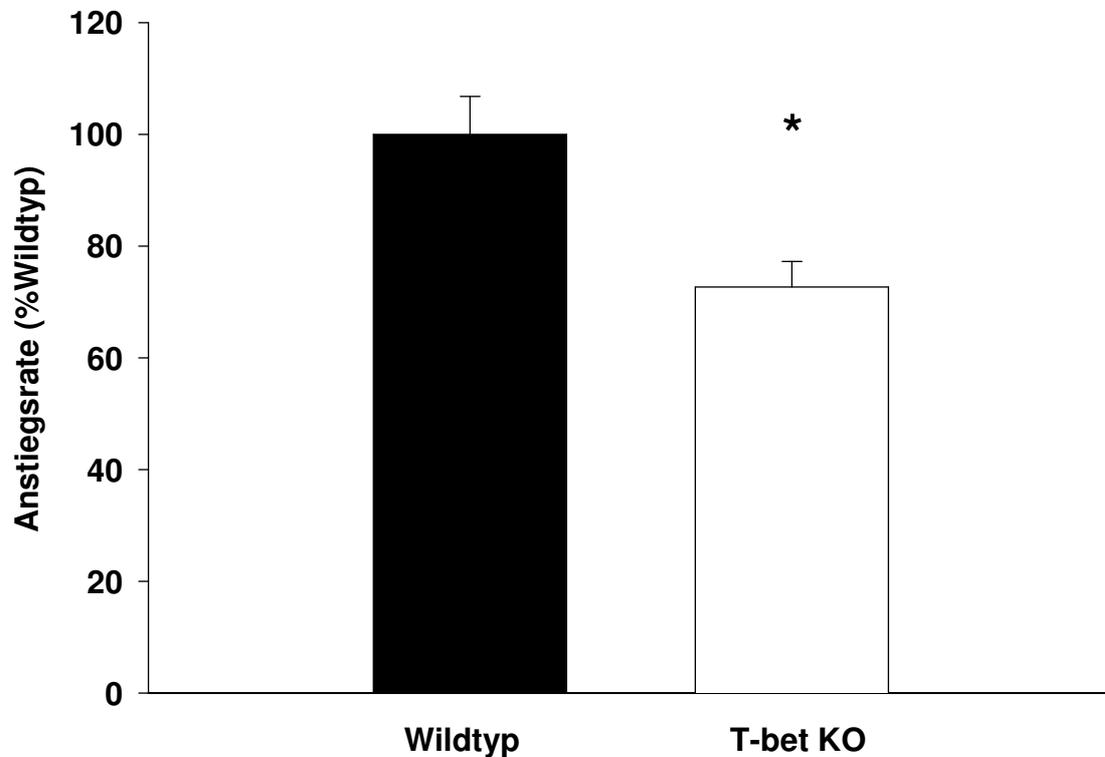


Abbildung 16 zeigt die Anstiegsgeschwindigkeit des maximalen Kalziumtransienten in kalziumfreiem Medium. Die Zellen von T-bet KO-Mäusen (weißer Balken) zeigen eine signifikant niedrigere Anstiegsgeschwindigkeit verglichen mit dem Wildtyp BALB/c (schwarzer Balken) (73% im Vergleich zu BALB/c, n = je 116, $*p < 0,001$). Die Werte sind als Prozentwerte T-bet KO im Vergleich zu BALB/c mit Standardfehler angegeben.

3.4.4 Abfallsgeschwindigkeit der maximalen Fluoreszenzänderung

Die Abfallsgeschwindigkeit stellte sich bei T-bet KO signifikant niedriger im Vergleich zu BALB/c dar (n = 116, $p < 0,001$) (Abbildung 17).

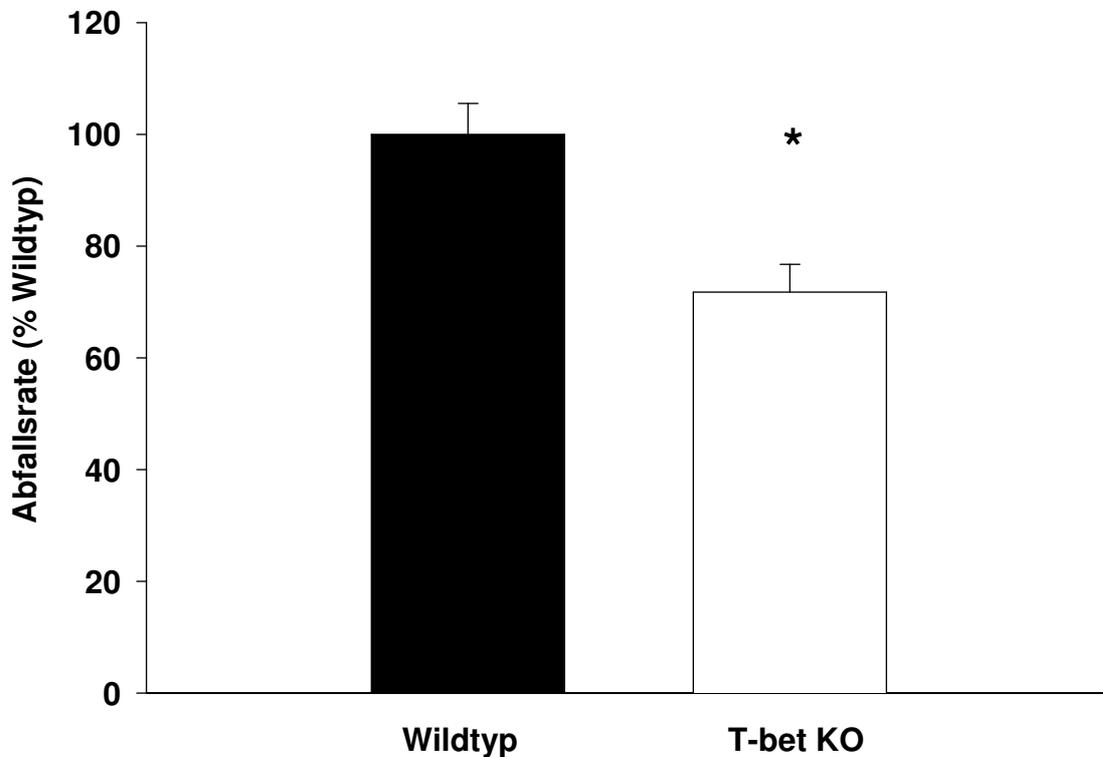


Abbildung 17 zeigt die Geschwindigkeit des Abfalls der maximalen Fluoreszenzänderung bei Entzug des externen Kalziums. Zellen von T-bet KO-Mäusen (weißer Balken) zeigen eine signifikant niedrigere Abfallsgeschwindigkeit des maximalen Kalziumtransienten verglichen mit dem Wildtyp BALB/c (schwarzer Balken) (72% im Vergleich zu BALB/c, n = je 116, $*p < 0,001$). Die Werte sind als Prozentwerte T-bet KO im Vergleich zu BALB/c mit Standardfehler angegeben.

3.4.5 Häufigkeit der Fluoreszenzänderungen

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der Fluoreszenzänderungen in kalziumfreiem Medium im Vergleich von T-bet KO und BALB/c (n = je 116, p=0,207) (Abbildung 18).

84% der T-bet KO- und 68% der BALB/c-Zellen zeigten mehrere Fluoreszenzänderungen pro Messung. Der Unterschied zwischen dem Prozentsatz „oszillierender“ T-bet KO- und BALB/c-Zellen erwies sich als signifikant (n = 116, p<0,05) (Abbildung 19).

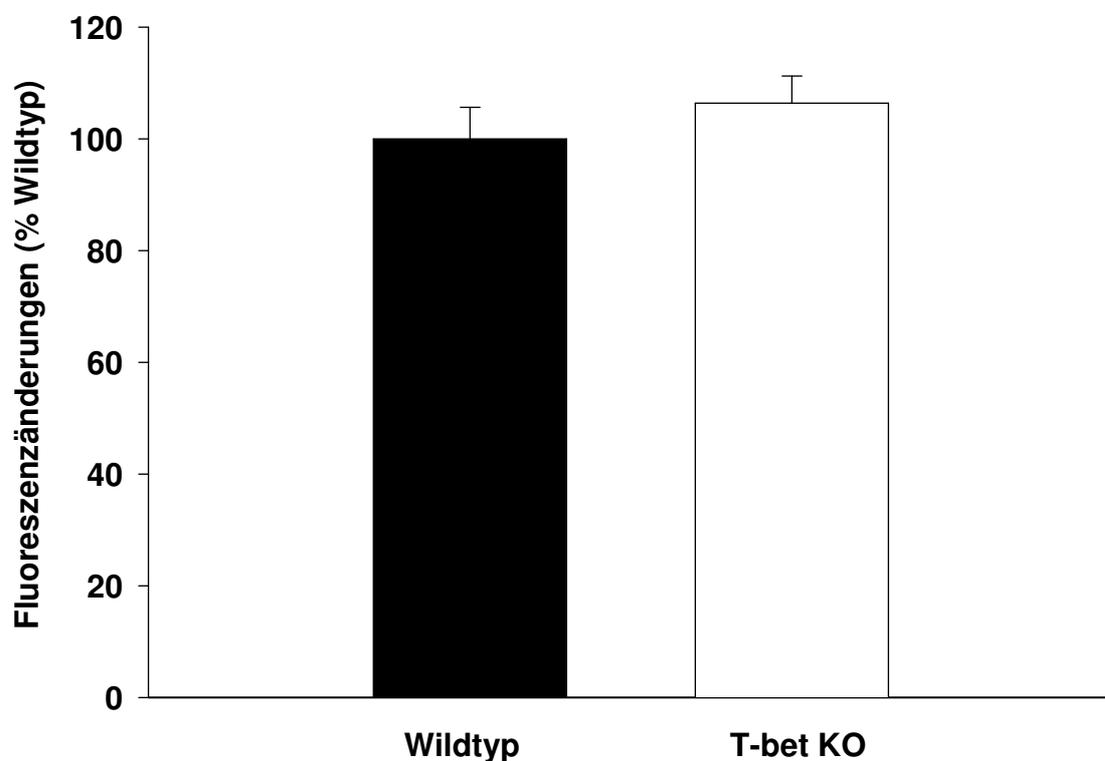


Abbildung 18 zeigt die Anzahl der Fluoreszenzänderungen von T-bet KO-Zellen (weißer Balken) im Vergleich zu BALB/c (schwarzer Balken) in EDTA-Lösung. T-Bet KO-Zellen hatten eine höhere Anzahl (106% im Vergleich zu BALB/c). Der Unterschied ist nicht signifikant (n = je 116, p=0,207). Die Werte sind als Prozentwerte T-bet KO im Vergleich zu BALB/c mit Standardfehler angegeben.

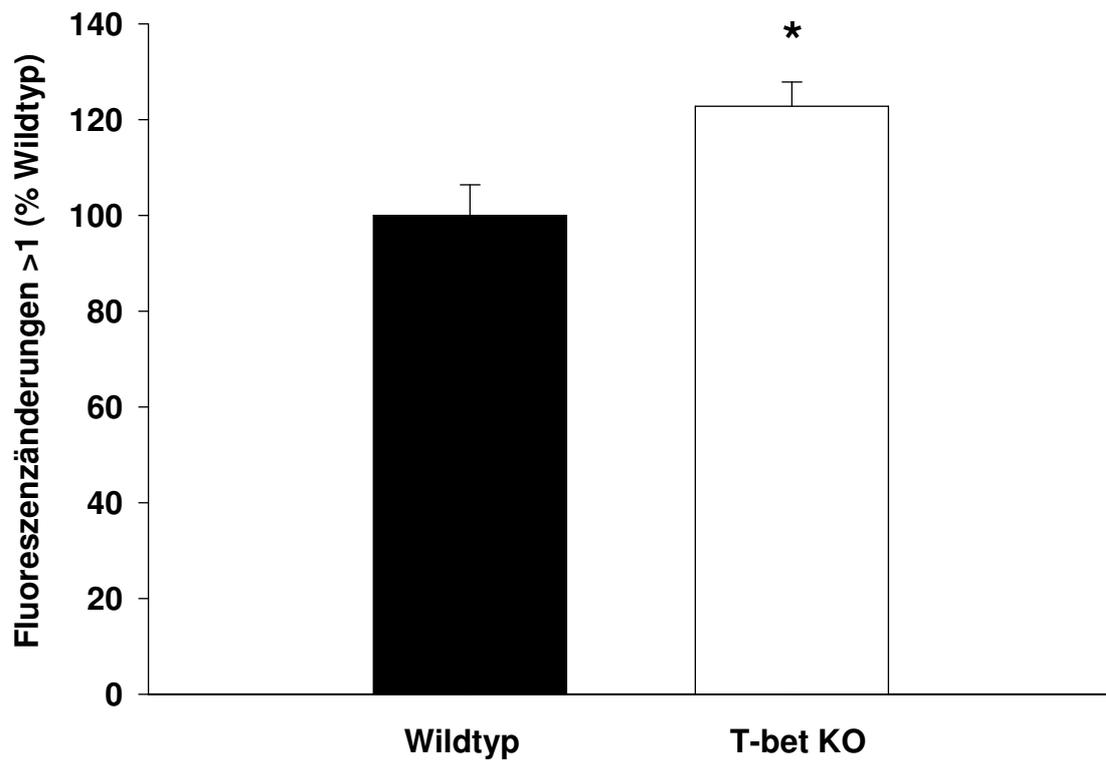


Abbildung 19 zeigt den Prozentsatz der Zellen mit mehreren Fluoreszenzänderungen in EDTA-Lösung. T-bet KO-Zellen zeigten zu einem höheren Prozentsatz mehrere Fluoreszenzänderungen als BALB/c-Zellen (123% im Vergleich zu BALB/c, n = je 116, *p<0,05). Die Werte sind als Prozentwerte T-bet KO im Vergleich zu BALB/c mit Standardfehler angegeben.

3.5 Acetylcholin-induziertes versus spontanes Kalzium-Signaling

3.5.1 Initialer Transient versus maximale Fluoreszenzänderung

3.5.1.1 BALB/c

Zwischen dem initialen Transienten bei ACh-Zugabe und dem spontanen maximalen Transienten in kalziumfreiem Medium sah man keinen signifikanten Unterschied zwischen den BALB/c-Zellen (ACh-Zugabe entspricht 100%, spontaner Transient in EDTA-Lösung entspricht 106%, $n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, $p=0,229$).

3.5.1.2 T-bet KO

Bei den T-bet KO-Zellen stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem initialen Transienten bei ACh-Zugabe und dem spontanen maximalen Transienten in kalziumfreiem Medium heraus. Der spontane maximale Transient ist kleiner als der Acetylcholin-induzierte initiale Transient (69% im Vergleich zu ACh-induziertem Transient, $n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, $p<0,001$) (Abbildung 20).

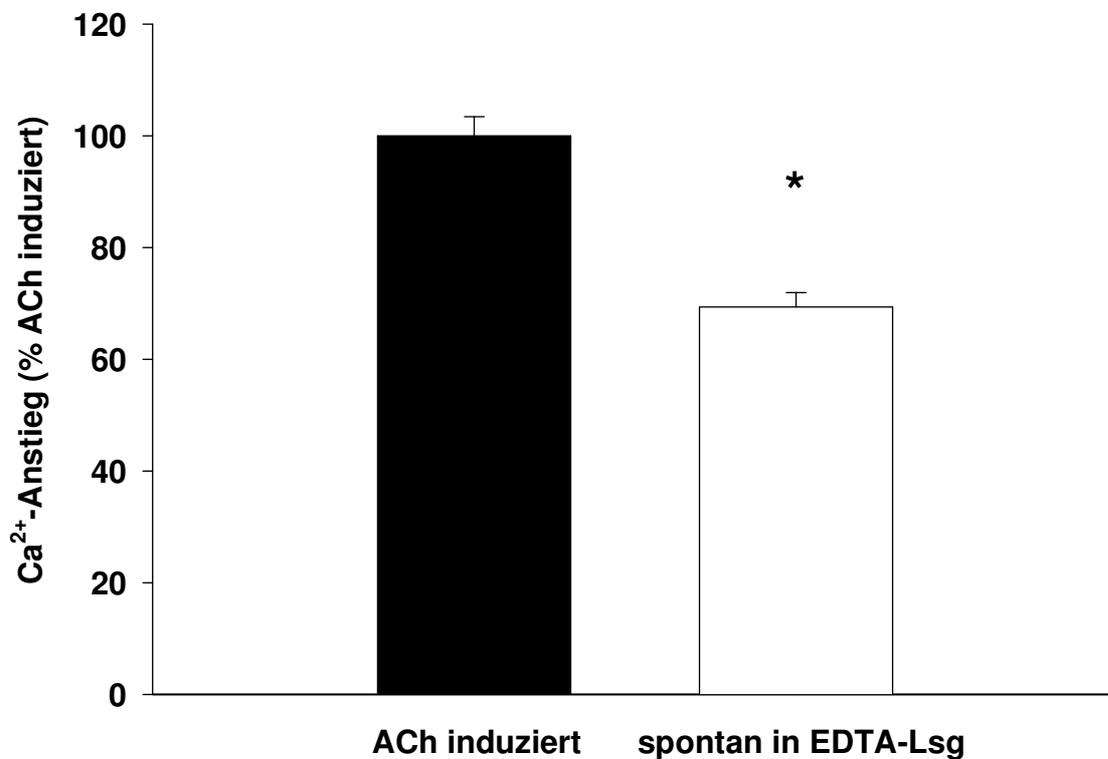


Abbildung 20 zeigt den Vergleich des ACh-induzierten initialen Transienten mit dem maximalen Kalziumtransienten nach Entzug des externen Kalziums mit 1 ml EDTA-Lösung bei T-bet KO. Die Zellen mit spontanem maximalen Transienten (weißer Balken) zeigen einen signifikant niedrigeren Transienten verglichen mit dem ACh-induzierten initialen Transienten (schwarzer Balken) (69% im Vergleich zu ACh-induziertem Transient, $n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, $*p < 0,001$). Die Werte sind als Prozentwerte der spontanen Fluoreszenzänderung im Vergleich zur ACh-induzierten Fluoreszenzänderung mit Standardfehler angegeben.

3.5.2 Anstiegsrate

3.5.2.1 BALB/c

Beim Vergleich der Anstiegsraten bei ACh-Zugabe und des spontanen maximalen Transienten in kalziumfreiem Medium ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den BALB/c-Zellen (76% im Vergleich zur Anstiegsrate des ACh-induziertem Transienten, $n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, $p = 0,068$).

3.5.2.2 T-bet KO

Bei den T-bet KO-Zellen sah man einen signifikanten Unterschied zwischen den Anstiegsraten des initialen Transienten bei ACh-Zugabe und des spontanen maximalen Transienten in kalziumfreiem Medium. Letztere ist niedriger als die des Acetylcholin-induzierten initialen Transienten (43% im Vergleich zur Anstiegsrate des ACh-induziertem Transienten, $n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, $p < 0,001$) (Abbildung 21).

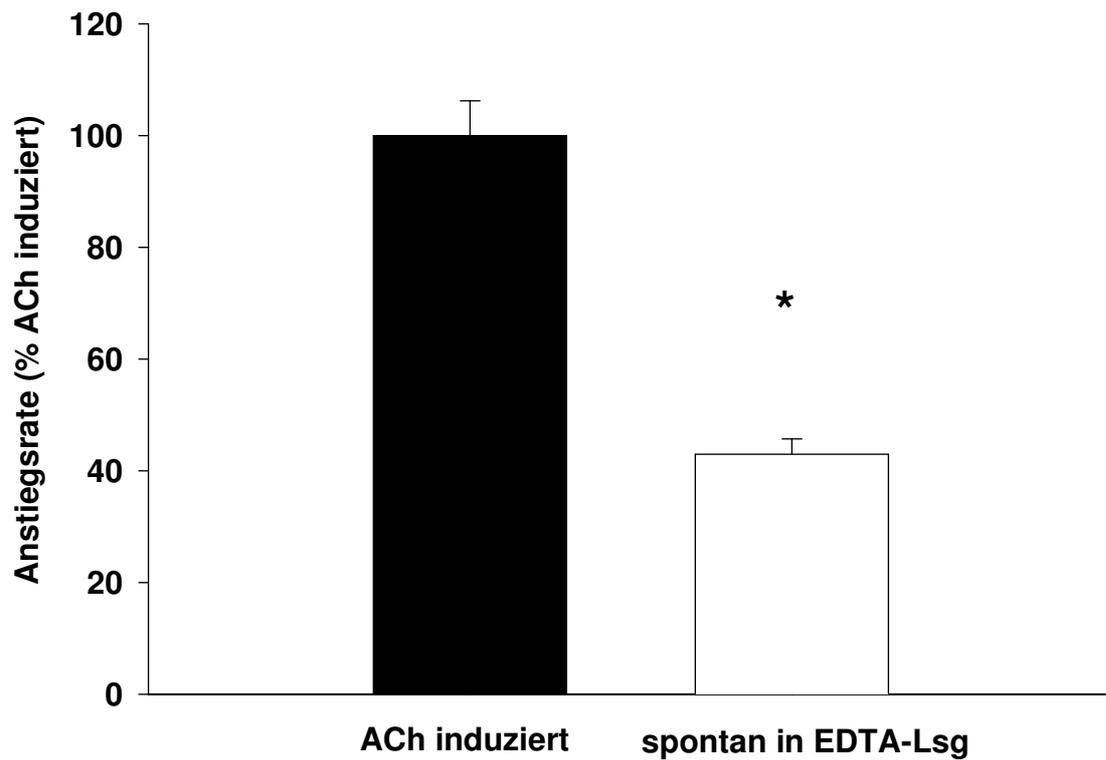


Abbildung 21 zeigt den Vergleich der Anstiegsgeschwindigkeit des ACh-induzierten initialen Transienten mit der des maximalen Kalziumtransienten nach Entzug des externen Kalziums mit 1 ml EDTA-Lösung bei T-bet KO. Die Zellen mit spontanem maximalen Transienten (weißer Balken) zeigen eine signifikant niedrigere Anstiegsgeschwindigkeit verglichen mit der des ACh-induzierten initialen Transienten (schwarzer Balken) (43% im Vergleich zur Anstiegsrate des ACh-induzierten Transienten, $n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, $*p < 0,001$). Die Werte sind als Prozentwerte der spontanen Fluoreszenzänderung im Vergleich zur ACh-induzierten Fluoreszenzänderung mit Standardfehler angegeben.

3.5.3 Abfallsrate

Sowohl bei BALB/c (Abbildung 22a) als auch bei T-bet KO (Abbildung 22b) sind die Abfallsgeschwindigkeiten signifikant höher bei den spontanen maximalen Transienten in kalziumfreiem Medium als bei ACh-induzierten Transienten. Dabei handelt es sich bei BALB/c um eine 479%ige Steigerung im Vergleich zur Abfallsrate des ACh-induzierten Transienten. Bei T-bet KO-Zellen war die Rate um 266% gesteigert ($n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, p jeweils $<0,001$).

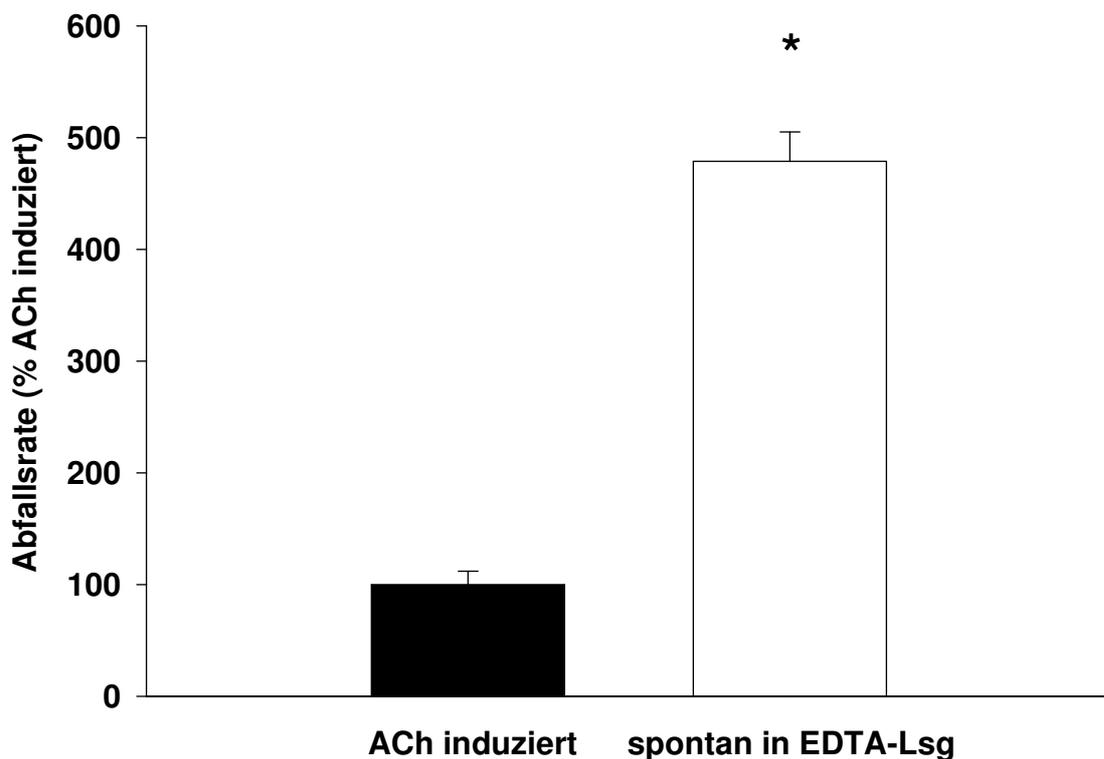


Abbildung 22a zeigt den Vergleich der Abfallsgeschwindigkeit des ACh-induzierten initialen Transienten mit der des maximalen Kalziumtransienten nach Entzug des externen Kalziums mit 1 ml EDTA-Lösung bei BALB/c. Die Zellen mit spontanem maximalen Transienten (weißer Balken) zeigen eine signifikant höhere Abfallsgeschwindigkeit verglichen mit der des ACh-induzierten initialen Transienten (schwarzer Balken) (266% im Vergleich zur Abfallsrate des ACh-induziertem Transienten, $n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, $*p < 0,001$). Die Werte sind als Prozentwerte der spontanen Fluoreszenzänderung im Vergleich zur ACh-induzierten Fluoreszenzänderung mit Standardfehler angegeben.

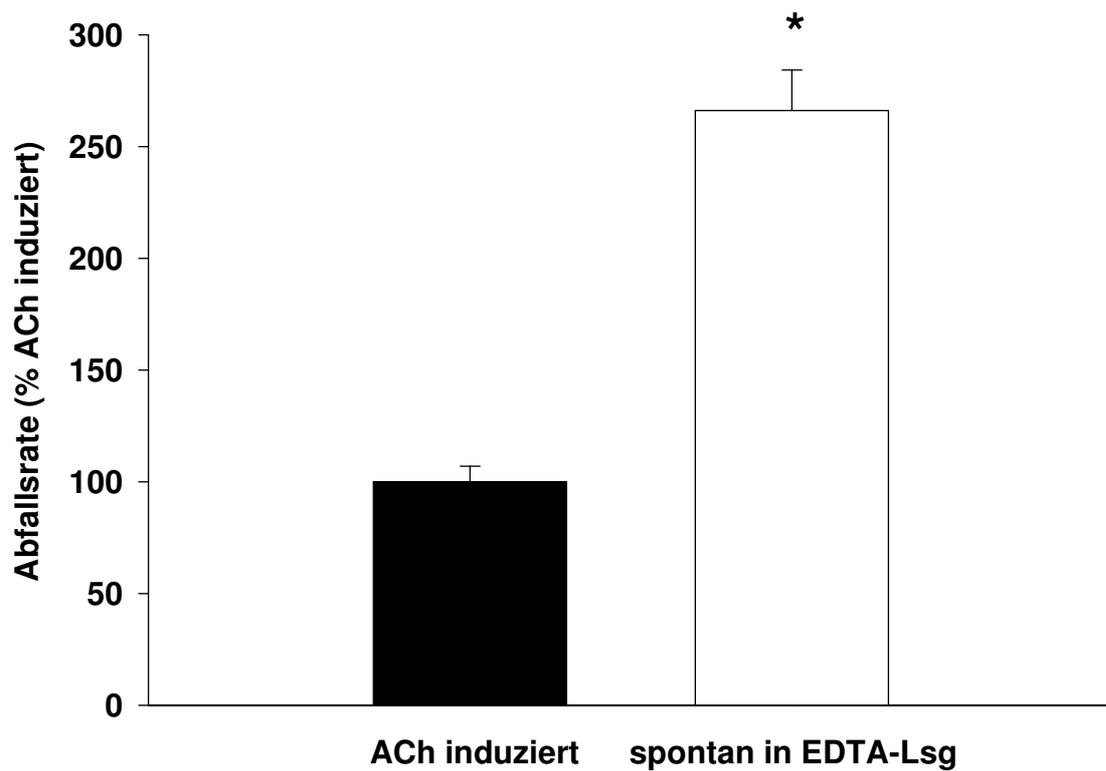


Abbildung 22b zeigt den Vergleich der Abfallsgeschwindigkeit des ACh-induzierten initialen Transienten mit der des maximalen Kalziumtransienten nach Entzug des externen Kalziums mit 1 ml EDTA-Lösung bei T-bet KO. Die Zellen mit spontanem maximalen Transienten (weißer Balken) zeigen eine signifikant höhere Abfallsgeschwindigkeit verglichen mit der des ACh-induzierten initialen Transienten (schwarzer Balken) (479% im Vergleich zur Abfallsrate des ACh induziertem Transienten, $n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, $*p < 0,001$). Die Werte sind als Prozentwerte der spontanen Fluoreszenzänderung im Vergleich zur ACh-induzierten Fluoreszenzänderung mit Standardfehler angegeben.

3.5.4 Anzahl der Oszillationen und Fluoreszenzänderungen

Die Häufigkeit sowie der Prozentsatz der oszillierenden Zellen war bei BALB/c (Abbildung 23a, 24a) und T-bet KO (Abbildung 23b, 24b) höher in kalziumfreiem Medium verglichen mit Acetylcholin-Induktion. Bei BALB/c handelt es sich um eine um 436% erhöhte Anzahl bei einem um 241% erhöhten Satz an Zellen, die Oszillationen zeigen. Bei T-bet KO-Zellen oszillierten 365% mehr Zellen mit einer um 514% erhöhten Anzahl ($n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, p jeweils $<0,001$).

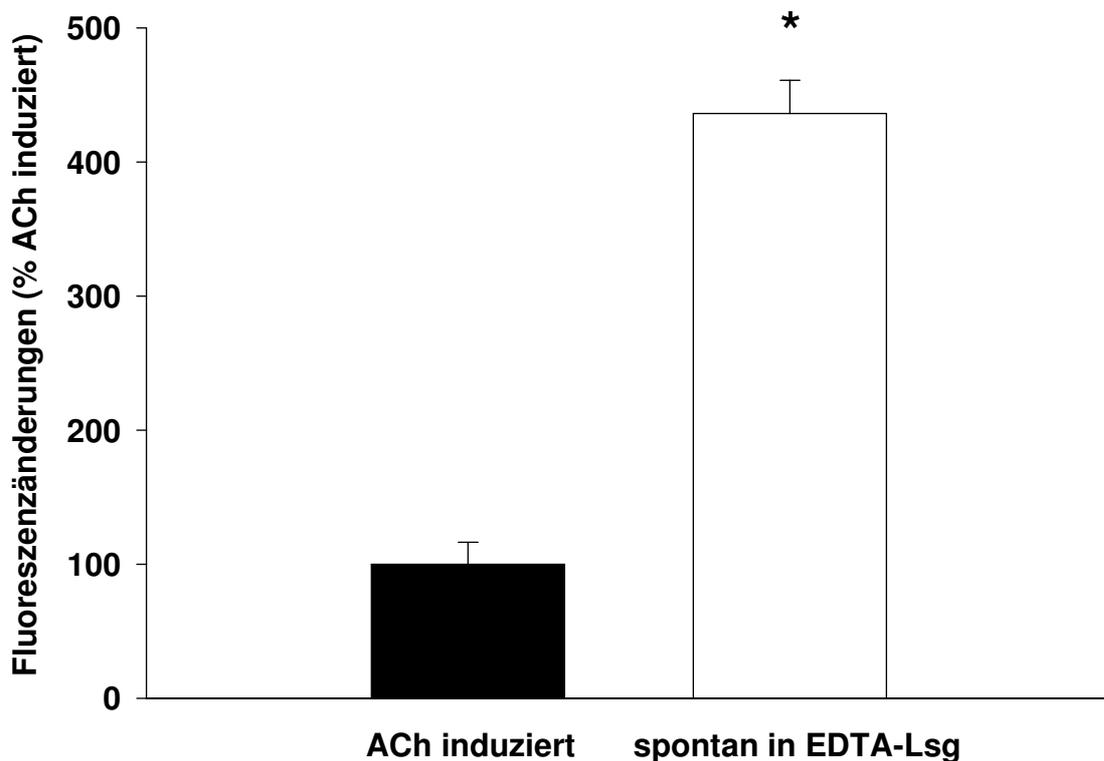


Abbildung 23a stellt den Unterschied zwischen der Häufigkeit der Oszillationen bei Stimulierung der Zellen mit Acetylcholin und der Häufigkeit der Fluoreszenzänderungen in kalziumfreiem Medium bei Zellen von BALB/c dar. Dabei ist sie in kalziumfreiem Medium höher (436% im Vergleich zur Anzahl der ACh-induziertem Oszillationen, $n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, $*p < 0,001$).

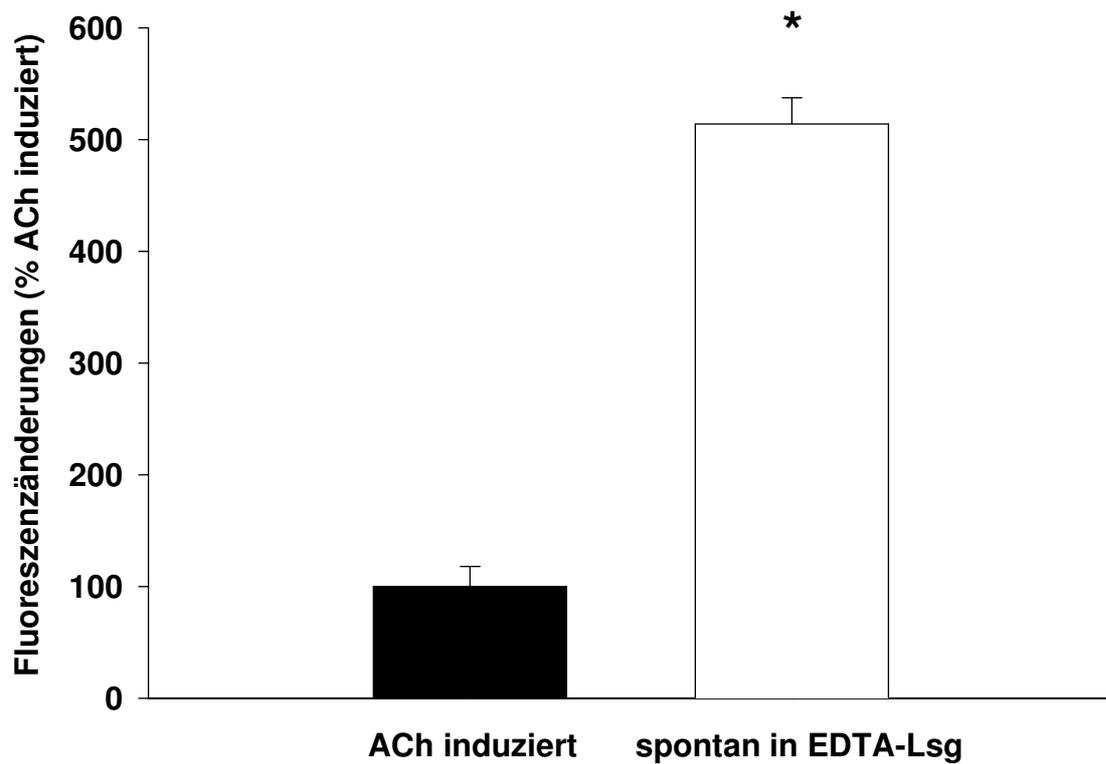


Abbildung 23b stellt den Unterschied zwischen der Häufigkeit der Oszillationen bei Stimulierung der Zelle mit Acetylcholin und der Häufigkeit der Fluoreszenzänderungen in kalziumfreiem Medium bei Zellen von T-bet KO dar. Dabei ist die Anzahl in kalziumfreiem Medium höher (514% im Vergleich zur Häufigkeit der ACh-induziertem Oszillationen, $n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, $*p < 0,001$)

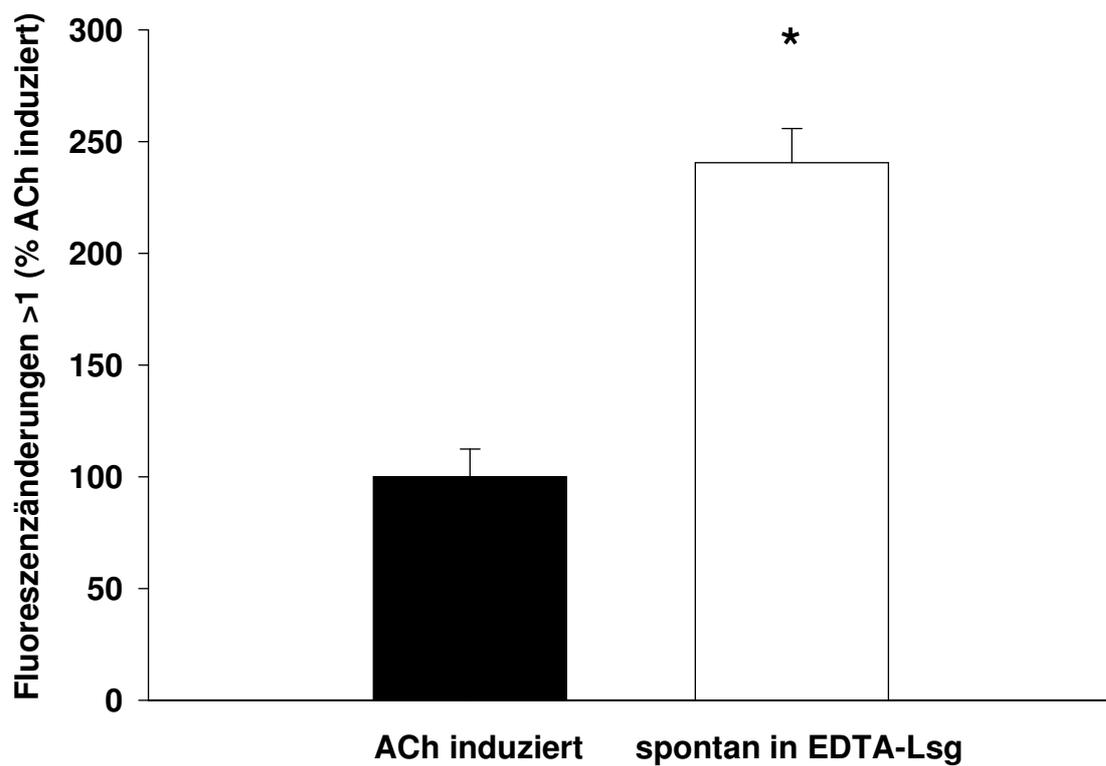


Abbildung 24a stellt den Vergleich des Prozentsatzes der Zellen, die Oszillationen bei ACh-induziertem Signaling mit dem der Zellen, die Fluoreszenzänderungen in kalziumfreiem Medium bei BALB/c zeigen, dar. In kalziumfreiem Medium zeigt ein höherer Prozentsatz der Zellen mehr als eine Fluoreszenzänderung (241% im Vergleich zu % der Zellen mit ACh-induziertem Oszillationen, $n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, $*p < 0,001$).

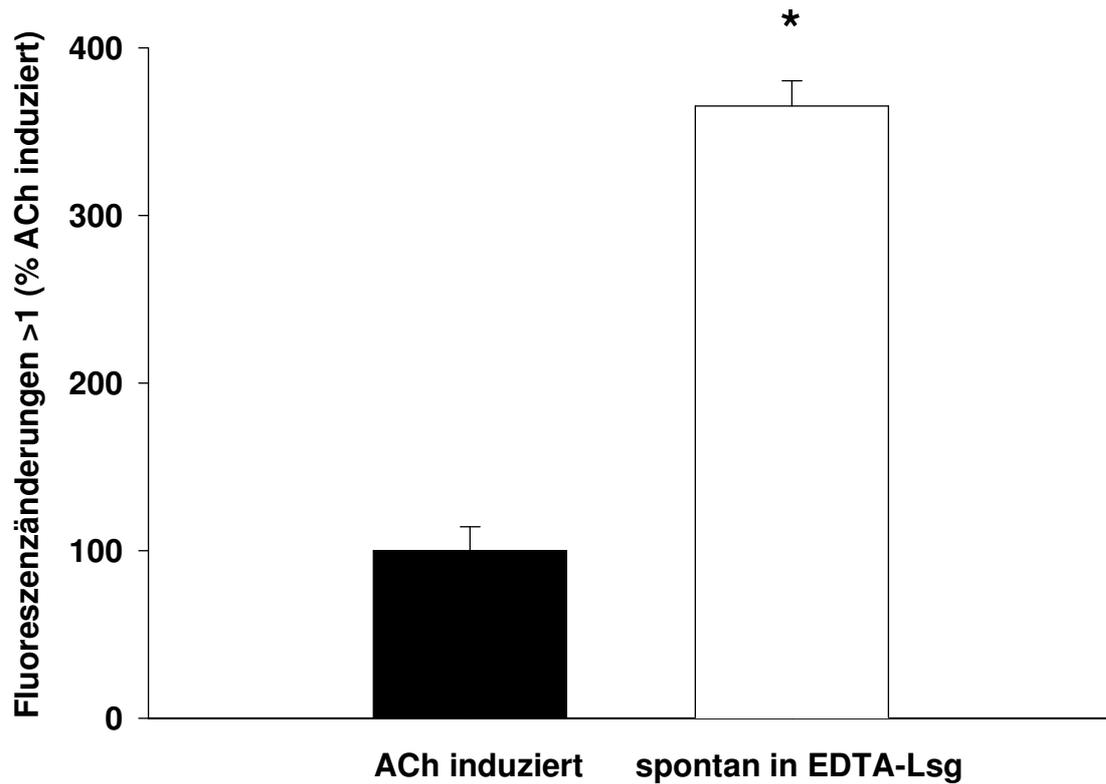


Abbildung 24b stellt den Vergleich des Prozentsatzes der Zellen, die Oszillationen bei ACh-induziertem Signaling mit dem der Zellen, die Fluoreszenzänderungen in kalziumfreiem Medium bei T-bet KO zeigen, dar. In kalziumfreiem Medium zeigt ein höherer Prozentsatz der Zellen mehr als eine Fluoreszenzänderung (365% im Vergleich zu % der Zellen mit ACh-induziertem Oszillationen, $n_{\text{ACh}} = 166$, $n_{\text{EDTA}} = 116$, $*p < 0,001$).

3.6 Beteiligung von IP₃-Rezeptoren

Ziel war es, herauszufinden, ob in murinen trachealen glatten Muskelzellen die IP₃-Rezeptoren an der Kalziumhomöostase beteiligt sind. Dazu wurden Zellen aus zwei BALB/c-Mäusen mit Xestospongine D inkubiert und anschließend, unter Zugabe von Acetylcholin, während des Mikroskopierens aufgenommen. Es wurde der initiale Kalziumtransient dieser Zellen mit dem initialen Transienten der BALB/c-Zellen des Acetylcholin-Versuchs ohne Xestospongine D (n = 166) verglichen. Eine Reihe Zellen wurde mit 10 µM Xestospongine D blockiert, davon reagierten 30% (n = 32) mit einem Kalziumanstieg nach ACh-Zugabe. Eine zweite Gruppe von Zellen wurde mit 50 µM blockiert, hier reagierten 42% (n = 12) der Zellen auf Acetylcholin.

Bei den mit 10 µM inkubierten Zellen ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Xestospongine D beladenen Zellen und den Kontrollen. Die mit Xestospongine D inkubierten Zellen hatten einen geringeren Kalziumtransienten (n = 32/166, p<0,001) (Abbildung 25a).

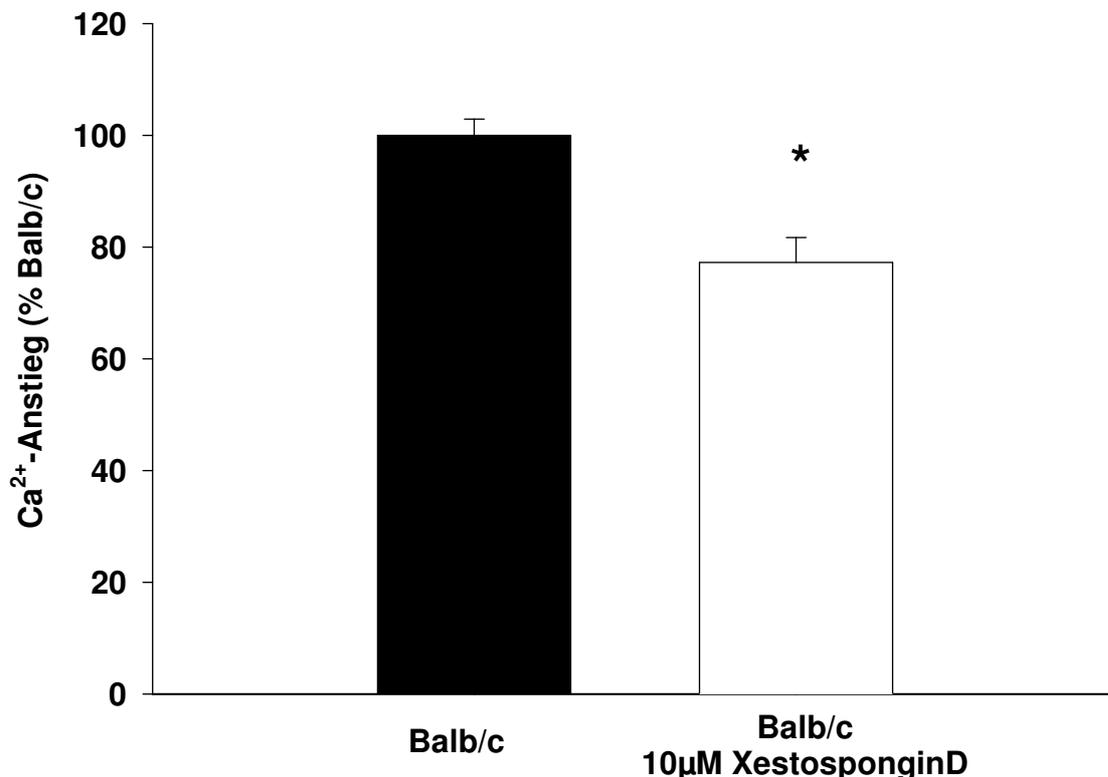


Abbildung 25a zeigt den initialen Kalziumtransienten nach Exposition der Zellen mit 1 mM ACh. Die Zellen von BALB/c-Mäusen mit 10 µM Xestospongine D (weißer Balken) zeigen

einen signifikant niedrigeren Transienten verglichen mit den Kontrollen BALB/c ohne Xestospongin D (schwarzer Balken) (77% im Vergleich zu BALB/c ohne Xestospongin D, n = 32/166, *p<0,001). Die Werte sind als Prozentwerte BALB/c mit 10 μ M Xestospongin D im Vergleich zu BALB/c ohne Xestospongin D mit Standardfehler angegeben.

Bei den Zellen, die mit 50 μ M Xestospongin D inkubiert wurden, sah man einen signifikant höheren Transienten verglichen mit den Kontrollen (n = 12/166, p<0,05) (Abbildung 25b). Man beachte die geringe Anzahl der beobachteten Zellen.

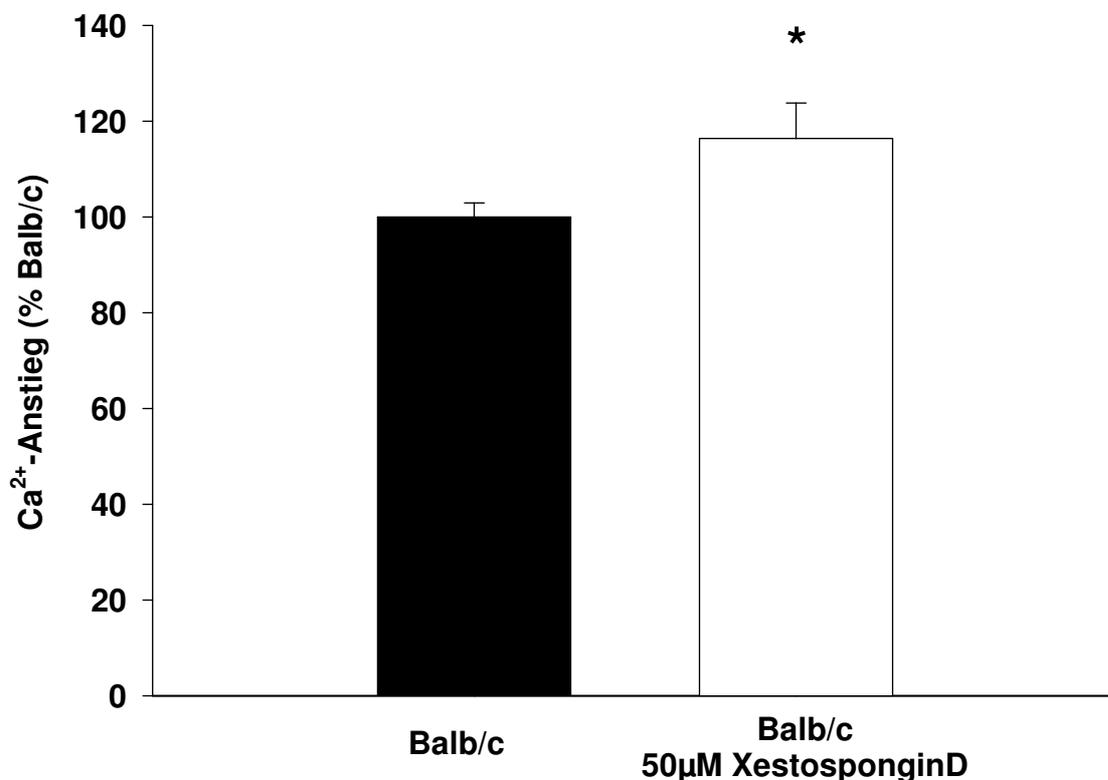


Abbildung 25b zeigt den initialen Kalziumtransienten nach Exposition der Zellen mit 1 mM ACh. Die Zellen von BALB/c-Mäusen mit 50 μ M Xestospongin D (weißer Balken) zeigen einen signifikant höheren Transienten verglichen mit den Kontrollen BALB/c ohne Xestospongin D (schwarzer Balken) (116% im Vergleich zu BALB/c ohne Xestospongin D, n = 12/166, *p<0,05). Die Werte sind als Prozentwerte BALB/c mit 50 μ M Xestospongin D im Vergleich zu BALB/c ohne Xestospongin D mit Standardfehler angegeben.

Betrachtet man die Transienten der mit 10 μM und mit 50 μM inkubierten Zellen zusammen im Vergleich zu den Kontrollen, so ergibt sich ein insgesamt signifikant niedrigerer Transient der inkubierten Zellen ($n = 44/166$, $p < 0,05$) (Abbildung 25c).

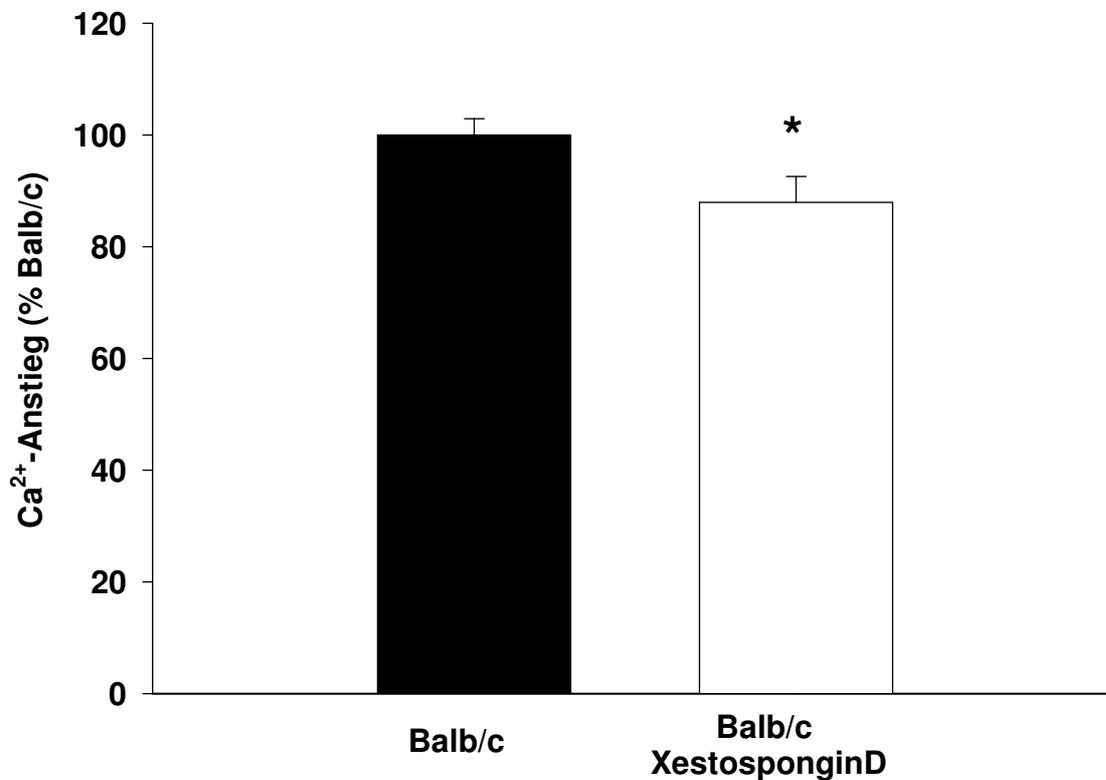


Abbildung 25c zeigt den initialen Kalziumtransienten nach Exposition der Zellen mit 1 mM ACh. Die Zellen von BALB/c-Mäusen mit 50 μM Xestospongine D, zusammen mit denen mit 10 μM (weißer Balken), zeigen einen signifikant niedrigeren Transienten verglichen mit den Kontrollen BALB/c ohne Xestospongine D (schwarzer Balken) (88% im Vergleich zu BALB/c ohne Xestospongine D $n = 44/166$, $*p < 0,05$). Die Werte sind als Prozentwerte BALB/c mit 50 μM + 10 μM Xestospongine D im Vergleich zu BALB/c ohne Xestospongine D mit Standardfehler angegeben.

3.7 Beteiligung von Ryanodinerezeptoren

Da auch die Ryanodinerezeptoren an der Kalziumhomöostase beteiligt sind, war es hier das Ziel, herauszufinden, in wie weit diese Tatsache für murine tracheale glatte Muskelzellen zutrifft. Nach Inkubation mit 1 mM Ryanodine wurde erneut unter dem Mikroskop Acetylcholin zugegeben und der initiale Kalziumtransient mit den Kontrollen BALB/c ohne

Ryanodine verglichen. Bei diesem Versuch reagierten 30% der aufgenommenen Zellen mit einer Fluoreszenzänderung von mehr als 10%.

Wenn man die inkubierten Zellen mit der Kontrollgruppe vergleicht, zeigen die inkubierten Zellen einen geringeren initialen Transienten. Dieser Unterschied ist nicht signifikant (n = 46/166, p=0,163) (Abbildung 26).

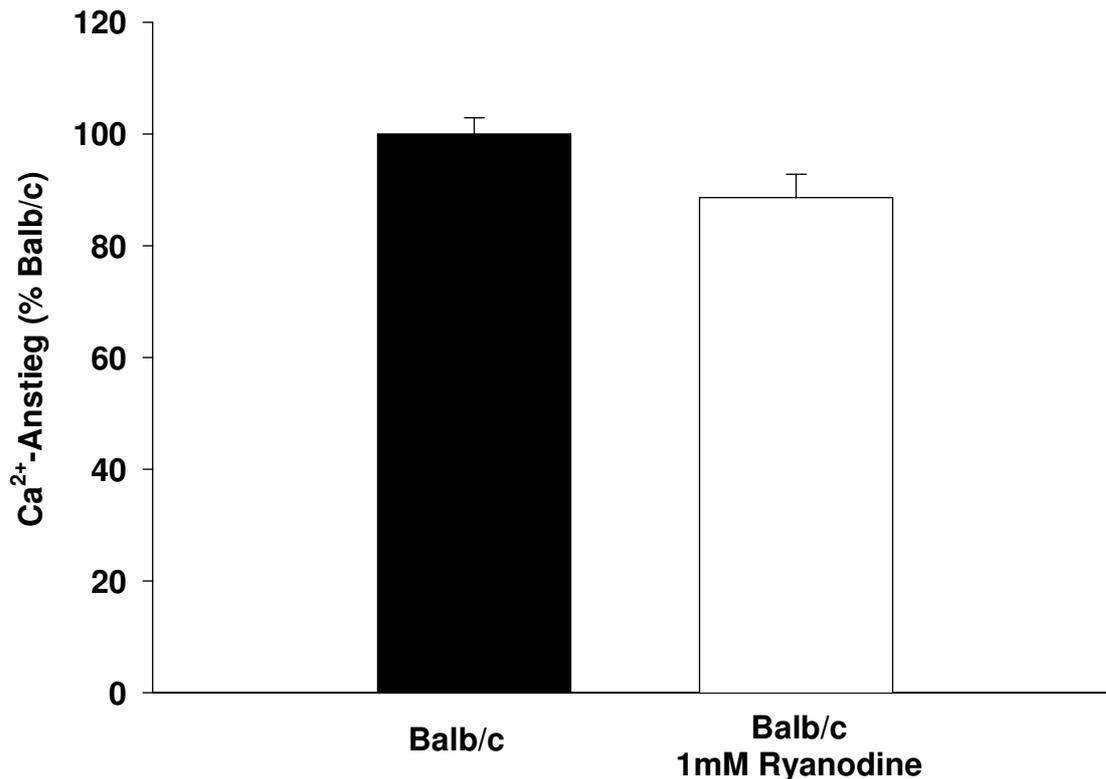


Abbildung 26 zeigt den initialen Kalziumtransienten nach Exposition der Zellen mit 1 mM ACh. Die mit Ryanodine inkubierten Zellen von BALB/c-Mäusen (weißer Balken) zeigen einen niedrigeren Transienten verglichen mit den Kontrollen BALB/c ohne Ryanodine (schwarzer Balken) (87% im Vergleich zu BALB/c ohne Ryanodine). Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (n = 46/166, p = 0,163). Die Werte sind als Prozentwerte BALB/c mit 1 mM Ryanodine im Vergleich zu BALB/c ohne Ryanodine mit Standardfehler angegeben.

3.8 Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums

3.8.1 Untersuchung mit Caffeine

Caffeine wurde in verschiedenen Konzentrationen nach Färbung mit Oregon Green zugegeben und die Reaktion aufgenommen. Erst bei einer Konzentration von 11 mM konnten wenige Zellen bei beiden Mäusen zur Reaktion gebracht werden. Ein Versuch mit 13 mM blieb bei den Zellen der T-bet KO-Mäuse erfolglos. Die Versuchsreihe wurde abgebrochen, da keine ausreichende Anzahl an Zellen eine Reaktion zeigte.

3.8.2 Untersuchung mit CPA

Daraufhin wurde versucht, CPA zur Bestimmung des Kalziumgehaltes des Sarkoplasmatischen Retikulums einzusetzen. CPA wurde in Konzentrationen zwischen 0,5 μ M und 20 μ M zugegeben. Da sich keine Konzentration mit Reaktion von je BALB/c- und T-bet KO-Zellen finden ließ, wurde auch diese Versuchsreihe abgebrochen. Diese Versuche stehen deshalb nicht der Auswertung zur Verfügung.

3.8.3 Untersuchung mit Thapsigargin

Im Folgenden wurde versucht, die Kalziumspeicher durch Zugabe von Thapsigargin zu entleeren. Wie schon weiter oben beschrieben, ist Thapsigargin der potenteste Inhibitor der SERCA (Inesi G, Sagara Y 1994). Nach Zugabe von 10 μ M Thapsigargin konnte eine Fluoreszenzänderung beobachtet werden. Es konnten 30 T-bet KO-Zellen (17%) und 7 BALB/c-Zellen (13%) zur Reaktion gebracht werden. Der Unterschied zwischen der AUC von T-bet KO und BALB/c ist signifikant, man beachte aber die geringe Zellzahl von BALB/c (n = 30/7, $p < 0,05$) (Abbildung 27).

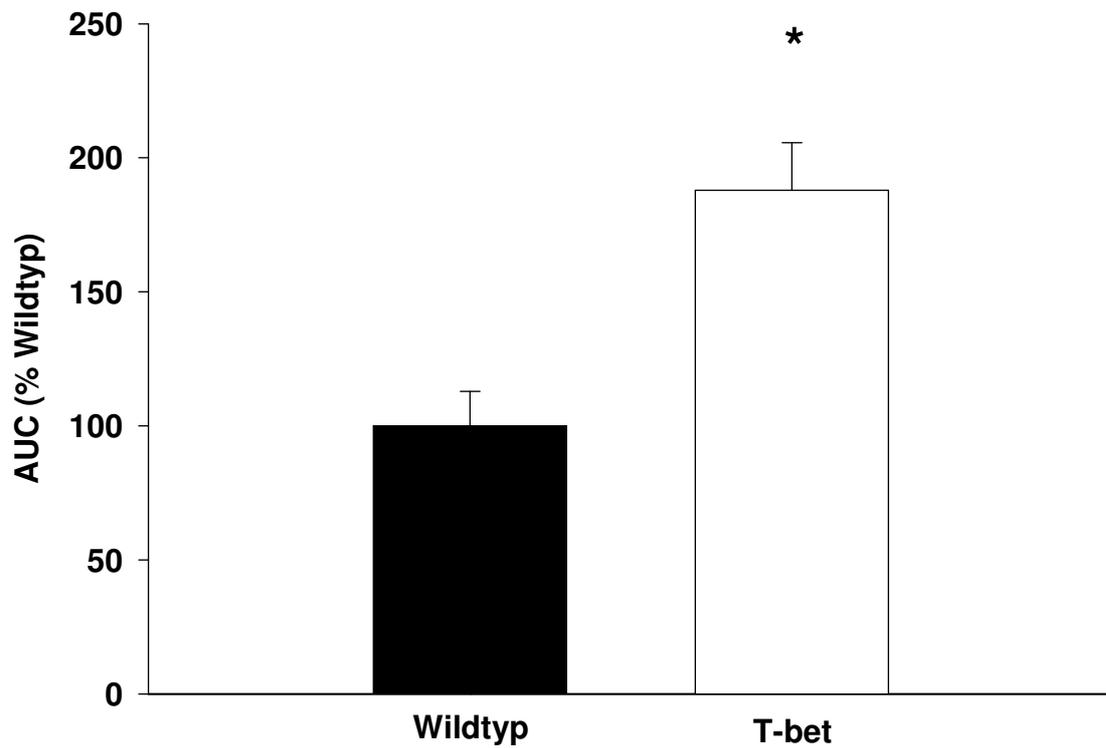


Abbildung 27 zeigt die Area under the Curve nach Zugabe von 10 μ M Thapsigargin. Die Zellen von T-bet KO-Mäusen (weißer Balken) zeigen eine signifikant höhere AUC verglichen mit dem Wildtyp BALB/c (schwarzer Balken) (188% im Vergleich zu BALB/c, n = 30/7, *p<0,05). Die Werte sind als Prozentwerte T-bet KO im Vergleich zu BALB/c mit Standardfehler angegeben.

3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Der Acetylcholin-induzierte Kalziumtransient und dessen Anstiegs- und Abfallgeschwindigkeit ist in glatten trachealen Muskelzellen von T-bet KO erhöht.
- T-bet KO-Zellen zeigen verminderte Transienten und Anstiegsgeschwindigkeiten in kalziumfreier EDTA-Lösung.
- Abfallgeschwindigkeiten sind sowohl bei T-bet KO als auch bei BALB/c in kalziumfreiem Medium erhöht.
- Oszillationen treten in kalziumhaltigem Medium in beiden Mausspezies kaum und ohne Unterschied auf, in kalziumfreiem Medium sind im Vergleich dazu sowohl Häufigkeit als auch Prozentsatz der oszillierenden Zellen erhöht.
- IP₃-Rezeptoren scheinen am Acetylcholin-induzierten Kalzium-Signaling beteiligt zu sein.
- Die Beteiligung von Ryanodinerezeptoren konnte nicht nachgewiesen werden.
- Der Kalziumgehalt des SR ist in T-bet KO-Zellen erhöht.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Materialien und Methoden

4.1.1 Monolayer-Zellkultur, Gewinnung und Kultivierung

Monolayer-Zellkulturen sind in der Forschung weit verbreitet. Auch bei Atemwegsmuskelzellen ist diese Kultivierungsform seit längerem fest etabliert (Hall IP, Kotlikoff M 1995). Schon 1981 wurde eine erste Methode beschrieben, wie glatte Atemwegsmuskelzellen kultiviert werden können und womit sich diese Zellen in Kultur auszeichnen (Avner BP, et al. 1981). Um die benötigten Zellen zu gewinnen, wurde dort Hunden die Luftröhre entfernt und diese möglichst von Bindegewebe befreit. Einzelne Teile der Trachea wurden dann in einer Enzymlösung bestehend aus Kollagenase, Elastase, DNase und Trypsin-Inhibitor gelöst, in einem Puffer platziert und inkubiert. Nach erfolgreicher Inkubation wurde die Reaktion durch Pufferzugabe beendet und das erhaltene Zellpellet in Medium auf Kulturplatten ausgesät und im Inkubator bebrütet. Das Medium wurde in regelmäßigen Abständen gewechselt (Avner BP, et al. 1981). Um die Zellen abzulösen, kann Trypsin verwendet werden (Hall IP, Kotlikoff M 1995). Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode wurde ähnlich vorgegangen. Der Enzymlösung allerdings wurde lediglich Kollagenase beigefügt, da sich dies als ausreichend zum Lösen der Muskelzellen herausgestellt hatte. Zum Splitten wurde außerdem statt reinem Trypsin ein Trypsin-EDTA-Gemisch verwendet, da sich die Zellen dadurch sehr schnell ablösen. Hall und Kollegen beschrieben, dass zur Kultivierung der Muskelzellen keine spezielle Vorbehandlung der Kulturbehälter nötig sei (Hall IP, Kotlikoff M 1995). Die Beschichtung der Kulturflaschen mit Kollagen, wie sie hier verwendet wurde, sollte trotz der denkbaren Insignifikanz dem übermäßigen Anwachsen von Fibroblasten vorbeugen und der Produktion von Kollagen durch „synthetisierende“ Muskelzellen entgegenwirken, die in Kulturen regelmäßig beschrieben werden (Hirst SJ 1996, Chung KF 2000). Bei den für die Signaling-Versuche verwendeten Passagen wurden die Kulturflaschen und -schalen nicht mit Kollagen beschichtet. Dies hatte den Grund, dass sich Kollagen bei Mediumwechsel oder Zugabe von anderen Reagenzien vom Boden lösen kann. Das dann frei schwimmende Kollagen kann sich auf die Zellen legen und sowohl die Anfärbbarkeit als auch die Reaktivität bei den Versuchen beeinflussen. Außerdem trübt freies Kollagengemisch das Medium, was sich durch schlechte Aufnahmequalität bemerkbar machen könnte.

In früheren Versuchen mit T-bet KO-Mäusen wurden Lungenschnitte verwendet (Bergner A, et al. 2006a, Bergner A, et al. 2006b). Diese stellen ein lebensnahes Versuchsmodell dar, weil

Eigenschaften der Bronchien, wie ihr Kaliber, der Grundtonus oder die Zellverbindungen im Zusammenhang dargestellt werden können. Im Gegensatz zu Primärkulturen einzelner Zellen, die oftmals aus der Trachea stammen, bieten sie die Möglichkeit, Funktionen und Vorgänge in tieferen Luftwegen nachzuvollziehen. Allerdings bewahren sie nur wenige Tage ihre ursprüngliche Kontraktilität und Morphologie und schon nach 10 Tagen nimmt die Ziliaraktivität bedeutend ab (Bergner A, Sanderson MJ 2002a). Außerdem ist es nicht möglich, einzelne Zellen aus diesen Lungenschnitten proteinbiochemischen Verfahren zugänglich zu machen. Bindegewebe und andere Zellen würden Ergebnisse bei Westernblot oder Immunhistochemie wenig spezifisch erscheinen lassen.

Für diese Verfahren bieten sich kultivierte glatte Muskelzellen eher an. Sie können durch einfache Methoden gewonnen werden, wachsen in den verschiedensten Medien und können leicht aufgesplittet werden. Je nach Anzahl der ausgesäten Zellen erreichen sie in Tagen bis wenigen Wochen Konfluenz und eignen sich durch ihre Lebensdauer und Passagierbarkeit hervorragend für Langzeitstudien an Rezeptoren, Kanälen oder Signalwegen in der Zelle (Hall IP, Kotlikoff M 1995).

Den Vorteilen, die diese Methode bietet, stehen natürlich auch Einschränkungen gegenüber. Bei glatten Muskelzellen handelt es sich um Zellen mit einer hohen phenotypischen Plastizität (Halayko AJ, Solway J 2001). In Kultur können die natürlichen Wachstumsbedingungen der Zellen nicht genau reproduziert werden. So sind Phenotypänderungen ein Problem, welches schwer zu beherrschen ist. Beispielsweise können sich die Zellen von einem kontraktilen in einen synthetisierenden Typ umwandeln, der Matrixproteine, Zytokine und andere Faktoren produziert. Dieser Vorgang ist über lange Zeit reversibel und korreliert mit der Dichte der Zellen. So werden in subkonfluenten Kulturen vermehrt „synthetisierende“ Muskelzellen gefunden, die bei Konfluenz wieder im kontraktilen Status sind. Nach vielen Passagen tritt zunehmend ein irreversibler, synthetisierender Typ Muskelzelle auf, der nicht mehr kontraktionsfähig ist (Hirst SJ 1996). Dies ist einer der Gründe, warum in dieser Arbeit nur Zellen aus 3 Passagen verwendet wurden. Außerdem treten bei länger kultivierten Zellen vermehrt Veränderungen in Kanälen und Rezeptoren auf. So ist zum Beispiel die Anzahl der M3 Rezeptoren vermindert (Hall IP, Kotlikoff M 1995), was zu einer schwächeren Antwort auf Acetylcholin führen könnte.

Diese Dedifferenzierung kann aufgehalten werden, aber dies ist in unserem Fall nicht tragbar. Man müsste die Kulturen in serumfreiem Medium anzüchten (Bowers CW, Dahm LM 1993, Halayko AJ, Solway J 2001). Serum wie FCS, das hier verwendet wurde, trägt zur schnellen

Proliferation der Zellen bei, die sich aber auch in stärkerer Phenotypänderung ausdrückt. Allerdings ist die Anzahl der erhaltenen Zellen bei Wegnahme des Serums sehr gering, da ihnen ihre Ernährungsgrundlage entzogen wird (Hall IP, Kotlikoff M 1995). Dann könnten zwar die Zellen einzeln in ihrer Funktionsweise betrachtet werden, aber für die Proteinbiochemie wären es wahrscheinlich zu wenige.

Größere Schwierigkeiten als die genannten liegen am Beginn der Gewinnung von Primärzellen. Auch bei gründlichster Präparation der Trachea sind es nicht nur Muskelzellen, die in Kultur gebracht werden. Es werden immer Epithel- und Bindegewebszellen eingebracht. Die meisten Epithelzellen scheinen beim Splitten abgetötet zu werden (Hall IP, Kotlikoff M 1995). Fibroblasten aber sind widerstandsfähiger. Wie schon beschrieben, sollte die Kollagenbeschichtung der Kulturflaschen ihr Wachstum unterbinden. Aber woher weiß man, ob das funktioniert?

Es gibt einige Unterscheidungskriterien zwischen glatten Muskelzellen und Bindegewebszellen. Schon in den ersten Kulturversuchen wurde auf Unterschiede aufmerksam gemacht. So kontrahieren sich Muskelzellen auf Stimulation mit Carbachol, Fibroblasten tun dies nicht (Avner BP, et al. 1981). Bei Zugabe von Acetylcholin konnte lichtmikroskopisch eine Kontraktion bei einem Großteil der Zellen beobachtet werden. Aufnahmen davon wurden nicht ausgewertet, da sie nur exemplarisch erhoben wurden. Die erfolgreiche Wirkung von Acetylcholin auf Muskelzellen wurde schon anderweitig beschrieben (Bergner A, Sanderson MJ 2002a).

Lichtmikroskopisch kann man in subkonfluenten Kulturen keinen Unterschied zwischen der Morphe beider Zellarten feststellen. Bei Konfluenz zeigen Muskelzellen ein typisches Berg- und Tal-Muster. Es liegen viele Zellen übereinander, wohingegen sich Fibroblasten auf ein bis zwei Zellschichten beschränken (Tom-Moy M, et al. 1987). Vollständige Konfluenz wurde in den vorliegenden Versuchen aber nicht erreicht. Einzelne Zellen sollten betrachtet werden, da wären viele Zellschichten hinderlich gewesen. Desweiteren lassen sich bei Präparation einer Mäusetrachea, wegen der geringen Größe, sehr wenig Zellen gewinnen. Bis zur Konfluenz hätte es sehr lange gedauert und andere schnell proliferierende Zellen hätten überhand nehmen können.

Man kann auch per Elektronenmikroskopie zwischen Fibroblasten und Muskelzellen unterscheiden, da Muskelzellen eine spezifische Ultrastruktur aufweisen (Tom-Moy M, et al. 1987). Da diese Methode nicht verfügbar war, kam ein drittes Kriterium zur Anwendung.

Dieses liegt in der Anfärbarkeit der glatten Muskelzellen für α -Actin (Skalli O, et al. 1986, Wong JZ, et al. 1998). Da diese Methode sehr zeitaufwändig ist und der Nachweis nur generell für die Kulturmethode erbracht werden sollte, wurden bloß wenige Stichproben angefärbt. Dabei waren 48% der T-bet KO-Zellen und 56% der BALB/c-Zellen α -Actin positiv. Was ist aber mit den anderen Zellen? In Kultur, vor allem in subkonfluenten Kulturen, die unter Serumzugabe wachsen, sinkt der Anteil an α -Actin in der Muskelzelle. Es ist immernoch präsent, aber in geringerem Maße (Wong JZ, et al. 1998). Nun könnten es tatsächlich nur die ca. 50% Muskelzellen in der Kultur sein, aber auch ungenügend Aktin bei phenotypisch veränderten Zellen. Klarheit wurde in diesem Punkt nicht geschaffen, da elektronenmikroskopische Verfahren nicht zur Anwendung kommen konnten.

Da angenommen wurde, dass es sich bei den auf Acetylcholin reagierenden Zellen, die dazu morphologisch zumindest von Epithelzellen abgegrenzt werden können, um glatte Muskelzellen aus der Trachea handelt, wurde auf weitere Untersuchung der Identität der Zellen verzichtet.

Trotz dieser Einschränkungen, scheint die Kultivierung aus Primärzellen für die hier zu erzielenden Ergebnisse ein geeignetes Verfahren darzustellen. Die einfache Passagierbarkeit und das gute Wachstum machte es möglich, mehrere Proben gleichzeitig zu betrachten und damit in den meisten Fällen hohe Versuchszahlen zu erreichen. Einzelne Zellen konnten ohne Überlagerungen aus umgebendem Gewebe gezielt untersucht werden. Außerdem können Erkenntnisse über zelluläre Mechanismen mit bestehenden Ergebnissen aus Lungenschnittversuchen verglichen werden. Diese können weiter vertieft werden, da die kultivierten Zellen Untersuchungen der Proteinbiochemie störungsfreier möglich machen. Die Langlebigkeit der kultivierten Zellen lässt sie auch für zukünftige pharmakologische Studien an Rezeptoren und Kanälen zu einem potentiellen Ziel werden (Hall IP, Kotlikoff M 1995).

4.1.2 Primärkultur aus trachealen glatten Muskelzellen

Die Vor- und Nachteile von Primärkulturen glatter Muskelzellen sind soeben diskutiert worden. Aber wie sieht es mit der Vergleichbarkeit trachealer glatter Muskelzellen und der von Bronchien aus? Der Name „Asthma bronchiale“ impliziert, dass Asthma eine Erkrankung vorwiegend der Bronchien ist. Generell wird zwischen oberen und unteren Atemwegen unterschieden. Zu den oberen gehören Mund, Nase und Rachen. Die unteren beginnen mit der Trachea und enden mit den Alveolen. Somit liegen Bronchien und Trachea zumindest in einer

Ebene der Klassifikation. Studien, die tracheale und bronchiale glatte Muskelzellen in ihrem Reaktionsverhalten gemeinsam untersuchen, gibt es wenige. Eine der existierenden Studien untersucht muskarinerge Erregungs-Kontraktions-Mechanismen. Dabei schienen die verschiedenen Mechanismen abhängig vom Gewebe zu sein. Tracheale Muskelzellen zeigten bei Stimulation mit CPA und bei Wegnahme von externem Kalzium schwächere Reaktionen als bronchiale Muskelzellen. Die Betreiber dieser Studie stellten aufgrund ihrer Ergebnisse die klinische Relevanz trachealer Muskelzellen für die Durchführung klinischer Studien stark in Frage (Janssen LJ, et al. 2001).

In einer anderen Studie wurde die Hyperreagibilität isolierter Atemwegsmuskelzellen bei mit einem Antigen (Ovalbumin) sensibilisierten Mäusen untersucht. Eine Gruppe Mäuse wurde nach Sensibilisierung einer salzhaltigen Inhalation ausgesetzt, eine andere musste wiederum Ovalbumin inhalieren. Die Reaktion auf Acetylcholin und Endothelin-1 war bei Muskelzellen bronchialer Herkunft bei den Ovalbumin inhalierenden Mäusen stärker, als bei der anderen Gruppe. Bei trachealen Zellen gab es keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dieses Ergebnis deutet auf eine bronchiale aber nicht tracheale Hyperreagibilität bei allergischen Atemwegserkrankungen hin.

Als mögliche Gründe hierfür wurden eventuelle Unterschiede der vaskulären Permeabilität oder der neuronalen Steuerung zwischen bronchialem und trachealem Gewebe genannt oder auch unterschiedliches Verhalten der Adhäsion des Ovalbumins durch die Lumenunterschiede der Luftwege (Chiba Y, et al. 2004).

Zwar zeigen T-bet KO-Mäuse die gleichen Schlüsselcharakteristika des Asthma bronchiale wie Antigen-sensibilisierte Mäuse (Finotto S, et al. 2002), doch fällt die Provokation mit einem Antigen wie Ovalbumin durch Inhalation weg. Die T-bet KO-Mäuse werden nicht erst durch Antigeninjektion und –inhalation sensibilisiert, sondern kommen mit den spezifischen Veränderungen der Luftwege auf die Welt. Damit könnte einer der oben genannten Gründe für das unterschiedliche Reaktionsverhalten außer Kraft genommen werden.

Nun stellt sich die Frage, ob man die Unterschiede, die bei Antigen-sensibilisierten Mäusen feststellbar waren, auch bei T-bet KO reproduzieren kann, oder ob sich tracheale Muskelzellen dort ähnlich den bronchialen Muskelzellen verhalten.

Bei ähnlichem Reaktions- und Signalingverhalten der zwei Zellgruppen bei T-bet KO wäre es ein Leichtes, diese gut zu kultivierenden Zellen für die Beforschung von Teilvergängen der Asthmapathogenese zu verwenden. Damit könnte man ein Modell etablieren, das Vorgänge

ursprünglich kleiner Luftwege mit leichter zu gewinnenden Zellen aus der Trachea darstellbar macht.

4.1.3 Die T-bet KO-Maus als Asthmamodell

Asthma bronchiale ist eine Erkrankung, die hauptsächlich für den Menschen eine Rolle spielt. Nun ist eine Untersuchung der Pathomechanismen dieser Erkrankung am Menschen nur sehr bedingt möglich. Allein aus ethischen Gründen verbieten sich die meisten Medikamentenstudien und die Gewinnung von Muskelzellen aus den Luftwegen ist nur post mortem möglich oder auf Operationspräparate erkrankter Menschen beschränkt. Ergebnisse, die mit so gewonnenen Materialien entstanden sind, sind kaum verwertbar, da sowohl post mortem als auch bei Operationen kein allein asthmatisch verändertes Gewebe gewonnen werden kann. Vielmehr sind unspezifische Entzündungsreaktionen auf Tumore oder chronisch obstruktive Lungenerkrankungen zu erwarten oder auch nur durch ein langes Leben verändertes Gewebe, die Schlüsse über die Krankheit nicht zulassen.

Nur wenige Spezies abgesehen vom Menschen zeigen eine natürliche Disposition zu allergischen Erkrankungen. Beispielsweise werden Hunde oder Schafe durch *Ascaris suum* sensibilisiert. Hunde zeigen dann aber eher oberflächliche allergische Reaktionen wie Dermatitis oder Konjunktivitis. Schafe dagegen haben erstaunliche Ähnlichkeit zu Menschen, betrachtet man ihre bronchokonstriktiven Reaktionen und bronchiale Hyperreagibilität. Jedoch zeigen sich auch hier Diskrepanzen zwischen Mensch und Schaf bezüglich des Ansprechens auf einige Medikamente (Zosky GR, Sly PD 2007). Desweiteren darf man Kosten und Arbeitsaufwand nicht außer acht lassen. Bei großen Tieren wie Hunden, Katzen oder Schafen stehen diese an vorderer Stelle. Auch Affen wären dem Menschen in ihrem krankheitsspezifischen Reaktionsverhalten recht gleich, aber auch hier steht die Kosten-Nutzen-Relation nicht auf Seite des Nutzens (Kurucz I, Szelenyi I 2006).

Schaut man sich die nächst kleineren Tiere an, die im Labor genutzt werden können, rücken Meerschweinchen oder Ratten ins Rampenlicht. Beide Spezies sind recht kostengünstig zu vermehren und für größere Versuchsmengen geeignet. Meerschweinchen werden trotzdem wenig verwendet, da kaum spezifische Reagenzien oder genetisch veränderte Tiermodelle zur Verfügung stehen. Außerdem werden überschießende allergische Reaktionen auf viele Chemikalien beschrieben, die oft tödlich enden und damit das Tier als Asthmamodell

unbrauchbar werden lassen. Auch ihre hohe Toleranzentwicklung nach Antigenpräsentation ist ein Nachteil für ihre Verwendung (Zosky GR, Sly PD 2007).

Sowohl Mäuse als auch Ratten stehen nun an nächster Stelle. Für in vivo Versuche sind Ratten besser geeignet als Mäuse, da sie ihrer Größe wegen für direkte Messungen an Atemwegen leichter zu verwenden sind. Beide Tiere sind ansonsten in vielen Eigenschaften vergleichbar (Zosky GR, Sly PD 2007).

Hier möchte ich aber noch einmal die Maus näher betrachten. Im Gegensatz zu anderen Labortieren handelt es sich bei der Maus um eine sehr einfach zu züchtende Spezies, die in vielen Laboratorien die erste Stelle unter den Versuchstieren einnimmt. Sie vermehrt sich schnell und ist durch ihre Anspruchslosigkeit ein hervorragendes, kosteneffektives Versuchstier. Ihre Genetik ist weitgehend verstanden und lässt sich einfach manipulieren (Zosky GR, Sly PD 2007). Sie ist das am häufigsten verwendete Modell bei der Untersuchung der Immunpathologie des Asthma (Kurucz I, Szelenyi I 2006). Jedoch sind die in unterschiedlichen Laboratorien gewonnenen Ergebnisse nur bedingt vergleichbar. Denn sowohl verschiedene Rassen als auch verschiedene Versuchsprotokolle reduzieren die Vergleichbarkeit. Die Stimulation mit einem Antigen ist die gängigste Methode zur Induktion von asthmaspezifischen Charakteristika bei der Maus. Die damit induzierten inflammatorischen Ereignisse und die bronchiale Hyperreagibilität sind aber nicht von Dauer. Es handelt sich um akute Geschehen, die Chronizität bleibt auf Grund von Toleranzentwicklung gegenüber dem Antigen aus. Asthma allerdings ist durch Chronizität gekennzeichnet. Ein weiterer Nachteil der Maus ist der Unterschied zwischen Mediatoren und Entzündungszellen bei Mensch und Maus und die geringe Größe der Maus, die mit weniger Muskelzellen einhergeht (Zosky GR, Sly PD 2007).

Will man einige der Nachteile ausschalten, die eine normale Labormaus als Astmamodell mit sich bringt, kann man versuchen sein Augenmerk auf T-bet KO-Mäuse zu richten. Oftmals wird bemängelt, dass es sich bei Zellkulturen um sehr in vivo ferne Verfahren handelt. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde mit Monolayer-Zellkulturen gearbeitet. Die Gründe dafür wurden schon besprochen. Um mit T-bet KO-Mäusen mit lebensnahen Bedingungen zu arbeiten, eignen sich Lungenschnitte hervorragend. Dazu sei auf Ergebnisse aus unserem Labor von 2006 verwiesen (Bergner A, et al. 2006b).

Die bei Antigen-sensibilisierten Mäusen ausbleibende chronische Reaktion kann bei der Verwendung von T-bet KO betrachtet werden. Da T-bet KO Mäuse durch die genetische

Manipulation mit den Schlüsselcharakteristika des Asthma auf die Welt kommen und einen chronischen Umbau der Luftwege und Inflammation zeigen (Finotto S, et al. 2002), stellen sie ein geeigneteres Modell dar, um Pathomechanismen der Erkrankung zu verstehen. Die Ergebnisse wären eher reproduzierbar, da die Rasse einheitlich und die Asthmainduktion nicht durch unterschiedliche Antigene und Reagenzien herbeigeführt, sondern durch die genetische Veränderung geprägt ist.

T-bet KO-Mäuse stellen also eine lohnenswerte Alternative dar, wenn man Asthma besser kennenlernen will.

Menschliches Asthma soll dabei nicht perfekt reproduziert werden, sondern einzelne Mechanismen und die Effekte verschiedener Einflussgrößen könnten im Gesamten ein besseres Verständnis der Erkrankung ergeben (Kurucz I, Szelenyi I 2006).

4.1.4 Färbung der Zellen und Mikroskopie

Eine ganze Reihe von intrazellulären Kalziumindikatoren stehen der Forschung inzwischen zur Verfügung. Sie sind nach verschiedenen Gesichtspunkten unterteilbar. Die meisten von ihnen ändern bei Kalziumbindung ihr Fluoreszenzspektrum. Grundsätzlich unterscheidet man ratiometrische von nicht-ratiometrischen Indikatoren. Erstere ändern ihre Anregungs- und Emissionsspektren in Abhängigkeit von der freien Kalziumkonzentration. Man braucht zwei Wellenlängen, um die Fluoreszenz aufzuzeichnen, ermittelt dann das Verhältnis zwischen beiden Werten und kann so verschieden mit Farbstoff beladene Zellen vergleichbar machen, da die Ratio bei gleichem Kalziumgehalt auch gleich wäre.

Nicht-ratiometrische Indikatoren bestimmen die Kalziumkonzentration mit dem relativen Anstieg der Fluoreszenzintensität bei Anstieg des freien Kalziums. Oregon Green zählt zu eben diesen Indikatoren (Rudolf R, et al. 2003). Nach Messung der Intensität können bei ihnen die relativen Veränderungen in der Kalziumkonzentration durch Normalisierung der Messwerte auf die initiale Fluoreszenz (F/F_0) vergleichbar gemacht werden.

Weiterhin kann man Indikatoren nach ihren Anregungs- und Emissionsspektren unterteilen. So gibt es welche, die UV-Licht zur Anregung brauchen. Sie haben den Nachteil, dass UV-Licht zytotoxische Eigenschaften hat und auch nicht angefärbte Strukturen der Zelle zur Autofluoreszenz anregen kann. Die Indikatoren, wie auch Oregon Green, die im Bereich der sichtbaren Wellenlängen angesiedelt sind, weisen dagegen kaum Zytotoxizität auf und ihr Spektrum liegt in Bereichen, in denen Autofluoreszenz oder Streuung eine geringere Rolle spielen (Takahashi A, et al. 1999).

Betrachtet man die chemische Form, finden sich häufig synthetische Polycarboxylate. Sie sind konjugiert mit Salzen, Dextranen oder Estern. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Acetoxymethylester verwendet. Ester haben die Eigenschaft zelldurchlässig zu sein. So gelangt der Indikator in das Zellinnere. Dort wird die Estergruppe von Esterasen abgespalten und der Farbstoff ist gefangen. Wenn man die gefärbten Proben bei Raumtemperatur stehen lässt, kann der Indikator die Zelle nicht verlassen. Somit ist unter diesem Gesichtspunkt eine Leckage des Indikators bei längeren Versuchszeiten zu vernachlässigen (Thomas D, et al. 2000).

Das Austreten von Indikator aus der Zelle ist dennoch eines der Probleme, die beim Umgang mit diesen Stoffen zu beachten sind. Welche gibt es noch und was macht Oregon Green 488 BAPTA-1 zum Indikator der Wahl im vorliegenden Versuchsaufbau?

Wie schon besprochen, stellt die Leckage des Indikators bei Oregon Green aus der Zelle keine nennenswerte Einschränkung dar (Thomas D, et al. 2000). Trotzdem ist die Verwendung von Ester-konjugierten Stoffen nicht unproblematisch. Sie sind schlecht wasserlöslich und es kann vorkommen, dass der Indikator nicht komplett aufgelöst werden kann. Um eine bessere Löslichkeit zu erzielen, kann Pluronic als Lösungsmittel verwendet werden.

Die bei anderen synthetischen Polycarboxylaten wie Calcium Orange oder Fura Red bekannte Kompartimentierung, also das vermehrte Abwandern des Indikators in subzelluläre Strukturen wie Mitochondrien und Sarkoplasmatisches Retikulum, ist bei Oregon Green nicht relevant (Thomas D, et al. 2000). Einzig der Zellkern zeigte ein höheres Fluoreszenzsignal. Dieses konnte aber bei Auswertung der Versuche durch konsequentes Messen der Intensitätsänderung an zellkernfernen Regionen außen vor gelassen werden. Bei der Verwendung des in unserer Arbeitsgruppe auch gebräuchlichen Fluo-4 (Bergner A, et al. 2006b) würde das vom Zellkern ausgesendete Fluoreszenzsignal in der normalen (nicht-konfokalen, nicht-multiphotonen) Mikroskopie über das Zytoplasma dominieren (Gee KR, et al. 2000, Thomas D, et al. 2000).

Ein weitere Vorteil über Fluo-4 ist die geringere pH-Sensitivität im physiologischen Bereich von Oregon Green (Takahashi A, et al. 1999).

Welcher der Indikatoren eine bessere Photostabilität aufweist, wird kontrovers diskutiert. Takahashi und Kollegen fassen zusammen, dass Oregon Green eine große Photostabilität besitzt (Takahashi A, et al. 1999), wohingegen Thomas et al. in Oregon Green den gegen Ausbleichen empfindlichsten Indikator sehen (Thomas D, et al. 2000). Im zeitlichen Verlauf bleicht der Farbstoff exponentiell aus (Thomas D, et al. 2000). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit verifiziert werden (Abbildungen 5a, 5b in Material und Methoden).

Um das Entfärben so gering wie möglich zu halten, kann der Sauerstoffgehalt bei den Versuchen reduziert werden, da Sauerstoff eine wesentliche Rolle beim Bleichvorgang spielt. Allerdings ist dieses Vorgehen bei lebenden Zellen problematisch, da diese häufig auf Sauerstoff angewiesen sind (Takahashi A, et al. 1999). Geeigneter ist die Verwendung eines konfokalen oder Multiphotonen-Mikroskops. Dort wird die Fluoreszenz in kleinen ausgewählten Abschnitten der Zelle angeregt und umliegende Zellbestandteile geschont (Stephens DJ, Allan VJ 2003, Rubart M 2004). Bei herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen hilft ein eingebauter Shutter, der sich bei messungsfreien Intervallen vor die Lichtquelle schiebt, das Abblenden des Indikators zu reduzieren (Herman B 2002, Stephens DJ, Allan VJ 2003).

Da das Ausbleichen nicht vollständig verhindert werden konnte, musste es für die Auswertung weitestmöglich herauskorrigiert werden. Dies geschah unter Verwendung einer jeweils für BALB/c und T-bet KO angefertigten exponentiellen Ausgleichsfunktion aus den Bleachingwerten von je 47 Kontrollversuchen.

Bei Teilen der Versuche mit Thapsigargin konnte keine Exponentialfunktion verwendet werden, da bei der Bildspeicherung einiger Messungen die Graustufen fehlerhaft hinterlegt wurden. Es war bei diesen Messungen nur eine farbcodierte Darstellung der Intensitätsverläufe möglich. Die Intensitätsverläufe und das Ausbleichen zeigten dort einen eher stufenförmigen Verlauf. Dieser konnte nicht korrigiert werden, da zu wenige Messpunkte zur Verfügung standen. Es musste deswegen vernachlässigt werden. Bei allen anderen Thapsigarginversuchen wurde die Drift durch die standardisierte Exponentialfunktion ausgeglichen.

Die farbcodierte Darstellung dieser Thapsigargindateien ordnet schwach zu differenzierenden Grauwerten deutlich unterscheidbare Farbwerte zu. Sie wird generell nicht empfohlen und kam dadurch für die anderen Versuchsreihen nicht in Frage (Brown CM 2007).

Es sollte im Allgemeinen darauf geachtet werden, dass Bilder im Original abgespeichert werden und einheitliche Formate benutzt werden (Herman B 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bilddateien ohne Kompression im TIF-Format gespeichert, mit Ausnahme der schon erwähnten fehlerhaften Speicherung einiger Thapsigarginversuche.

Zur Verwendung eines bestimmten Indikators ist zusammenfassend zu sagen, dass die Wahl vom Experiment abhängt (Thomas D, et al. 2000). Protein-basierte Farbstoffe, basierend auf

GFP (Green Fluorescent Protein), kamen wegen ihrer ausgeprägten pH-Sensibilität und des massiven Ausbleichens nicht in Frage (Rudolf R, et al. 2003). In unserer Arbeitsgruppe wurde sowohl Fluo-4 (Bergner A, et al. 2006b) als auch Oregon Green (Kellner J, et al. 2007) verwendet. Die Nachteile von Fluo-4 in der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie wurden bereits besprochen. Da mit Oregon Green hierbei gute Erfahrungen gemacht wurden, fiel die Wahl auf diesen Indikator.

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Analyse von Verteilung und Dynamik funktionaler Moleküle in lebenden Zellen (Takahashi A, et al. 1999). Ein Fluoreszenzmikroskop sollte unter anderem eine dem Indikator angemessene Wellenlänge emittieren, das Anregungslicht von der ausgesendeten Fluoreszenz trennen können, dabei soviel Fluoreszenz wie möglich einfangen und die Beobachtung von Details in der Zelle ermöglichen (Herman B 2002).

Bei sehr dickem Gewebe ist die Verwendung eines herkömmlichen Fluoreszenzmikroskops problematisch, da oftmals Fluoreszenz außerhalb des Fokus die eigentlich zu messende Fluoreszenz überdeckt und die Ergebnisse verfälscht. Um dies zu vermeiden, sollten eher konfokale oder Multiphotonen-Mikroskope verwendet werden (Brown CM 2007). Diese haben außerdem eine sehr gute örtliche Auflösung und erlauben die räumliche Darstellung von subzellulären Strukturen (Takahashi A, et al. 1999). Für Langzeitversuche wird die Zweiphotonen-Mikroskopie empfohlen, da durch die exakte Fokussierung das Ausbleichen reduziert wird und die Intensität durch unüberschattete Fluoreszenzsignale steigt (Rubart M 2004). Das Ausbleichen reduziert man beim herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop durch Einsatz eines Kameraverschlusses in den Phasen, wo keine Messung stattfindet. Herkömmliche Fluoreszenzmikroskope sind verhältnismäßig kostengünstig und flexibel einsetzbar (North AJ 2006). In den hier durchgeführten Versuchen war es nicht nötig, subzelluläre Strukturen darzustellen. Einzig der Zellkern hob sich durch das verstärkte Anfärbeverhalten von der Umgebung ab. Da es sich um Monolayer-Zellkulturen handelte, spielte auch die Dicke des Gewebes keine Rolle. Damit war eine Verwendung spezialisierterer Mikroskope unnötig, die „normale“ Fluoreszenzmikroskopie war völlig ausreichend. Ein Problem sollte dennoch nicht außer Acht gelassen werden. Die Belichtungszeiten konnten nicht standardisiert werden. Sie mussten je nach Sichtbarkeit der Zellen manuell angepasst werden. Dies impliziert ein stärkeres Bleichverhalten durch längere Belichtungszeiten und ein schwächeres durch kürzere. Durch Inkubation der Zellen im Dunkeln und Verwendung der standardisierten Ausgleichsgerade bei Korrektur der Drift

sollten jedoch im Mittel vergleichbare Kurven entstehen. Durch Bildung der Fluoreszenzratio (F/F_0) wurden die verschiedenen Messwerte miteinander vergleichbar gemacht.

4.1.5 Ermittlung der Messwerte

Die zur Auswertung verwendete Bildanalysesoftware „Scion Image“ stellt ein in unserer Arbeitsgruppe etabliertes Auswerteinstrument dar (Bergner A, et al. 2006a, Bergner A, et al. 2006b, Kellner J, et al. 2007). Für die Messung der Intensitätswerte im Bereich eines region of interest unterstützt es alle benötigten Funktionen problemlos. Es zeichnet sich dabei durch eine benutzerfreundliche Oberfläche und einfache Handhabung aus. Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der kostenlosen Bereitstellung des Programms vom Hersteller.

Nach Ermittlung der Intensitätswerte wurden diese in Excel tabellarisch dargestellt. Der Mittelwert der ersten 5 Werte wurde errechnet und als initiale Fluoreszenz F_0 bezeichnet. Diese 5 Werte wurden verwendet, um statistische Schwankungen im ersten Wert auszugleichen. Die Beschränkung auf die ersten 5 Intensitäten war aufgrund der Reagenzienzugabe ab Wert 7 notwendig. Da die Belichtungszeit bei den verschiedenen Versuchen unterschiedlich war, konnten keine direkt vergleichbaren Intensitäten ermittelt werden. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurden alle Intensitätswerte auf F_0 normalisiert (F/F_0), so dass Anfangsfluoreszenzen um den Wert 1 lagen. Nach Import und Darstellung der Werte in einem Graphen durch Matlab, wurde die Drift mit einem hierfür erstellten Windowsprogramm korrigiert. Dieses Programm war auch für die Berechnung von Transient, Geschwindigkeiten und AUC zuständig. Dazu mussten die Grenzwerte für jeden Graphen individuell eingegeben werden. Eine automatisierte Erkennung der Grenzwerte war aufgrund der Vielfältigkeit der dargestellten Graphen nicht möglich. Die Grenzwerte bedurften einer genauen Definition, um die Vergleichbarkeit der Zellen zu erhalten. So musste für den initialen oder, bei EDTA, maximalen Transienten eine 10%ige Abweichung des maximalen Messwertes vom Anfangswert vorliegen. Da das initiale Verhältnis auf 1 normalisiert wurde, bedeutete dies eine Abweichung von 0,1. Diese 10% wurden nicht willkürlich gewählt. Bei Analyse verschiedener Graphen fiel auf, dass kaum ein initialer Anstieg unter 0,1 fiel. Die wenigen Graphen, die einen geringeren Anstieg zeigten, schienen eine unruhige Grundlinie und schwer zu fassende Fluoreszenzänderungen aufzuweisen. Oszillationen mussten einen Anstieg von 0,05 also 5% vorweisen. Geringere Anstiege als 0,05 konnten nicht verwendet werden, da durch Aufnahmequalität und natürliche geringe Schwankungen der Fluoreszenz die Trennschärfe zwischen Anstieg und Nicht-Anstieg verloren gegangen wäre.

Bei Bewertung der Ergebnisse in kalziumfreiem Medium entfiel der Vergleich des initialen Transienten. Die EDTA-Lösung wurde vor Platzierung der Petrischale unter dem Mikroskop zugegeben, da Zugabe von 1 ml Lösung während einer Aufnahme die Bildqualität erheblich verschlechterte. Damit wurden aber auch zelluläre Reaktionen vor dem Aufnahmezeitpunkt hervorgerufen. Da die Zeit zwischen Zugabe von EDTA und Beginn der Messungen durch Einstellung von Bildschärfe und Belichtungszeit nicht vereinheitlicht werden konnte, war ein Vergleich der initialen Transienten nicht möglich. In die Bewertung flossen dadurch die maximalen Transienten pro Zelle ein, alle anderen Transienten wurden zu den Oszillationen gerechnet.

Die Höhe des Abfalls, als Differenz zwischen Maximalwert und Absinken auf den Ausgangswert beziehungsweise das Ende der Aufnahme, wurde nicht als Zahlenwert angegeben. Im Normalfall sollte die Fluoreszenz auf ihren Ausgangswert abfallen. Da durch eine beschränkte Aufnahmezeit dieser Zustand nicht immer erreicht wurde, sollten die Differenzwerte nicht zum absoluten Vergleich herangezogen werden. Sie waren allein zur Berechnung der Abstiegsgeschwindigkeit vonnöten.

Die Berechnungen der Geschwindigkeiten von Anstieg und Abfall als Quotient der Anstiegs-/Abfallsdifferenzen und den benötigten Zeiten bedürfen keiner Erklärung. Sie definieren sich durch die allgemeine Berechnung der Steigung einer Funktion, wobei für die Abfallsgeschwindigkeit positive Werte angenommen werden.

Für die Berechnung der Area under the Curve (AUC) wurde das Integral der Intensitätsverläufe des initialen Anstiegs mit dem Integral der Oszillationsverläufe zusammengerechnet. Durch das Miteinbeziehen der Oszillationen wird gewährleistet, dass sämtliches ins Zytosol gelangende Kalzium in die Berechnungen eingeht. Dabei ist zu beachten, dass der Einstrom extrazellulären Kalziums nicht verhindert werden konnte. Beim Versuch des Ausschlusses extrazellulären Kalziums durch Einbettung der Zellen in EDTA-Lösung zeigten sich wie beschrieben spontane Kalziumsignale, die die Verwendung dieser Lösung für die meisten Versuchsreihen unmöglich machte. Die Berechnungen sind demnach in gewissem Maße eingeschränkt. Die AUC konnte mit dem weiter oben benannten Programm errechnet werden.

Bei den Bildern der Thapsigarginreihe, bei denen Farbinformationsverluste vorlagen, war weder eine automatisierte Darstellung noch Berechnung möglich. Die AUC dieser Bilddateien wurden mit einem in Excel angefertigten Makro berechnet. Da die AUC sowohl in Matlab als auch in Excel als Integral des Intensitätsverlaufes berechnet wird, ist sie trotz unterschiedlicher Programme vergleichbar.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Acetylcholin-induziertes Kalzium-Signaling

4.2.1.1 Allgemeines

Die Wirkung des Neurotransmitters Acetylcholin auf Kalzium-Signaling, Spannungsaufbau und Kontraktionsverhalten von glatten Atemwegsmuskelzellen ist oft untersucht worden (Shieh CC, et al. 1991, Bergner A, Sanderson MJ 2002a, Bergner A, Sanderson MJ 2003). Auch in unserer Arbeitsgruppe ist die Verwendung dieses Stoffes etabliert (Bergner A, et al. 2006a, Bergner A, et al. 2006b, Kellner J, et al. 2007). Die Wirkung scheint konzentrationsabhängig zu sein. Steigende Konzentrationen (z.B. von 10^{-10} – 10^{-3} M) führen zu steigender Spannung (Shieh CC, et al. 1991) und vermehrter Kalziumausschüttung (Bergner A, Sanderson MJ 2002a). Bei allen Konzentrationen zwischen 10^{-10} und 10^{-6} M war die ACh-induzierte Kontraktion und der initiale Kalziumtransient bei Lungenschnitten von Tbet KO höher als bei BALB/c (Bergner A, et al. 2006b). Damit relativiert sich die Frage, welche Konzentration an Acetylcholin für die vorliegende Versuchsdurchführung zu gebrauchen sei. Vergleiche werden nur innerhalb gleicher Versuchsaufbauten und Durchführungen gemacht und Ergebnisse daraus bereits bestehenden Untersuchungen gegenüber gestellt. Darum ist die Verwendung einer einheitlichen Konzentration in einer Versuchsreihe wichtiger als deren genauer Zahlenwert.

Die Verwendung von 1 mM ACh ist also durchaus möglich, auch wenn vorhergehende Gruppen zumeist mit niedrigeren Konzentrationen gearbeitet haben. Dass glatte Atemwegsmuskelzellen auf diese Konzentration reagieren, ist bekannt (Bergner A, Sanderson MJ 2002a). Auch im jetzigen Versuchsaufbau kontrahierten sich die Zellen bei Zugabe von 1 mM Acetylcholin.

Die Auszählung der reagierenden Zellen im Bezug zu allen im Sichtfeld liegenden Zellen ergab einen Anteil von etwa ein Drittel bei beiden Mausgruppen. Es überrascht, dass bloß eine Zelle aus allen Kontrollen eine spontane Reaktion ohne Kontakt zu einem Agens zeigt.

Bei Versuchen mit Lungenschnitten beobachtete man bei 60% der Zellen spontane Kalziumänderungen in Form von Oszillationen oder Transienten (Bergner A, et al. 2006b). Warum dies in der Monolayer-Kultur nicht beobachtet werden konnte, ist nicht klar. Vorstellbar wäre dabei, dass in Einzelzellen das Membranpotential durch direkt umgebendes extrazelluläres Kalzium gestützt wird und spontane Änderungen verhindert. Schließlich können Membranpotentialänderungen zu Kalziumsignalen führen (Bayginov O, et al. 1989). In Lungenschnitten sind Zell-Zell-Kontakte und Verbindungen unterschiedlicher Gewebe erhalten. Dies könnte zu spontanen Kalziumänderungen durch beispielsweise interzelluläre Kalziumsignale (Sanderson MJ, et al. 1994) beitragen. Interzelluläre Signale können zur Kommunikation zwischen Zellen führen, die im Monolayer nicht gegeben ist. Es bilden sich zwar auch im Monolayer Zellkontakte in Form von unter anderem GAP-Junctions aus (Sanderson MJ, et al. 1994), aber die natürliche Verbindung, wie sie in Lungenschnitten vorliegt, kann natürlich nicht wiederhergestellt werden.

Dass nur ein Drittel der Zellen reagiert, kann also sowohl an fehlenden Zellkontakten als auch an den die Zelle erreichenden ACh-Konzentrationen liegen. Da Muskelzellen in Kultur ihre Eigenschaften verändern (Hall IP, Kotlikoff M 1995), könnten desweiteren vermehrt Zellen überhaupt nicht mehr auf ACh reagieren und auch die Eigenschaft des spontanen Signalings ablegen.

4.2.1.2 Kalziumsignale

Wie auch in den Lungenschnitten (Bergner A, et al. 2006b), so ist auch in den Einzelzellen der initiale Kalziumtransient bei T-bet KO höher als bei BALB/c. Trotz der wahrscheinlichen Dedifferenzierung der Zellen in Kultur (Hall IP, Kotlikoff M 1995), ist der initial höhere Transient erhalten. Dies lässt die Annahme zu, dass Zellen aus Kultur für Untersuchungen verwendbar sind, die Grundlagen dieses Mechanismus erarbeiten wollen. Es bestätigt außerdem, dass auch in den Muskelzellen der Trachea von T-bet KO-Mäusen die Bereitschaft, auf ACh mit einem erhöhten Kalziumanstieg zu reagieren, vorhanden ist. Dies lässt darauf schließen, dass die Kalziumhomöostase in trachealen glatten Muskelzellen bei T-bet KO-Mäusen verändert ist.

Warum aber ist die Kalziumhomöostase verändert?

Verschiedene Mechanismen könnten dem zugrunde liegen. Beispielsweise könnten der Kalziumgehalt des SR, die Kalziumpuffer in SR oder Zytosol, die Expression von SERCA, Ryanodine- und IP₃-Rezeptoren oder auch der Influx von extrazellulär eine Rolle spielen.

In Lungenschnitten zeigten Zellen von T-bet KO-Mäusen eine höhere Kontraktionsgeschwindigkeit als die von BALB/c. Dabei war ab ACh-Konzentrationen von $>10^{-6}$ M kein Unterschied mehr zwischen den Kontraktionsgeschwindigkeiten beider Mäuse festzustellen (Bergner A, et al. 2006b). Dies gab Anlass, die Anstiegs- und Abfallgeschwindigkeiten des initialen Kalziumtransienten in Monolayerzellen bei 10^{-3} M ACh zu untersuchen.

Sowohl An- als auch Abstiegsgeschwindigkeit war trotz der höheren ACh-Konzentration bei T-bet KO gesteigert. Dabei könnte die Anstiegsgeschwindigkeit mit der erhöhten Kontraktionsgeschwindigkeit in Lungenschnitten korrelieren. Die erhöhte Abstiegsgeschwindigkeit findet dabei kein Korrelat.

Bezieht man sich auf das SR als intrazellulären Hauptspeicher für Kalzium ist es denkbar, dass den gesteigerten Geschwindigkeiten eine vermehrte Ausprägung oder Aktivität von IP_3 - und Ryanodinerezeptoren für den Anstieg zugrunde liegt. Bei Asthmodellzellen menschlicher Luftwege ist vor kurzem eine stärkere Expressierung dieser Rezeptoren nachgewiesen worden. Bei den Zellen unserer Mausspezies allerdings fiel diese Untersuchung negativ aus. Ryanodinerezeptoren wurden kaum exprimiert und zwischen IP_3 -Rezeptoren von T-bet KO und BALB/c gab es keinen Unterschied der Ausprägung (Kellner J, et al. 2008). Damit bleibt noch die Möglichkeit einer vermehrten Aktivität der vorhandenen Rezeptoren.

Es ist außerdem möglich, dass Puffer im SR das Kalzium bei T-bet KO schneller freigeben oder ein erhöhter Kalziumgehalt der Zelle mehr Kanäle zur Freisetzung aktiviert.

Die schnellere Abfallgeschwindigkeit könnte von Nutzen sein, um intrazelluläre Speicher schnell wieder aufzufüllen und Kalzium bei erneuter Stimulation schneller wieder verfügbar zu haben. Dabei könnten entweder mehr SERCAs exprimiert werden oder die Aktivität der vorhandenen Pumpen könnte gesteigert sein. Bei Untersuchungen zur Ausprägung von SERCA 2 fand sich kein Unterschied zwischen T-bet KO und BALB/c, aber wiederum ein stärkeres Auftreten in menschlichen mit IL-13 oder -4 inkubierten Atemwegsmuskelzellen (Kellner J, et al. 2008). Wiederum steht aus, die Aktivität dieser Pumpen zu untersuchen. Auch die Möglichkeit des Vorhandenseins anderer SERCA-Isoformen bei murinen trachealen Muskelzellen sollte bedacht werden. Desweiteren ist ein vermehrter Efflux durch veränderte Pumpen und Kanäle in den Extrazellulärraum denkbar.

In vorrangegangenen Untersuchungen von Lungenschnitten wurde publiziert, dass der initiale Transient die Stärke der Kontraktion bestimmt und Oszillationen die Kontraktion aufrecht erhalten (Bergner A, Sanderson MJ 2003, Bergner A, et al. 2006b). An anderer Stelle wurde

beschrieben, dass die Spannung glatter Trachealmuskelzellen vom Kalziumspitzenwert determiniert und dann von einer Art stabilen Niveau aufrecht erhalten wird, welches aber erst nach mehreren Minuten erreicht wird (Shieh CC, et al. 1991). Ab einer bestimmten Konzentration Acetylcholin (10^{-8} M) wurden in Lungenschnitten keine Oszillationen nahe der Grundlinie mehr gesehen. Stattdessen stellte sich ein Plateau ein oder Oszillationen traten auf erhöhtem Niveau auf (Bergner A, et al. 2006b). Dort wurde eine Aufnahmegeschwindigkeit von bis zu 10 Bildern/Sekunde verwendet, um hochfrequente Oszillationen zu detektieren. Diese würden bei der hier vorliegenden Aufnahmegeschwindigkeit von 0,5 Bildern/Sekunde überhaupt nicht bemerkt werden. An anderer Stelle wird publiziert, dass mit erhöhter ACh-Konzentration auch die Frequenz von Oszillationen steigt (Prakash YS, et al. 2000). Damit würden bei 1 mM Acetylcholin mehr Oszillationen auftreten als bei den Konzentrationen, die bei den Lungenschnitten verwendet wurden. Diese könnten so schnell sein, dass sie nur sehr schwer zu detektieren wären. Dies widerspricht einem Bericht, der aussagt, dass zwischen 10^{-6} und 10^{-3} M ACh keine Frequenzänderung der Oszillationen in glatten Muskelzellen von murinen Lungenschnitten vorliegt (Bergner A, Sanderson MJ 2002a). Bei letzterer Untersuchung wurden Aufnahmen von bis zu 60 Bildern pro Sekunde gemacht.

Die Oszillationen, die während des Acetylcholin-induzierten Kalzium-Signalings in den Monolayer-Kulturen aufgezeichnet wurden und die 5% Marke überschritten, zeigten sowohl in Frequenz als auch in Prozent der oszillierenden Zellen keinen Unterschied zwischen T-bet KO und BALB/c. In Lungenschnitten von T-bet KO war der Prozentsatz der Zellen erhöht, die Oszillationen zeigen, die Frequenz war auch da gleich (Bergner A, et al. 2006b).

Da die Kontraktionen der trachealen glatten Muskelzellen nicht untersucht werden sollten, können keine Aussagen dazu gemacht werden, wie Kontraktion, initialer Transient und Oszillationen in diesen Zellen zusammenhängen.

Weshalb hier kaum Oszillationen aufgezeichnet wurden und keine Unterschiede zwischen T-bet KO und BALB/c bestehen, bleibt zu untersuchen. Wie schon beschrieben, könnte die Frequenz der Oszillationen so hoch sein, dass sie nicht detektiert worden sind. Vielleicht sind kaum Oszillationen vorhanden, was einen der Unterschiede zwischen bronchialer und trachealer Muskelzelle darstellen könnte. Allerdings wäre es auch möglich, dass die Mechanismen, über die Oszillationen auftreten, nicht identisch sind. So wird in Muskelzellen der Schweinetrachea angenommen, dass hauptsächlich Kalzium induzierte Kalziumfreisetzung (CICR) über Ryanodinrezeptoren dafür eine Rolle spielt (Prakash YS, et al. 2000). Die Beteiligung dieser Rezeptoren ist aber für murine glatte tracheale Muskelzellen

unserer Mausspezies noch nicht nachgewiesen. Sie werden scheinbar überhaupt kaum exprimiert (Kellner J, et al. 2008). Desweiteren könnten im intakten Zellverband der Lungenschnitte Mechanismen des interzellulären Kalzium-Signalings eine Rolle spielen, die in den Monolayern so nicht stattfinden können.

Dass die Kalziumhomöostase in glatten trachealen Muskelzellen von T-bet KO-Mäusen verändert ist, steht außer Frage. Welche Rolle dabei Oszillationen spielen und über welche Mechanismen diese stattfinden, übersteigt die Grenzen dieser Arbeit und bietet sich für nachfolgende Untersuchungen an.

4.2.2 Acetylcholin-induziertes Kalzium-Signaling in kalziumfreiem Medium

Laut einer Arbeit, die sich mit Acetylcholin-induziertem Kalzium-Signaling in Lungenschnitten beschäftigt, ist der Influx von extrazellulärem Kalzium nicht direkt nötig für das ACh-induzierte Signaling. Er kann aber durchaus eine Rolle für das Wiederauffüllen von intrazellulären Speichern und als Ausgleich für Verluste über die Zellmembran spielen (Bergner A, Sanderson MJ 2002a).

Trotz dieses Ansatzes kann die Rolle von extrazellulärem Kalzium beim Signaling nicht von vornherein missachtet werden. Beispielsweise kommt es bei Blockierung der SERCA durch CPA zu einem spannungsabhängigen Kalziuminflux über die Zellmembran in der glatten Atemwegsmuskulatur von Hunden (Janssen LJ, Nana R 1997). Zudem könnte externes Kalzium zur Generation spontaner Kontraktionen glatter Atemwegsmuskeln beitragen (Bergner A, Sanderson MJ 2002a).

Der Einfluß des externen Kalziums sollte demnach auch bei trachealen Muskelzellen eliminiert werden. Dafür wurde den angefärbten Zellen in kalziumfreiem Medium Acetylcholin zugegeben und die Reaktion zum Vergleich mit kalziumhaltigem Medium aufgezeichnet. Dabei fiel auf, dass sich schon vor der Zugabe von Acetylcholin die Fluoreszenz änderte. Es kam zu spontanen Kalziumsignalen. Das führte dazu, dass nicht mehr abzugrenzen war, welche Zellen spontan und welche auf Acetylcholin reagierten. Ein Vergleich konnte nicht stattfinden. Diese spontanen Änderungen sind in Lungenschnitten nur in kalziumhaltigem Medium vorbeschrieben (Bergner A, et al. 2006b). Die Beobachtung der spontanen Änderungen führte zum Abbruch der Versuchsreihe. Stattdessen wurde auf Acetylcholinzugabe verzichtet und einzig die spontanen Änderungen untersucht.

4.2.3 Spontanes Kalzium-Signaling in kalziumfreiem Medium

4.2.3.1 Allgemeines

Für den Eintritt des Kalziums von extrazellulär in das Zytosol stehen vielfältige Mechanismen zur Verfügung. Dazu gehören beispielsweise spannungs-, rezeptor-, speicher- oder mechanisch-betriebene Kanäle. Um Kalzium wieder zurück in den Extrazellulärraum zu befördern, werden unter anderem Plasmamembran-Kalzium-ATPasen und Natrium/Kalzium-Austauscher genutzt (Berridge MJ, et al. 2000, Bootman MD, et al. 2001).

Um den Kalziumeintritt von außen zu verhindern, wurde eine 0,02%ige EDTA-Lösung nach sHBSS-Wegnahme zugegeben. Die Zugabe musste vor der Aufnahme unter dem Mikroskop erfolgen. Bei dem Versuch, die Lösung während der Mikroskopie aufzubringen, verschlechterten sich die Bildschärfe und der Fokus derartig, dass keine genauen Messungen mehr durchführbar waren. Die Zeiten zwischen EDTA-Lösungszugabe und Beginn der Aufnahmen waren nicht einheitlich zu halten, da Parameter wie die Belichtungszeit immer individuell auf die jeweilige Zellkultur abgestimmt werden mussten. Dadurch war es nicht möglich, einen initialen Transienten zu bestimmen und diesen von Oszillationen abzugrenzen. Die Beobachtung eines maximalen Transienten war möglich, jedoch ist es unklar, ob es sich dabei um den wahren maximalen Transienten handelt. Da dennoch Messwerte zum Vergleich benötigt wurden, musste diese Fehlerquelle vernachlässigt werden, sollte aber beim Lesen der Ergebnisse beachtet werden.

Beim Auszählen der spontan reagierenden Zellen fand sich bei T-bet KO kaum ein Unterschied zu den ACh-induzierten Zellen. 31% der Zellen zeigten spontane Fluoreszenzänderungen. Bei den BALB/c-Zellen wiesen 10% mehr Zellen als beim ACh-induzierten Signaling (also 46%) spontane Fluoreszenzänderungen auf. Diese Zahlen halten sich dennoch in ähnlichem Rahmen wie bei Acetylcholinstimulierung.

Warum gibt es diese spontanen Fluoreszenzänderungen in beiden Zellpopulationen? In glatten Muskelzellen von Katzenmagen verschwanden spontane kontraktile und elektrische Aktivität in kalziumfreier Lösung. Als man EDTA zu dieser Lösung dazugab, trat eine Depolarisation der Zellmembran und Fluktuationen des Membranpotentials abhängig von der extrazellulären Natriumkonzentration auf. Dies führte zu der Annahme, dass die Membranpotentialänderungen über Natriumionen, die durch die Kalziumkanäle eindringen, bestimmt werden. Diese Potentiale könnten für die Ausschüttung von Kalzium aus intrazellulären Speichern verantwortlich sein (Bayginov O, et al. 1989). Auch in einer anderen

Untersuchung wird davon ausgegangen, dass Depolarisations-getriggerte Ausschüttung intrazellulären Kalziums keinen Influx von extrazellulärem Kalzium benötigt (Mangel AW, et al. 1982). Dieser Mechanismus könnte auch auf tracheale Muskelzellen der T-bet KO- und BALB/c-Mäuse zutreffen. Zum Beispiel könnte es möglich sein, dass die trachealen Muskelzellen das externe Kalzium benötigen, um ihr Membranpotential stabil zu halten und dann auch keine spontanen Signale bei Anwesenheit externen Kalziums generieren. Bei Wegnahme dessen könnte dieses Gleichgewicht zu Potentialänderungen und damit zu Kalziumsignalen führen.

Vielleicht ist diese Depolarisation aber gar nicht nötig. Bei Wegnahme und Pufferung des extrazellulären Kalziums könnte ein Transient über die Zellmembran entstehen, der im Zytosol vorhandenes Kalzium nach außen befördert. Diese Wegnahme des intrazellulären Kalziums könnte die basale Leckage des SR durch ein größeres Konzentrationsgefälle verstärken. Das so ins Zytosol gelangende Kalzium könnte dann über CICR sichtbare Kalziumsignale aus den intrazellulären Speichern triggern.

Erstaunlich ist, dass diese spontanen Signale bei Lungenschnitten von T-bet KO und BALB/c nicht für kalziumfreies Medium, sondern nur in kalziumhaltiger Lösung beschrieben worden sind (Bergner A, et al. 2006b). An anderer Stelle wird berichtet, dass sowohl in kalziumhaltiger als auch in kalziumfreier EDTA-haltiger Lösung spontane Kalziumsignale sichtbar waren, nochmals unterstreichend, dass Kalziuminflux von außen nicht nötig ist (ZhuGe R, et al. 1999).

Andererseits scheint der Kalziumeintritt von außen für tracheale Muskelzellen wichtiger zu sein als für bronchiale, da sie laut Janssen und Kollegen bei Nutzung einer 1 mM EDTA-Lösung kaum noch auf Carbachol reagierten. Bronchiale Muskelzellen reagierten unter dieser Bedingung jedoch gleich gegenüber Kontrollen in kalziumhaltigem Medium (Janssen LJ, et al. 2001). Dies relativiert die Feststellung, dass in den Lungenschnitten keine spontanen Änderungen in EDTA-Lösung auftauchten, da generell ein unterschiedliches Verhalten trachealer und bronchialer Muskelzellen in diesem Medium aufzutreten scheint.

4.2.3.2 Kalziumsignale

Die maximale Fluoreszenzänderung, Anstiegs- und Abfallsgeschwindigkeit der BALB/c-Zellen waren jeweils größer als bei T-bet KO. Die Ergebnisse verhalten sich demnach genau spiegelbildlich zu den Acetylcholin-induzierten Fluoreszenzänderungen, wo T-bet KO die höheren Transienten und Geschwindigkeiten zeigt. Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um einen größeren Transienten bei BALB/c oder um erniedrigte Kalziumsignale bei T-bet

KO handelt, wurden die ACh-induzierten Signale des jeweiligen Mausmodells mit den spontanen EDTA-Lösungs-getriggerten Signalen verglichen.

Bei diesem Vergleich muss beachtet werden, dass das Acetylcholin-induzierte Signaling sicherlich andere Aktivierungswege als die spontanen Fluoreszenzänderungen aufweist. Ob also beide Transienten vergleichbar sind, kann in Frage gestellt werden. Dass die Kalziumausschüttung aus dem SR in beiden Fällen hauptsächlich über Ryanodine- und IP₃-Rezeptoren stattfindet, bleibt aber unbestritten (Berridge MJ, et al. 2000). Deswegen soll hier trotz unterschiedlicher Aktivierungskaskaden der Vergleich vorgenommen werden. Problematisch bleibt weiterhin der scheinbare maximale Transient, da dieser hier mit dem initialen ACh-induzierten gleichgesetzt werden muss.

Der Vergleich sowohl des maximalen/initialen Transienten und der Anstiegsgeschwindigkeit derer ließ keinen Unterschied zwischen ACh-induziert und spontan in EDTA-Lösung bei BALB/c erkennen. Es scheint also bei BALB/c-Zellen für den Transienten und dessen Anstiegsrate keinen Unterschied zwischen den beiden Medien zu geben. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein Kalziuminflux von außen bei den Wildtypmäusen keine Rolle für das initiale Kalzium-Signaling spielt. Ganz anders bei T-bet KO. Sowohl Transient als auch Anstiegsgeschwindigkeit sind in EDTA-Lösung deutlich vermindert. Spielt der Influx extrazellulären Kalziums bei T-bet KO also doch eine größere Rolle? In Lungenschnitten von BALB/c war man übereingekommen, dass dieser Influx beim Acetylcholin-induzierten Signaling von untergeordneter Bedeutung sei (Bergner A, Sanderson MJ 2002a). Der Vergleich von Acetylcholin-induzierten und spontanen Signalen in EDTA-Lösung der T-bet KO-Zellen zeigt in eine andere Richtung. Vielleicht finden sich im Asthmodell Veränderungen von Plasmamembrankanälen, die einen vermehrten Influx extrazellulären Kalziums möglich machen und damit die ACh-induzierten Transienten höher und schneller werden lassen. Vielleicht sind es aber auch intrazelluläre Veränderungen, die bei Wegnahme des extrazellulären Kalziums die Fluoreszenzänderungen in T-bet KO-Zellen schwächer erscheinen lassen. Kalzium ist im SR an Proteine gebunden (Laporte R, et al. 2004). Wenn bei T-bet KO zum Beispiel durch Pufferproteine mehr Kalzium im SR gebunden werden könnte, könnte es sein, dass diese das Kalzium erst bei stärkeren Stimuli als Wegnahme des Extrazellulärkalziums entlassen. Diese Annahme ist rein hypothetisch. Es erscheint eher wahrscheinlich, dass T-bet KO vermehrt auf das extrazelluläre Kalzium angewiesen sind. Die Mechanismen, die dazu führen, bleiben noch zu untersuchen.

Beim Beschreiben der Abfallsraten der Transienten bei Acetylcholin und spontan in EDTA fiel bei BALB/c und T-bet KO eine Erhöhung der Geschwindigkeit in EDTA-Lösung im Vergleich zu Acetylcholin-induziert auf. Diese Beobachtung erscheint nicht unlogisch. Kalzium von außerhalb wird anscheinend für das Auffüllen der intrazellulären Speicher benötigt (Bergner A, Sanderson MJ 2002a). Das SR wird kontinuierlich durch die SERCA aufgefüllt (Laporte R, et al. 2004). Fehlt Kalzium zum Wiederauffüllen, könnte es zu einem schnelleren Stoppen der Transienten führen, da Kalzium nicht ausreichend schnell für das Aufrechterhalten der Transienten in das SR geschafft werden kann.

Kalzium wird auch über die Plasmamembran aus der Zelle geräumt (Berridge MJ, et al. 2003). Ist das Konzentrationsgefälle durch fehlendes extrazelluläres Kalzium größer als in sHBSS, könnte dieser Vorgang beschleunigt stattfinden. Auch dadurch könnte die schnellere Abfallsrate bedingt sein. Aus diesen Gründen sollte der erhöhte Abfallgeschwindigkeit hier keine besondere Bedeutung zugemessen werden.

Beim Acetylcholin-induzierten Kalzium-Signaling waren weder Anzahl der Oszillationen noch Zellzahl, die Oszillationen zeigten, zwischen T-bet KO und BALB/c unterschiedlich. Die Häufigkeit der Fluoreszenzänderungen ist auch in kalziumfreiem Medium nicht signifikant verschieden, betrachtet man BALB/c und T-bet KO. Der Prozentsatz aber der Zellen mit mehr als einer Fluoreszenzänderung in der EDTA-Lösung ist bei T-bet KO höher als bei BALB/c. In Lungenschnitten konnte diese Beobachtung in kalziumhaltigem Medium gemacht werden. Dort wurde geschlussfolgert, dass eine gesteigerte Rekrutierung von Muskelzellen mit Oszillationen zur Aufrechterhaltung einer stärkeren Kontraktion der Zellen bei T-bet KO beitragen könnte. Es wurden Zellen im Zellverband untersucht und der erhöhte Prozentsatz oszillierender Zellen mit bronchialer Hyperreagibilität korreliert (Bergner A, et al. 2006b). In Monolayerkulturen isolierter trachealer Muskelzellen kann man diese Beobachtung nicht zum Vergleich heranziehen, zumal die Kontraktilität der Zellen gar nicht untersucht wurde. Warum also in EDTA-Lösung T-bet KO-Zellen zu einem höheren Prozentsatz als BALB/c-Zellen oszillieren und in sHBSS kein Unterschied feststellbar ist, kann hier nicht geklärt werden.

Schaut man sich die Oszillationen wieder im Vergleich ACh-induziert und spontan in kalziumfreiem Medium an, sind sowohl Häufigkeit als auch Zellzahl mit Oszillationen in EDTA-Lösung höher. Dies korreliert mit der gesteigerten Abfallsrate. Man könnte annehmen, dass wegen fehlendem extrazellulärem Kalzium nicht schnell genug Kalzium wieder in das

SR gepumpt werden kann, um den Transienten länger aufrecht zu halten. Wenn nur Kalzium von außen benutzt werden würde, um das SR wieder aufzufüllen, würden in EDTA vielleicht keine Oszillationen dem Transienten folgen.

Doch die SERCA pumpt auch frisch ausgeschüttetes Kalzium direkt aus dem Zytosol wieder in das SR (Berridge MJ, et al. 2000). Nicht zu vergessen sind zudem die Mitochondrien. In verschiedenen glatten Muskelzellen wurde nachgewiesen, dass diese Kalzium aufnehmen, das aus dem SR ausgeschüttet wird (Drummond RM, Tuft RA 1999, Szado T, et al. 2003). Danach haben sie die Möglichkeit Kalzium langsam wieder abzugeben und zum Auffüllen des SR bereitzustellen (Babcock DF, et al. 1997, Bootman MD, et al. 2001).

So bleibt der Zelle auch in fehlendem extrazellulären Kalzium noch die Möglichkeit Oszillationen zu zeigen. Wenn, wie zuvor angenommen, der Transient schnell abgefallen ist, aber der Stimulus in Form des fehlenden extrazellulären Kalziums erhalten bleibt, erscheint das Auftreten einer erneuten Oszillation sinnvoll. Wenn ausreichend Kalzium im SR wieder mobilisiert werden kann, könnte es zur erneuten Fluoreszenzänderung kommen.

4.2.4 Beteiligung von IP₃-Rezeptoren

Die IP₃-Rezeptoren, als Teil der Kalzium-entlassenden Kanäle des SR, wurden durch Xestospongine D blockiert. Xestospongine gelten als potente Inhibitoren der IP₃-Rezeptoren (Laporte R, et al. 2004). Allerdings ist nicht ganz klar, in welchem Maße sie auch an anderen Rezeptoren der Zelle wirken. Beispielsweise wirken sie in der Glattmuskel-Zelllinie A7r5 ebenso stark als Inhibitor der SERCA. Am basalen Ausstrom aus dem SR ändern sie nichts, was eine langsame Entleerung dessen mit Hemmung der Wiederaufnahme von Kalzium zur Folge hätte (De Smet P, et al. 1999). In einer anderen Zelllinie wird auch die basale Entleerung blockiert (Gafni J, et al. 1997). Xestospongine wird zusätzlich eine Wirkung am Ryanodinrezeptor zugeschrieben (Laporte R, et al. 2004). Beachtet man diese möglichen Angriffsstellen am SR, fällt eine exakte Beurteilung der Kalziumsignale nach Xestospongine-Inkubation nicht leicht, da auch ein durch basale Leckage entleertes SR zur Verminderung des initialen Transienten beitragen könnte.

Eine Inkubation von Lungenschnitten mit 10 µM Xestospongine inhibierte den Acetylcholin-induzierten Kalziumtransienten der glatten Muskelzellen. Dort wurde geschlussfolgert, dass IP₃-Rezeptoren an der Kalziumausschüttung in glatten Atemwegsmuskelzellen von BALB/c-Mäusen beteiligt sind (Bergner A, Sanderson MJ 2002a). Diese Beteiligung sollte nun auch in trachealen glatten Muskelzellen dieser Spezies, auf deren Hintergrund auch T-bet KO basiert, untersucht werden, um später folgenden Westernblotanalysen Vorarbeit zu leisten.

Tatsächlich wurde der Acetylcholin-induzierte Kalziumtransient nach Inkubation mit 10 μM Xestospongine D nur noch abgeschwächt vorgefunden. Nach dem Versuch einer Inkubation mit 50 μM Xestospongine, erschien dieser Transient jedoch erhöht im Vergleich mit nicht inkubierten Zellen. Die reagierende Anzahl Zellen betrug da lediglich 12 im Vergleich zu 166 Zellen ohne Inkubation. Um die Zellzahl zu erhöhen, wurden diese 12 mit 50 μM inkubierten Zellen zusammen mit den 32 mit 10 μM inkubierten Zellen betrachtet. Dabei stellte sich ein insgesamt deutlich erniedrigter Transient dar. Ob 50 μM Xestospongine eine geeignete Konzentration für diese Muskelzellen darstellt, ist nicht eindeutig. Höhere Konzentrationen sollten eine stärkere Blockade der Rezeptoren bewirken (Gafni J, et al. 1997). Allein diese Feststellung stellt das Ergebnis der 50 μM Blockade in Frage. In Lungenschnitten wurden 10 μM verwendet und etabliert (Bergner A, Sanderson MJ 2002a). Das macht die Verwendung und Beurteilung dieser Konzentration hier sinnvoll, da es sich um die gleiche Mauslinie handelt. Sowohl in Lungenschnitten als auch in trachealen glatten Muskelzellen von BALB/c scheinen demnach IP_3 -Rezeptoren beim Kalzium-Signaling eine Rolle zu spielen. Diese Beobachtung ist aufgrund der beschriebenen potentiellen Wirkungen von Xestosponginen an der Zelle kritisch zu betrachten. Endgültigen Aufschluss über die IP_3 -Rezeptor-Verteilung und mögliche Veränderungen derer in T-bet KO-Mäusen können wahrscheinlich nur proteinbiochemische Verfahren geben. Dabei wurde schon festgestellt, dass es keinen Unterschied bezüglich der Ausprägung der Rezeptordichte zwischen T-bet KO und BALB/c gibt (Kellner J, et al. 2008).

4.2.5 Beteiligung von Ryanodinerezeptoren

Ryanodinerezeptoren können durch Ryanodine in einen geschlossenen Zustand versetzt werden. Dieser wird in mikromolaren oder höheren Konzentrationen erreicht (Fill M, Copello JA 2002, Laporte R, et al. 2004). In glatten Muskelzellen von Lungenschnitten wurden diese Kanäle mit 200 μM Ryanodine blockiert. Nach Acetylcholinzugabe wurden dort keine Fluoreszenzänderungen mehr gesehen, was zu der Annahme führte, dass Ryanodinerezeptorkanäle zum Kalzium-Signaling in glatten Atemwegsmuskelzellen beitragen (Bergner A, Sanderson MJ 2002a). Dieses Ergebnis kann hier nicht bestätigt werden. Die Blockade der Kanäle erfolgte mit einer höheren Konzentration Ryanodine. Diese Konzentrationserhöhung sollte zu keiner Verschlechterung der Blockade führen, sondern einen zumindest gleichwertigen Verschluss der Kanäle bewirken (Laporte R, et al. 2004). In trachealen glatten Muskelzellen der Rasse BALB/c konnte kein Unterschied zwischen Acetylcholin-induzierten Transienten in mit Ryanodine inkubierten Zellen und ohne

Ryanodine gefunden werden. Dies lässt eine rege Beteiligung der Ryanodinerezeptoren am Kalzium-Signaling in diesen Zellen unwahrscheinlich werden. Bei Beurteilung dieses Ergebnisses sei noch einmal auf die wenigen Acetylcholin-induzierten Oszillationen hingewiesen, die möglicherweise über Ryanodinerezeptorkanäle (CICR) getriggert werden (Prakash YS, et al. 2000). Natürlich ist es auch möglich, dass in diesen trachealen Muskelzellen Ryanodinerezeptoren Typ 1 vorkommen. Für diese ist die Affinität zu Ryanodine gering, verglichen mit Ryanodinerezeptoren Typ 2. Allerdings stellen RyR 2 und 3 die in Glattmuskelzellen dominierende Kanalgruppe (Laporte R, et al. 2004). Damit wäre es ungewöhnlich ausgerechnet erstere in trachealen Glattmuskelzellen zu finden. Es scheint, als ob keiner der Subtypen in trachealen Muskelzellen unserer Spezies eine größere Rolle spielt, da kaum eine Expressierung von Ryanodinerezeptoren in diesen Zellen gefunden werden konnte (Kellner J, et al. 2008). Wie schon bei den IP₃-Rezeptoren, so ist auch bei den Ryanodinerezeptoren eine weitere Klärung der Verteilung und Ausprägung durch proteinbiochemische Analyse anzustreben.

4.2.6 Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums

Um zu klären, ob der erhöhte initiale Kalziumtransient bei T-bet KO mit einem erhöhten Kalziumgehalt des SR einhergeht, musste dieses entleert und der Kalziumanstieg in der Zelle gemessen werden.

Am Anfang wurde versucht die Öffnungswahrscheinlichkeit der Ryanodinerezeptoren durch Zugabe von Caffeine zu erhöhen. Diese Untersuchung kam zu keinem Ergebnis, da kaum Fluoreszenzänderungen gemessen werden konnten. Trotz Verwendung von millimolaren Konzentrationen, die bei verschiedenen glatten Muskelzellen etabliert sind (Laporte R, et al. 2004), wurden nur sehr wenige Zellen zur Reaktion gebracht. In Lungenschnitten konnte bereits bei einer Konzentration von 1 mM Caffeine ein insgesamt erhöhter Kalziumanstieg und damit potentieller SR-Kalziumgehalt bei T-bet KO festgestellt werden (Bergner A, et al. 2006b). Es scheint nicht verwunderlich, dass die trachealen glatten Muskelzellen hier keine Reaktion auf Caffeine zeigen. Wirkt es doch am Ryanodinerezeptor (Pessah IN, et al. 1987, Bazan-Perkins B, et al. 2000) und dieser scheint, mit Verweis auf den vorangegangenen Abschnitt dieser Arbeit, kaum wesentlich an der Kalziumhomöostase beteiligt zu sein.

Daraufhin wurde ein weiterer Stoff, CPA, eingesetzt. Dieses wirkt nicht am Ryanodinerezeptor, sondern an der SERCA. Es inhibiert sie und damit den Kalziumtransport zurück in das SR (Goeger DE, et al. 1988). Durch den kontinuierlich vorhandenen Ausstrom

aus dem SR entleert es sich ohne wieder aufgefüllt werden zu können. In Lungenschnitten wurde durch den Einsatz von 1 μM CPA ein gleiches Ergebnis wie durch Caffeine erlangt. Der Kalziumausstrom war bei T-bet KO erhöht und implizierte so wiederum einen höheren Gehalt im SR (Bergner A, et al. 2006b). Aber auch auf CPA reagierten kaum tracheale Muskelzellen. Allerdings wirkt CPA konzentrationsabhängig mit beispielsweise stärksten Kontraktionen bei erst 60 μM in Atemwegsmuskelzellen von Hunden (Janssen LJ, Nana R 1997). In trachealen Muskelzellen konnte bei Konzentrationssteigerung zwischen 0,5 und 20 μM keine einheitliche Steigerung der Kalziumtransienten beobachtet werden, was die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion in diesen Zellen in Frage stellt. Stattdessen reagierten ein Drittel der BALB/c-Zellen erst bei 20 μM , 2/3 aber bei Konzentrationen < 2 μM . Bei T-bet KO waren es jedoch über 90% der Zellen, die erst bei 20 μM reagierten. Auch in bovinen glatten Atemwegsmuskelzellen wurde die Konzentrationsabhängigkeit schon hinterfragt und konnte nicht bestätigt werden (Ethier MF, et al. 2001).

Das erklärt aber noch nicht die niedrige Zellzahl, die überhaupt zur Reaktion gebracht werden konnte. Es gibt Berichte, dass CPA temperaturabhängig agiert. In hündischen glatten Atemwegsmuskelzellen konnte bei Temperaturen kleiner 31 Grad Celsius keine Kontraktion durch CPA mehr ausgelöst werden (Janssen LJ, Nana R 1997). Die hiesigen Versuche wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt, was sich demnach negativ auf das CPA auswirken könnte. Andererseits konnten in Lungenschnitten auch bei Raumtemperatur Kalziumtransienten aufgezeichnet werden (Bergner A, et al. 2006b). Natürlich könnte sich hier auch wieder die Unterschiedlichkeit trachealer und bronchialer Muskelzellen auswirken. Gibt es doch Berichte, die in trachealen Muskelzellen schwächere Kontraktionen auf CPA als in bronchialen Muskelzellen publizieren (Janssen LJ, Nana R 1997). Auch ein weiterer Unterschied zwischen trachealen und bronchialen Muskelzellen im Reaktionsverhalten auf CPA findet sich in der Literatur. In hündischen bronchialen Muskelzellen setzten Kontraktionen auf CPA erst nach einer gewissen Zeit ein, wohingegen in trachealen Muskelzellen die Reaktion direkt nach CPA-Zugabe erfolgte (Janssen LJ, Nana R 1997).

Nachdem auch CPA nur sehr schwache Reaktionen in den Kulturen hervorgerufen hatte, wurde versucht durch Thapsigargin eine Inhibition der SERCA herbeizuführen. Thapsigargin gilt als einer der potentesten Inhibitoren der SERCA (Inesi G, Sagara Y 1994). In Lungenschnitten von BALB/c-Mäusen inhibierte eine 30 minütige Inkubation mit 10 μM Thapsigargin den Acetylcholin-induzierten Kalziumtransienten (Bergner A, Sanderson MJ 2002a). Demnach scheint es in diesen Lungenschnitten an der SERCA zu agieren und

verhindert dort die Kalziumwiederaufnahme in das SR, dass durch einen kontinuierlichen Ausstrom entleert wird. Aber auch mit diesem potenten Inhibitor konnten kaum Zellen zur Reaktion gebracht werden. Nur 17% der T-bet KO-Zellen und 13% von BALB/c hatten einen messbaren Kalziumanstieg. Durch eine fehlerhafte Bildspeicherung in einer Aufnahmeserie wurde zudem die Einheitlichkeit der Auswerteverfahren unmöglich gemacht. Trotzdem konnten Fluoreszenzänderungen beobachtet werden. Aber auch in den fehlerhaften Bildern waren nur sehr wenige Zellen am Signaling beteiligt. Dies führte dazu, dass keine weiteren Versuche mit Thapsigargin gemacht wurden. Beim Vergleich der reagierenden Zellen überlagerte trotz der geringen Zahl die Größe der AUC von T-bet KO-Zellen deutlich. So stellt sich bei T-bet KO ein höherer Kalziumgehalt des SR dar. Die Reaktion der wenigen Zellen lässt sich auch hier kaum erklären. Es wird ein für Thapsigargin insensitiver Pumpentyp beschrieben (Bian JH, et al. 1991). Allerdings lässt die erfolgreiche Inhibition des ACh-induzierten Kalzium-Signalings in BALB/c-Lungenschnitten (Bergner A, Sanderson MJ 2002a) Zweifel an dieser Möglichkeit aufkommen. Natürlich ist es auch möglich, dass das Kalziumleak in trachealen glatten Muskelzellen aus dem SR nur sehr schwach ist und deswegen sowohl CPA als auch Thapsigargin in der zweiminütigen Aufnahme kaum Veränderungen gezeigt haben.

Trotz geringer Zellzahl liefert Thapsigargin gleiche Ergebnisse bezüglich des Kalziumgehaltes des SR wie Caffeine und CPA in Lungenschnitten. Daraus kann geschlossen werden, dass tatsächlich der Kalziumgehalt im Asthmodell erhöht ist.

Eine zusätzliche Einschränkung dieses Ergebnisses darf nicht außer Acht gelassen werden. Untersuchungen mit Caffeine ebenso wie mit CPA und Thapsigargin werden zumeist in kalziumfreiem Medium durchgeführt, da Kalzium durch steigende zytosolische Konzentration auch über Membrankanäle von außen in die Zelle gelangt und SR-Messungen damit verfälscht (Inesi G, Sagara Y 1994, Ethier MF, et al. 2001, Laporte R, et al. 2004). Auch in Lungenschnitten wurde der Eintritt extrazellulären Kalziums durch kalziumfreie EDTA-Lösung verhindert (Bergner A, et al. 2006b). Bei den jetzigen Versuchen mit trachealen Muskelzellen war dies nicht möglich. Grund dafür war das spontan auftretende Signaling in kalziumfreiem Medium. Diese spontanen Änderungen hätten durch andere Stoffe hervorgerufene Änderungen der Fluoreszenz verdeckt und die exakte Beurteilung verhindert. Dadurch ist es möglich, dass erhöhte Kalziummessungen bei T-bet KO durch vermehrten Kalziuminflux von extrazellulär hervorgerufen werden. Dabei sei noch einmal auf die Ausführungen zum spontanen Kalzium-Signaling in EDTA-Lösung hingewiesen.

Es ist also durchaus möglich, dass sowohl ein erhöhter Kalziumgehalt des SR, wie bei Lungenschnitten, als auch eine Veränderung in den Membrankanälen zu vermehrtem Kalzium-Signaling bei T-bet KO beitragen können. Die These eines tatsächlich höheren Kalziumgehaltes des SR stärken Untersuchungen, die eine Erhöhung der Pufferproteine Calreticulin und Calsequestrin in SR von T-bet KO-Mäusen beweisen (Kellner J, et al. 2008).

5 Zusammenfassung, Schlußfolgerung, Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollte das Acetylcholin-induzierte Kalzium-Signaling in trachealen glatten Muskelzellen von T-bet KO-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen untersucht werden. Dabei stellen T-bet KO-Mäuse ein etabliertes Asthmamodell dar (Bergner A, et al. 2006a, Bergner A, et al. 2006b). Sie zeichnen sich durch bronchiale Hyperreagibilität, einem charakteristischen Umbau der Luftwege und einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine und inflammatorischer Zellen in der Bronchoalveolären Lavage aus (Finotto S, et al. 2002). Diese Veränderungen werden durch Interleukin 13 (Finotto S, et al. 2005) vermittelt, welches auch in der Pathogenese des Asthma zu finden ist (Larche M, et al. 2003). In Studien an Lungenschnitten dieser Spezies im Vergleich zu BALB/c, dem Wildtyp, fielen bei T-bet KO Veränderungen in der Kalziumhomöostase der glatten Atemwegsmuskelzellen auf. Dies äußerte sich in einem erhöhten Bronchotonus in vitro mit spontanen Kalziumsignalen, stärkeren Acetylcholin-induzierten Kontraktionen im Zusammenhang mit höheren Kalziumtransienten und erhöhtem Prozentsatz an oszillierenden Zellen bei T-bet KO. Außerdem scheint im Sarkoplasmatischen Retikulum von T-bet KO ein erhöhter Kalziumgehalt vorzuliegen (Bergner A, et al. 2006b). Diese Ergebnisse sollten in trachealen glatten Muskelzellen reproduziert werden, um diese leicht zu gewinnenden Zellen proteinbiochemischen Verfahren zugänglich zu machen. Mit diesen Verfahren können bei Bestätigung der Vergleichbarkeit trachealer mit bronchialen Muskelzellen eventuelle Veränderungen in Kanälen, Transportern oder anderer Zellbestandteile für die Kalziumhomöostase nachgewiesen werden. Außer der Untersuchung des Acetylcholin-induzierten Kalzium-Signaling und des Kalziumgehaltes des SR, wurde auf Ryanodine- und IP₃-Rezeptoren ebenso wie auf den Einfluss externen Kalziums ein Augenmerk gelegt.

Dass eine zytoplasmatische Erhöhung von Kalzium zur Kontraktion der Atemwegsmuskulatur führt, wurde schon anderweitig untersucht (Bergner A, Sanderson MJ 2002a, Bergner A, Sanderson MJ 2002b). Da bei Asthma Kontraktilität und Funktionalität der bronchialen Muskulatur Veränderungen unterworfen sind (Amrani Y, Panettieri RA 2003), interessiert nun auch, ob Veränderungen der Kalziumhomöostase dazu beitragen (Amrani Y, Panettieri RA, Jr. 2002, Parameswaran K, et al. 2002, Amrani Y, et al. 2004). Kalzium gelangt durch zwei Wege in das Zytosol. Ersterer ist die Entleerung interner Speicher, letzterer der Einstrom von außen (Bootman MD, et al. 2001). Auf dem Sarkoplasmatischen Retikulum als einem

wichtigen internen Speicher- und Regulationsort für Kalzium in der Zelle (Berridge MJ 2002) sollte nun ein besonderer Fokus in der Kalziumhomöostase bei Asthma bronchiale liegen.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

- Der Acetylcholin-induzierte Kalziumtransient und dessen Anstiegs- und Abfallsgeschwindigkeit ist in glatten trachealen Muskelzellen von T-bet KO erhöht.
- T-bet KO-Zellen zeigen verminderte Transienten und Anstiegsgeschwindigkeiten in kalziumfreier EDTA-Lösung.
- Abfallsgeschwindigkeiten sind sowohl bei T-bet KO als auch bei BALB/c in kalziumfreiem Medium erhöht.
- Oszillationen treten in kalziumhaltigem Medium in beiden Mausspezies kaum und ohne Unterschied auf, in kalziumfreiem Medium sind im Vergleich dazu sowohl Häufigkeit als auch Prozentsatz der oszillierenden Zellen erhöht.
- IP₃-Rezeptoren scheinen am Acetylcholin-induzierten Kalzium-Signaling beteiligt zu sein.
- Die Beteiligung von Ryanodinerezeptoren konnte nicht nachgewiesen werden.
- Der Kalziumgehalt des SR ist in T-bet KO-Zellen erhöht.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich Folgendes: Die Kalziumhomöostase ist in glatten trachealen Muskelzellen von T-bet KO-Mäusen verändert, der Transient nach ACh-Stimulation erhöht und der Kalziumgehalt des SR gesteigert. Dies bestätigt Ergebnisse aus bronchialen Muskelzellen von Lungenschnitten (Bergner A, et al. 2006b). Damit werden tracheale glatte Muskelzellen dieser Spezies auch für Westernblot, andere proteinbiochemische Verfahren und weiterführende Untersuchungen zugänglich gemacht.

Das Fehlen von Oszillationen, der gescheiterte Nachweis von Ryanodinerezeptorbeteiligung bei BALB/c und die spontanen Signale in kalziumfreiem Medium lassen dennoch die Unterschiedlichkeit beider Zellgruppen erkennen.

Weiterführende Untersuchungen an trachealen glatten Muskelzellen können sicherlich weitere Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen diesen und bronchialen glatten Muskelzellen belegen und zum Verständnis der Veränderungen der Kalziumhomöostase beim Asthma bronchiale beitragen. Mit der Möglichkeit der Gewinnung und Kultivierung großer Mengen

trachealer glatter Muskelzellen ist der Forschung an Kanälen, Rezeptoren und Proteinen mit proteinbiochemischen Verfahren ein Grundstein gelegt.

Dabei bleiben noch viele Fragen zu klären. Nur einige davon seien hier genannt.

So müssten für eine genaue Messung des SR-Kalziumgehaltes Alternativen zur üblichen Methodik gefunden werden, die daraus besteht, den Influx von außen durch EDTA-Lösung zu unterbinden. Wenn der Kalziumgehalt wie angenommen tatsächlich erhöht ist, dann müssen Fragen nach dem „Warum“ im Vordergrund stehen. Ist es beispielsweise eine Erhöhung des freien Kalziums zusammen mit der bereits nachgewiesenen Erhöhung der Pufferproteine (Kellner J, et al. 2008)? Ist zusätzlich die Aktivität von IP₃- und Ryanodinerezeptoren gesteigert? Wie sieht es mit der SERCA aus und welche Rolle spielen Plasmamembrankanäle und extrazelluläres Kalzium bei T-bet KO?

Die Beantwortung dieser und weiterer Fragen soll dazu dienen, die Kalziumhomöostase in Zukunft noch besser zu verstehen. Es soll ein Anstoss für die Entwicklung neuer Medikamente und therapeutischer Ansätze gegeben werden, um in Zukunft nicht nur symptom- sondern krankheitsbasiert Menschen mit Asthma bronchiale zu helfen.

Literaturverzeichnis

1. Amrani Y, Panettieri RA. Airway smooth muscle: contraction and beyond. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:272-6.
2. Amrani Y, Panettieri RA, Jr. Modulation of calcium homeostasis as a mechanism for altering smooth muscle responsiveness in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002;2:39-45.
3. Amrani Y, Tliba O, Deshpande DA, Walseth TF, Kannan MS, Panettieri RA, Jr. Bronchial hyperresponsiveness: insights into new signaling molecules. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:230-4.
4. Avner BP, Delongo J, Wilson S, Ladman AJ. A method for culturing canine tracheal smooth muscle cells in vitro: morphologic and pharmacologic observations. *Anat Rec* 1981;200:357-70.
5. Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, Park YB, Hille B. Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *J Cell Biol* 1997;136:833-44.
6. Bayginov O, Bonev A, Boev K, Papisova M. Electromechanical coupling in cat stomach smooth muscle in Ca²⁺-free EGTA-containing solutions. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 1989;15:31-8 (abstract).
7. Bergner A, Kellner J, Kemp da Silva A, Fischer R, Gamarra F, Huber RM. Bronchial hyperreactivity is correlated with increased baseline airway tone. *Eur J Med Res* 2006a;11:77-84.
8. Bergner A, Kellner J, Silva AK, Gamarra F, Huber RM. Ca²⁺-signaling in airway smooth muscle cells is altered in T-bet knock-out mice. *Respir Res* 2006b;7:33.
9. Bergner A, Sanderson MJ. Acetylcholine-induced calcium signaling and contraction of airway smooth muscle cells in lung slices. *J Gen Physiol* 2002a;119:187-98.
10. Bergner A, Sanderson MJ. ATP stimulates Ca²⁺ oscillations and contraction in airway smooth muscle cells of mouse lung slices. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002b;283:L1271-9.
11. Bergner A, Sanderson MJ. Airway contractility and smooth muscle Ca(2+) signaling in lung slices from different mouse strains. *J Appl Physiol* 2003;95:1325-32; discussion 1314.
12. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 2002;32:235-49.
13. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:517-29.
14. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984;312:315-21.
15. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:11-21.
16. Bian JH, Ghosh TK, Wang JC, Gill DL. Identification of intracellular calcium pools. Selective modification by thapsigargin. *J Biol Chem* 1991;266:8801-6 (abstract).
17. Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol* 2002;12:R563-5.
18. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12:3-10.
19. Bowers CW, Dahm LM. Maintenance of contractility in dissociated smooth muscle: low-density cultures in a defined medium. *Am J Physiol* 1993;264:C229-36, abstract.
20. Brown CM. Fluorescence microscopy--avoiding the pitfalls. *J Cell Sci* 2007;120:1703-5.

21. Chiba Y, Ueno A, Sakai H, Misawa M. Hyperresponsiveness of bronchial but not tracheal smooth muscle in a murine model of allergic bronchial asthma. *Inflamm Res* 2004;53:636-42.
22. Chung KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J* 2000;15:961-8.
23. Collier ML, Ji G, Wang Y, Kotlikoff MI. Calcium-induced calcium release in smooth muscle: loose coupling between the action potential and calcium release. *J Gen Physiol* 2000;115:653-62.
24. De Smet P, Parys JB, Callewaert G, Weidema AF, Hill E, De Smedt H, Erneux C, Sorrentino V, Missiaen L. Xestospongins C is an equally potent inhibitor of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca(2+) pumps. *Cell Calcium* 1999;26:9-13.
25. Dixon WE. Contributions to the physiology of the lungs: Part I. The bronchial muscles, their innervation, and the action of drugs upon them. *J Physiol* 1903;29:97-173.
26. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med* 2006;355:2226-35.
27. Eglen RM, Hegde SS, Watson N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev* 1996;48:531-65.
28. sample chapter on asthma from the "European Lung White Book" European Respiratory Society, 2003. (Accessed 15.01.2008, at www.ersnet.org.)
29. Ethier MF, Yamaguchi H, Madison JM. Effects of cyclopiazonic acid on cytosolic calcium in bovine airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L126-33.
30. Fatigati V, Murphy RA. Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. *J Biol Chem* 1984;259:14383-8.
31. Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 2002;82:893-922.
32. Finotto S, Hausding M, Doganci A, Maxeiner JH, Lehr HA, Luft C, Galle PR, Glimcher LH. Asthmatic changes in mice lacking T-bet are mediated by IL-13. *Int Immunol* 2005;17:993-1007.
33. Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, Glimcher LH. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 2002;295:336-8.
34. Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF, Pessah IN. Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 1997;19:723-33.
35. Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 2000;27:97-106.
36. Global Initiative for Asthma (GINA): Global Burden of Asthma. 2004. (Accessed 15.01.2008, at www.ginasthma.com.)
37. Global Initiative for Asthma (GINA): Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2007. (Accessed 15.01.2008, at www.ginasthma.org.)
38. Goeger DE, Riley RT, Dorner JW, Cole RJ. Cyclopiazonic acid inhibition of the Ca²⁺-transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem Pharmacol* 1988;37:978-81.
39. Halayko AJ, Solway J. Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 2001;90:358-68.

40. Hall IP, Kotlikoff M. Use of cultured airway myocytes for study of airway smooth muscle. *Am J Physiol* 1995;268:L1-11.
41. BALB/c. 2007. (Accessed 05.09.2007, at www.harlaneurope.com.)
42. Herman B. Fluorescence microscopy. *Curr Protoc Cell Biol* 2002;Chapter 4:Unit 4 2.
43. Hirota S, Helli P, Janssen LJ. Ionic mechanisms and Ca²⁺ handling in airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2007;30:114-33.
44. Hirst SJ. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. *Eur Respir J* 1996;9:808-20.
45. Inesi G, Sagara Y. Thapsigargin, a high affinity and global inhibitor of intracellular Ca²⁺ transport ATPases. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:313-7.
46. Inesi G, Sagara Y. Specific inhibitors of intracellular Ca²⁺ transport ATPases. *J Membr Biol* 1994;141:1-6.
47. James P, Inui M, Tada M, Chiesi M, Carafoli E. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 1989;342:90-2.
48. Janssen LJ, Nana R. Na⁺/K⁺ ATPase mediates rhythmic spontaneous relaxations in canine airway smooth muscle. *Respir Physiol* 1997;108:187-94.
49. Janssen LJ, Wattie J, Lu-Chao H, Tazzeo T. Muscarinic excitation-contraction coupling mechanisms in tracheal and bronchial smooth muscles. *J Appl Physiol* 2001;91:1142-51.
50. Jiang H, Stephens NL. Calcium and smooth muscle contraction. *Mol Cell Biochem* 1994;135:1-9.
51. Kabsch W, Vandekerckhove J. Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992;21:49-76.
52. Kellner J, Gamarra F, Welsch U, Jorres RA, Huber RM, Bergner A. IL-13/Ralpha2 reverses the effects of IL-13 and IL-4 on bronchial reactivity and acetylcholine-induced Ca⁺ signaling. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;142:199-210.
53. Kellner J, Tantzsch J, Oelmez H, Edelmann M, Fischer R, Huber RM, Bergner A. Mechanisms altering airway smooth muscle cell Ca⁺ homeostasis in two asthma models. *Respiration* 2008;76:205-15.
54. Klinke R, Bauer C. *Lehrbuch der Physiologie*. 4., korr. Aufl., 85-99 ed. Stuttgart: Thieme; 2003
55. Kurucz I, Szelenyi I. Current animal models of bronchial asthma. *Curr Pharm Des* 2006;12:3175-94.
56. Laporte R, Hui A, Laher I. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 2004;56:439-513.
57. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:450-63; quiz 464.
58. Low RB, White SL. Lung smooth muscle differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:869-83.
59. Lytton J, Westlin M, Hanley MR. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 1991;266:17067-71.
60. Mangel AW, Nelson DO, Rabovsky JL, Prosser CL, Connor JA. Depolarization-induced contractile activity of smooth muscle in calcium-free solution. *Am J Physiol* 1982;242:C36-40 (abstract).
61. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004;59:469-78.
62. Moller JV, Juul B, le Maire M. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1996;1286:1-51.

63. Nakagawa M, Mamoru E. Structures of Xestospongin A, B, C and D, Novel Vasodilative Compounds from Marine Sponge, *Xestospongia Exigua*. *Tetrahedron Letters* 1984;25:3227-3230.
64. Health, United States, 2007. National Center for Health Statistics (NCHS), 2007. (Accessed 15.01.2008, at www.cdc.gov/nchs/hus.htm.)
65. North AJ. Seeing is believing? A beginners' guide to practical pitfalls in image acquisition. *J Cell Biol* 2006;172:9-18.
66. Ozaki H, Hori M, Kim YS, Kwon SC, Ahn DS, Nakazawa H, Kobayashi M, Karaki H. Inhibitory mechanism of xestospongin-C on contraction and ion channels in the intestinal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2002;137:1207-12.
67. Parameswaran K, Janssen LJ, O'Byrne PM. Airway hyperresponsiveness and calcium handling by smooth muscle: a "deeper look". *Chest* 2002;121:621-4.
68. Patel S, Joseph SK, Thomas AP. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 1999;25:247-64.
69. Pessah IN, Stambuk RA, Casida JE. Ca²⁺-activated ryanodine binding: mechanisms of sensitivity and intensity modulation by Mg²⁺, caffeine, and adenine nucleotides. *Mol Pharmacol* 1987;31:232-8.
70. Prakash YS, Pabelick CM, Kannan MS, Sieck GC. Spatial and temporal aspects of ACh-induced [Ca²⁺]_i oscillations in porcine tracheal smooth muscle. *Cell Calcium* 2000;27:153-62.
71. Rabe KF, Adachi M, Lai CK, Soriano JB, Vermeire PA, Weiss KB, Weiss ST. Worldwide severity and control of asthma in children and adults: the global asthma insights and reality surveys. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:40-7.
72. Rabe KF, Vermeire PA, Soriano JB, Maier WC. Clinical management of asthma in 1999: the Asthma Insights and Reality in Europe (AIRE) study. *Eur Respir J* 2000;16:802-7.
73. Racke K, Matthiesen S. The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther* 2004;17:181-98.
74. Rudolf R, Mongillo M, Rizzuto R, Pozzan T. Looking forward to seeing calcium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:579-86.
75. Sanderson MJ, Charles AC, Boitano S, Dirksen ER. Mechanisms and function of intercellular calcium signaling. *Mol Cell Endocrinol* 1994;98:173-87.
76. Seidler NW, Jona I, Vegh M, Martonosi A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1989;264:17816-23.
77. Shieh CC, Petrini MF, Dwyer TM, Farley JM. Concentration-dependence of acetylcholine-induced changes in calcium and tension in swine trachealis. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;256:141-8.
78. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986;103:2787-96.
79. Suissa S, Ernst P. Inhaled corticosteroids: impact on asthma morbidity and mortality. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:937-44.
80. Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD, Herman B. Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev* 1999;79:1089-125.
81. Tao FC, Tolloczko B, Eidelman DH, Martin JG. Enhanced Ca(2+) mobilization in airway smooth muscle contributes to airway hyperresponsiveness in an inbred strain of rat. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:446-53.
82. Thomas D, Tovey SC, Collins TJ, Bootman MD, Berridge MJ, Lipp P. A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* 2000;28:213-23.

83. Tom-Moy M, Madison JM, Jones CA, de Lanerolle P, Brown JK. Morphologic characterization of cultured smooth muscle cells isolated from the tracheas of adult dogs. *Anat Rec* 1987;218:313-28.
84. Wang J, Zohar R, McCulloch CA. Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res* 2006;312:205-14.
85. Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 1998;77:59-79.
86. Global Burden of Disease Estimates. 2002. (Accessed 15.01.2008, at www.who.int.)
87. Fact sheet No 307, Asthma. 2006. (Accessed 15.01.2008, at www.who.int.)
88. Wong JZ, Woodcock-Mitchell J, Mitchell J, Rippetoe P, White S, Absher M, Baldor L, Evans J, McHugh KM, Low RB. Smooth muscle actin and myosin expression in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;274:L786-92.
89. ZhuGe R, Tuft RA, Fogarty KE, Bellve K, Fay FS, Walsh JV, Jr. The influence of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ concentration on Ca²⁺ sparks and spontaneous transient outward currents in single smooth muscle cells. *J Gen Physiol* 1999;113:215-28.
90. Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy* 2007;37:973-88.

Anhang

Anhang 1: Skript für die Berechnung der Ausgleichsfunktion gegen den Bleaching-Effekt des Farbstoffes Oregon Green.

```
-----
%
%
% Matlab-Skript intensity.m
%
% Autor: Heiko Günther
% September 2007
%
% Intensitätsverlauf von Zellen plotten. Dieses Skript ist insbesondere
% für Experimente zur Bestimmung einer Korrekturfunktion gegen den Effekt
% des Bleachings des Zellfarbstoffs gedacht.
% Die Ausgleichskurve ist die Funktion  $f(x)=a1*\exp(-a2*t)+a3*\exp(-a4*t)$ .
%
% Parameter:
% data_in    -> Intensitätsdaten, erzeugt mit dem Skript import_excel.m
%
% Rückgabewert:
% assorted   -> Datensätze, die ein spezifisches Kriterium verletzt haben
% bleaching  -> über alle Messreihen gemitteltes Bleaching
%
%
-----

function [bleaching, assorted] = intensity(data_in, celltype)

% Spalten mit Zeitwerten und Anzahl Zellen entfernen
count = data_in(1,1);
tmp = data_in(1:60,3:count+2);
data_in = tmp;

assorted = [];
datasets = [];

% Zeitvektor
t=0:2:118;

% Ausgleichskurve, abhängig vom Maustyp
if strcmp(celltype, 'tbet')
    % T-bet:
    fit = 0.1024*exp(-0.02501*t) + 0.9122*exp(-0.00138*t);
end
if strcmp(celltype, 'balbc')
    % BalbC:
    fit = 0.2377*exp(-0.01309*t) + 0.7742*exp(-0.0003587*t);
end

% Grafikfenster
close all;
figure('Position',[1 1 700 900])

% Schleife über alle Datensätze
for i=1:count

    % Mittelwert über die ersten 5 Werte
    Mean_Val = mean(data_in(1:5,i));

    % signifikante Ausreißer ermitteln
    threshold_assorted = 0.93;
    if ((data_in(30,i)./Mean_Val) > threshold_assorted)
        assorted = [assorted ; i];
    end

    % F/F0 bilden
    data = data_in(:,i)./Mean_Val;
    datasets = [datasets data];

    % unkorrigierte Daten darstellen
    subplot(2,1,1);
    plot(t',data);
    hold on;
    grid on;
    axis([0 120 0.5 1.1]);
    xlabel('Zeit [s]');
    ylabel('F/F_0');
    %title('Bleaching');

    % Daten mit Korrektur plotten
    subplot(2,1,2);
    plot(t',data - fit');
    hold on;
    grid on;
    axis([0 120 -0.2 0.2]);
    xlabel('Zeit [s]');
    ylabel('F/F_0');
    %title('Bleaching korrigiert');
end

% mittleren Verlauf des Bleachings für diesen Zelltyp ermitteln
% und als rote Linie in das Diagramm aufnehmen
sums = zeros(60,1);

for i=1:count
```

```

        sums = sums + datasets(1:60,i);
    end

sums = sums ./ count;
bleeching = sums;
subplot(2,1,1);
plot(t',sums,'r-');

end

```

Anhang 2: Skript zum Importieren der Messdaten aus Excel. Die Daten sind spaltenweise pro Zelle angeordnet.

```

% -----
%
% Matlab-Skript import_excel.m
%
% Autor: Heiko Günther
% September 2007
%
% Importiert die Intensitätswerte aus Excel-Tabellen und stellt die Daten
% als Matrix in Matlab zur Verfügung.
%
% Parameter:
% filename    -> Dateiname der einzulesenden Excel-Datei
%
% Rückgabewert:
% data       -> Spalte 1:   in Datei gefundene Anzahl Zellen,
%                für die gesamte Spalte gleicher Wert!
%                Spalte 2:   Zeitwerte
%                Spalte 3..n: Datenwerte
% -----

function data = import_excel(filename)

    data = [];

    % Zeitvektor
    t=2:2:120;

    % Einlesen der Daten von Excel
    data_in = xlsread(filename, 'Sheet1');
    dims = size(data_in);

    cell_count = dims(2);

    % Schleife über alle Zellen
    for column = 1:cell_count

        % Zelldaten auswählen
        col = data_in(1:60,column);

        % Normalisierte Darstellung
        F0 = mean(col(1:5));
        tmp = col./F0;

        col = tmp;

        data = [data col];
    end

    cells = [];
    for i = 1:60
        cells = [cells ; cell_count];
    end

    % Rückgabe der Datenwerte
    data = [cells t' data];

end

```

Anhang 3: Skript zur Darstellung der Intensitätsverläufe. Wird insbesondere von der graphischen Auswertesoftware verwendet.

```

% -----
%
% Matlab-Skript plot_cell.m
%
% Autor: Heiko Günther
% September 2007
%
% Darstellung der mit import_data.m importierten Zelldaten.
%
% Parameter:
% data       -> Intensitätsverlauf einer Zelle
% t          -> Zeitwerte
%
% Rückgabewerte:
% -----

function x = plot_cell(data, t)

    close all;

```

```

figure('Position', [400 300 600 400]);
plot(t,data);

xlabel('Zeit [s]');
ylabel('F/F_0');
grid on;

x = 1;
end

```

Anhang 4: Auszug aus dem Quellcode der graphischen Auswertesoftware. Importiert wurde die Klasse „Matlab_auswertung“. Es handelt sich hierbei um eine DLL (dynamische Bibliothek), welche mit der Matlab-Erweiterung „Matlab Builder for .NET“ automatisch aus den Funktionen „plot_cell.m“ und „import_excel.m“ erstellt wurde. Zur Generierung muss in Matlab der Befehl „deploytool“ aufgerufen werden und die beiden genannten Matlab-Skripte hinzugefügt werden. Der Name der Klasse muss „Matlab_auswertung“ benannt sein.

```

// -----
//
// Quellcode-Auszug der grafischen Auswertesoftware
//
// Autor: Heiko Günther
// September 2007
// -----

private: System::Void btnOpenFile_Click(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {

    // Indexauswahlfelder zurücksetzen
    resetFields();

    // Dialog zum Öffnen der Exceldatei konfigurieren
    openFileDialogExcelFile->InitialDirectory = "d:\\";
    openFileDialogExcelFile->Filter = "Excel Tabellen (*.xls)|*.xls";
    openFileDialogExcelFile->RestoreDirectory = true;

    MWNumericArray ^ data;

    if(openFileDialogExcelFile->ShowDialog() == System::Windows::Forms::DialogResult::OK){
        lblFile->Text = openFileDialogExcelFile->FileName;

        // ausgewählten Zelltyp setzen
        System::Byte celltype;
        if (checkBoxBalb->Checked){
            celltype = 1;
        }
        else {
            celltype = 2;
        }

        // Excel Werte in Datenarray einlesen
        data = (MWNumericArray^)matlab->import_excel((MathWorks::MATLAB::NET::Arrays::MWCharArray
^)openFileDialogExcelFile->FileName);
        cell_data = (array<double,2>^)data->ToArray(MWArrayComponent::Real);

        // Anzahl der Zellen und aktuelle Zelle (Spalte in Excel) bestimmen
        cell_count = (System::Int16)cell_data[0,0];
        act_cell = 1;

        // Zeitvektor bestimmen
        time = gcnew array<double,1>(60);

        int i;
        for (i=0; i < 60; i++){
            time[i] = cell_data[i,1];
        }

        // Zellwerte korrigieren
        act_cell_data = correctCellData(cell_data, act_cell);

        lblCells->Text = act_cell.ToString() + "/" + cell_count.ToString();
    }
}

private: void resetFields(){

    textDiff->Text = "";
    textAbfall->Text = "";
    textAnstieg->Text = "";
    textAUC->Text = "";

    Start1->Value = 0;
    Start2->Value = 0;
    Start3->Value = 0;
    Start4->Value = 0;
    Start5->Value = 0;
    Start6->Value = 0;

    End1->Value = 0;
    End2->Value = 0;
    End3->Value = 0;
    End4->Value = 0;
    End5->Value = 0;
    End6->Value = 0;
    MaxIndex->Value = 0;
}

```

```

private: array<double,1>^ correctCellData(array<double,2>^ data, int cellnr){
    array<double,1> ^ cell = gnew array<double,1>(60);

    // Zelle aus Array extrahieren
    int i;
    for (i=0; i < 60; i++){
        cell[i] = data[i,1 + cellnr];
    }

    // Zellen korrigieren
    for (i=0; i < 60; i++){
        // Balb
        if (cell_type == 1){
            cell[i] = cell[i] - (0.2377*Math::Exp(-0.01309*time[i]) + 0.7742*Math::Exp(-0.0003587*time[i]) -
1);
        }

        // Tbet
        if (cell_type == 2){
            cell[i] = cell[i] - (0.1024*Math::Exp(-0.02501*time[i]) + 0.9122*Math::Exp(-0.00138*time[i]) -
1);
        }
    }

    return cell;
}

private: System::Void checkBoxBalb_CheckedChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if (checkBoxBalb->Checked == false){
        checkBoxTbet->Checked = true;
        cell_type = 2;
    }
    else {
        checkBoxTbet->Checked = false;
    }

    act_cell_data = correctCellData(cell_data, act_cell);
}

private: System::Void checkBoxTbet_CheckedChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if (checkBoxTbet->Checked == false){
        checkBoxBalb->Checked = true;
        cell_type = 1;
    }
    else {
        checkBoxBalb->Checked = false;
    }

    act_cell_data = correctCellData(cell_data, act_cell);
}

private: System::Void Start1_ValueChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if ((Start1->Value % 2) != 0) {
        Start1->Value = Start1->Value - 1;
    }
}

private: System::Void Start2_ValueChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if ((Start2->Value % 2) != 0) {
        Start2->Value = Start2->Value - 1;
    }
}

private: System::Void Start3_ValueChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if ((Start3->Value % 2) != 0) {
        Start3->Value = Start3->Value - 1;
    }
}

private: System::Void Start4_ValueChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if ((Start4->Value % 2) != 0) {
        Start4->Value = Start4->Value - 1;
    }
}

private: System::Void Start5_ValueChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if ((Start5->Value % 2) != 0) {
        Start5->Value = Start5->Value - 1;
    }
}

private: System::Void Start6_ValueChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if ((Start6->Value % 2) != 0) {
        Start6->Value = Start6->Value - 1;
    }
}

private: System::Void End1_ValueChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if ((End1->Value % 2) != 0) {
        End1->Value = End1->Value - 1;
    }
}

private: System::Void End2_ValueChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if ((End2->Value % 2) != 0) {
        End2->Value = End2->Value - 1;
    }
}

private: System::Void End3_ValueChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if ((End3->Value % 2) != 0) {
        End3->Value = End3->Value - 1;
    }
}

```

```

}

private: System::Void End4_ValueChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if ((End4->Value % 2) != 0) {
        End4->Value = End4->Value - 1;
    }
}

private: System::Void End5_ValueChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if ((End5->Value % 2) != 0) {
        End5->Value = End5->Value - 1;
    }
}

private: System::Void End6_ValueChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if ((End6->Value % 2) != 0) {
        End6->Value = End6->Value - 1;
    }
}

private: System::Void MaxIndex_ValueChanged(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if ((MaxIndex->Value % 2) != 0) {
        MaxIndex->Value = MaxIndex->Value - 1;
    }
}

private: System::Void btnShowCell_Click(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    // korrigierten Zellverlauf darstellen

    if (act_cell_data == nullptr) {
        MessageBox::Show("Es ist kein Datensatz geladen", "Kein Datensatz geladen");
        return;
    }
    matlab->plot_cell((MWNumericArray^)act_cell_data, (MWNumericArray^)time);
}

private: System::Void btnNextCell_Click(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if (act_cell < cell_count){
        act_cell++;
    }

    // Ausgewählte Zelle korrigieren
    act_cell_data = correctCellData(cell_data, act_cell);

    lblCells->Text = act_cell.ToString() + "/" + cell_count.ToString();
}

private: System::Void btnPrevCell_Click(System::Object^ sender, System::EventArgs^ e) {
    if (act_cell > 1){
        act_cell--;
    }

    // Ausgewählte Zelle korrigieren
    act_cell_data = correctCellData(cell_data, act_cell);

    lblCells->Text = act_cell.ToString() + "/" + cell_count.ToString();
}

private: System::Int16 calc_Values(array<double>^ data, array<double>^ res){

    array<System::Int16>^ start_index = gcnew array<System::Int16>(6);
    array<System::Int16>^ end_index = gcnew array<System::Int16>(6);

    int i;
    for (i=1 ; i <= 6 ; i++){
        switch(i){
            case 1:
                start_index[i-1] = (int)((double)this->Start1->Value / 2) -1;
                end_index[i-1] = (int)((double)this->End1->Value / 2) -1;
                break;
            case 2:
                start_index[i-1] = (int)((double)this->Start2->Value / 2) -1;
                end_index[i-1] = (int)((double)this->End2->Value / 2) -1;
                break;
            case 3:
                start_index[i-1] = (int)((double)this->Start3->Value / 2) -1;
                end_index[i-1] = (int)((double)this->End3->Value / 2) -1;
                break;
            case 4:
                start_index[i-1] = (int)((double)this->Start4->Value / 2) -1;
                end_index[i-1] = (int)((double)this->End4->Value / 2) -1;
                break;
            case 5:
                start_index[i-1] = (int)((double)this->Start5->Value / 2) -1;
                end_index[i-1] = (int)((double)this->End5->Value / 2) -1;
                break;
            case 6:
                start_index[i-1] = (int)((double)this->Start6->Value / 2) -1;
                end_index[i-1] = (int)((double)this->End6->Value / 2) -1;
                break;
        }
    }

    // Liste mit gültigen Indize-Paaren erstellen
    List<int>^ valid_indices = gcnew List<int>(6);

    for (i = 0; i < 6 ; i++){
        if ((start_index[i] != -1) && (end_index[i] != -1)){
            if ((start_index[i] > end_index[i]) && (i == 0)){
                return -1;
            }
        }
        else {

```

```

        valid_indices->Add(i);
    }
}

// Mindestens ein Start- Endindex-Paar muss angegeben werden!
if ((start_index[0] == -1) || (end_index[0] == -1)){
    return -2;
}

// Fehler, falls der Index des maximalen Wertes nicht angegeben wurde
if (MaxIndex->Value == 0)
{
    return -3;
}

// Index des Maximalwerts einlesen
int max_index = (int)((double)(MaxIndex->Value) / 2) -1;

// Liegt der Index des Maximalwertes in einem gültigen Bereich zwischen erstem Start-/Endindex?
if ((max_index <= start_index[0]) || (max_index >= end_index[0]))
{
    return -4;
}

// Zeitintervall 2 Sekunden
double dt = 2.0;
double area = 0;
int index_of_first_end_value = -1;

// Schleife über Oszillationen der Zelle und AUC berechnen
for (i=0 ; i < valid_indices->Count ; i++){
    // neuen Index auslesen
    int act_index = valid_indices[i];
    double base_val = data[start_index[act_index]];

    System: Boolean last_value_reached = false;
    double sum = 0;

    // Vorwärtsintegration?
    if (start_index[act_index] <= end_index[act_index]){

        // Schleife über alle angegebenen Oszillationen
        for (int a=start_index[act_index]; a < end_index[act_index]; a++){
            if (last_value_reached == true){
                continue;
            }

            if (i == 0){
                index_of_first_end_value = a+1;
            }

            if (data[a+1] > data[a]){
                sum = sum + (((data[a+1] - data[a])*dt)/2.0 + (data[a] - base_val)*dt);
            }
            else {
                if (data[a+1] > base_val){
                    sum = sum + ((data[a] - base_val)*dt - (((data[a] -
data[a+1])*dt)/2.0));
                }
                else{

                    // Falls Endwert unterhalb des Startwerts liegt, muss eine
                    // Teilfläche berechnet werden.

                    last_value_reached = true;

                    double t_tmp = ((base_val - data[a+1])*dt) / (data[a] -
data[a+1]);
                    sum = sum + (dt - t_tmp)*(data[a] - base_val)/2.0;
                }
            }
        }
    }

    // Rückwärtsintegration?
    else {
        // Schleife über alle angegebenen Oszillationen
        for (int a=start_index[act_index]; a > end_index[act_index]; a--){
            if (last_value_reached == true){
                continue;
            }

            if (i == 0){
                index_of_first_end_value = a-1;
            }

            if (data[a-1] > data[a]){
                sum = sum + (((data[a-1] - data[a])*dt)/2.0 + (data[a] - base_val)*dt);
            }
            else {
                if (data[a-1] > base_val){
                    sum = sum + ((data[a] - base_val)*dt - (((data[a] - data[a-
1])*dt)/2.0));
                }
                else{

                    // Falls Endwert unterhalb des Startwerts liegt, muss eine
                    // Teilfläche berechnet werden.

                    last_value_reached = true;

```


Danksagung

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Mann Heiko und meine Familie, die mich auf meinem Lebensweg immer unterstützt, mir mein Studium ermöglicht und stets an mich geglaubt haben.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. R.M. Huber, Leiter der Pneumologie der Medizinischen Klinik-Innenstadt der LMU, für die freundliche Aufnahme als Doktorandin in die Abteilung, die interessante Aufgabenstellung und die Möglichkeiten der persönlichen Entfaltung bei den Experimenten.

Dank gilt Herrn PD Dr. med. A. Bergner, der die Arbeit betreute, stets Anregungen und Hinweise zur Versuchsplanung und –durchführung bereit hatte und mir bei vielen theoretischen und technischen Problemen zur Seite stand.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn H. Oelmez, Frau A. Kemp da Silva, Frau Dr. J. Stief, Frau J. Kellner und meinen Mitdoktoranden danken, die mir viele Grundlagen der Laborarbeit näherbrachten, mir ihre Hilfe anboten und für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten.

Den Mitarbeitern der Abteilung klinische Pharmakologie und ihrem Leiter, Herrn Prof. Dr. med. S. Endres, sei für die Möglichkeit der Mitnutzung verschiedener Geräte und Räumlichkeiten gedankt.

Auch an alle hier nicht näher genannten Personen, die mich während dieser Zeit unterstützt haben, die zu meiner Ausbildung beitrugen und damit ihren Teil am Gelingen dieser Arbeit haben, ist mein Dank gerichtet.

Lebenslauf

Name: Christel Juliane Günther geb. Tantzsch

Geburtsdatum: 27.10.1982

Geburtsort: Stollberg/Erzg.

Familienstand: verheiratet

Bildungsweg:

1993-1999 Gymnasium Oelsnitz

1999-2001 Clara-Wieck-Gymnasium Zwickau

06/2001 Abitur

10/2001-03/2003 Studium der Theaterwissenschaft an der LMU München

03/2003 Studium der Humanmedizin an der LMU München

03/2005 Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung

06/2009 Ablegen des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen:

Innere Medizin: Kreiskrankenhaus Stollberg

Allgemeinmedizin: Praxis DM Hamsch, Neuwürschnitz

Chirurgie: Rotkreuzkrankenhaus München

Innere Medizin: Universitätsklinikum Iasi, Rumänien

Radiologie: Klinikum Augsburg

Praktisches Jahr:

1. Terial Chirurgie: Klinikum Augsburg

2. Terial Innere Medizin: Klinikum Augsburg

3. Terial Radiologie: Klinikum München Pasing

Berufliche Tätigkeit:

Seit 08/2009 Assistenzärztin am Institut für Radiologie des HBK Zwickau

Veröffentlichung:

Kellner J, Tantzsch J, Oelmez H, Edelmann M, Fischer R, Huber RM, Bergner A. Mechanisms altering airway smooth muscle cell Ca⁺ homeostasis in two asthma models. Respiration 2008;76:205-15.