

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. Roewer

**Etablierung eines Zellkulturmodells des alveolaren Lungenepithels  
basierend auf der humanen Zelllinie NCI-H441**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Fabian Samwer  
aus Köln

Würzburg, Oktober 2014

**Referentin:** Prof. Dr. Carola Förster

**Korreferent:** Prof. Dr. Steffen Kunzmann

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 27.3.2015

**Der Promovend ist Arzt.**

Meinen Eltern gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Histologischer Aufbau der Lunge	1
1.2	Die Alveolarepithelzellen und ihre Charakteristika	3
1.2.1	Alveolarepitheltyp I	4
1.2.2	Alveolarepitheltyp II	4
1.3	Aufbau der Zell-Zellkontakte und der epithelialen Barriere	5
1.3.1	ARDS	7
1.4	Ziel dieser Arbeit	8
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>10</b>
2.1	Material	10
2.1.1	Material	10
2.1.2	Geräte	10
2.1.3	Substanzen	11
2.1.4	Zelllinien	11
2.1.4.1	Epithelzellen	11
2.1.4.2	Endothelzellen	12
2.1.5	Antikörper für Fluoreszenzmikroskopie	13
2.1.6	Antikörper für Western Blotting	14
2.1.7	qPCR-Primer und Sonden	15
2.2	Zellkulturmethoden	16
2.2.1	Kultivierungsbedingungen	16
2.2.2	Subkultivierung der Zellen	16
2.2.3	Gewinnung der konditionierten Medien	17
2.2.4	Beschichtung der Transwelleinsätze	17
2.2.5	Kultivierung der Zellen auf den Transwelleinsätze	18
2.2.6	Ko-Kultur mit Endothelzellen	19
2.2.7	Simulierung einer Hypoxie und einer Hyperoxie	19
2.3	Überprüfung der Funktionalität der Barriere	20
2.3.1	Messung des elektrischen Widerstands	20
2.3.2	Fluoreszeinpermeabilitätsmessung	20
2.3.3	Auswertung der Messdaten	21
2.4	Biochemische Methoden	22
2.4.1	Herstellung der Zelllysate	22
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	24
2.4.3	Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.4.4	Western Blotting	26

2.4.5	Fluoreszenzmikroskopie	27
2.5	Molekularbiologische Methoden	28
2.5.1	RNA-Isolierung	28
2.5.2	cDNA-Herstellung	29
2.5.3	Quantitative reverse Transkriptase PCR	30
2.6	Statistische Analyse	32
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>33</b>
3.1	Optimierung der Kultivierungsbedingungen	33
3.2	Einfluss der Dexamethasonkonzentration auf die Funktionalität der Barriere	35
3.3	Das Lungenkulturmodell enthält Alveolarepithelzellen Typ I und II	38
3.3.1	Regulierung des Caveolin-1	39
3.3.2	Regulierung des SP-B	40
3.3.3	Immunfluoreszenzbilder von Caveolin-1 und SP-B	41
3.4	Das Lungenkulturmodell exprimiert Occludensjunktions-proteine	42
3.5	Einfluss der Endothelfaktoren auf die Epithelbarriere	42
3.6	Einfluß der Endothelfaktoren auf die Expression von Occludensjunktionsproteinen	45
3.6.1	Claudin-1	46
3.6.2	Claudin-3	48
3.6.3	Claudin-4	50
3.6.4	Claudin-5	52
3.6.5	Occludin	54
3.6.6	ZO-1	56
3.6.7	Übersicht der Regulation der Occludensjunktionsproteine	58
3.7	Simulierung einer Hypoxie und einer Hyperoxie	58
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>61</b>
4.1	Optimierung der Zellkulturbedingungen	61
4.2	Einfluß der Dexamethasonkonzentration auf die Funktionalität der Epithelbarriere des H441-Modells	62
4.3	Das Lungenkulturmodell enthält Alveolarepithellenzellen Typ 1 und Typ 2	63
4.4	Einfluss der Endothelfaktoren auf die Epithelbarriere des H441-Modells	64
4.5	Einfluss der Endothelfaktoren auf die Occludensjunktionsproteine und Barrierefunktion des H441-Modells	65
4.6	Simulierung einer Lungenschädigung	68
4.7	Umsetzung der Ziele	69

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>70</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	
	Danksagung	
	Lebenslauf	

# 1 Einleitung

## 1.1 Histologischer Aufbau der Lunge

Ziel dieser Arbeit ist es, die Blut-Luft Schranke der menschlichen Lunge anhand eines *in vitro*-Modells nachzustellen. Die humane Lunge steht über den Mund-Nasenrachenraum im direkten Kontakt mit der Umwelt. Angefangen mit der Luftröhre (*Trachea*) teilt sich die Lunge in jedem Röhrenabschnitt über 23 Generationen hinweg meistens in zwei neue Äste (*dichotomer* Aufbau). Funktionell lässt sich die Lunge dabei mit Generation 1-16 in einen rein luftleitenden Abschnitt (Haupt-, Lappen-, Segmentbronchien, *Bronchioli* und *Bronchioli terminales*) und ab der 17. Generation in einen respiratorischen (gasaustauschenden) Abschnitt einteilen.

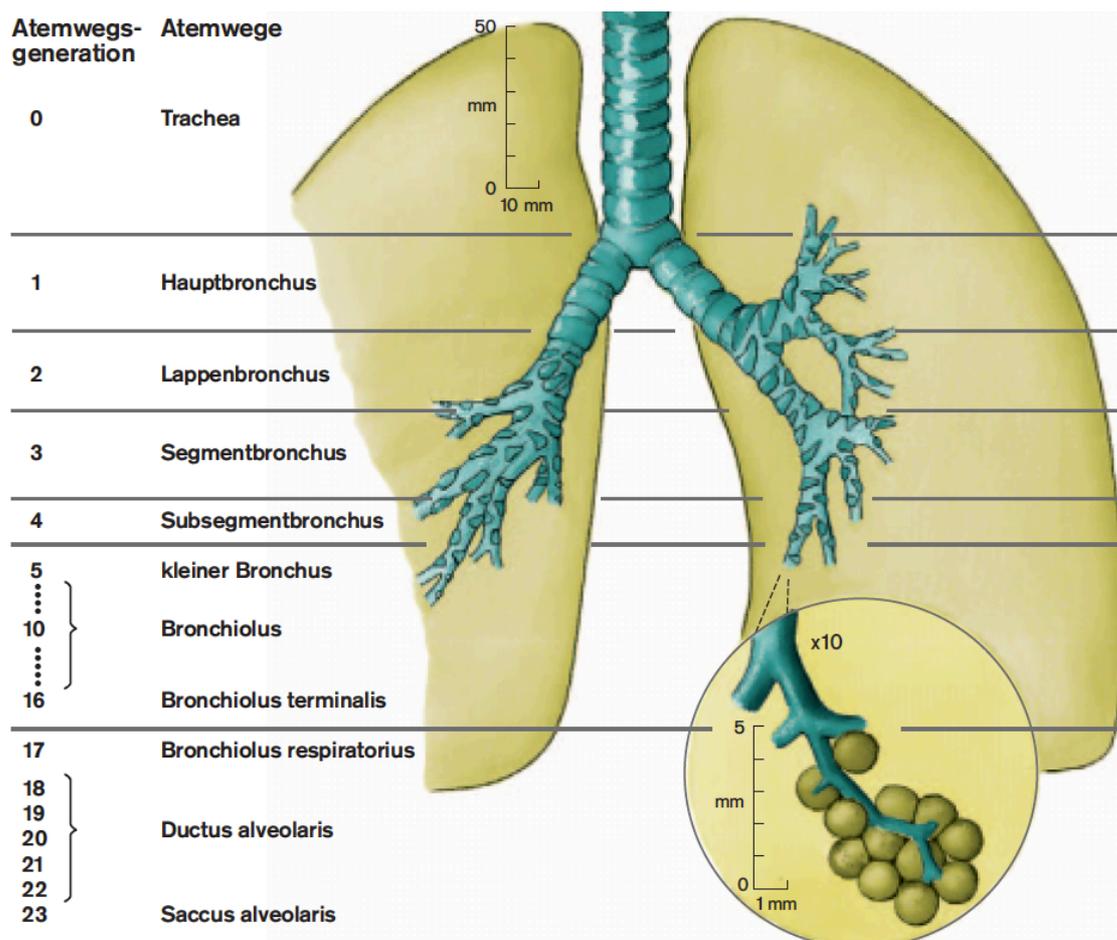


Abbildung 1.1 Anatomie der Atemwege. Verzweigung der Bronchien bis hin zu den Alveolen (R. Klinke, 2005).

Der respiratorische Abschnitt beginnt mit den *Bronchioli respiratorii*, die sich in *ducti alveolares* und *sacculi alveolares* weiter aufteilen (Weibel and Gomez, 1962). Der Gasaustausch erfolgt dabei über sogenannte Alveolen (Lungenbläschen), die man sich als luftgefüllte polygonale Bläschen vorzustellen hat. Die Alveolen sind schon vereinzelt an den Wänden der *Bronchioli respiratorii* anzutreffen und liegen dann in den *sacculi alveolares* dicht beieinander (Lüllmann-Rauch, 2012). Die rund 300 Millionen Alveolen in der erwachsenen menschlichen Lunge formen insgesamt eine Epitheloberfläche von ca. 100-140 m<sup>2</sup> (Gehr et al., 1978). Die Schranke zwischen der Luft und dem Blut in den Alveolen (s. auch Abbildung 1.3) wird aus den Epithelzellen, den Endothelzellen der umliegenden Blutgefäße und einer gemeinsamen dünnen Basallamina gebildet (Weibel, 1973). Die Epithelzellen besitzen hierbei die niedrigste Permeabilität (Durchlässigkeit) und sind essentiell zur Aufrechterhaltung der Barriere zwischen Blut und Luft (sog. Blut-Luft-Schranke). Endothelzellen sind permeabler als Epithelzellen in der Lunge und besitzen kein vergleichbar dichtes und komplexes Netzwerk an Occludensjunctionen wie die Epithelzellen (Schneeberger, 1978, Wiener-Kronish et al., 1991). Die Permeabilität der Blut-Luft-Schranke wird dementsprechend vor allem durch die Funktion der Epithelzellen bestimmt (Gorin and Stewart, 1979).

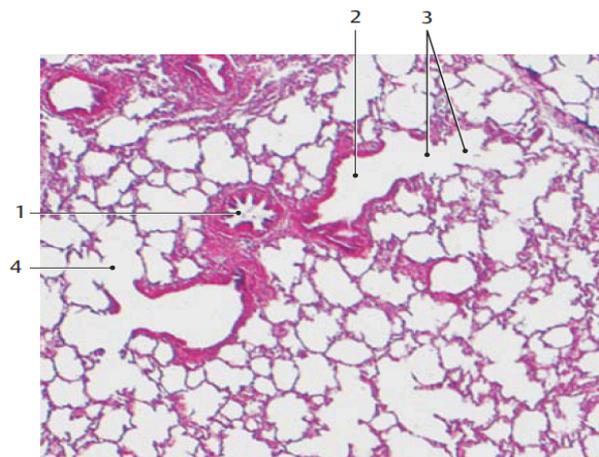


Abbildung 1.2 Histologischer Querschnitt der Lunge. Zu sehen ist ein Bronchiolus (1), ein Bronchiolus terminalis (2), ein Bronchiolus respiratorius (3), ein Ductus alveolaris (4) und zahlreiche Alveolen. H.E.-Färbung, Vergrößerung 40-fach nach (Ulfig, 2011)

## 1.2 Die Alveolarepithelzellen und ihre Charakteristika

In den gasaustauschenden Alveolen der menschlichen Lunge kommen zwei Typen von Epithelzellen vor, die unterschiedliche Charakteristika und Funktionen haben. Man spricht von den Alveolarepithelzellen bzw. Pneumozyten Typ-I und Typ-II. Der Anteil der Alveolarepithelzellen Typ-I ist in etwa nur halb so groß wie der Anteil an Alveolarepithelzellen Typ-II. Bedingt durch die jeweilige Morphologie setzt sich die alveoläre epitheliale Oberfläche jedoch zu ca. 93% aus Typ-I- und nur zu 7 % aus Typ-II-Zellen zusammen (Crapo et al., 1982). *In vivo* erneuert sich diese epitheliale Zellschicht alle 30-50 Tage (Crystal et al., 2008).

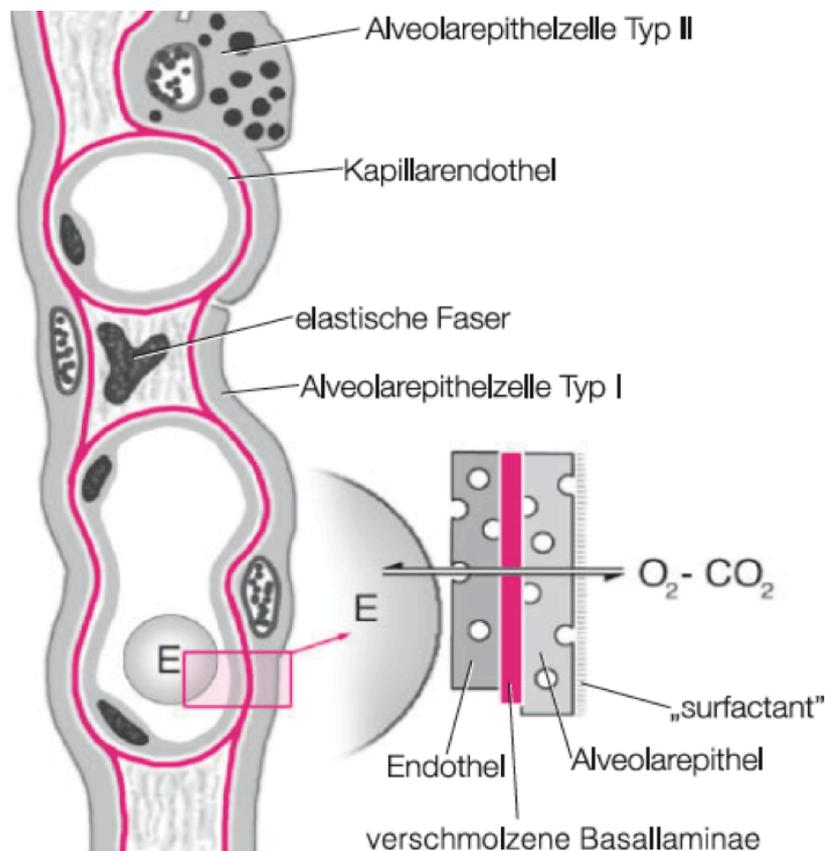


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des Alveolareseptums und der Blut-Luft-Schranke. Die Basallaminae (rot) der Alveolarepithelzellen und der Kapillarendothelzellen verschmelzen zu einer gemeinsamen Basallamina. Die Pfeile zeigen den Gasaustausch zwischen einem Erythrozyten (E) und der Alveole mit dem aufliegendem *Surfactant*. (Schiebler and Korf, 2007)

### 1.2.1 Alveolarepitheltyp I

Die größeren Typ-I-Zellen, auch Deckzellen genannt, bilden mit ihren flachen Zellkörpern eine dünne Schicht zwischen den Kompartimenten Blut und Luft. Sie sind hochdifferenzierte Zellen, deren Hauptfunktion es ist, den Gasaustausch zu ermöglichen. Sie besitzen nicht die Fähigkeit zur Proliferation und scheinen durch Differenzierung aus den Typ-II-Zellen zu entstehen (Adamson and Bowden, 1975, Wang and Hubmayr, 2011).

Außerdem nehmen sie Einfluß auf den Wasser- und Ionenhaushalt der Alveole, den Stoffwechsel von Peptiden und die Regulation der alveolären Makrophagen (Williams, 2003). Ein wichtiges Zellelement für den Transport von Molekülen über die alveoläre Einheit sind dabei die Caveolae, die als sackförmige Einbuchtungen in der Plasmamembran vorzufinden sind und vor allem aus dem Protein Caveolin-1 bestehen (Gumbleton et al., 2000). Dieses Protein gilt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* als ein typisches Merkmal des Typ-I-ähnlichen Phenotyps im Alveolarepithel (Campbell et al., 1999, Kasper et al., 1998).

### 1.2.2 Alveolarepitheltyp II

Die kubischen Pneumozyten Typ-II sind meist in den Ecken der Alveolen lokalisiert und werden auch Nischenzellen genannt. Sie gelten schon seit langer Zeit (Kapanci et al., 1969) als die Stammzelle des Lungenepithels. Typ-II-Zellen können dabei sowohl proliferieren als auch zu Typ-I-Zellen ausdifferenzieren und sind somit essentiell zur Regeneration nach Epithelschäden (Beers and Morrissey, 2011). Eine weitere wichtige Funktion der Typ-II-Zellen ist die Sekretion des sogenannten *Surfactants* (Wortbildung aus den englischen Wörtern **Surface Active Agents: oberflächenaktive Mittel**) in das alveoläre Lumen per Exozytose. Der *Surfactant* moduliert die Oberflächenspannung an der Grenzfläche von Luft und alveolärem Flüssigkeitsfilm (Hypophase) dabei so, dass die Alveolen während des Ausdehnens bei der Respiration nicht kollabieren. *Surfactant* besteht zu ca. 90% aus verschiedenen Lipiden und zu ca. 10 % aus spezifischen Proteinen (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D; SP steht für *Surface Proteins*) (Johansson and Curstedt, 1997). Die Interaktion der Proteine mit den Lipiden sorgt für die Organisation und Strukturierung des *Surfactants*.

SP-A und SP-D scheinen dabei zusätzliche immunologische Aufgaben zu erfüllen (Chroneos et al., 2010). SP-B und SP-C spielen des Weiteren eine wichtige Rolle bei der Regulation von intra- und extrazellulären Prozessen und der Erhaltung der Respiration. Ihre Bedeutung spiegelt sich zusätzlich durch ihre Beteiligung bei der Pathophysiologie verschiedener Lungenkrankheiten wider (Whitsett and Weaver, 2002). Schlüssigerweise wird *Surfactant* erfolgreich als Therapeutikum bei akuten Lungenschädigungen eingesetzt (Raghavendran et al., 2011). SP-B wird neben SP-C von Typ-II-Zellen hochspezifisch synthetisiert (Floros et al., 1991, Weaver et al., 1988). Die durch Glukokortikoide geförderte Produktion von SP-B besitzt dabei eine besondere Bedeutung in der fetalen Lungenentwicklung (Phelps and Floros, 1991). Die fetale Lungenreifung ist auf die Produktion von *Surfactant*-Proteinen angewiesen (Fehrenbach, 2007).

### **1.3 Aufbau der Zell-Zellkontakte und der epithelialen Barriere**

Bei Zellverbänden unterscheidet man hinsichtlich des Aufbaus und der Funktion mit den Nexus, Adhäsionsverbindungen und Occludensjunkten drei verschiedene Zell-Zell-Verbindungen. Die sogenannten Nexus dienen dem schnellen Austausch von Molekülen und werden durch die Transmembranproteine der Connexine gebildet. Adhäsionsverbindungen sind wichtig für die mechanische Fixierung der Zellen und die daraus folgende Gewebestabilisierung. Diese Adhäsionskontakte werden durch die Proteinklasse der Cadherine gebildet.

Occludensjunkten werden zwei wesentliche Aufgaben, die „*gate*“ und „*fence*“ *function* genannt werden, zugeschrieben. Occludensjunkten trennen den an das Lumen angrenzenden apikalen Teil von dem an die Basalmembran angrenzenden basalen Teil der Zelle und stellen somit die Polarität der Zelle her. Diese „*fence function*“ verhindert die Durchmischung von apikalen und basalen Membrankomponenten. Als „*gate function*“ bezeichnet man die Regulation der parazellulären Permeabilität des Gewebes (Schneeberger and Lynch, 1984, van Meer and Simons, 1986). Um das Alveolarlumen gegenüber

den Kapillaren abzugrenzen, besitzen die epithelialen Zellen der menschlichen Lunge ein komplexes Netzwerk an Occludensjunctionen (Simionescu, 1980).

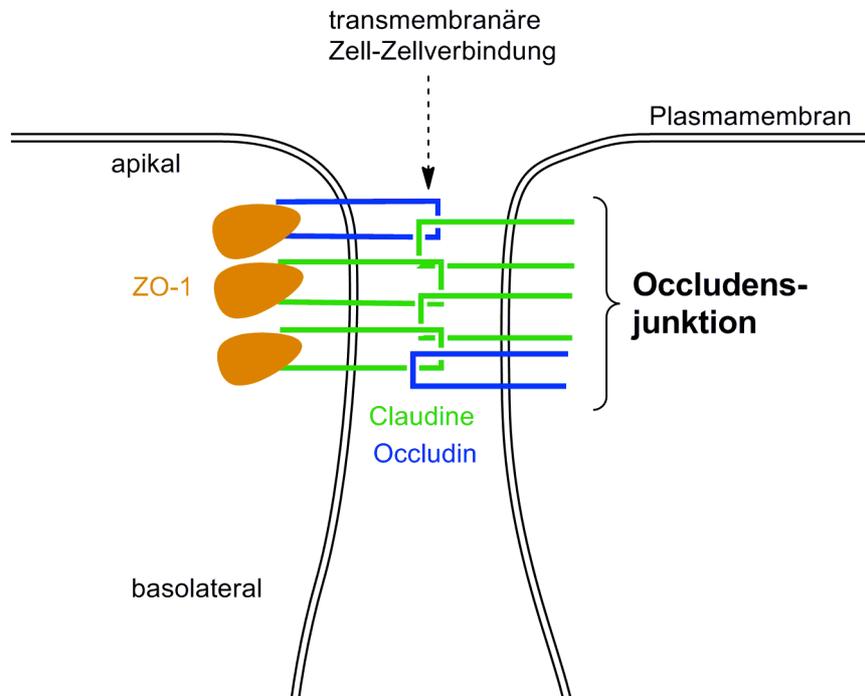


Abbildung 1.4 Schematischer Aufbau einer Verbindung zwischen zwei Epithelzellen. Die Occludensjunction ist im apikalen Bereich der Zellen lokalisiert.

Damit spielen die Occludensjunctionen sowohl als Strukturelemente im Aufbau einer Barriere zwischen den Kompartimenten als auch in der Pathophysiologie verschiedener Krankheiten eine essentielle Rolle (Balda and Matter, 1998, Sawada et al., 2003). Wichtige Strukturproteine der Occludensjunctionen sind die transmembranären Claudine und das Occludin (s.a. Abbildung 1.4.). Sie „verschließen“ (abgeleitet vom lateinischen claudere bzw. occludere) über die jeweilige Membran miteinander interagierend die Lücke zwischen den Zellen. Dieser Proteinkomplex wird durch Zonula Occludens Proteine jeweils im Aktin-Zytoskelett verankert (Overgaard et al., 2011, Fanning et al., 1998, Koval, 2013).

Die Claudine nehmen erheblichen Einfluß auf die parazelluläre Permeabilität (Krause et al., 2008). Neben Occludin und Zonula Occludens-1 (ZO-1) wurden vor allem die Claudinen -1,-3,-4,-7, und -18 im Lungenepithel gefunden. (Daugherty et al., 2004, Kaarteenaho et al., 2010, Coyne et al., 2003, Kaarteenaho-Wiik and Soini, 2009).

### 1.3.1 ARDS

Die klinische Relevanz einer intakten alveolokapillären Membran zeigt sich bei dem Krankheitsbild des akuten Lungenversagens (*Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)*). Die Lunge wird bei diesem Krankheitsbild entweder direkt (z.B. Pneumonie, Aspiration, etc.) oder indirekt (z.B. Sepsis, Polytrauma, etc.) geschädigt. Pathophysiologisch kommt es ungeachtet der Ätiologie zur Störung bzw. Zerstörung der alveolokapillären Membran mit Entwicklung eines interstitiellen und alveolären, proteinreichen Lungenödems (Ware and Matthay, 2000). Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wie  $H_2O_2$  (wie sie z.Bsp. bei Beatmung mit hoher Sauerstoffkonzentration auftreten können) scheint bei dieser Schädigung zusätzlich eine Rolle zu spielen (Carnesecci et al., 2012, Seeger et al., 1995).

Konsekutiv entwickeln sich ausgedehnte Atelektasen und pulmonale Konsolidierungen. Es kommt zur Abnahme der pulmonalen *Compliance* (Lungendehnbarkeit) sowie zur ausgeprägten Erhöhung des Rechts-Links-Shunts und Zunahme des pulmonalarteriellen Druckes mit entsprechender Rechtsherzbelastung. Durch das proteinreiche Lungenödem kommt es zusätzlich zur Inaktivierung des *Surfactants*, was die *Compliance* zusätzlich vermindert und die Symptomatik aggraviert (Pugin et al., 1999, Gregory et al., 1991).

In der Folge kommt es zur schweren Beeinträchtigung des Gasaustauschs mit Hypoxämie und Hyperkapnie. Klinisch steht die akut einsetzende Dyspnoe des Patienten im Vordergrund die innerhalb kürzester Zeit zur Notwendigkeit der künstlichen Beatmung führt (Ware and Matthay, 2000). Eine Graduierung des *ARDS* lässt sich mittels der „Berlin-Definition“ in die Stadien mild, moderat und schwer vornehmen (Ranieri et al., 2012).

Die Therapie des *ARDS* besteht in der lungenprotektiven Beatmung der Patienten in Kombination mit adjunktiven Maßnahmen wie Lagerungstherapie, Rekrutierungsmanöver, restriktives Flüssigkeitsmanagement und inhalative Vasodilatation. Als „Ultima Ratio“ stehen extrakorporale Verfahren zur Verfügung (Kustermann et al., 2013, Brodie and Bacchetta, 2011).

In der Phase der Regeneration ist die Beseitigung des Ödems im Wesentlichen abhängig vom Lungenepithel. Die Intaktheit und Regenerationsfähigkeit des Epithels und insbesondere der Alveolarepitheltyp-II-Zellen spielen somit eine große Rolle für die Prognose der Patienten (Matthay and Wiener-Kronish, 1990, Ware and Matthay, 2001).

Über die barriestabilisierenden Mechanismen der Epithelzellen ist allerdings noch relativ wenig bekannt. Erkenntnisse hierzu könnten neue Therapieoptionen aufweisen und die aktuell immer noch hohe Mortalitätsrate der Krankheit weiter senken (Matthay et al., 2012, Erickson et al., 2009).

#### **1.4 Ziel dieser Arbeit**

Es ist erstrebenswert, die Blut-Luft-Schranke und deren Regulation genauer zu untersuchen. Das primäre Ziel war es, ein Zellkulturmodell basierend auf der humanen Zelllinie NCI-H441 zu etablieren, das alle wichtigen Charakteristika der Alveolarepithelzellen Typ-I und Typ-II besitzt. Das *in vitro*-Modell sollte eine möglichst starke funktionelle Barriere, wie sie *in vivo* essentiell ist, aufbauen. Um die Funktionalität der Barriere zu überprüfen, wurden mit Messungen des elektrischen Widerstands und Fluoreszenzpermeabilitätsmessungen zwei verschiedene Verfahren eingesetzt, die im Material- und Methodenteil erläutert werden. Gleichzeitig war zu untersuchen, wie sich die Barriere im zeitlichen Verlauf optimal entwickelt, und welche Rolle dabei Glukokortikoide spielen. Um die Charakteristika des Epithels zu validieren, sollte die Zellkultur auf die zuvor beschriebenen spezifischen Charakteristika (Caveolin-1- und SP-B-Expression) und Occludensjunktionsproteine hin untersucht werden. Mit diesem etablierten Modell sollte daraufhin erforscht werden, welchen Einfluß Lungenendothelfaktoren auf die Funktionalität der Barriere und auf die Zusammensetzung der Occludensjunktionsproteine der Epithelzellen haben. Bisher gibt es nur wenig Untersuchungen zur Interaktion von Lungenepithel- und –endothelzellen (Hermanns et al., 2004, Hermanns et al., 2010, Hermanns et al., 2009). Um zu sehen, ob dies gewebsspezifische Effekte sind, sollte vergleichend geprüft werden, welchen Einfluß Faktoren von humanen

Hirndothelzellen (Zelllinie hCMEC/D3) - die an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind - auf das Zellkulturmodell nehmen.

Eine weitere Fragestellung war, wie das Kulturmodell auf verschiedene Noxen wie z.B.  $H_2O_2$  bei dem *ARDS* bzw. auf stressige Bedingungen reagiert und welchen Einfluß die Lungenendothelfaktoren darauf haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Material

Zellkulturflaschen (T-25)	GreinerBioOne, 690175
Zellkulturflaschen (T-75)	GreinerBioOne, 658175
6-Well Platten Falcon	Becton Dickinson, 353046
6-Welleinsätze (Porengröße 0,4 µm)	Becton Dickinson, 353090
12-Well Platten Falcon	Becton Dickinson, 353043
12-Welleinsätze (Porengröße 0,4 µm)	Becton Dickinson, 353180
Petrischalen	Thermo Scientific
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)	Sartorius, Minisart®
Skalpell	Braun, 5518059
Zellzählkammer	Maierfeld, "Neubauer-improved"
PVDF Membran	Ultra Cruz, SC-3723

#### 2.1.2 Geräte

Wasserbad	GFL, Typ 1083
Zentrifuge	Thermo Scientific, Multifuge 3S-R Heraeus Eppendorf Centrifuge, 5418 R PeqLab, Perfect Spin
Spektrometer	Tecan, Genios Pro (Fluoreszein) Tecan, Sunrise (Proteinbestimmung) Nano Drop, Thermo Fischer
Brutschrank	Stericult 200 Incubator, Thermo Scientific

Mikroskop	Zeiss, Axiovert 25
Thermal Cycler	Applied Biosystems, 2720
Sterilbank	Hera Safe, Typ 15
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, LSM 510
Sonifikator	Bandelin, UW 3080
Hypoxiekammer	Thermo Scientific, Hera Cell 150

### 2.1.3 Substanzen

BSA für Immunfluoreszenz, Fraktion V	Sigma Aldrich, A 9647- 100 G
BSA für Western Blotting	Sigma Aldrich, A7906
Chloroform	Roth, Art 3313
Dexamethason	RBI, D-157
Propidiumiodid	Molecular Probes, P1304MP
Milchpulver	Appli Chem, A0830
Natrium-Fluoreszein	Sigma Aldrich, F6377
Kollagen I	Sigma Aldrich, C7661
Kollagen IV	Sigma Aldrich, C5533
Gelatine	Serva, 22151
PBS Dulbecco w/o $Mg^{2+}$	Biochrom AG, L 1825
Tween 20	Sigma Aldrich, D 7949
Triton X-100	Sigma Aldrich, 23, 472-9
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich, G 5882
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, P 4707
$H_2O_2$ (30%)	Sigma Aldrich, 31642

### 2.1.4 Zelllinien

#### 2.1.4.1 Epithelzellen

Es gelang bisher nicht, primäre humane Alveolarepithel-Typ-I-ähnliche Zellen zu isolieren und zu kultivieren (Wang and Hubmayr, 2011). Eine mögliche Transdifferenzierung *in vitro* von Typ-II zu Typ-I-Zellen wurde tituiert (Campbell et al., 1999). Eine mögliche Zelllinie für dieses Modell scheinen dabei die humanen Adenokarzinomzellen „NCI H441“ zu sein. Diese Zelllinie besitzt

neben Eigenschaften der weiter proximal gelegenen Clara-Zellen (Epithel der respiratorischen Bronchioli) auch wichtige Charakteristika der Alveolarepithelzellen Typ-II. Sie werden schon erfolgreich als *in vitro-Modell* genutzt und stellen sich als geeigneter als vergleichbare Zelllinien heraus (Hermanns et al., 2004). Die humane epitheliale Lungenzelllinie NCI-H441 wurde bei ATCC (HTB-174™) gekauft.

#### **2.1.4.2 Endothelzellen**

Die verwendeten Endothelzelllinien sind ebenfalls humanen Ursprungs. In dem vorliegenden Modell wurde als pulmonale Endothelzellreihe die HPMEC-ST1.6R Zelllinie verwendet (Krump-Konvalinkova et al., 2001). Diese Zelllinie besitzt die wichtigsten Charakteristika der primären Lungenendothelzellen und gilt für *in vitro* Studien als sehr geeignet (Unger et al., 2002). Um zu überprüfen, ob der Einfluss der Lungenendothelzellen auf die Epithelzellen gewebespezifisch ist, wurde dieser Einfluss mit dem Einfluss von Hirnendothelzellen verglichen. Als Hirnendothelzellreihe dienten hCMEC/D3-Zellen, die als etabliertes Modell der Blut-Hirnschranke zur Erforschung der neurovaskulären Einheit gelten (Weksler et al., 2005). Unter dem Konzept der neurovaskulären Einheit versteht man dabei die komplexe Interaktion zwischen dem Endothel, den Astrozyten, den Neuronen und deren Extrazellulärmatrize. Diese Interaktion unterliegt einer hohen Regulation (Abbott et al., 2006). Die auf diese Weise modulierte Barriere zwischen Blut und Gehirn spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei pathophysiologischen Vorgängen (Lecrux and Hamel, 2011). Die Lungenendothelzelllinie HPMEC-ST1.6R (Krump-Konvalinkova et al., 2001) wurde freundlicherweise von Professor Kirkpatrick und Dr. Unger von der Univesitätsklinik Mainz zur Verfügung gestellt. Als Hirnendothelzelllinie dienten hCMEC/D3-Zellen von Professor Couraud von der Universität Paris Descartes (Weksler et al., 2005).

Tabelle 2.1 Zelllinien und deren Medien

<b>Zelllinie</b>	<b>Medium und Zusätze</b>	<b>Hersteller und Produktnummer</b>
<b>NCI-H441</b>	RPMI 1640 1mM Na-Pyruvat 2mM Glutamax I 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x ITS 10% FBS	Sigma R 8758 Biochrom L0473 Gibco, Invitrogen 35050-38 Biochrom A2212 Biochrom A2212 Gibco, Invitrogen 41400-045 Ge Healthcare, A15-151
<b>HPMEC-ST1.6R</b>	M199 1mM Na-Pyruvat 2mM Glutamax I 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 25µg/ml Sodium Heparin 25µg/ml ECGS 10% FBS	Gibco, Invitrogen Biochrom L0473 Gibco, Invitrogen 35050-38 Biochrom A2212 Biochrom A2212 Sigma H3149 Sigma E 2759 Ge Healthcare, A15-151
<b>hCMEC/D3</b>	EBM-2 EGM-2 Kit (FBS, VEGF, R <sup>3</sup> -IGF-1, hEGF, hbFGF, Heparin, Ascorbinsäure, Gentamycin, Amphotericin B)	Lonza, C-4147      Lonza,C-3162

### 2.1.5 Antikörper für Fluoreszenzmikroskopie

Tabelle 2.2 Primäre Antikörper Fluoreszenzmikroskopie

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Produkt</b>
Anti-Claudin-1, Kaninchen polyklonal	1:100	Zymed, 519000
Anti-Claudin-3, Kaninchen	1:100	Zymed, 341700

polyklonal		
Anti-Claudin-4, Maus monoklonal	1:100	Zymed, 329400
Anti-Claudin-5, Kaninchen polyklonal	1:100	Zymed, 341600
Anti-Caveolin-1, Kaninchen polyklonal	1:100	Santa Cruz, Sc-894
Anti-SP-B, Kaninchen polyklonal	1:100	Santa Cruz, Sc-13978
Anti-Occludin, Kaninchen polyklonal	1:100	Zymed, 711500
Anti-ZO-1, Kaninchen polyklonal	1:100	Zymed, 40-2300

Tabelle 2.3 Sekundäre Antikörper Fluoreszenzmikroskopie

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Produkt</b>
Esel-Anti-Kaninchen IgG Alexa® 488	1:100	Invitrogen, A21206
Ziegen-Anti-Maus IgG-FITC	1:100	Dako, 040301

Antikörper gelöst in 1 % BSA/PBS

### 2.1.6 Antikörper für Western Blotting

Tabelle 2.4 Primäre Antikörper *Western Blotting*

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Produkt</b>
Anti-Claudin-1, Kaninchen polyklonal	1:200	Zymed, 519000
Anti-Claudin-3, Kaninchen polyklonal	1:200	Zymed, 341700
Anti-Claudin-4, Maus monoklonal	1:200	Zymed, 329400
Anti-Claudin-5, Kaninchen	1:200	Zymed, 341600

polyklonal		
Anti- $\beta$ -actin, Maus monoklonal	1:15000	Sigma, A5441

Tabelle 2.5 sekundäre Antikörper, HRP-gekoppelt, *Western Blotting*

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Produkt</b>
Anti-Kaninchen (Claudin-1,- 3)	1:1000	Roche, 12015L18001, Lumi-Light <sup>Plus</sup> Western Blotting Kit
Anti-Kaninchen (Claudin-5)	1:5000	GE Healthcare, NA934V
Anti-Maus (Claudin-4, $\beta$ - actin)	1:5000	GE Healthcare, NA0310V

Antikörper gelöst in 1 % BSA/PBS

### 2.1.7 qPCR-Primer und Sonden

Tabelle 2.6 Primer (MWG Eurofins)

<b>Name des amplifizierten Gens</b>	<b>Sequenz des forward- Primers</b>	<b>Sequenz des revers-Primers</b>
Claudin-1	5'-CCGTTGGCAT GAAGTGTATG-3'	5'-AAGGCAGAGA GAAGCAGCAG-3'
Claudin-3	5'-AAGGTGTAC GACTCGCTGCT-3'	5'-AGTCCCGGAT AATGGTGTG-3'
Claudin-4	5'-CGCATCAGGAC TGGCTTTATCTC-3'	5'-CAGCGCGA TGCCCATTA-3'
Claudin-5	5'-GAGGCGTGC TCTACCTGTTT-3'	5'-CAGCGCGA TGCCCATTA-3'
Occludin	5'-TCCAATGGCA AAGTGAATGA-3'	5'-GCAGGTGCTC TTTTTGAAGG-3'
ZO-1	5'-TGAGGCAGCT CACATAATGC-3'	5'-GGTCTCTGCT GGCTTGTTTC-3'
18SrRNA	5'-ATGGTTCCTTT GGTCGCTCG-3'	5'-GAGCTCACC GGGTTGGTTTT-3'

Tabelle 2.7 Sonden (Taqman®, Applied Biosystems)

<b>Name des amplifizierten Gens</b>	<b>Nummer</b>
EUK 18 SrRNA	4352930810022
SP-B	Hs001667036_m1
Caveolin-1	Hs00971716_m1

## 2.2 Zellkulturmethoden

Alle Arbeitsschritte unter Punkt 2.2 wurden, soweit wie möglich, unter der Sterilbank durchgeführt.

### 2.2.1 Kultivierungsbedingungen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Gelatine (0,5 %) beschichteten T-75-Flaschen eingeführt und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert (15 ml Medium/T-75). Ein Mediumwechsel wurde alle 2-3 Tage durchgeführt. Hierbei wurde das verbrauchte Medium mittels Pasteurpipette abgesaugt und durch frisches und auf 37°C im Wasserbad vorgewärmtes Medium ersetzt.

### 2.2.2 Subkultivierung der Zellen

Einmal pro Woche wurden die adhärent und konfluent gewachsenen Zellen gesplittet beziehungsweise subkultiviert. Zuerst wurde Trypsin eine halbe Stunde vorher auf 37°C erwärmt und jede T-75-Zellkulturflasche mit 10 ml 0,5 % Gelatine beschichtet. Dann wurde die Gelatine in den neuen und das Medium in den alten Flaschen abgesaugt. Die Zellen wurden zwei Mal mit 10 ml PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin in die Zellkulturflasche gegeben und bis zur Ablösung der Zellen ca. 2 min bei 37°C inkubiert. Dies wurde mittels Lichtmikroskopie kontrolliert. Nach der Ablösung der Zellen wurde die Enzymwirkung durch Hinzufügen des jeweiligen Mediums gestoppt. Die resuspendierten H441-Zellen wurden im 1:6 Teilungsverhältnis (St.1 im 1:8; D3 im 1:3) in die neuen beschichteten Flaschen überführt. Um auf 15 ml Medium insgesamt zu kommen, wurde die fehlende Menge Kulturmedium hinzugefügt.

### 2.2.3 Gewinnung der konditionierten Medien

Um die von den Endothelzellen abgegebenen Faktoren zu erhalten, wurde der Mediumüberstand von wachsenden und noch nicht konfluenten Endothelzellen eingesetzt. Am Tag 3 beziehungsweise 5 nach Aussaat wurde das überstehende Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt und durch 0,2 µm Poren sterilfiltriert. In Vorversuchen zeigte sich das Medium von wachsenden und noch nicht konfluenten Endothelzellen wirkungsvoller als das Medium von konfluenten Zellrasen.

### 2.2.4 Beschichtung der Transwelleinsätze

Für die Zellexperimente wurden sogenannte Transwelleinsätze verwendet.

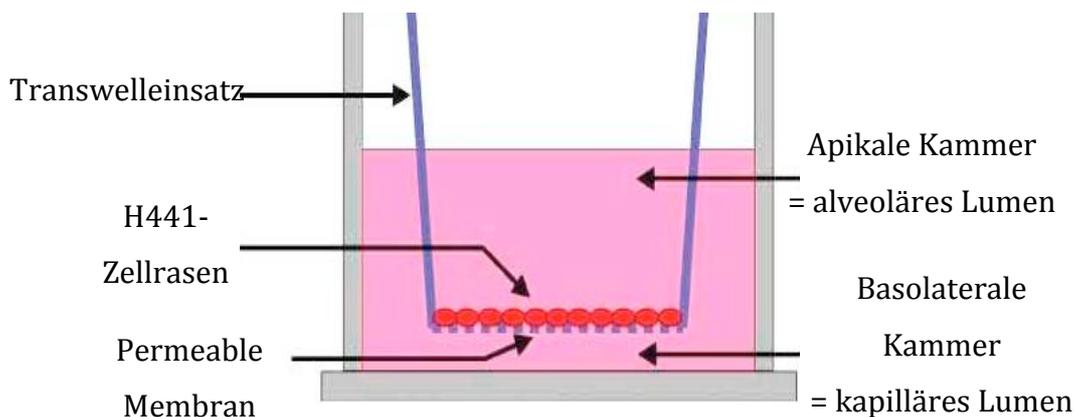


Abbildung 2.1 Transwelleinsatz in einem Well (Napf) (Saunders, 2009). Grafik modifiziert.

Als optimale Beschichtung der Einsätze stellte sich in Vorversuchen das Kollagen I (C7661, Sigma) heraus. Zur Herstellung einer 0,01 % Lösung wurden 5 mg Kollagen I in 5 ml 0,1 M Essigsäure für 1-3 h bei Raumtemperatur in einem sterilen Glasfläschen mit Hilfe eines sterilen Rührers gelöst. Diese Lösung wurde vorsichtig mit 500 µl sterilfiltriertem Chloroform unterschichtet. Das Chloroform bildete am Boden eine organische Phase, die sich nicht mit der Kollagenlösung vermischt. Bei 4°C wurde das Glasfläschen über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Dekantat in ein steriles Gefäß überführt und mit der entsprechenden Menge PBS auf eine 0,01 % Lösung verdünnt. Diese Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

Als erster Schritt wurden die 6-Welleinsätze steril in die Wellplatte überführt und für zwei Stunden (Raumtemperatur) flächendeckend mit 0,5 ml 0,01 % Kollagen I-Lösung bei den 6-Welleinsätze beschichtet. Bei den 12-Wells wurden die Einsätze jeweils mit 0,2 ml gefüllt. Nach dem Absaugen der überstehenden 0,01 % Kollagen I-Lösung wurden die Einsätze wegen der verbliebenen Essigsäure drei Mal mit PBS gewaschen.

### **2.2.5 Kultivierung der Zellen auf den Transwelleinsätzen**

Nach dem Ablösen der konfluent gewachsenen Zellen (s.a. 2.2.2) wurde die Zellsuspension zentrifugiert (5 min bei 175G, RT) und der entstehende Überstand entfernt, um die Dauer der Trypsinwirkung auf die Zellen möglichst gering zu halten. Das Zellpellet wurde in H441-Medium resuspendiert, und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Bei den 6-Wells wurden in das basolaterale Kompartiment jeweils 3 ml Medium und bei den 12-Wells 1,5 ml gefüllt. In das apikale Kompartiment bzw. auf die Membran der Einsätze wurden 23 000 Zellen/cm<sup>2</sup> -gelöst in H441-Medium- ausgesät. An dieser Stelle waren die Zellen bei den 6-Wells in 2 ml Medium und bei den 12-Wells in 0,5 ml Medium suspendiert.

Ein Mediumwechsel wurde apikal und basolateral alle 2-3 Tage durchgeführt. Hierbei wurden eine leere Wellplatte und eine Petrischale neben die mit Zellen kultivierten Transwelleinsätze gestellt. Die Einsätze wurden einzeln aus ihrem *Well* (Napf) mittels desinfizierter und am Bügel des Einsätze greifender Pinzette hochgehoben. Über der Petrischale wurde das Medium der Einsätze durch Herumdrehen ausgeleert und in der leeren 6-Well- beziehungsweise 12-Wellplatte zwischengelagert. Anschließend wurden die Medien in den basolateralen Kammern abgesaugt und diese mit frischem Medium gefüllt. Die Einsätze wurden wieder in ihr zugehöriges *Well* mit der Pinzette zurückgestellt. In die apikale Kammer wurde nun vorsichtig am Rande des Einsatzes jeweils 3 ml (6-Welleinsätze) oder 1,5 ml (12-Welleinsätze) Medium hinzugegeben. Dieses Verfahren wurde entwickelt, da sich durch das normale Absaugen des Mediums Löcher im Zellrasen bildeten.

Ab Tag 5 nach der Aussaat, bei ca. 70-80 % Konfluenz, wurde apikal dexamethasonhaltiges Medium in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Dies wurde bei jedem folgenden Medienwechsel fortgeführt. Dexamethason wurde in 100 % Ethanol gelöst und bei -20°C flüssig aufbewahrt.

### **2.2.6 Ko-Kultur mit Endothelzellen**

Bei den Versuchen mit der Ko-Kultur mit Endothelzellen wurden die 6-Well-Einsätze nach der Kollagen I Beschichtung und dreimaligem Waschen mit PBS mit sterilen Pinzetten umgedreht und in sterile Petrischalen gestellt. Daraufhin wurden 91000 Endothelzellen/cm<sup>2</sup> gelöst in 1ml Endothelmedium auf die Membranfläche pipettiert. Die Zellen beziehungsweise die Petrischalen wurden mit sterilen Glasbehältern überdeckt und für 4 h bei 37°C in den Brutschrank gestellt, um die Endothelzellen auf der Rückseite der Einsatzmembranen anwachsen zu lassen. Nach dem vorsichtigen Überführen unter die Sterilbank wurden die Einsätze mit zwei Pinzetten – über einer neuen Petrischale haltend – wieder richtig herum gedreht, sodass das Endothelmedium abtropfte. Die Einsätze wurden in die Wells gestellt, und es wurde mittels Lichtmikroskopie die Adhärenz der Zellen überprüft. Danach wurden die H441-Epithelzellen auf der üblichen Seite der Membran ausgesät (s.a. 2.2.5).

### **2.2.7 Simulierung einer Hypoxie und einer Hyperoxie**

Um zu testen, wie die funktionelle Barriere des Lungenzellkulturmodells auf Stress reagiert, wurde sie am Tag 15 unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. Hierbei wurde zuerst ein normaler Mediumwechsel durchgeführt (siehe 2.2.5). Im Anschluß wurde in H441-Medium eine 1 mM und eine 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung in 50 ml Röhrchen hergestellt und gemäß dem Standardprotokoll (siehe 2.3.1) der TER Wert der Transwelleinsätze bei vier 12-Wellplatten gemessen. Bei zwei Platten wurde apikal das Medium entnommen und die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösungen hinzugegeben. Diese zwei Platten und eine Kontrollplatte wurden für 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in den Brutschrank gestellt. Gleichzeitig wurde eine Platte für 4 Stunden einer Hypoxie von 1 % O<sub>2</sub> (37°C, 5

% CO<sub>2</sub>) ausgesetzt. Nach einer erfolgten TER-Messung wurde das apikale Medium von allen Einsätzen durch frisches Medium ersetzt, und die Zellen noch einmal für 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank untergestellt. Nach 4 Stunden wurde erneut der TER-Wert gemessen.

## **2.3 Überprüfung der Funktionalität der Barriere**

### **2.3.1 Messung des elektrischen Widerstands**

Um den elektrischen Widerstand und damit die Barriereigenschaften des Zellmonolayers zu überprüfen, wurde ein Volt-Ohm-Meter (World-Precision Instruments Inc.; New Haven, CT, USA ) genutzt. Der elektrische Widerstand beziehungsweise der sogenannte TER-(Transepithelial electrical Resistance) Wert verhält sich dabei umgekehrt proportional zu den transportierten kleinen Ionen durch den parazellulären Raum der Zellschicht.

Der TER-Wert gilt als Indikator für die Dichtigkeit der Zell-Zell Verbindungen und die Anzahl der Occludensjunktions (Claude, 1978).

Als Vorbereitung wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellkultur eine Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, um sich adaptieren zu lassen. Währenddessen wurden die Messelektroden des Volt-Ohm-Meters bei eingeschaltetem Gerät erst eine halbe Stunde in 70 % Alkohol stehend desinfiziert und dann für ein halbe Stunde in 6 ml H441-Medium feucht gehalten und somit äquilibriert.

Bei der Messung wurde die kürzere Messelektrode in den Einsatz und die längere in dem *Well* platziert. Wichtig war hierbei, dass der Einsatz immer in der Mitte stand und die Elektroden im rechten Winkel positioniert wurden. Gemessen wurde am linken Rand der Einsätze. Zur Ermittlung des Leerwertes wurde bei jeder Versuchsreihe der TER-Wert eines Transwelleinsatzes ohne Zellen gemessen.

### **2.3.2 Fluoreszeinpermeabilitätsmessung**

Natriumfluoreszein besitzt ein Molekulargewicht von 376,28 g/mol. Es wird vor allem parazellulär, also entlang der Zell-Zell-Grenzen transportiert. Gemessen werden sollte der Transport in apikal-basolateraler Richtung.

Dafür wurde Natriumfluoreszein im Verhältnis 1 mg/ml in H441-Medium gelöst und sterilfiltriert. Diese Stocklösung wurde für die Experimente auf eine 10 µM Fluoreszein Mischung in H441-Medium verdünnt. Zu Beginn der Transportexperimente wurde das Medium innerhalb des Einsatzes ausgeleert und 2 ml der 10 µM Fluoreszein H441-Medium in die apikale Kammer hinzugegeben.

300 µl Proben wurden von der basolateralen Kammer nach exakt 15, 45, 105, 165 und 225 Minuten entnommen. Um den gleichen hydrostatischen Druck während des gesamten Versuchs aufrecht zu erhalten, wurde direkt nach jeder Probenentnahme 300 µl vorgewärmtes Medium der basolateralen Kammer hinzugefügt. Zwischen den Probenahmen wurden die Transwelleinsätze wieder in den 37°C warmen Brutschrank gestellt. 90 µl/Well wurden jeweils von allen Proben, der Stocklösung, den Überständen aus den apikalen Kammern und des reinen Mediums in eine schwarze 96-Wellplatte von Greiner BioOne pipettiert. Jede Probe wurde als Triplikat untersucht. Die Fluoreszenz der jeweiligen Probe wurde mit der Hilfe eines Tecan GeniosPro (Anregungswellenlänge: 485nm;Emissionswellenlänge 535nm) detektiert und mit dem Programm Magellan erfasst. Die Daten wurden in das Computerprogramm Microsoft Excel übertragen.

### **2.3.3 Auswertung der Messdaten**

Bei jedem Zellversuch wurde der Leerwert (TER-Wert der Einsatz-Well-Konstruktion mit Medium und ohne Zellschicht) zusätzlich gemessen. Von dem gemessenen elektrischen Widerstand [Ohm] einer Zellschicht wurde der Mittelwert der drei Leerwerte abgezogen und mit der Fläche des Einsatzes [cm<sup>2</sup>] multipliziert.

TER-Wert in Ohm\*cm<sup>2</sup> = [ Gemessener Wert – Mittelwert der Leerwerte] \* Membranfläche

Um den Permeabilitätskoeffizienten auszurechnen, wurde zuerst der Fluoreszenzwert des reinen Mediums ohne Fluoreszein von den Proben mit

Fluoreszein abgezogen. Um den Verdünnungseffekt durch das Nachpipettieren der 300 µl puren Mediums auszugleichen, wurden die realen Fluoreszenzdifferenzen zwischen den Entnahmezeitpunkten berechnet (gemessener bzw. berechneter Fluoreszenzwert – vorangegangenem Fluoreszenzwert x 2700/3000= neu berechneter Fluoreszenzwert).

Anschließend wurden diese relativierten Differenzen addiert und in einem Diagramm in Bezug zu der jeweiligen Zeit gesetzt, um eine Steigung der Permeabilität zu erhalten. Um den Einfluß der Membran auf die Permeabilität zu beseitigen, wurde folgende Formel verwendet:

$$1/P_{\text{Zellschicht}} = 1/P_{\text{gesamt}} - 1/P_{\text{pure Membran}}$$

Hierbei stehen  $P_{\text{gesamt}}$  für die Steigung der Kurve (Fluoreszenz im Bezug zu der Zeit) von den Zellexperimenten und  $P_{\text{pure Membran}}$  für den Durchschnitt der Steigungen der Kurven (Fluoreszenz im Bezug zu der Zeit) von den Experimenten mit leerer Membran.

Anschließend wurde mit folgender Formel der Permeabilitätskoeffizient ausgerechnet:

$$\text{Permeabilitätskoeffizient } [\mu\text{m}/\text{min}] = P_{\text{Zellschicht}} * V_{\text{basolateral}} * 10000 / (F_{10\mu\text{M}} * \text{Membranfläche})$$

$P_{\text{Zellschicht}}$  [Fluoreszein/min] steht für die Permeabilität der reinen Zellschicht,  $V_{\text{basolateral}}$  [ $\text{cm}^3$ ] bedeutet das Mediumvolumen des basolateralen Kompartments, 10000 ist der Faktor um von  $\text{cm}/\text{min}$  auf  $\mu\text{m}/\text{min}$  umzurechnen und  $F_{10\mu\text{M}}$  ist der gemessene Fluoreszenzwert der 10 µM Fluoreszeinlösung.

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Herstellung der Zellysate

Als Vorbereitung wurde fast vollständiger RIPA Puffer (50 mM TRIS pH 8; 150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5 % Natrium-deoxycholate, 1 % NP40 und

Protease Inhibitor Cocktail (REF11836153001, Roche)) hergestellt und eisgekühlt.

Anschließend wurden die in 6-Welleinsätze kultivierten Zellen zwei Mal mit eisgekühltem PBS gewaschen. Danach wurde der RIPA Puffer mit 2 mM PMSF komplettiert, um daraufhin sofort die Zellen unter Verwendung von Cell Scrapern in 50 µl RIPA Puffer pro Einsatz von der Membran zu lösen. Die Lysate wurden jeweils mit einer Pipette in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mittels Ultraschall 5 Mal bei 20 W sonifiziert (pulse on: 0,5 sek, pulse off 5 sek). Hinterher wurden die Proben zentrifugiert (5 Sek bei 13000 Umdrehungen pro Minute mit der 5418R Zentrifuge) und der Überstand in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde der von Lämmli entwickelte Puffer (Laemmli, 1970) in vierfacher Konzentration (z.B. 75 µl Probe + 25 µl 4x Lämmli) mit 6 % β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Nach einer weiteren fünfmaligen Sonifizierung bei 20 Watt (pulse on: 0,5 sek, pulse off 5 sek) wurden die Proben bei -80°C gelagert.

#### RIPA Puffer

50 mM TRIS pH8

150 mM NaCl

0,1 % SDS

0,5 % Natrium-deoxycholate

1 % NP40

1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (REF11836153001, Roche) auf

10 ml

#### 4x Laemmli Puffer

8 % SDS

40 % Glycerol

0,0004 % Bromphenol

0,25 M TRIS Hcl pH 6,8

#### **2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Konzentrationsbestimmung der Lysate erfolgte durch die von Smith etablierte und auf Bichinonsäure (BCA) basierende Methode (Smith et al., 1985).

Hierzu wurde das Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23227) verwendet und nach dem entsprechenden Standardprotokoll verfahren. Proben der Lysate wurden mit den Reagenzien in einer transparenten 96-Well Platte im Verhältnis 1:5 bzw. 1:25 bei 37°C für eine halbe Stunde inkubiert und anschließend mittels des Spektrometers Sunrise von Tecan bei 540 nm die Absorption der Proben gemessen. Mit einer kompatiblen BSA-Standardreihe (Albumin Standard 0-1500 µg/mL, Thermo Scientific) wurde hierbei eine Referenzkurve erstellt und anhand dieser die Proteinkonzentrationen der Lysate ermittelt.

#### **2.4.3 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Herstellung des SDS-Polyacrylamid-Gels wurde nach dem von Ornstein und Davis entwickelten Standardprotokoll für diskontinuierliche Gelelektrophorese verfahren (Ornstein, 1964). Bei dem Verfahren der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*) erfolgt die Auftrennung der Proteine nach der Kettenlänge beziehungsweise der Größe der Moleküle. Das Detergens Dodecylsulfat denaturiert die Proteine und versieht sie mit einer negativen Ladung. Somit wandern die negativ geladenen Proteine je nach Größe unterschiedlich schnell zur positiven Anode.

Das unten angeführte Trenngel wurde 1,5 mm dick in die entsprechende Kammer gegossen, mit destilliertem Wasser überschichtet und 20 Minuten bei Raumtemperatur polymerisiert. Anschließend wurde das Wasser abgegossen, die Kammer mit Sammelgel aufgefüllt, und ein Kamm zur Bildung der Proteintaschen eingesteckt. Nach ca. 20-minütiger Auspolymerisation wurde das fertige SDS-PAGE-Gel in die mit Elektrophoresepuffer gefüllten Kammern gestellt.

Der Molekulargewichtsstandard (peq GOLD prestained markerV, PEQLAB) wurde auf Eis aufgetaut und die Proben bei 70°C für 10 min denaturiert.

Daraufhin wurden die Taschen mit 20 µg (30 µg bei Claudin 5) der Proteine beladen. Der Molekulargewichtsstandard wurde in eine Tasche pipettiert, um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können. Bei einer Spannung von 60 V wurden die Proben bis ins Sammelgel laufen gelassen und anschließend auf 135 V erhöht bis die Proben bis kurz vor das untere Ende des Trenngels gelaufen waren (ca. 2 h).

#### 15 % Trenngel

2,35 ml H<sub>2</sub>O (Braun)  
5 ml Acrylamid/ Bis 30% ( Roth, 30291)  
2,5 ml 3M TRIS pH 8,8 ( Merck)  
100 µl 10% SDS (Sigma Aldrich)  
100 µl 10% APS (Roth, 9592)  
5 µl Temed (Sigma Aldrich)

#### Sammelgel

2,85 ml H<sub>2</sub>O  
0,85 ml Acrylamid/ Bis 30% ( Roth, 30291)  
1,25 ml 0,5M TRIS pH 6,8 (Merck)  
50 µl 10% SDS (Sigma Aldrich)  
50 µl 10% APS (Roth, 9592)  
5 µl Temed (Sigma Aldrich)

#### 10x Elektrophoresepuffer

60,4 g Tris (Merck)  
376 g Glycine (Sigma, G 6388)  
20 g SDS (Sigma)  
ad 2 l H<sub>2</sub>O

#### 2.4.4 Western Blotting

Zum Transfer der Proteine wurde nach der Semi-Dry-Methode eine PVDF Membran 1 min lang in Methanol aktiviert und dann zusammen mit Vortmen-Papier mit Semi-Transfer Puffer befeuchtet. Auf dem Boden der Transferbox wurden Vortmenpapier, die PVDF Membran, das SDS-Gel und ein Vortmenpapier aufeinandergelegt, woraufhin das Konstrukt mit dem entsprechenden Deckel komplettiert wurde. Die Proteine wurden für 75 min mit 18 V (max. 200 mA) in die PVDF Membran transferiert.

Diese Membran wurde hinterher 1 Stunde lang in 20 ml 5 % Milch/PBS geblockt.

Daraufhin wurde die Membran mit dem jeweiligen primären Antikörper, gelöst in 1 ml 1 % BSA/PBS, in einer Plastikfolie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf einer Schüttelplatte inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde anfangs die Membran drei Mal 10 Minuten lang in 0,1 % Tween 20/PBS gewaschen. Bevor der in 10 ml 1 % BSA/ PBS gelöste sekundäre Antikörper für 1 h wirken konnte, wurde die Membran für 25 min in 5 % Milch/PBS geblockt. Als nächster Schritt wurde erneut drei Mal 10 Minuten lang mit 0,1 % Tween 20/PBS gewaschen.

ECL 1 und ECL 2 Lösungen wurden frisch im Verhältnis 1:1 gemischt. Mit 10 ml dieser Mischung wurde eine Membran für 2 min inkubiert. Mit Hilfe eines Fluor Chem FC2 Multiimager II (Alpha Innotech) wurden die Bilder des Blots entwickelt. Mit der dazugehörigen Software Alpha View wurden die jeweiligen Dichtigkeitswerte der Proteinbanden kalkuliert und auf den Wert der entsprechenden  $\beta$ -Aktin Banden bezogen. Die Werte wurden in Microsoft Excel übertragen und ausgewertet.

Um eine Membran erneut zu verwenden, wurden die gebundenen Antikörper mit folgenden Schritten gelöst: Mit destilliertem H<sub>2</sub>O wurde die Membran für 5 Minuten gewaschen, gefolgt von 5 Minuten in 0,2 M NaOH (Merck, 9137.1000), um danach erneut für 5 Minuten mit dest. H<sub>2</sub>O zu waschen. Nach 10 Minuten Waschen in 0,1 % Tween 20/PBS und 25 min in 5 % Milch/PBS konnte die Membran erneut mit primären Antikörper inkubiert werden.

### Transferpuffer

- 48 mM Tris (Merck)
- 39 mM Glycin (Sigma Aldrich)
- 1,3 mM SDS (Sigma Aldrich)
- 20 % Methanol (Appli Chem)

### ECL 1

- 1 ml Luminol; 250 mM in DMSO (Sigma Aldrich, 123072)
- 440 µl p-Coumaric-Acid; 90 mM in DMSO (Sigma Aldrich, C-9008)
- 5 ml Tris 1 M pH 8,8 ( Appli Chem, A 1086)
- ad 50 ml H<sub>2</sub>O

### ECL 2

- 32 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 5 ml Tris 1 M pH 8,8 ( Appli Chem, A 1086)
- ad 50 ml H<sub>2</sub>O

### **2.4.5 Fluoreszenzmikroskopie**

Das Protokoll der Immunfluoreszenzmarkierung basiert auf einer vormals veröffentlichten Methode (Neuhaus et al., 2008). Die verwendeten Zellen hatten am Tag 15 nach Aussaat eine funktionelle Barriere in den Transwelleinsätzen aufgebaut. Der H441 Zellmonolayer wurde drei Mal mit PBS gewaschen und mit vorgekühltem MeOH bei -20°C für 20 min fixiert und permeabilisiert. Erneut wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und für 20 min in PBS bei Raumtemperatur rehydriert. Danach wurden die Zellen pro 6-Welleinsatz mit 400 µL der primären Antikörperlösungen (1:100 in 1 % BSA/PBS) bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde wurde der Zellmonolayer drei Mal mit PBS gewaschen und mit den sekundären Antikörperlösungen (1:100 in 1 % BSA/PBS ) für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Chromogen zur grünen Färbung der Proteine war FITC oder Alexa® 488 an die sekundären Antikörper gekoppelt. Um die Zellkerne zu markieren, war in den sekundären

Antikörperlösungen zusätzlich noch 1 µg/ml Propiumiodid enthalten. Propiumiodid interkaliert die DNA und reichert sich somit in den Zellkernen an. Nach der Inkubation wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen, und die Kunststoffmembran vorsichtig mit einem Skalpell von den Einsätzen getrennt. Im Anschluß wurde die Membran – mit der Seite ohne Zellen – auf einen Objektträger gelegt. Die Seite der Membran mit den Zellen wurde mit dem Vectashield Hard-Set mounting Medium und mit einem Deckglas bedeckt. Das Vectashield Hard-Set mounting Medium verhindert das Ausbleichen von dem FITC. Als Kontrolle diente die Färbung einer Zellschicht ohne Inkubation mit dem primären Antikörper. Die Zellen wurden mit einem 40-fachen Objektiv und einem Brechungsindex von 1,3 mittels Immersionsöl betrachtet. Die Immunfluoreszenzbilder wurden zum einen durch ein Zeiss Axio Observer.Z1 Mikroskopiesystem mit LD Plan-Neofluarobjektiven, die mit dem LED Beleuchtungssystem Colibri (Software: AxioVision Rel. 4.8.2) ausgestattet sind, gemacht. Zum anderen wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop mit der Software LSM 510 (Zeiss) im Expert Mode eingesetzt. Die Bilder wurden mit dem LSM 5 Image Browser analysiert.

## **2.5 Molekularbiologische Methoden**

### **2.5.1 RNA-Isolierung**

Die auf Transwelleinsätzen gewachsenen Zellen wurden an Tag 7 oder Tag 15 bei Raumtemperatur unter der Sterilbank pro Einsatz mit 350 µl RA1 Puffer (mit 1 % Mercaptoethanol versetzt) vom RNA Isolierungs-Kit Nucleospin-RNA II (Macherey Nagel, REF.740955.250) lysiert. Um die Lysate zu homogenisieren, wurden sie mindestens 10 Mal auf und abgezogen. Anschließend wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

Um die Viskosität zu reduzieren und die aufgetauten Lysate zu reinigen, wurden die Proben durch den NucleoSpin® Filter filtriert und für eine Minute bei 11000 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde in autoklavierte Eppis überführt und mit 350 µl Ethanol versetzt, damit die RNA folgend besser binden konnte. Nach dem Vortexen wurden die Proben auf eine Säule mit Röhrchen aufgetragen und bei 11000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein

neues Röhrchen gestellt und zur Entsalzung 350 µl MDB Puffer hinzugegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 1 Minute bei 11000 g.

Zur Herstellung des DNase-Mix wurden pro Probe 90 µl des Reaktionspuffers und 10 µl rDNase mittels Schnippen in einem autoklavierten Röhrchen gemischt. Daraufhin wurden 95 µl des DNase Mix auf jede Membran der Säulen hinzugegeben, um die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren. Für jede Membran wurde eine neue Pipettenspitze verwendet. Als erster Waschschrift nach der Inkubation wurde pro Säule 200 µl RA2 Puffer hinzugefügt und für 30 Sekunden mit 11000 g zentrifugiert. Danach wurden die Säulen jeweils in ein neues Röhrchen gestellt, 600 µl RA3 Puffer hinzugefügt und bei 11 000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Als letzter Waschschrift wurde jede Säule wieder in ein neues Röhrchen gestellt und mit hinzugefügten 250 µl RA3 Puffer für 1 Minute bei 11000g zentrifugiert. Die Röhrchen wurden kurz ausgeleert und nochmals für 2 Minuten bei 11000 g zentrifugiert. Die RNA wurde nun in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße eluiert, indem auf die Membran 40 µl RNase freies H<sub>2</sub>O pipettiert wurde. Um die RNA vollständiger zu lösen, wurden die Eppendorfreaktionsgefäße erst für 1 Minute stehen gelassen und dann bei 11000 g für 2 Minuten zentrifugiert. Die Säulen konnten verworfen werden, und die isolierte RNA in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde bei -80°C aufbewahrt.

Mit 1,2 µl Lösung der isolierten RNA wurden mittels eines Nanodrop ND 2000 Spektrometer (ThermoFisher) bei 260/280 nm die entsprechenden RNA Konzentrationen gemessen.

### **2.5.2 cDNA-Herstellung**

Um die komplementäre DNA (cDna) zu synthetisieren, wurde mit dem high capacity cDNA-kit von Applied Biosystems gearbeitet. Der Mastermix wurde in autoklavierten Röhrchen hergestellt. Jeweils 10 µl des Mastermixes wurden in auf Eis gestellte beschriftete Mini Caps pipettiert. Anschließend wurden zuerst die entsprechenden Mengen Nuklease freies H<sub>2</sub>O und die jeweils benötigte Menge an Gesamt-RNA hinzugefügt. Hierbei wurde das Verhältnis des H<sub>2</sub>O und der Gesamt-RNA anhand der jeweiligen bestimmten Konzentration (s.a.

2.4.1) so gewählt, dass 1 µg RNA in 10 µl gelöst waren und zusammen mit dem Mastermix im Endeffekt 20 µl cDNA entstanden.

Tabelle 2.8 Reaktionsansatz für 20 µl cDNA

Reagenz	Volumen
10x RT Puffer	2 µl
25 dNTP Mix (100nM)	0,8 µl
10x RT Random Primers	2 µl
Multiscribe Rev. Transkriptase	1 µl
Rnase Inhibitor	1 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	3,2 µl
Template (1µg RNA)	10 µl

Die abgespinnnten Minicaps wurden in den Thermal Cycler (Applied Biosystems, 2720) gestellt und mittels PCR Programm (10 min bei 25°C, 120 min bei 37°C, 5 min bei 85°C und Abkühlung auf 4°C) cDNA synthetisiert. Gelagert wurde die cDNA bei -80°C.

### 2.5.3 Quantitative reverse Transkriptase PCR

Die quantitative RT-PCR (qPCR) Analyse wurde mit Hilfe von Sonden (SP-B, Caveolin-1 und 18 SrRNA als endogene Kontrolle) oder mit Hilfe von Primern (Claudin-1,-3,-4,-5 und 18 SrRNA) durchgeführt. Anhand von Fluoreszenzsignalgebern kann dabei die Menge der cDNA in Echtzeit gemessen werden. Die Fluoreszenz steigt dabei proportional zur synthetisierten DNA Menge an.

Zur Vorbereitung wurden die Sonden und der QPCR ROX Mix (AB-1138, Applied Biosystems) bzw. die Primer und der QPCR SYBR Green Mix (AB-1162/B, Applied Biosystems) auf Eis und die cDNA in einer -20°C kalten Schachtel aufgetaut. Die gevortexte cDNA wurde 1:10 in sterilem, nukleasefreiem H<sub>2</sub>O verdünnt. Die *Mastermixe* wurden hergestellt und in jedes Well 20 µl vorgelegt. Anschließend wurde jedes Well mit 5 µl cDNA bzw. als Kontrolle mit 5 µl H<sub>2</sub>O komplettiert. Bei SP-B und Caveolin-1 wurden Taqman

Sonden genutzt, während die mRNA Expression der anderen Proteien mittels Primern untersucht worden ist. Die Reaktionsansätze für jeweils ein Well werden in folgender Tabelle gezeigt:

Tabelle 2.9 Reaktionsansatz qPCR

18 SrRNA	SP-B	Caveolin-1	Primer
12,5 µL abs. QPCR ROX Mix	12,5 µL abs. QPCR ROX Mix	12,5 µL abs. QPCR ROX Mix	12, 5 µL QPCR SYBR GreenMIX
1,25 µL 18 SrRNA Taqman-Sonde	1,25 µL SP-B Taqman-Sonde	1,25 µL Caveolin- 1 Taqman-Sonde	1,75 µL 3 µM Primer (jeweils forward + revers)
6,25 µL Nukleasefreies H <sub>2</sub> O	6,25 µL Nukleasefreies H <sub>2</sub> O	6,25 µL Nukleasefreies H <sub>2</sub> O	4 µL Nukleasefreies H <sub>2</sub> O
5 µL cDNA (1:10)			

Anschließend wurde die Platte mittels entsprechender Folie (ThermoScientific, AB-0558) versiegelt und in der Zentrifuge (Perfect Spin) für 1 min abgespinn. Bei der folgenden qPCR wurden zunächst bei 95°C die Doppelstränge der cDNA für 15 Minuten getrennt und das Enzym aktiviert. Als zweiter Schritt wurde die Temperatur der Platte in 50 Zyklen für jeweils 15 Sekunden auf 95°C und für 1 Minute auf 60°C gesetzt, damit es in jedem Zyklus zu einer Doppelstrangbildung und Farbstoffanlagerung kam. Nach jedem Zyklus wurde dabei die steigende Fluoreszenz gemessen. Jede Probe wurde als Triplet in der qPCR untersucht, und die drei Kurven lagen dabei idealerweise übereinander. Falls ein Ausreißer vorhanden war, wurde dieser herausgenommen.

Die Analyse wurde mit Hilfe des 7300 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) durchgeführt.

Die Menge der mRNA wurde durch die  $\Delta\Delta C_t$  Methode bezogen auf die 18 SrRNA mit folgender Formel berechnet:

$$[\text{mRNA}] = 2^{(\text{Ct der 18 SrRNA} - \text{Ct der Probe})}$$

(Der Ct-Wert ist die benötigte Zyklenanzahl bis zum Übergang in eine exponentielle Amplifizierung).

## **2.6 Statistische Analyse**

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Um statistische Unterschiede zu berechnen, wurde der t-test von Microsoft Excel® verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurde dieser Test zweiseitig durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Optimierung der Kultivierungsbedingungen

Um die optimalen Bedingungen für die Aussaat der humanen Lungenepithelzellen H441 herauszufinden, wurden einige Vorversuche durchgeführt. Bei Beschichtungen mit Glutaraldehyd, Gelatine 0,5 %, Poly-L-Lysin oder Kollagen IV sind die Zellen häufig nur in der Mitte des Einsatzes und nicht konfluent bis an die Ränder gewachsen. Abbildung 3.1 zeigt den Übergang vom konfluenten Zellbereich zu der wenig bewachsenen Peripherie. Als geeignetste Beschichtung stellte sich das 0,01 %-ige Kollagen I heraus. Die Vorversuche zeigten, dass eine Behandlung der Zellen mit Dexamethason ab Tag 5 optimal ist, um ein frühzeitiges Ablösen der Zellen von den Transwelleinsätzen zu vermeiden. Bezüglich der Endothelfaktoren hatte das konditionierte Medium von wachsenden Endothelzellen einen größeren und verstärkenden Effekt auf die Barriere als das konditionierte Medium von bereits konfluenten Zellen.

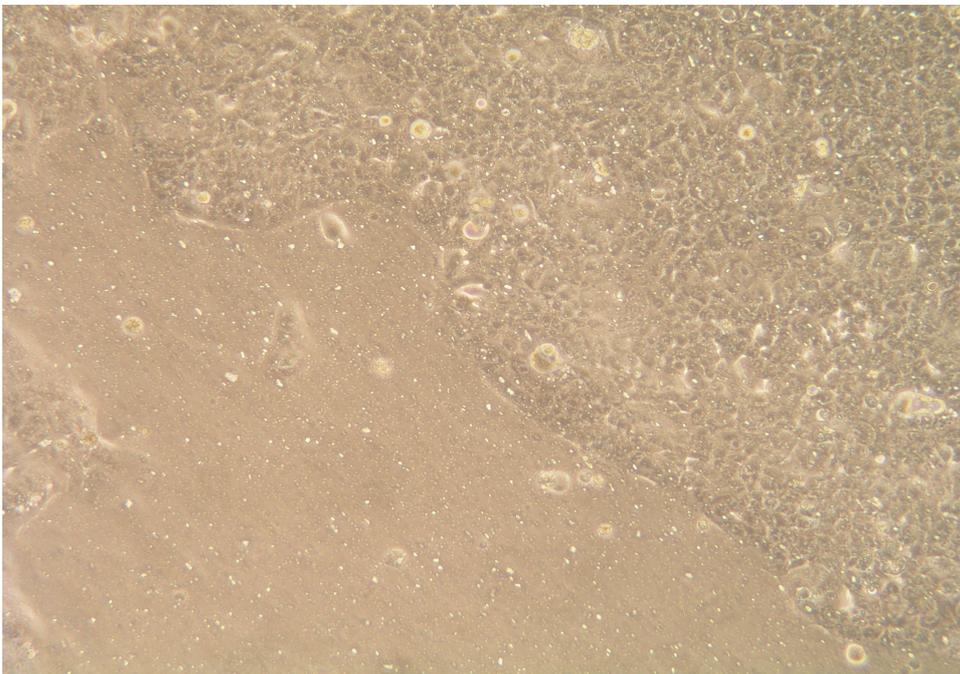


Abbildung 3.1 H441-Zellen, Tag 7 nach Aussaat, Beschichtung mit Gelatine 0,5 %. Zu sehen ist der Übergang von der konfluenten zellbewachsenen Mitte des Einsatzes zu der vereinzelt bewachsenen Peripherie des Einsatzes.

Wie in Abbildung 3.2 zu erkennen ist, ließen sich lichtmikroskopisch unter Behandlung mit Dexamethason sogenannte *Domes* erkennen. Durch die Betrachtung verschiedener Ebenen mit Hilfe des Mikroskops konnte man sehen, dass die Zellen in der Form eines Kuppelgewölbes (*Domes*) übereinander wuchsen. Die *Domes* waren ab Tag 8 zu erkennen und korrelierten mit hohen TER-Werten und entsprechend niedrigen Fluoreszeinpermeabilitäten.

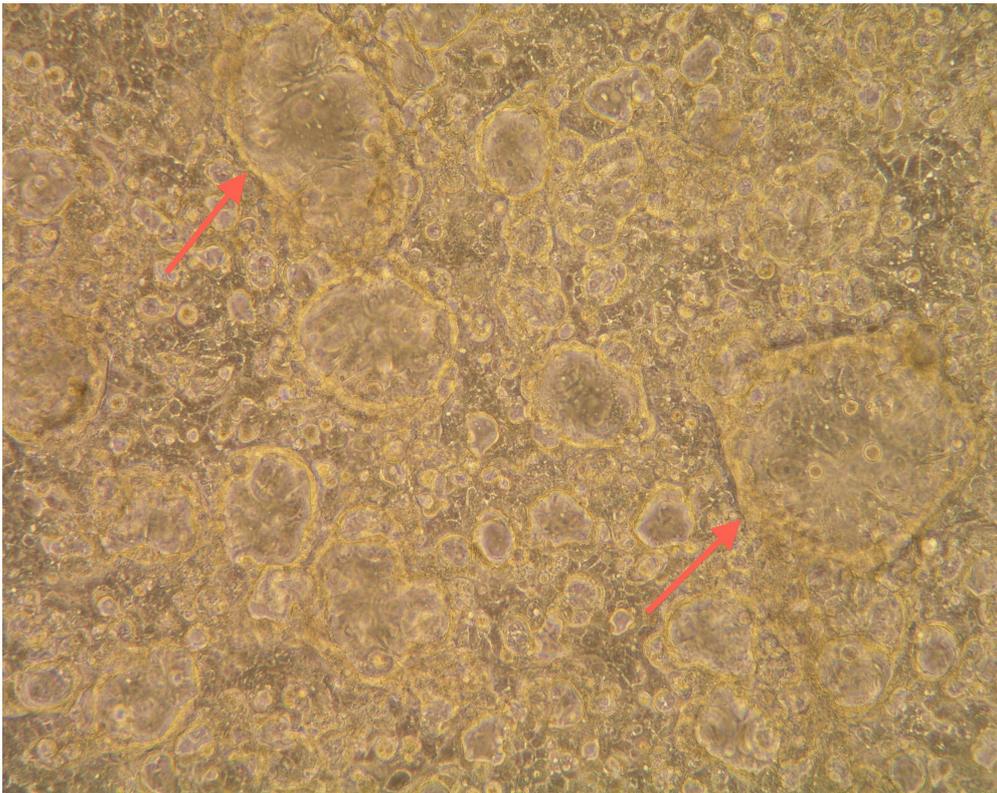


Abbildung 3.2 Tag 14 nach Zellaussaat, Beschichtung mit Kollagen I. Die Zellen wurden ab Tag 5 mit 100 nM Dexamethason behandelt und ab Tag 8 konnte man die Bildung von *Domes* erkennen. Die roten Pfeile zeigen jeweils auf den Rand von derartigen *Domes*

Bei den Versuchen mit Ko-Kulturen wuchsen die Endothelzellen zwar an der Rückseite der Transwelleinsätze an, allerdings konnten keine erhöhten TER-Werte gemessen werden.

### **3.2 Einfluss der Dexamethasonkonzentration auf die Funktionalität der Barriere**

Die auf Transwelleinsätzen kultivierten H441-Zellen erreichten ab Tag 7 Konfluenz. Abbildung 3.3 zeigt den zeitlichen Verlauf der TER-Werte mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dexamethason im herkömmlichen H441-Medium apikal. Zwischen Tag 8-10 wurden in den Zellschichten ohne Dexamethason mit Hilfe der Lichtmikroskopie Löcher im Zellrasen sichtbar. Die TER-Werte waren zwar noch messbar, doch nur mit Dexamethason behandelte Zellschichten bewahrten ihre Konfluenz und steigerten ihre TER-Werte. Den Höhepunkt ihrer Funktionalität bzw. ihrer Dichtigkeit erreichte die Barriere um den Tag 15 nach der Aussaat.

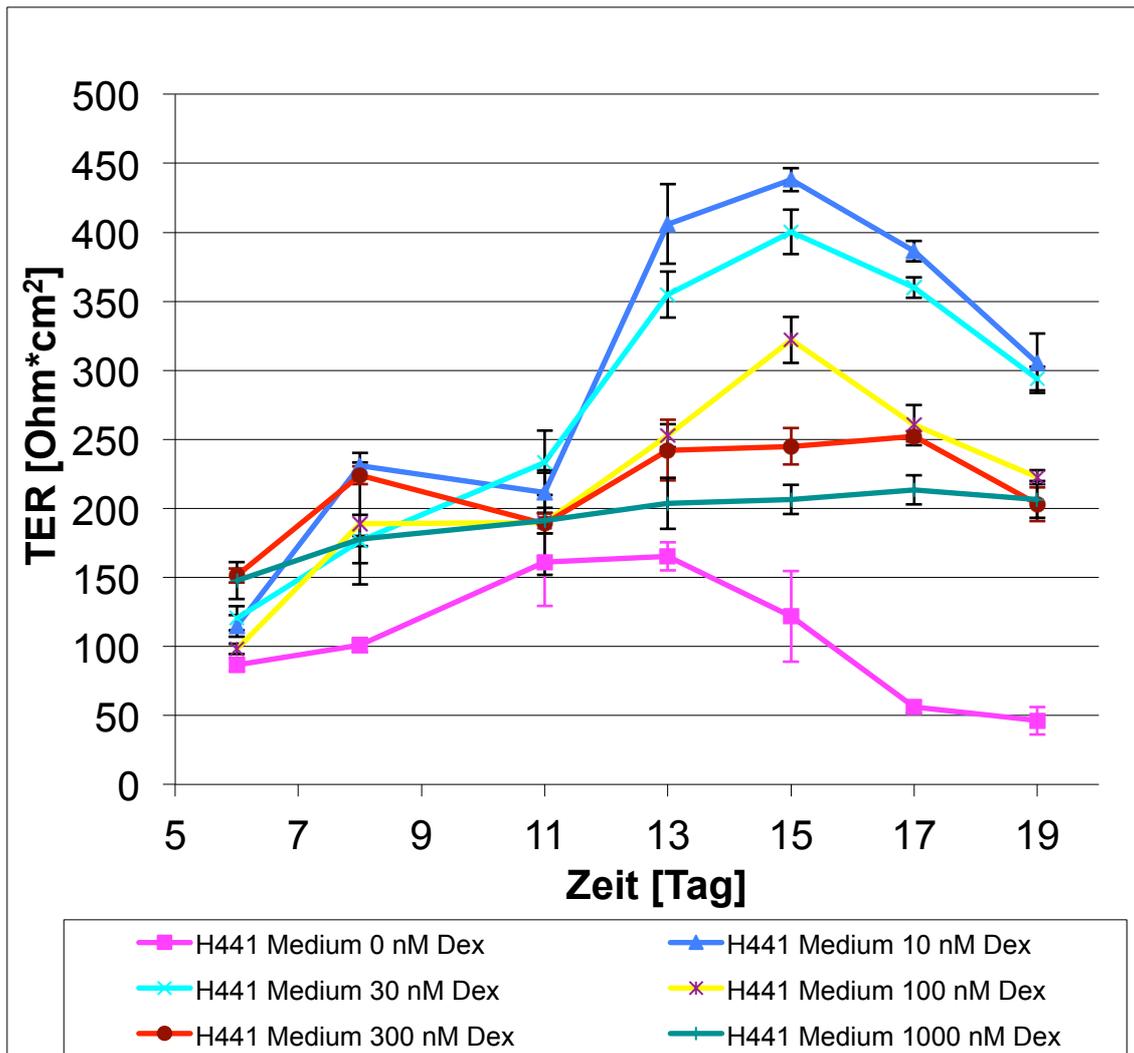


Abbildung 3.3 Entwicklung der TER-Werte in Abhängigkeit der Dexamethasonkonzentration. Zellen mit H441-Medium auf Transwelleinsätzen gezüchtet. Dexamethason wurde apikal ab Tag 5 alle 2-3 Tage mit dem Mediumwechsel neu hinzugefügt (Dex=Dexamethason). Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei n=3.

Wie man Abbildung 3.4 entnehmen kann, scheint ein negativer Zusammenhang zwischen der Dexamethasonkonzentration und der Höhe der TER-Werte zu bestehen. Der TER-Wert stieg von  $122 \pm 33 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$  durch die Hinzugabe von 100 nM Dexamethason signifikant auf  $322 \pm 16,8 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$  ( $p < 0,01$ ) und bei 10 nM sogar auf  $438,2 \pm 8,5 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$  ( $p < 0,001$ ). Bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  Dexamethason bewahrten die Zellen ebenfalls ihre Konfluenz, jedoch erreichte der TER-Wert lediglich eine nicht signifikante Steigerung auf  $207 \pm 10,6 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ . Diesem Trend entsprechend wurden

245 ± 13,4 Ohm\* cm<sup>2</sup> bei 300 nM und 400,4 ± 16,1 Ohm\* cm<sup>2</sup> bei 30 nM Dexamethason gemessen.

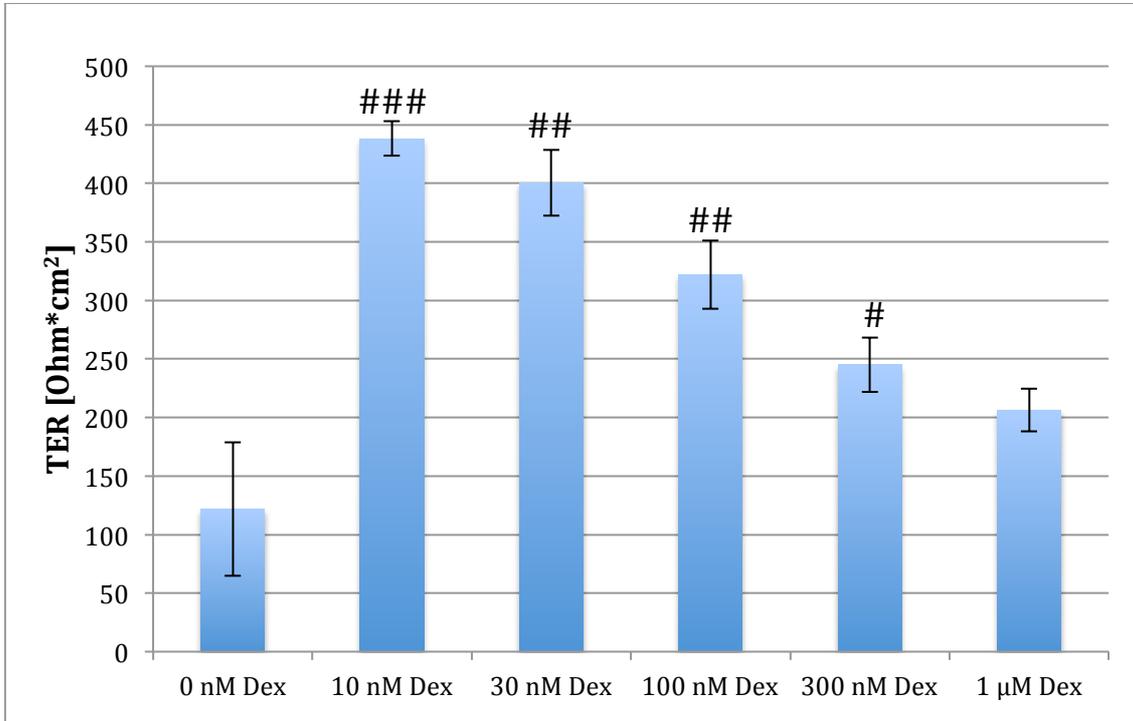


Abbildung 3.4 TER-Werte in Abhängigkeit der Dexamethasonkonzentration an dem Tag 15, dem Höhepunkt der funktionellen Barriere. (Dex = Dexamethason). Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zum TER-Wert der Zellen ohne Dexamethason wurde wie folgt markiert: ### ( $p < 0,001$ ); ## ( $p < 0,01$ ) und # ( $p < 0,05$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei  $n=3$ .

Bezüglich der Fluoreszeinpermeabilität zeigt Abbildung 3.5 die deutliche Wirkung des Dexamethasons zwischen Tag 5 und 7 auf die Fluoreszeinpermeabilität und somit die stärkende Wirkung auf die Barriere für größere Moleküle. An Tag 7 hatten die unbehandelten Zellen einen Permeabilitätskoeffizienten von  $1,16 \pm 0,43 \mu\text{m}/\text{min}$ . An Tag 15 war der Zellrasen ohne Dexamethason nicht mehr konfluent.

Durch die Zugabe von Dexamethason an Tag 5 kam es nach nur zwei Tagen zu jeweils einer signifikanten Senkung auf  $0,51 \pm 0,14 \mu\text{m}/\text{min}$  (100 nM Dexamethason) und auf  $0,44 \pm 0,07 \mu\text{m}/\text{min}$  (10 nM Dexamethason).

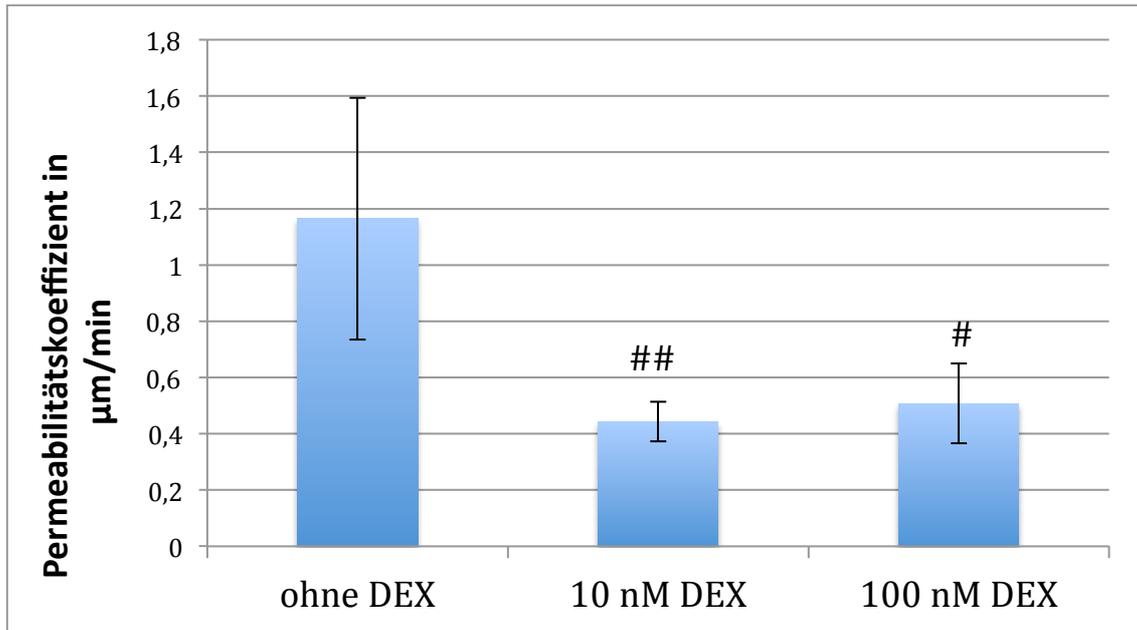


Abbildung 3.5 Fluoreszeinpermeabilität am Tag 7 mit und ohne Dexamethason. Die Zellen wurden an Tag 5 unterschiedlich behandelt und wiesen an Tag 7 signifikante Unterschiede in ihrer Permeabilität auf. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei  $n=3$ . Bei statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Tag 7 ohne Dexamethason wurden die Daten mit # ( $p < 0,05$ ) und ## ( $p < 0,01$ ) markiert.

### 3.3 Das Lungenkulturmodell enthält Alveolarepithelzellen Typ I und II

Das Modell sollte idealerweise – der Alveolen in der menschlichen Lunge entsprechend – aus Typ-I- und Typ-II-Epithelzellen bestehen. Als zellspezifische Marker wurden das Protein Caveolin1 für Typ-I-Zellen und *Surfactant Protein-B* für Typ-II-Zellen betrachtet. Dies wurde sowohl auf der mRNA Ebene mittels qPCR als auch auf der Proteinebene mittels Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft. Die folgenden Abbildungen unter Punkt 3.3 lassen erkennen, dass beide Marker bzw. Zelltypen in dem verwendeten Modell enthalten sind, und Dexamethason ihre Regulation beeinflusst. Bei der mRNA Quantifizierung mittels qPCR wurde die Expression immer auf Tag 7 ohne Dexamethason bezogen.

### 3.3.1 Regulation des Caveolin-1

Bei dem Protein Caveolin-1, dem Marker für Typ-1 Zellen, war die Regulation auf der mRNA Ebene schwach ausgeprägt (s. Abbildung 3.6). Im Vergleich zu Tag 7 ohne Dexamethason konnte man bei 10 nM Dexamethason am Tag 7 eine 1,03 ( $\pm 0,083$ )-fache und am Tag 15 eine signifikante 0,37 ( $\pm 0,001$ )-fache reduzierte Expression erkennen. Bei 100 nM Dexamethason folgte zunächst an Tag 7 eine 1,36 ( $\pm 0,286$ )-fache Steigerung und an Tag 15 eine Herunterregulierung um den Faktor 0,81 ( $\pm 0,062$ ). Der Unterschied bei der Caveolin-1-Expression zwischen 10 und 100 nM Dexamethason an Tag 15 war hierbei signifikant.

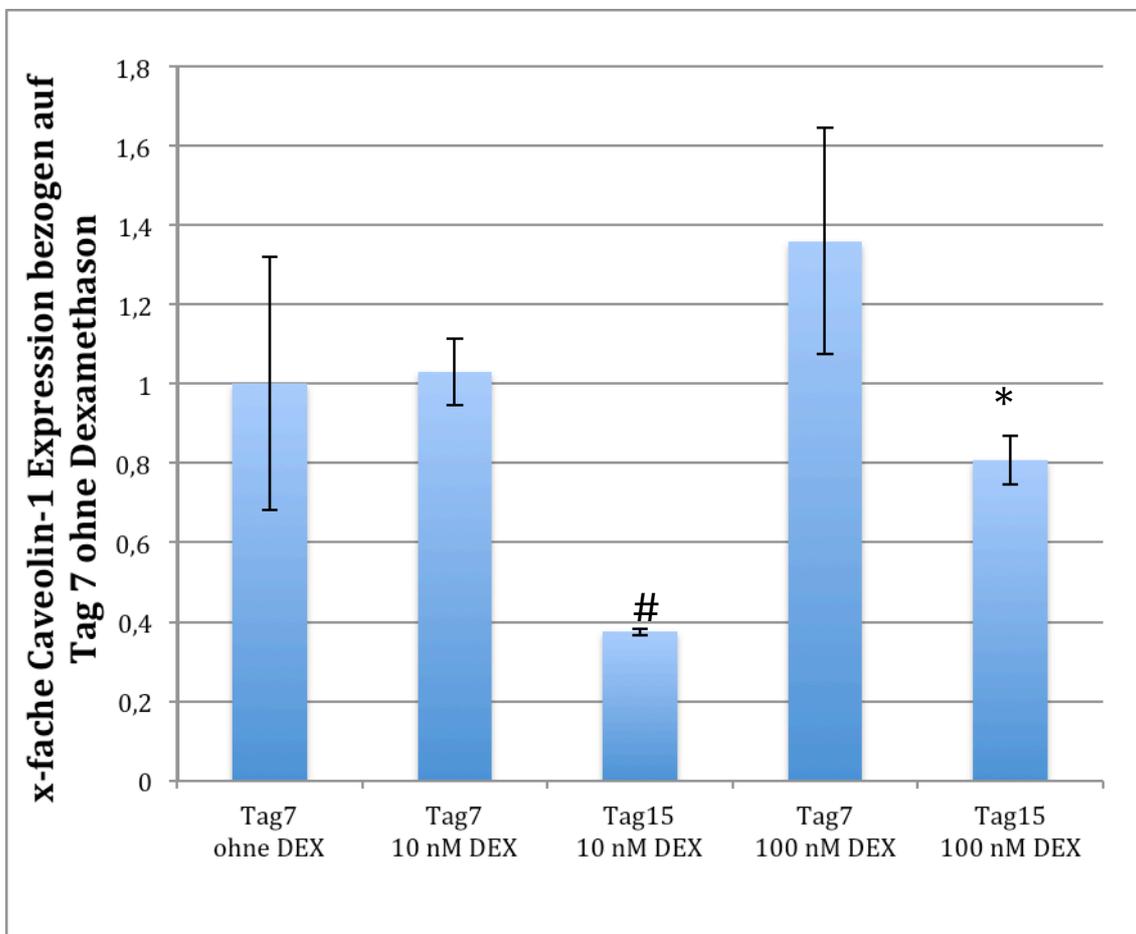


Abbildung 3.6 Wirkung von Dexamethason auf die mRNA Expression von Caveolin-1. Die Werte sind bezogen auf die mRNA Expression von Zellen an dem Tag 7 ohne Dexamethason. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei  $n=3$ . Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu Tag 7 ohne Dexamethason wurden die Daten mit # ( $p<0,05$ ) markiert. Der statistisch signifikante Unterschied zwischen 100 nM und 10 nM Dexamethason an Tag 15 wurde mit \* ( $p<0,05$ ) gekennzeichnet.

### 3.3.2 Regulation des SP-B

Die Abbildung 3.7 zeigt die starke Hochregulierung des SP-B an Tag 7 nach 2 Tagen Behandlung mit Dexamethason. Innerhalb von 2 Tagen lässt die Zugabe an Tag 5 von 100 nM Dexamethason die mRNA Expression um den Faktor 107,75 ( $\pm 45,19$ ) und die Zugabe von 10 nM um den Faktor 7,95 ( $\pm 2,92$ ) steigern. Der Effekt der durch Dexamethason induzierten Steigerung ist am Tag 15 nicht mehr so stark vorhanden. Bei einer Konzentration von 100 nM Dexamethason war das SP-B noch 16,04 ( $\pm 2,11$ )-fach und bei 10 nM 2,26 ( $\pm 0,13$ )-fach vermehrt exprimiert.

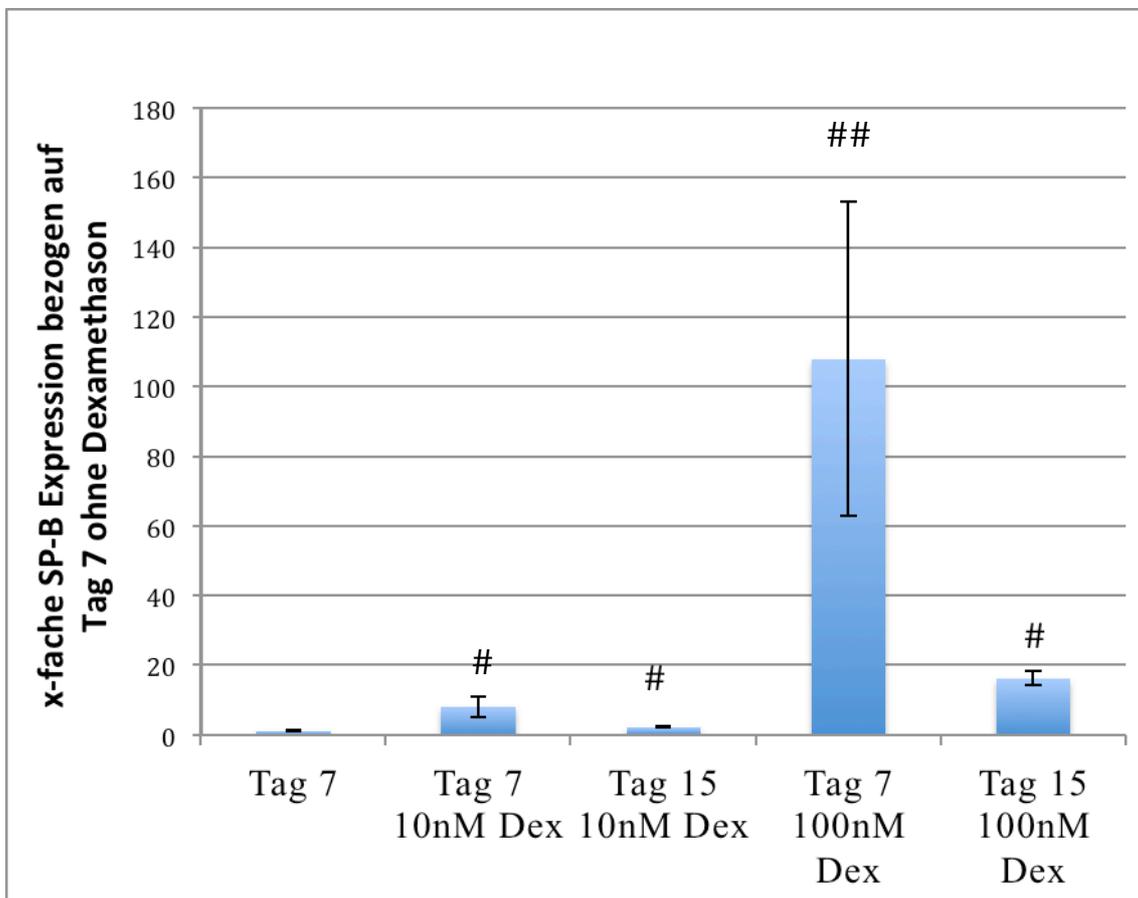


Abbildung 3.7 Wirkung von Dexamethason auf die mRNA Expression von SP-B. Die Werte sind bezogen auf die mRNA Expression von Zellen an dem Tag 7 ohne Dexamethason. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei  $n=3$ . Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu Tag 7 ohne Dexamethason wurden die Daten mit # ( $p < 0,05$ ) und ## ( $p < 0,01$ ) markiert.

### 3.3.3 Immunfluoreszenzbilder von Caveolin-1 und SP-B

Wie in Abbildung 3.8 zu erkennen ist, sind Caveolin-1 und SP-B unterschiedlich in der Zelle lokalisiert. SP-B (Bild A) ist diffus im gesamten Zytosol anzutreffen, während Caveolin-1 (Bild B) sehr stark an den Zellgrenzen und in den Caveoli vorhanden ist. Wie man in Bild C erkennen kann, liegen Typ-II-Marker SP-B und Typ-II-Marker Caveolin-1 exprimierende Zellen nebeneinander und scheinen jeweils ein Protein vermehrt zu synthetisieren. Dieses Bild bestätigt somit, dass Alveolarepithelzellen Typ-I und Typ-II koexistent in dem kultivierten Zellkulturmodell vorhanden sind.

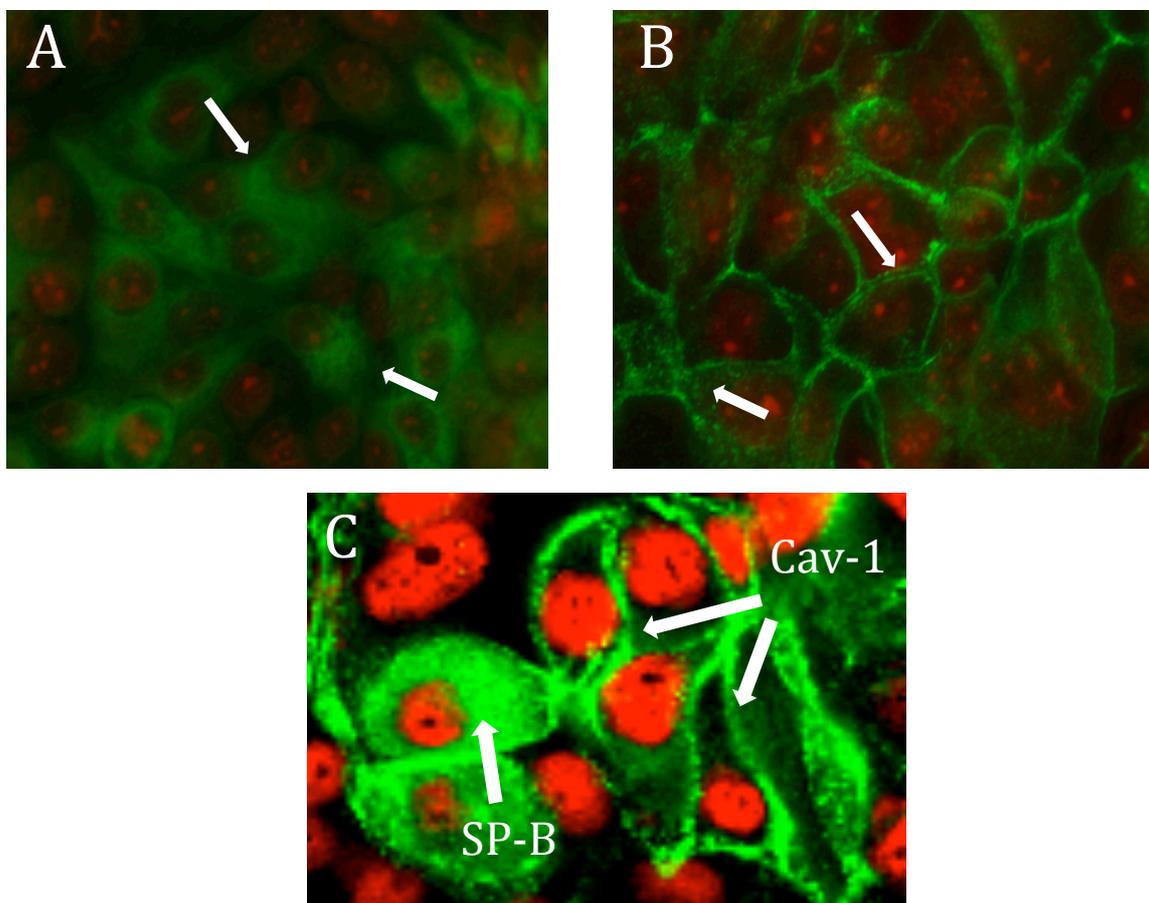


Abbildung 3.8 Nachweis auf der Proteinebene von SP-B (Bild A) und Caveolin-1 (Bild B) mittels Immunfluoreszenz am Tag 15. (40-fache Vergrößerung mit einem Brechungsindex von 1,3). Die Zellen wurden jeweils ab Tag 5 mit 100 nM Dexamethason behandelt. Die Proteine sind grün gefärbt. Die Zellkerne sind durch Propidiumiodid rot markiert. SP-B (In Bild A mit weißen Pfeilen markiert) ist diffus im Zytosol vorhanden. Caveolin-1 (In Bild B mit weißen Pfeilen markiert) findet sich an den Zellgrenzen und in Caveoli. Bild C zeigt eine Zellschicht die gleichzeitig gegen SP-B und Caveolin-1 gefärbt worden ist.

### 3.4 Das Lungenkulturmodell exprimiert Occludensjunctionsproteine

Die Immunfluoreszenz auf verschiedene Occludensjunctionsproteine wurde bei mit 100 nM Dexamethason behandelten Zellen an Tag 15 durchgeführt. Wie man an der Abbildung 3.9 erkennen kann, bilden die meisten Occludensjunctionsproteine ein ausgeprägtes Netzwerk, das sich über die gesamte Zellschicht erstreckt. Man sieht – im Falle von Claudin-1 und ZO-1 besonders ausgeprägt –, dass die Occludensjunctionsproteine überwiegend an den Zellgrenzen lokalisiert sind. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz stößt man am wenigsten auf das Protein Claudin-5. Es ist nur unregelmäßig nachweisbar gewesen.

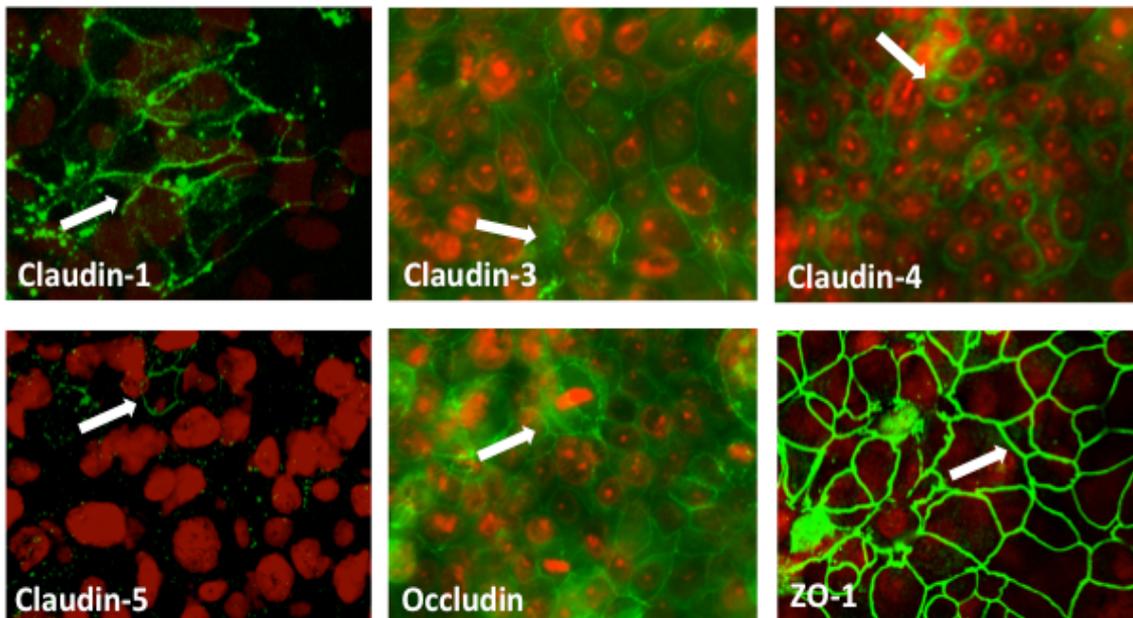


Abbildung 3.9 Immunfluoreszenz von verschiedenen Occludensjunctionsproteinen an Tag 15 mit 100 nM Dexamethason. Bei 40-facher Vergrößerung mit einem Brechungsindex von 1,3. Die Zellen sind konfluent gewachsen. Die Zellkerne sind durch Propidiumiodid rot angereichert. Die Proteine stellen sich grün gefärbt dar.

### 3.5 Einfluss der Endothelfaktoren auf die Epithelbarriere

Die Barriere der kultivierten H441-Zellen in reinem H441-Medium wurde mit der Barriere der Zellen verglichen, die apikal H441-Medium und basolateral das konditionierte Endothelmedium während des gesamten Transwellversuchs erhielten. Mit diesem Versuchsaufbau sollte der Einfluss von den abgegebenen

Faktoren der Endothelzellen auf die Epithelzellen untersucht werden. Das konditionierte Endothelmedium mit den gelösten Faktoren wurde deswegen – dem kapillären Lumen der alveolären Einheit entsprechend – basolateral hinzugefügt. Das konditionierte Medium der Endothelzelllinien wurde – wie im Material- und Methodenteil beschrieben – gewonnen. Als Lungenendothelzelllinie dienten hierbei HPMEC-ST1.6R (folgend ST1 genannt) Zellen und als humane Gehirnendothelzelllinie die hCMEM/D3-Zellen (folgend D3 genannt). Um den definitiven Einfluss der Endothelfaktoren genau zu bestimmen, wurde auch eine Reihe mit nativem Endothelmedium, d.h. frischem ST1- bzw. D3-Medium getestet. Auch die mit den basolateral unterschiedlichen Medien behandelten Zellen benötigten Dexamethason, um an den Tagen 14-15 die höchste Funktionalität ihrer Barriere zu erreichen (siehe Punkt 3.2 ). Die Analyse der Barriere fokussierte sich deswegen auf diesen Zeitpunkt. Die gewählte Konzentration lag bei 100 nM Dexamethason apikal, weil man bei dieser Konzentration neben einer funktionellen Barriere, Zellkulturen mit Typ-I-Zellen und auch Typ-II-Zellen mit einer maximalen SP-B Expression vorfand (vergleiche Punkt 3.3). Um die Endotheleffekte zu verdeutlichen, wurden die Werte des Kontrollmediums als Referenz genommen und die anderen Barrierewerte darauf bezogen. Die mit 100 nM Dexamethason behandelten Zellen steigerten bei basolateralem konditioniertem St1-Medium (Lungenendothelmedium) ihren TER-Wert signifikant auf  $127,1 \pm 6,4$  % (s. Abbildung 3.10). Die Zellen, die mit konditioniertem St1-Medium behandelt worden sind, bauten somit eine dichtere Barriere auf als Zellen mit herkömmlichem Medium bzw. Kontrollmedium. Unter nativem/frischem St1-Medium konnte mit einem ermittelten TER-Wert von  $113,9 \pm 13,7$  % kein signifikanter Unterschied zu dem H441-Medium festgestellt werden. Mit D3 Medien (Hirnendothelmedium) dagegen senkte sich der TER-Wert bezogen auf das Kontrollmedium signifikant. Unter frischem D3-Medium erreichten die Zellen  $82,4 \pm 4,7$  % und unter konditioniertem D3-Medium  $44,1 \pm 9,7$  % des TER-Wertes des basolateralen Kontrollmediums. Der Unterschied zwischen frischem und konditioniertem D3-Medium war dabei ebenfalls signifikant.

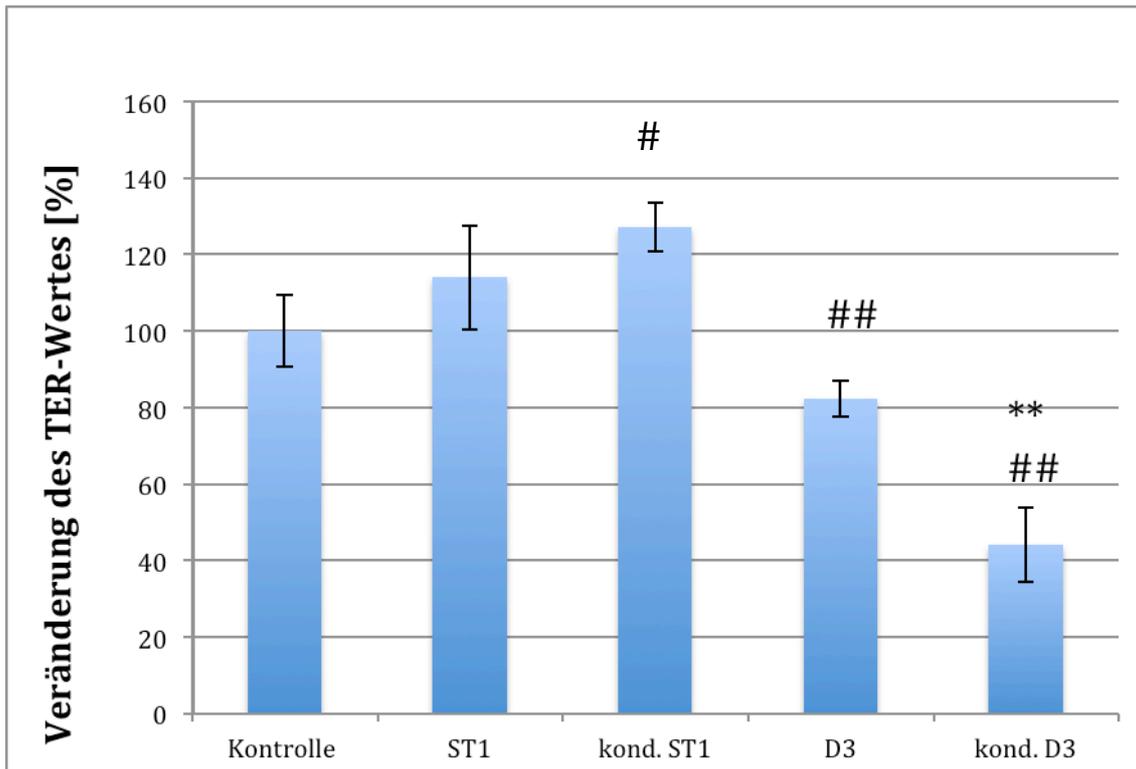


Abbildung 3.10 Beeinflussung des TER-Wertes durch verschiedene Medien. Gemessen am Tag 15 mit 100 nM Dexamethason. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei n=3. ST1 ist das Lungenendothelmedium. D3 ist das Hirnendothelmedium. ( $p < 0,05 = \#$ ;  $p < 0,01 = ##$  (jeweils zum Kontrollmedium);  $p < 0,01 = **$  (zum frischen D3-Medium))

Analog zu den ermittelten TER-Werten zeichnete sich das Ergebnis der Permeabilitätsversuche mit Fluoreszein am Tag 15 ab (siehe Abbildung 3.11). Den niedrigsten Permeabilitätskoeffizienten ( $0,23 \pm 0,01 \mu\text{m}/\text{min}$ ) und somit die am stärksten funktionelle Barriere ließ sich unter konditioniertem St1-Medium beobachten. Der höchste Permeabilitätskoeffizient ( $3,30 \pm 0,05 \mu\text{m}/\text{min}$ ) und somit die schwächste Barriere fand sich hingegen bei konditioniertem D3-Medium. Die Abbildung 3.11 zeigt die prozentuale Steigerung bzw. Schwächung der Permeabilität durch die Medien bezogen auf eine Zellschicht, die sowohl apikal als auch basolateral mit H441-Medium gefüttert worden ist. Mit basolateralem St1-Medium kam es zu einer signifikanten Erniedrigung auf  $85,3 \pm 4,7 \%$  der Fluoreszeinpermeabilität, mit konditioniertem St1-Medium sogar auf  $61,1 \pm 1,5\%$  (jeweils signifikante Senkung zu dem ST1- und H441-Medium). Mit frischem D3-Medium zeigte sich mit einer Permeabilität von  $101,1$

± 7,4 % kein signifikanter Unterschied. Im Gegensatz dazu steigerte konditioniertes D3-Medium die Fluoreszeinpermeabilität signifikant auf 279,2 % ± 4,6%.

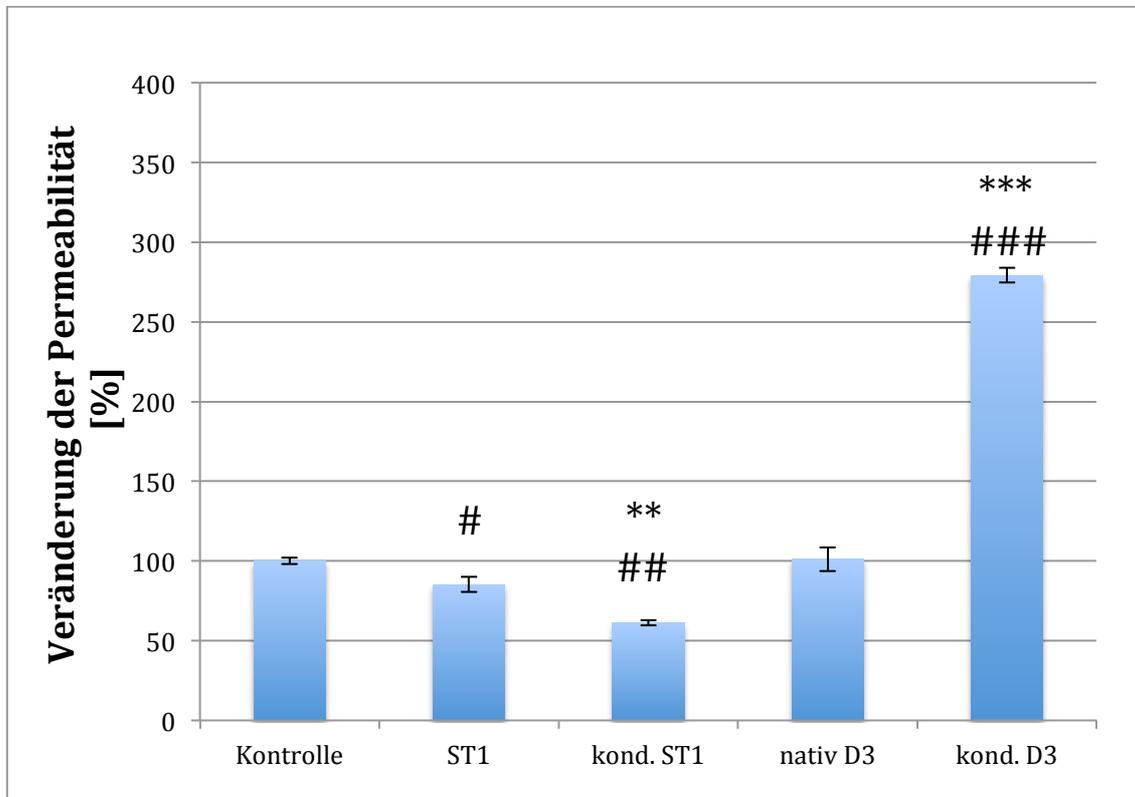


Abbildung 3.11 Beeinflussung der Fluoreszeinpermeabilität durch verschiedenen Medien. Gemessen am Tag 15 mit 100 nM Dexamethason. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei n=3. ST1 ist das Lungenendothelmedium. D3 ist das Hirnendothelmedium. Statistisch signifikante Unterschiede zu dem Kontrollmedium wurden mit # ( $p < 0,05$ ), mit ## ( $p < 0,01$ ) und mit ### ( $p < 0,001$ ) markiert. Signifikante Unterschiede zum frischen ST1 bzw. D3-Medium wurden mit \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ) markiert.

### 3.6 Einfluß der Endothelfaktoren auf die Expression von Occludensjunctionsproteinen

Um zu sehen, ob zwischen der Funktionalität der Barriere und der Expression von Occludensjunctionsproteinen ein Zusammenhang besteht, wurden die in Transwelleinsätzen gewachsenen und an Tag 15 lysierten Zellen mit Hilfe von mRNA Analytik und Western Blot untersucht. Analog zu den TER- und Fluoreszenzwerten wurde die Expression der Proteine auf die Versuchsreihe mit H441-Medium bezogen. Die folgenden Abbildungen unter 3.6 zeigen, dass

die Expression von Claudin-1,-3,-4,-5, Occludin und ZO-1 durch die verschiedenen Medien unterschiedlich beeinflusst worden sind.

### **3.6.1 Claudin-1**

Die Claudin-1 Expression wird in Abbildung 3.12 dargestellt. Die mRNA Expression unter den verschiedenen Medien zeigte nur geringe Unterschiede, die statistisch nicht signifikant waren. Auf der Proteinebene kam es jedoch unter basolateralem konditioniertem D3-Medium im Vergleich zum dem Kontrollmedium und dem frischen D3-Medium zu einer signifikant verminderten Expression. Durch das barriereschwächende konditionierte D3-Medium verringerte sich die Claudin-1 Expression im Vergleich zu H441-Medium auf  $46,75 \pm 7,95 \%$ .

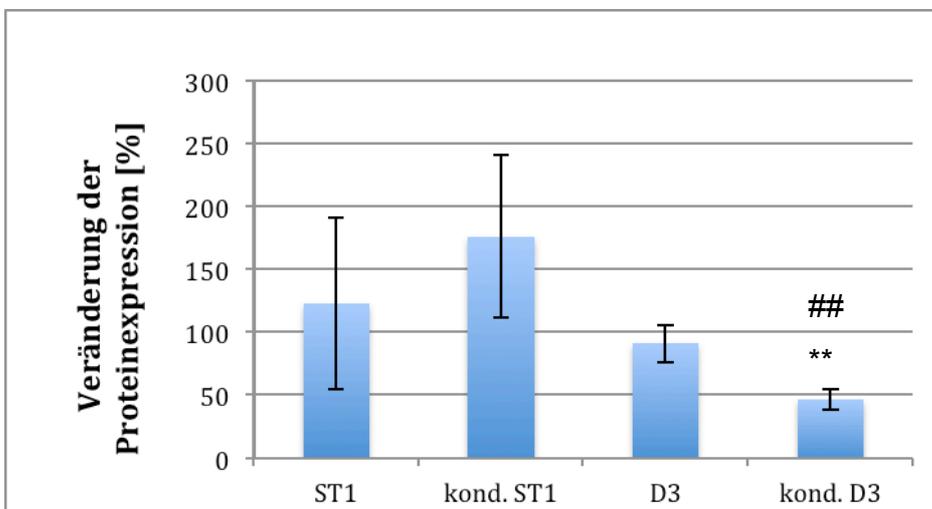
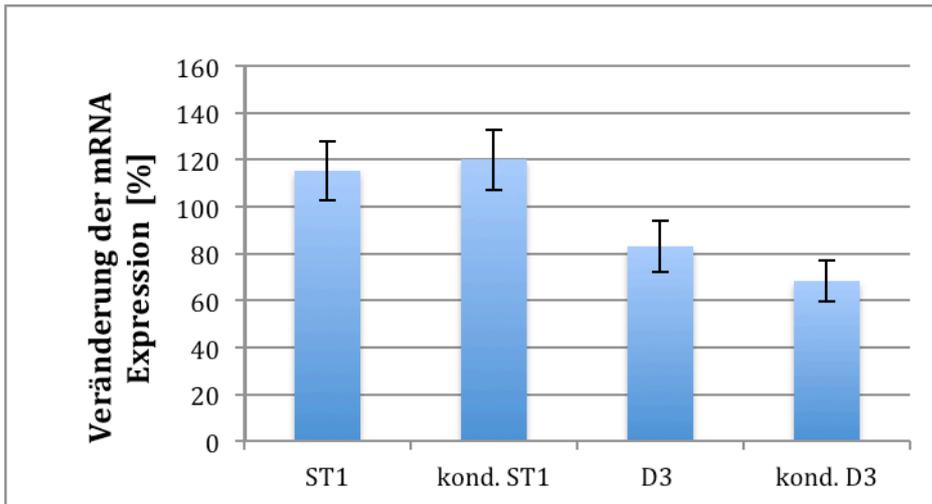
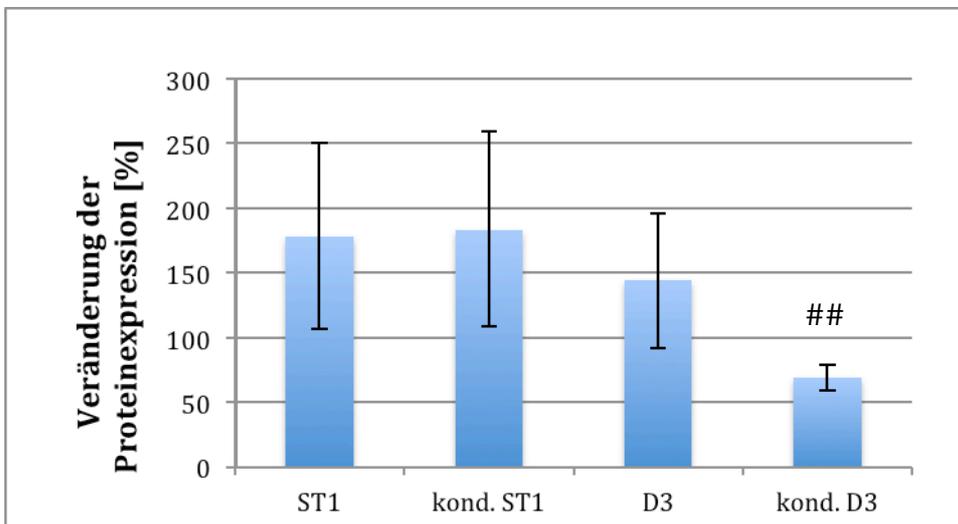
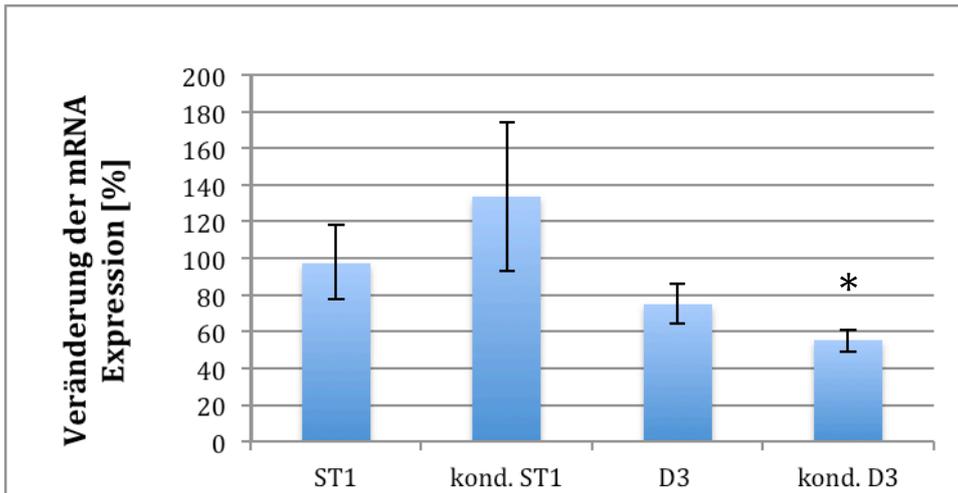


Abbildung 3.12 Claudin-1 Expression in H441-Zellen durch verschiedene Medien. Die Zellen erhielten alle 100 nM Dexamethason und wurden an Tag 15 lysiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei  $n=3$ . In dem oberen Diagramm ist die Expression auf der mRNA Ebene zu sehen. In dem unteren Diagramm ist die Expression auf der Proteinebene mit den entsprechenden Western Blots zu sehen. Claudin-1 mit einem Molekulargewicht von 22 kDa; Beta-Actin 42 kDa. Bei statistisch signifikanten Unterschieden wurden die Daten mit ## ( $p < 0,01$ , im Vergleich zu dem Kontrollmedium) und mit \*\* ( $p < 0,01$ , im Vergleich zu dem D3-Medium) markiert.

### 3.6.2 Claudin-3

Wie in Abbildung 3.13 zu erkennen ist, veränderte sich die Expression von Claudin-3 nur durch konditioniertes D3-Medium signifikant. Auf der mRNA Ebene zeigte sich durch konditioniertes D3-Medium auf die Kontrolle bezogen eine Expression von  $55,12 \pm 6,08$  %. Die Proteinexpression sank durch konditioniertes D3-Medium auf  $68,87 \pm 10,16$  %.



**Claudin-3**



**22 kDa**

**Beta-actin**



**42 kDa**

Abbildung 3.13

Claudin-3 Expression in H441-Zellen durch verschiedene Medien. Die Zellen erhielten alle 100 nM Dexamethason und wurden an Tag 15 lysiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei n=3. In dem oberen Diagramm ist die Expression auf der mRNA Ebene zu sehen. In dem unteren Diagramm ist die Expression auf der Proteinebene mit den entsprechenden Western Blots zu sehen. Claudin-3 mit einem Molekulargewicht von 22 kDa; Beta-Actin 42 kDa. Bei statistisch signifikanten Unterschieden wurden die Daten mit ## (p<0,01 im Vergleich zu dem Kontrollmedium) und mit \*(p<0,05,einseitig, im Vergleich zum frischen D3-Medium) markiert.

### 3.6.3 Claudin-4

Bei Claudin-4 zeigten sich auf der Proteinebene hinsichtlich der Expression keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 3.14). Auf der mRNA Ebene hingegen ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den konditionierten Medien und dem jeweiligen frischen Medium. Durch konditioniertes St1-Medium stieg die Expression auf  $128,41 \pm 18,85 \%$  und durch konditioniertes D3-Medium auf  $147,6 \pm 10,74 \%$ .

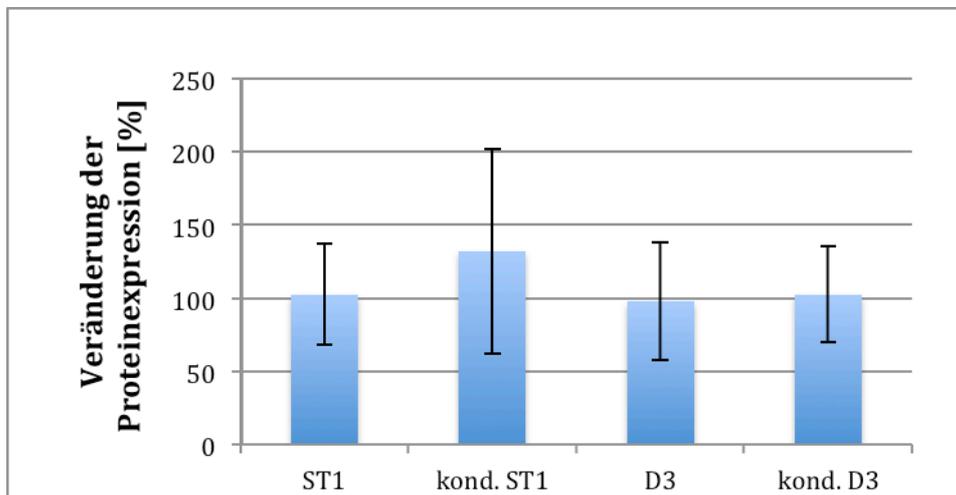
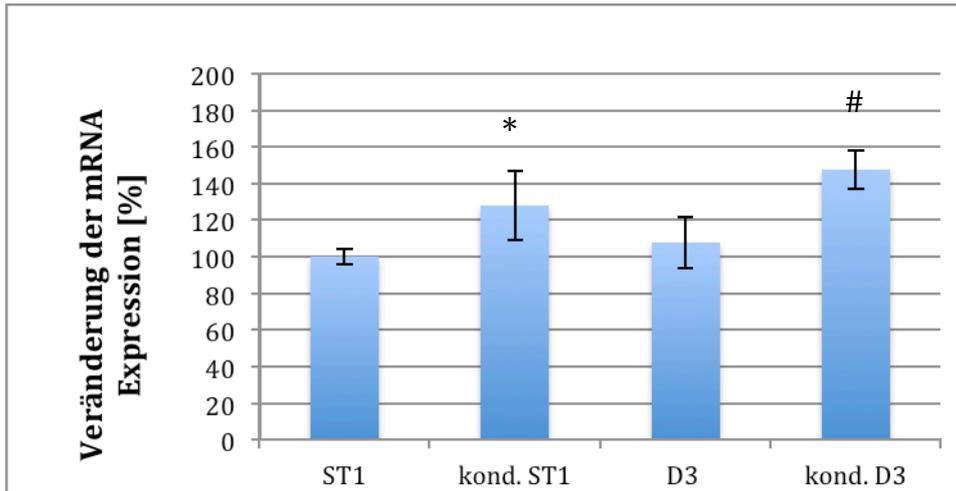


Abbildung 3.14 Claudin-4 Expression in H441-Zellen durch verschiedene Medien. Die Zellen erhielten alle 100 nM Dexamethason und wurden an Tag 15 lysiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei  $n=3$ . In dem oberen Diagramm ist die Expression auf der mRNA Ebene zu sehen. In dem unteren Diagramm ist die Expression auf der Proteinebene mit den entsprechenden Western Blots zu sehen. Claudin-4 mit einem Molekulargewicht von 22 kDa; Beta-Actin 42 kDa. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu dem jeweils unverbrauchten Medium wurden die Daten mit # ( $p < 0,05$ , zweiseitig) und mit \* ( $p < 0,05$ , einseitig) markiert.

#### 3.6.4 Claudin-5

Wie man Abbildung 3.15 entnehmen kann, unterlag die Expression des Occludensjunktionsproteins Claudin-5 starken Schwankungen. Auf der mRNA Ebene konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auf der Proteinebene kam es durch konditioniertes D3-Medium zu einer signifikanten Senkung der Expression auf  $48,8 \pm 15,7$  %. Bei dem frischen St1-Medium kam es zu einer signifikanten Steigerung der Proteinexpression auf  $192,08 \pm 69,12$  % und durch konditioniertes St1-Medium auf eine Steigerung von  $225,65 \pm 130,68$  %. Dieses Ergebnis konnte wie unter Abbildung 3.16 dargestellt mittels Immunfluoreszenz auch deutlich visualisiert werden. Es zeigte sich unter St1-Medium ein kontinuierliches Netzwerk von Claudin-5, wohingegen es unter kond. D3-Medium nur vereinzelt sichtbar wurde.

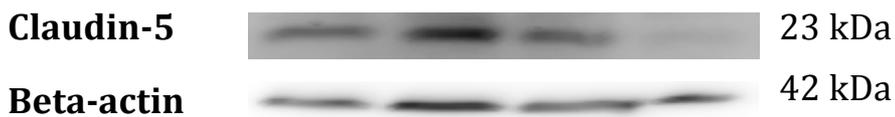
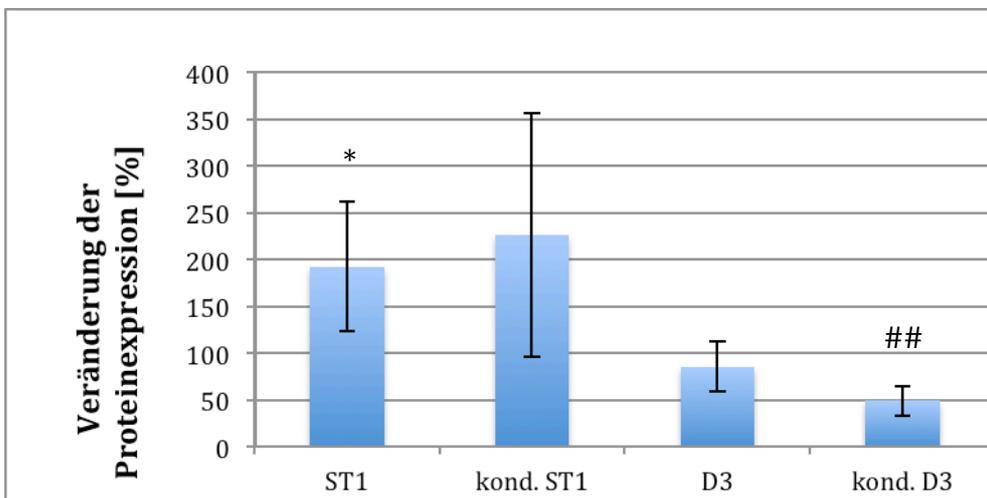
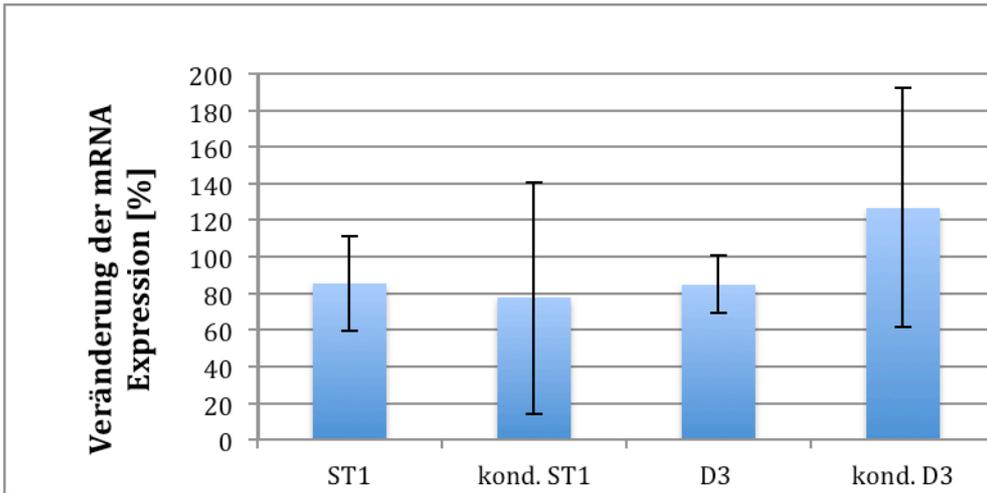


Abbildung 3.15 Claudin-5 Expression in H441-Zellen durch verschiedene Medien. Die Zellen erhielten alle 100 nM Dexamethason und wurden an Tag 15 lysiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei  $n=3$ . In dem oberen Diagramm ist die Expression auf der mRNA Ebene zu sehen. In dem unteren Diagramm ist die Expression auf der Proteinebene mit den entsprechenden Western Blots zu sehen. Claudin-5 mit einem Molekulargewicht von 23 kDa; Beta-Actin 42 kDa. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu dem Kontrollmedium wurden die Daten mit ## ( $p<0,01$ , zweiseitig) und mit \* ( $p<0,05$ , einseitig) markiert.

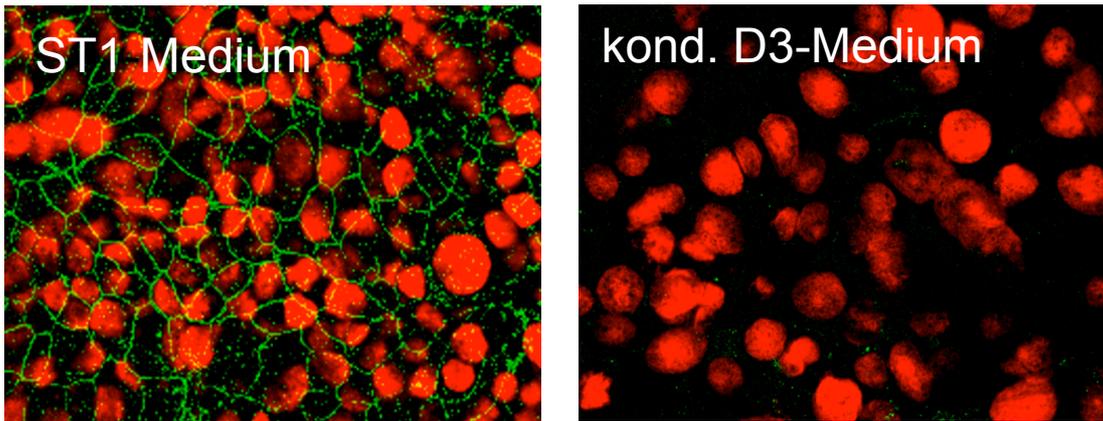


Abbildung 3.16 Claudin-5 Lokalisation in H441-Zellkulturen mit verschiedenen Medien. Immunfluoreszenz an Tag 15 mit 100 nM Dexamethason. Bei 40-facher Vergrößerung mit einem Brechungsindex von 1,3. Die Zellen sind konfluent gewachsen. Die Zellkerne sind durch Propidiumiodid rot dargestellt. Claudin-5 stellt sich grün gefärbt dar. Unter St1-Medium zeigt sich ein kontinuierliches Netzwerk (linkes Bild). Unter kond. D3-Medium sieht man Claudin-5 nur spärlich (rechtes Bild).

### 3.6.5 Occludin

Abbildung 3.17 stellt die Expression von Occludin dar. Auf der Proteinebene ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Auf der mRNA Ebene kam es durch das konditionierte D3-Medium zu einer vermehrten Expression von  $149,88 \pm 11,64$  %. Bei dem frischen St1-Medium kam es zu einer Expression von  $88,73\% \pm 7,37$  und unter dem konditionierten St1-Medium dagegen zu einer leichten Erhöhung auf  $107,85 \pm 10,33$  %.

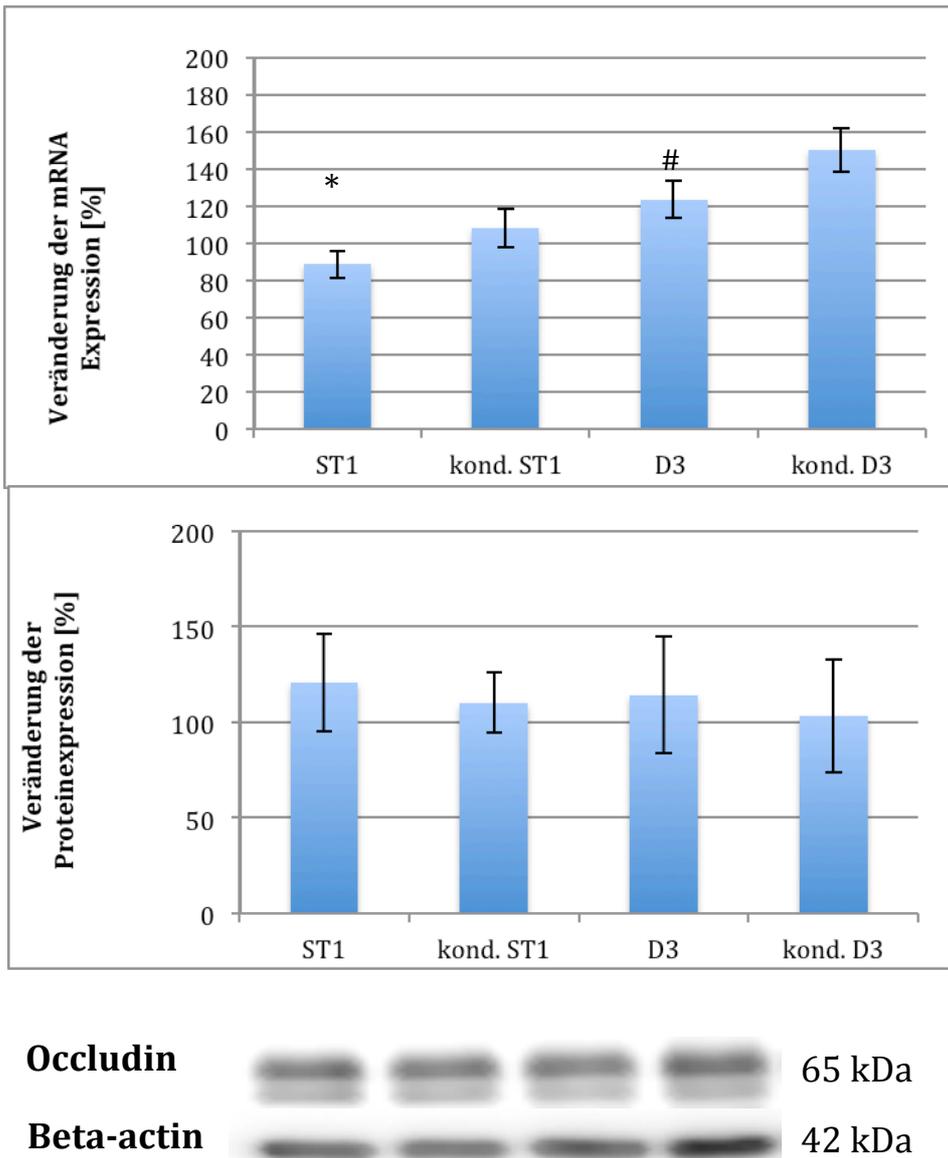


Abbildung 3.17 Occludin Expression in H441-Zellen durch verschiedene Medien. Die Zellen erhielten alle 100 nM Dexamethason und wurden an Tag 15 lysiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei n=3. In dem oberen Diagramm ist die Expression auf der mRNA Ebene zu sehen. In dem unteren Diagramm ist die Expression auf der Proteinebene mit den entsprechenden Western Blots zu sehen. Occludin mit einem Molekulargewicht von 65 kDa; Beta-Actin 42 kDa. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu dem jeweiligen unverbrauchten Medium wurden die Daten mit # ( $p < 0,05$ , zweiseitig) und mit \* ( $p < 0,05$ , einseitig) markiert.

### 3.6.6 ZO-1

Wie man Abbildung 3.18 entnehmen kann, wird die Expression des Proteins ZO-1 nur durch konditioniertes D3-Medium statistisch signifikant verändert. Die Expression auf der mRNA Ebene wird mit  $204,33 \pm 15,93$  % hochreguliert. Auf der Proteinebene zeigte sich unter frischen D3-Medium ein Expression von  $114,51\% \pm 12,98$  und unter konditioniertem D3-Medium – im Gegensatz zur mRNA Ebene – eine verminderte Expression von  $79,86 \pm 13,63$  %.

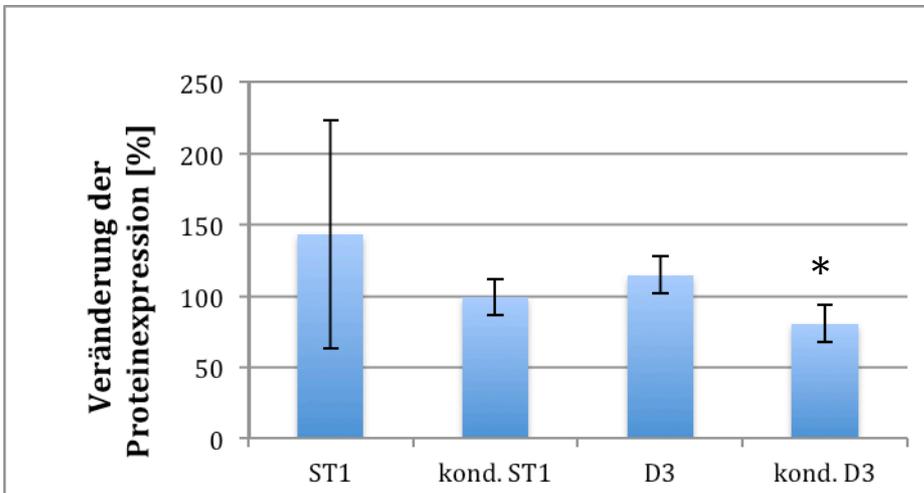
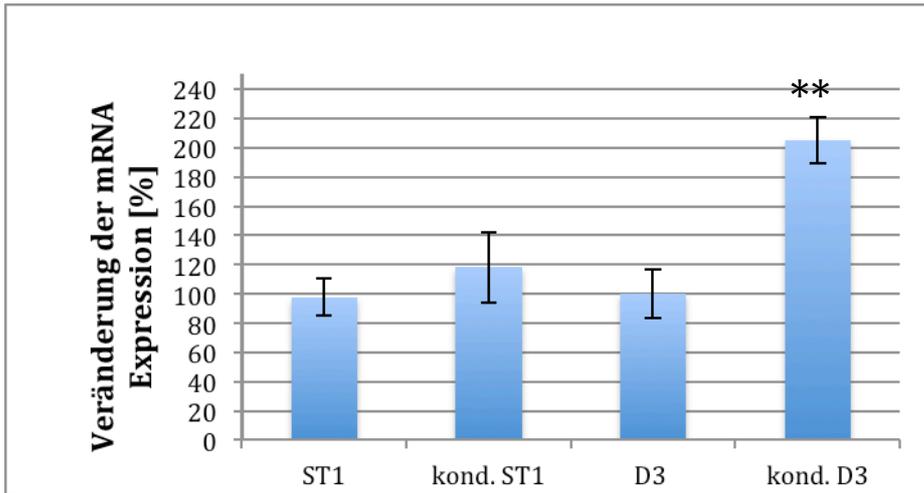


Abbildung 3.18 ZO-1 Expression in H441-Zellen durch verschiedene Medien. Die Zellen erhielten alle 100 nM Dexamethason und wurden an Tag 15 lysiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei  $n=3$ . In dem oberen Diagramm ist die Expression auf der mRNA Ebene zu sehen. In dem unteren Diagramm ist die Expression auf der Proteinebene mit den entsprechenden Western Blots zu sehen. ZO-1 mit einem Molekulargewicht von 225 kDa; Beta-Actin 42 kDa. Bei statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu dem jeweiligen unverbrauchten Medium wurden die Daten mit  $** (p < 0,01)$  und mit  $* (p < 0,05)$  markiert.

### 3.6.7 Übersicht der Regulation der Occludensjunctionsproteine

Tabelle 3.1 veranschaulicht zusammenfassend die Regulation der Occludensjunctionsproteine durch die verschiedenen Medien.

Tabelle 3.1 Zusammenfassung der Regulation der Occludensjunctionsproteine. Zahlen sind als x-fach angegeben. WB steht für Proteinanalyse mittels Western blotting

	St1-Medium		Kond. St1-Medium		D3-Medium		Kond. D3-Medium	
	mRNA	WB	mRNA	WB	mRNA	WB	mRNA	WB
Claudin 1	=	=	=	=	=	=	=	↓0,46
Claudin 3	=	=	=	=	=	=	↓0,55	↓0,68
Claudin 4	=	=	↑1,28	=	=	=	↑1,48	=
Claudin 5	=	↑1,92	=	↑2,25	=	=	=	↓0,49
Occludin	=	=	↑1,08	=	=	=	↑1,50	=
ZO-1	=	=	=	=	=	=	↑2,04	↓0,80

### 3.7 Simulation einer Hypoxie und einer Hyperoxie

Um zu testen, wie empfindlich die Barriere des Lungenkulturmodells auf Stress reagiert, wurden die mit Dexamethason behandelten Zellen an Tag 15 unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. Die Abbildung 3.19 zeigt die Entwicklung der TER Werte bezogen auf die Normoxie (37°C mit 5 % CO<sub>2</sub>). Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied gegenüber einer vierstündigen Hypoxie (37°C mit 1 % O<sub>2</sub>) und gegenüber einer vierstündigen Hyperoxie (Behandlung der Zellen mit 1 bzw. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der apikalen Kammer). Nach einem weiteren Wechsel des Mediums (ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) apikal und anschließender Normoxie für 4 Stunden erfolgte eine weitere TER-Messung.

Lediglich die Zellen, die mit 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apikal behandelt worden waren, senkten ihren TER-Wert signifikant auf 40,64 ± 3,96 %. Des Weiteren konnte man lichtmikroskopisch bei diesen Zellen kleine Löcher in der Zellschicht erkennen. Bei den anderen beiden behandelten Zelllinien zeigten sich keine

relevanten Änderungen der TER-Werte und keine Auffälligkeiten in der Lichtmikroskopie.

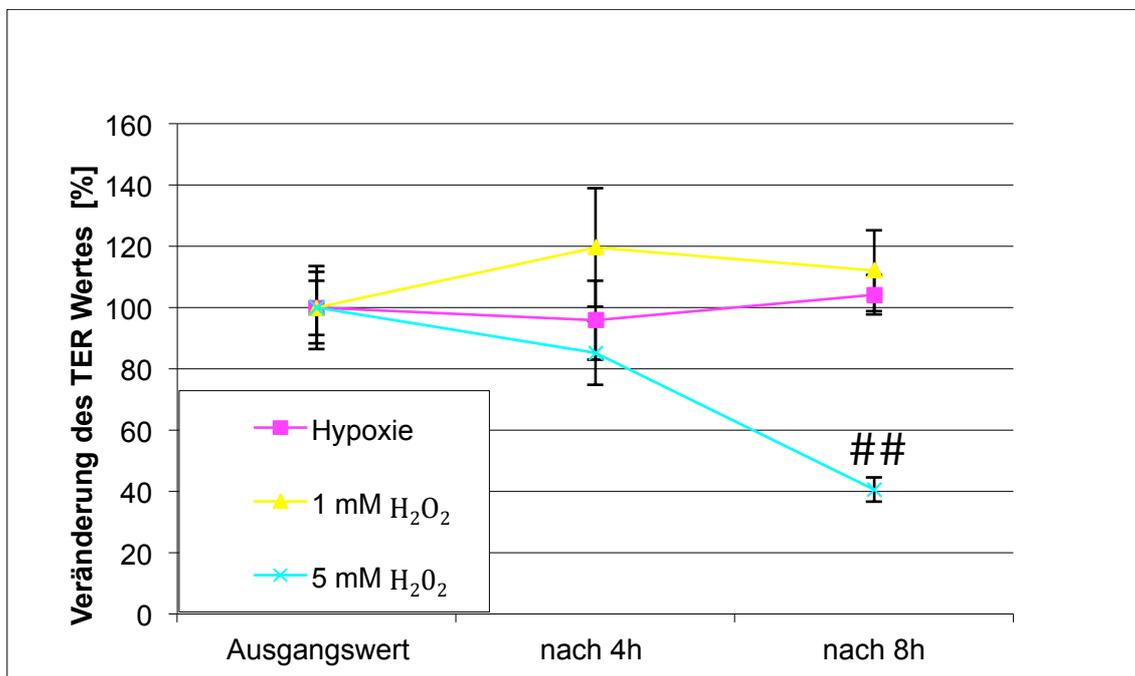


Abbildung 3.19 TER-Entwicklung unter Hypoxie/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bezogen auf die Normoxie unter konditioniertem St-1 Medium. Tag 15 nach der Zellaussaat mit konditioniertem St1-Medium und 100nM Dexamethason. Messung der TER-Werte direkt nach dem Mediumwechsel, nach 4 Stunden Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. unter Hypoxie und nach weiteren 4 Stunden ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Normoxie. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei n= 3. Bei statistisch signifikanten Unterschieden wurden die Daten mit ##(p < 0,01) markiert.

Nach der letzten erfolgten TER-Messung wurde im Anschluss die Fluoreszeinpermeabilität der Zellschichten erfasst. Die Ergebnisse der Fluoreszeinmessungen bestätigten wiederum die Ergebnisse der letzten TER-Messung bezüglich der Funktionalität der Barriere. Zwischen der Kontrolle und der vier Stunden andauernden Hypoxie bzw. dem 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Bei einer Behandlung mit 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> steigerte sich die Permeabilität der Barriere signifikant auf 215,04 ± 15,38 %.

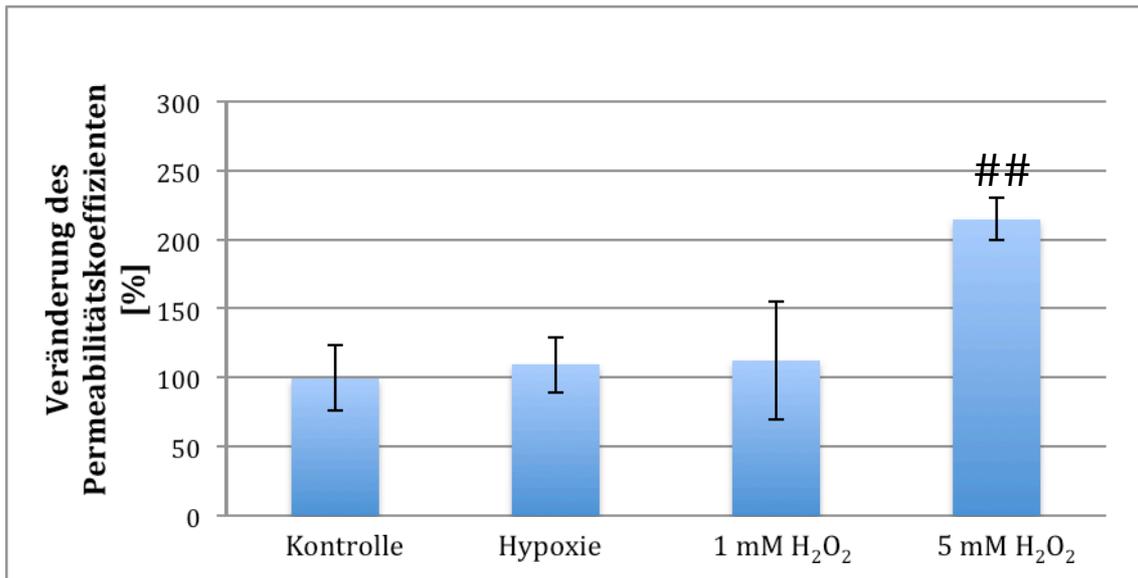


Abbildung 3.20 Fluoreszeinpermeabilität nach Hypoxie/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Wirkung bezogen auf die Normoxie unter konditioniertem St1-Medium. Tag 15 nach der Zellaussaat mit konditioniertem St1-Medium und 100nM Dexamethason. Messung nach 4 Stunden Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. unter Hypoxie und nach weiteren 4 Stunden ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Normoxie. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung bei n= 3. Bei statistisch signifikanten Unterschieden wurden die Daten mit ##(p < 0,01) markiert.

## 4 Diskussion

### 4.1 Optimierung der Zellkulturbedingungen

Bisher konnte kein Alveolarmodell mit beiden Zelltypen und stark ausgeprägter Barriere etabliert werden. Folglich war das Ziel der Untersuchung, eine barrierebildende, konfluent gewachsene Zellschicht auf den Transwelleinsätzen zu züchten. Zunächst wuchsen die Zellen jedoch nicht in der leicht höher gelegenen Peripherie der Einsätze. Dies geschah vermutlich aufgrund der Konkavität der Einsätze. Ohne eine Zellschicht in der Peripherie der Einsätze wären die gemessenen TER-Werte und Fluoreszeinpermeabilitäten nicht repräsentativ für die Zell-Zell-Verbindungen gewesen. Dieses Problem konnte mit der Beschichtung durch Kollagen I gelöst werden. Dieses Strukturprotein wurde schon in anderen Publikationen zur Beschichtung bzw. Kultivierung genutzt (Hermanns et al., 2004). Wie in Abbildung 3.1 (S. 33) gezeigt, ließen sich in den gut gewachsenen Zellkulturen Domes beobachten. Diese *Domes* wurden schon konkordant zu dieser Beobachtung mit gut differenzierten H441 Kulturen assoziiert (Shlyonsky et al., 2005). Dexamethason, ein Glukortikoid, war zusätzlich notwendig, um die Zellen langfristig auf den Einsätzen wachsen und ihre Barriere steigern zu lassen. Das physiologisch vorkommende Glukokortikoid Cortisol ist mit einer Konzentration von 165-690 nM ein lebenswichtiges Steroidhormon mit einer zirkadianen Rhythmik im menschlichen Körper. Dexamethason ist ein künstliches Glukokortikoid mit einer 25-fach stärkeren Wirkung und wird als Medikament für verschiedene Indikationen wie z.B. der fetalen Lungenreifung (Ward, 1994) eingesetzt. Dexamethason hat keine mineralkortikoide Wirkung und hat mit einer biologischen Halbwertszeit von 48 Stunden eine deutlich längere Halbwertszeit als Cortisol (8-12 h) (Freissmuth et al., 2012). Die höhere Halbwertszeit war ideal für unsere Zellkulturbedingungen, da das Medium auch alle 48-72 Stunden gewechselt worden ist. Dexamethason ist langwirkender durch die Substitution einer Fluorgruppe. Bezüglich der Lunge interessant scheint die

neue Entdeckung, dass die Behandlung mit Dexamethason dem Lungenödem in der Höhe entgegen wirkt (Siebenmann et al., 2011).

## **4.2 Einfluß der Dexamethasonkonzentration auf die Funktionalität der Epithelbarriere des H441-Modells**

Die vorliegenden Ergebnisse unseres Modells führen erstmalig zu der Erkenntnis, dass die Funktionalität der Barriere von H441-Zellen sehr stark von Dexamethason und dessen Konzentration abhängig ist. In bisherigen Experimenten wurden die Lungenzellkulturen mit scheinbar beliebig gewählten Konzentrationen von Dexamethason behandelt (Ladenburger et al., 2010, Ramin et al., 2004).

Die Zellen erhielten in Versuchen Konzentrationen von 50 nM (Shlyonsky et al., 2005) oder bis zu 1  $\mu$ M Dexamethason (Hermanns et al., 2010). Zellen, die gänzlich ohne Dexamethason auf den Transwelleinsätzen wuchsen, verloren ihre Konfluenz nach spätestens 10 Tagen und zeigten dementsprechend keine signifikant hohen Widerstände. Abbildung 3.5 (S. 38) zeigt die schnell einsetzende Wirkung des Dexamethason innerhalb von 2 Tagen auf die Barriere der Zellen. Auch hier ist schon ein signifikanter Unterschied in der Barrieredichtigkeit durch die Dexamethasonkonzentration zu sehen. Das Maximum ihrer Funktionalität erreichte die Barriere an Tag 15, so dass die Zellen an diesem Tag auch für Proteinuntersuchungen lysiert wurden. Andere Gruppen erreichten die höchsten Barrierewerte an Tag 11 (Hermanns et al., 2004). Diese haben jedoch 24-Transwelleinsätzen mit einer kleineren Fläche (0,3  $\text{cm}^2$  im Vergleich zu 0,9 und 4,2  $\text{cm}^2$ ) benutzt. Ausserdem fügten sie Dexamethason schon ab Tag 3 zu den Zellkulturen hinzu. Wie oben dargestellt, entspräche ein Zellmodell ohne ein essentielles Glukokortikoid nicht dem physiologischen Zustand des menschlichen Körpers. Des Weiteren ist die Konzentration bzw. der Spiegel von Glukokortikoiden essentiell für das physiologische Gleichgewicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bestätigt, dass es eines Glukokortikoids bedarf, um eine parazelluläre Barriere in H441 Kulturen aufzubauen. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde erstmalig

genauer gezeigt, welche Konzentration (100 nM) optimal für die Funktionalität einer Barriere in einem Modell ist (Neuhaus et al., 2012).

### **4.3 Das Lungenkulturmodell enthält Alveolarepithellenzellen Typ 1 und Typ 2**

Um ein reales Lungenkulturmodell zu etablieren, ist es wichtig, dass in dem *in vitro-Modell* Epithelzellen von den beiden vorherrschenden Zelltypen der distalen Lungenalveolen koexistieren. Oberflächenmikroskopisch konnte man die unterschiedlichen Zelltypen jedoch nicht erkennen (siehe Abbildung 3.2 S. 34). Zur Überprüfung der vorhandenen Zellen wurden deswegen die in der Einleitung näher beschriebenen spezifischen Zellmarker Caveolin-1 für Typ-I- und SP-B für Typ-II-Zellen verwendet. Sie konnten in unserem Zellmodell mittels qPCR und Immunfloreszenz nachgewiesen werden. Bei der mRNA Quantifizierung mittels qPCR wurde die Expression immer auf Tag 7 ohne Dexamethason bezogen, weil es nicht möglich war, Zellen zu gewinnen, die bis Tag 15 auf den Einsätzen ohne Dexamethason konfluent gewachsen wären.

Auf der mRNA Ebene zeigte sich dabei, dass die SP-B Expression von H441-Zellen als Typ-II-Zellmarker sehr viel stärker als die Caveolin Expression von Dexamethason beeinflusst worden ist. Dass die SP-B Expression von H441-Zellen signifikant durch Dexamethason gesteigert wird, wurde schon übereinstimmend dazu vormalig veröffentlicht (Ladenburger et al., 2010). Gleichzeitig spielt die Konzentration von Dexamethason für das Maß der Regulation eine entscheidende Rolle. Mit 100 nM Dexamethason kam es zu einer deutlicheren Steigerung der SP-B Expression als mit 10 nM Dexamethason. Den Ergebnissen aus Abbildung 3.6 (S. 39) schlussfolgernd, vermindert eine geringe Dosis von Dexamethason (10 nM) die Expression der Zellmarkers Caveolin an Tag 15 im Vergleich zu Tag 7 ohne und zu Tag 15 mit 100 nM Dexamethason signifikant. Leider bleibt die Frage offen, ob in dem Modell weniger Typ-I-Zellen vorliegen oder diese einfach nur weniger Caveolin-1 produzieren. Als wünschenswert wurde eine gleichzeitige Steigerung der Caveolin-1 Synthese im Sinne einer vermehrten Transdifferenzierung von Epithellzellen Typ-II zu Typ-I beschrieben (Fuchs et al., 2003). Allerdings

kommen in der natürlichen Alveole, wie in der Einleitung beschrieben, deutlich weniger Zellen vom Typ-I als Typ-II vor. Es gibt sogar Hinweise, dass es auch *in vivo* einen intermediären Zelltyp gibt, der die Charakteristika beider Zelltypen besitzt (Clegg et al., 2005). Bei einer Konzentration von 100 nM Dexamethason wurde in unseren Versuchen die Caveolin-1 Synthese im Vergleich zu Tag 7 nicht vermindert. Um sicher zu gehen, nicht weniger Typ-I-Zellen in dem *in vitro-Modell* zu kultivieren, wurde deswegen bei den Experimenten zu der Gewebsspezifität der Endothelzellen eine Konzentration von 100 nM Dexamethason verwendet. Wichtig war insbesondere, dass – den Verhältnissen *in vivo* entsprechend – beide Zellmarker bzw. Zelltypen in dem Modell vorhanden sind. Mittels Immunfluoreszenz konnte bestätigt werden, dass in dem Modell H441-Zellen kultiviert worden sind, die jeweils entweder mehr SP-B oder Caveolin exprimieren und wie man an Abbildung 3.8 (S. 41) erkennen kann, diese direkt nebeneinander liegen. Schlussfolgernd wurde das Ziel erreicht, analog zur menschlichen Lungenalveole in diesem H441 Modell jeweils Typ-I- und Typ-II-ähnliche Zellen zu kultivieren.

#### **4.4 Einfluss der Endothelfaktoren auf die Epithelbarriere des H441-Modells**

Der Aspekt der funktionellen Einheit von Endothel- und Epithelzellen in der Lungenalveole wurde schon mit Hilfe von Ko-Kulturen *in vitro* untersucht. In diesem Fall wurden die Epithelzellen auf der einen und die Endothelzellen auf der anderen Seite der Membran eines Transwelleinsatzes parallel gezüchtet. Als Epithelzellen dienten dabei die H441-Zellen sowie primäre Typ-II-Zellen. Als Endothelzellen wurden die HPMEC-ST1.R- und die ISO-HAS-1-Zelllinien genutzt. Es zeigten sich im Vergleich zu den Monokulturen signifikant dichtere Zellverbindungen zwischen den Epithelzellen. (Hermanns et al., 2004, Hermanns et al., 2009, Hermanns et al., 2010). Wie mittels TER- und zusätzlich Fluoreszeinpermeabilitätsmessungen gezeigt werden konnte, wird die Barriere durch das alleinige Hinzufügen von konditioniertem Lungenendothelmedium der HPMEC-ST1.R Zelllinie signifikant gesteigert. Folglich bedarf es keiner direkten Stimulation durch die benachbart wachsenden Endothelzellen. Die

Hirndothelzellenfaktoren der D3-Zellen schienen dagegen einen schwächenden Effekt auf die Barriere zu haben. Dies legt nahe, dass es jeweils gewebsspezifische Zellfaktoren der jeweiligen Endothelzellen gibt (Neuhaus et al., 2012). Die Interaktion von Epithel und Endothel ist somit als gewebsspezifisch anzusehen. Welche Faktoren es dabei genau sind, bleibt noch zu klären und könnte mögliche neue Therapiestrategien bei Lungenschädigungen ermöglichen.

#### **4.5 Einfluss der Endothelfaktoren auf die Occludensjunktionsproteine und Barrierefunktion des H441-Modells**

Wie in der Einleitung ausgeführt, wurde das Lungenkulturmodell auch auf wesentliche Occludensjunktionsproteine hin untersucht. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde zuerst nachgewiesen, dass die in der Literatur beschriebenen Occludensjunktionsproteine in den Zellen exprimiert wurden. Um zu sehen, ob der gewebsspezifische Effekt auf funktioneller Ebene sich auch auf der molekularen Ebene widerspiegelt, und eine dichte Barriere mit einer hohen Expression von Occludensjunktionsproteinen korrelierte, wurde deren Regulation unter den jeweiligen Medien mittels qPCR und Western Blot quantifiziert. Tabelle 4.1 zeigt nochmals zusammenfassend wie sich die Regulation auf mRNA und Proteinebene und die Funktionalitätsparameter am Tag 15 im Verhältnis zum natürlichen H441-Medium verändert hat.

Tabelle 4.1 Zusammenfassung Regulation der Occludensjunctionsproteine und des TER- beziehungsweise Fluoreszeinpermeabilitätswertes. Zahlen sind als x-fach angegeben. WB steht für Proteinanalyse mittels Western blotting.

	St1-Medium		Kond. St1-Medium		D3-Medium		Kond. D3-Medium	
	mRNA	WB	mRNA	WB	mRNA	WB	mRNA	WB
Claudin 1	=	=	=	=	=	=	=	↓0,46
Claudin 3	=	=	=	=	=	=	↓0,55	↓0,68
Claudin 4	=	=	↑1,28	=	=	=	↑1,48	=
Claudin 5	=	↑1,92	=	↑2,25	=	=	=	↓0,49
Occludin	=	=	↑1,08	=	=	=	↑1,50	=
ZO-1	=	=	=	=	=	=	↑2,04	↓0,80
TER	↑1,14		↑1,27		↓0,82		↓0,44	
Fluoreszein-permeabilität	↓0,85		↓0,61		=		↑2,79	

Die Tabelle 4.1 zeigt, dass hohe funktionelle Barrierewerte nicht komplett mit einer hohen Expression von Occludensjunctionen gleichzusetzen sind, sondern dass dem eine komplexe Regulierung zu unterstehen scheint und dabei Unterschiede zwischen den Proteinen existieren. Bei Claudin-1 zeigte sich nur unter konditioniertem D3-Medium und dort auf posttranslationaler Ebene eine Änderung. Unter der funktionell schwächsten Barriere kam es zu einer deutlich verminderten Claudin-1 Expression. Dieses Ergebnis steht im Einklang zur titulierten gestärkten Barriere unter erhöhtem Claudin-1 (Coyne et al., 2003). Claudin-3 wurde nur unter kond. D3-Medium, das eine sehr schwache Barriere zeigte, signifikant gesenkt. Bei anderen Versuchen mit Rattenalveolarepithelzellen Typ-II zeigte sich eine gestärkte Barriere unter einer niedrigeren Claudin-3 Expression (Mitchell et al., 2011). Eine gesteigerte Claudin-4 Expression – die neben Typ-II auch in Typ-I-Zellen der Ratte vorkommt - wird dagegen mit einer stärkeren parazellulären Barriere assoziiert (Mitchell et al., 2011). Übereinstimmend hierzu steigerte sich die Claudin-4 Expression auf mRNA Ebene in unserem Modell analog zu dem höchsten TER-

beziehungsweise dem niedrigsten Fluoreszenzwert der Zellkultur unter kond. ST1-Medium. Noch weiter wurde die Claudin-4 Expression auf mRNA Ebene durch das kond. D3-Medium, das die schwächste Barriere zeigte, gesteigert. Dies ist vermutlich –wie vorbeschrieben- als Gegenregulation bei einer akuten Lungenschädigung zu sehen (Wray et al., 2009). So ließe sich die verminderte Claudin-3 Expression unter konditioniertem D3-Medium gleichfalls als protektive Reaktion bei einer zu schwachen Barriere bzw. Lungenschädigung erklären. Ebenso könnte es eine direkte Herunterregulation durch die Endothellzellfaktoren sein. In der Literatur findet man zu der Expression von Claudin-5 in den Alveolarepithelzellen unterschiedliche Angaben. Beispielsweise wurde Claudin-5 als ein Occludensjunction referiert, das exklusiv in den anliegenden Endothelzellen eine wichtige Rolle spielt (Morita et al., 1999). Bei Rattenlungen konnte dagegen ein hohes Maß an Claudin-5 in den Lungenepithelzellen gefunden werden. (Wang et al., 2003). Wie man unter Abbildung 3.9 (S.42) sieht, wurde Claudin-5 nur partiell in den Epithelzellen nachgewiesen. Die mRNA Expression von Claudin-5 war in H441-Zellen unter den Occludensjunctionsproteinen am geringsten (Neuhaus et al., 2012). Bei den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit kam es interessanterweise unter den verschiedenen Medien lediglich auf Proteinebene zu signifikanten Änderungen. Diese Änderungen wurden schon beschrieben (Fernandez et al., 2007) und legen den Schluss nahe, dass Claudin-5 posttranslational reguliert wird. Die Regulierung von Claudin-5 auf Proteinebene korrelierte dabei sehr eng mit der Funktionalität der Barriere. Die mit ST1 Medien behandelten Epithelzellen zeigten erhöhte TER-Werte bzw. einen erniedrigten Permeabilitätskoeffizienten für den parazellulären Marker Fluoreszein und eine hohe Expression von Claudin-5. Umgekehrt zeigte die Lungenzellkultur unter dem barriereschwächenden konditionierten D3-Medium eine niedrige Claudin-5 Expression. Diese Expression zeigte sich sehr eindrücklich auf den jeweiligen Immunfluoreszenzbildern (Abbildung 3.16 auf S.54). Die von Wang (2003) diskutierte Assoziation zwischen einer hohen Claudin-5 Expression und einer dichten Barriere konnte bestätigt werden. Eine relativ kleine Hochregulierung des schwach vorhandenen Claudin-5 scheint somit signifikant die Barriere zu

erhöhen. Interessanterweise kam es bei Occludin unter den konditionierten Endothelmedien zu einer isolierten Steigerung der mRNA Expression. Eine Steigerung der Occludin-Synthese in H441-Zellen wurde bisher mit einer dichten Barriere assoziiert (Shlyonsky et al., 2005). Die Steigerung der Occludin-Synthese auf mRNA Ebene unter konditionierten Medien könnte somit als vergeblicher Versuch angesehen werden, die Barriere aufrecht zu erhalten. ZO-1 wurde in H441 Kulturen ohne Dexamethason als diskontinuierlich vorkommend beschrieben (Hermanns et al., 2004). Es konnte ein sichtbares kontinuierliches Netzwerk von ZO-1 in den kultivierten Zellen beobachtet werden (s. Abbildung 3.9 auf S.42). Isoliert unter konditioniertem D3-Medium wurde die ZO-1 Expression verändert. Dass ZO-1 hierbei auf mRNA Ebene stark gesteigert, jedoch auf Proteinebene vermindert, vorhanden war, könnte für eine direkte Schädigung der Proteinorganisation in der Zelle durch die Hirnendothelfaktoren sprechen.

#### **4.6 Simulation einer Lungenschädigung**

Mit der Hinzugabe von  $H_2O_2$  bzw. einer hypoxämischen Umgebung simuliert man einen Teilaspekt der akuten Schädigung der Lunge bei dem sehr komplexen pathophysiologischen Vorgang des *ARDS* (Perl et al., 2011, Umberto Meduri et al., 2011). Bei den vorliegenden Ergebnissen zur Lungenschädigung zeigte sich, dass die Barriere der H441-Zellen eine vierstündige Hypoxie ohne wesentliche Veränderungen tolerierte. Sowohl unter konditioniertem als auch unter normalem H441-Medium kam es während der Hypoxie und der anschließenden Normoxie zu keiner Dysfunktionalität der Barriere. Dies spricht für die stark gefestigte und robuste Barriere an Tag 15. In vergleichbaren Untersuchungen zeigten sich Zellschäden erst nach einer 24-stündigen Hypoxie und anschließender Reoxygenierung (Li et al., 2002).

Bei der Behandlung der Zellen mit 1 mM  $H_2O_2$  war ebenfalls keine signifikante Schädigung der Barriere zu beobachten. Mit 5 mM  $H_2O_2$  wurde die Barriere unter beiden Medien signifikant geschädigt. Unter konditioniertem ST-1 Medium kam es zu einer Senkung auf  $40,64 \pm 3,96$  % des TER-Wertes, wohingegen die TER-Werte unter H441-Medium nur auf  $58,52 \pm 7,83$  % gesenkt wurden.

Somit scheint konditioniertes St1-Medium keine protektive Wirkung auf die Barriere zu haben. Analog dazu wurde die Fluoreszeinpermeabilität unter kond. ST-1 Medium und 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stark gesteigert. Interessanterweise scheinen die Lungenendothelfaktoren somit die Barriere zu stärken, sie aber nicht vor Noxen zu schützen. Eine andere plausible Interpretation ist, dass unter kond. St1-Medium vermehrt Typ 1 ähnliche Zellen und deren Verbindungen wachsen würden und diese – wie vorbeschrieben – susceptibler für Schädigungen als Typ 2 Zellen sind (Simon et al., 1991).

#### **4.7 Umsetzung der Ziele**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es gelungen ist, ein humanes Zellkulturmodell zu entwickeln, das die wichtigsten Charakteristika der alveolaren Epithelzellen besitzt. Die humane Zellreihe H441 wurde hierzu schon als geeignet tituiert (Hermanns et al., 2004). Um die Barriere maximal zu fördern, war es nötig die Zellen für 15 Tage kultivieren zu lassen. Die niedrig dosierte Konzentration des Glukokortikoids Dexamethason (100 nM) spielte dabei eine entscheidende Rolle in der Steigerung des TER-Wertes bzw. Senkung der Permeabilität. Lungenendothelzellen zeigten auf die Barriere einen positiven bzw. fördernden Effekt, der erstmalig im Rahmen dieser Arbeit als gewebsspezifisch herausgestellt worden ist (Neuhaus et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die Funktionalität der Barriere eng mit der Regulation von Occludensjunktionsproteinen assoziiert ist. Das *in vitro-Modell* und deren Barriere wurde – analog zur *in vivo* Pathogenese des *ARDS* – durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geschädigt. Dieses Modell kann somit genutzt werden, um die Regulation der Barriere, die unter anderem bei der *ARDS* extrem wichtig ist, zu erforschen und mögliche neue Therapeutika zur Stabilisierung bzw. Regeneration zu entdecken.

## 5 Zusammenfassung

Rund 300 Millionen Alveolen sorgen in der menschlichen Lunge für den Gasaustausch. Eine essentielle Rolle spielen dabei die Alveolarepithelzellen, die die erste Barriere der Luft gegenüber dem Blut bilden. Man unterteilt diese in die kubisch förmigen Typ-II-Epithelzellen, die den wichtigen stabilisierenden *Surfactant* bilden und in die flacheren Typ-I-Zellen, die aufgrund von engen Zell-Zell Kontakten miteinander eine funktionelle Barriere zwischen Luft und Blut (Blut-Luft-Schranke) ermöglichen. In der Pathophysiologie von verschiedenen Lungenerkrankungen, wie z.B. dem *ARDS*, spielt die Störung dieser Barriere eine essentielle Rolle.

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, ein *in vitro-Modell* dieser Barriere, basierend auf der humanen Epithellzelllinie NCI H441, zu etablieren. Die Epithelzellen wurden hierzu erfolgreich und konfluent auf Kollagen I beschichteten Transwelleinsätzen gezüchtet. Die apikale Kammer repräsentiert die „Luftseite“ der Barriere.

Um die Barriereeigenschaften zu überprüfen, wurden mit TER Messungen und Fluoreszenzpermeabilitätsmessungen zwei verschiedene Verfahren eingesetzt. Für die Bewahrung der Konfluenz wurden die Zellen mit Dexamethason – einem potenten Glukokortikoid – behandelt. Dexamethason wurde idealerweise bei jedem Medienwechsel ab Tag 5 apikal hinzugefügt und zeigte einen barrierefördernden Effekt. Die optimale hinzugefügte Dexamethasonkonzentration erwies sich als 100 nM. Hierunter bildete die Zellschicht – sowohl mittels TER-Messung als auch mittels Fluoreszenzpermeabilitätsmessung überprüft – eine starke Barriere aus, die am Tag 14-15 nach Zellaussaat ihr Maximum erreichte.

Auf mRNA Ebene konnten zu diesem Zeitpunkt unter 100 nM Dexamethason jeweils relevante Mengen zellspezifischer Proteine von Alveolarepithelzellen Typ-I und II nachgewiesen werden. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte zusätzlich visualisiert werden, dass die zwei Zelltypen koexistieren.

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte sich weiterhin ein ausgeprägtes Netz an Occludensjunktionsproteinen (Claudin -1,-3,-4, Occludin, ZO-1). In

weiteren Versuchen wurde der Einfluß von Endothelzellfaktoren auf das epitheliale Lungenkulturmodell untersucht. Es zeigte sich ein stark ausgeprägter gewebsspezifischer Effekt: Die Faktoren der Lungenendothelzellen stärkten die Barriere des Modells, hingegen die Hirnendothelzellfaktoren sie stark schwächten. Dieser Effekt zeigte sich sowohl durch die gemessenen TER-Werte als auch durch die gemessenen Fluoreszeinpermeabilitätswerte.

Der gewebsspezifische Effekt der Endothelzellfaktoren spiegelte sich zum Teil auch in der durch sie unterschiedlich beeinflussten Expression von Occludensjunktionsproteinen der Epithelzellkulturen wider.

Erste Belastungsversuche des Modells durch Hypoxie und reaktive Sauerstoffspezies zeigten eine gewisse Widerstandsfähigkeit der Barriere gegenüber Noxen.

Das vorliegende Zellkulturmodell des Lungenalveolarepithels, basierend auf der NCI H441 Zelllinie, kann folglich genutzt werden, um die Regulation der Barriere genauer zu erforschen und mögliche neue Therapiestrategien zu entwickeln.

## Abkürzungsverzeichnis

µg	mikrogramm
µl	mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol/Liter
18 SrRNA	18 S ribosomale Ribonukleinsäure
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
BCA	Bichinonsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cm <sup>2</sup>	quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	<i>Cycle Treshold</i>
Dest.	destilliert
DEX	Dexamethason
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EBM-2	<i>Endothelial Basal Medium</i>
ECGS	<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EGM-2	<i>Endothelial Growth Medium</i>
FBS	<i>Fetal bovine Serum</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
g	Gravitationsbeschleunigung
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	<i>Wasser</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

hbFGF	human basic fibroblast growth factor
Hcl	Chlorwasserstoff
HCMEC	<i>Human cerebral microvascular endothelial cells</i>
hEGF	Human epidermal Growth Factor
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HPMEC	<i>human pulmonary microvascular endothelial cells</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)</i>
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
kDa	Kilodalton
kond.	Konditioniert
LSM	<i>Laser Scanning Mikroskop</i>
MDB	<i>Membrane Desalting Buffer</i>
MeOH	Methanol
mA	milliAmpere
mg	milligram
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimol/Liter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Na	Natrium
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NaOH	Natriumlauge
nm	Nanometer
NP 40	Nonoxinol
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	<i>Phospate Buffered Saline</i>
PBS w/o Mg <sup>2+</sup>	PBS ohne Magnesium

PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative PCR
rDNase	rekombinante DNase
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
Rt PCR	Real time PCR
RT Puffer	Reverse Transkriptase Puffer
s. a.	siehe auch
S.	Seite
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Sog.	Sogenannte
SP-B	<i>Surface Protein-B</i>
Surfactant	<i>Surface Active Agent</i>
Temed	Tetramethylethylendiamin
TER	Transepithelial electrical Resistance
TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Umdrehung
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
W	Watt
z.B.	<i>zum Beispiel</i>
ZO-1	Zonula Occludens-1

## 6 Literaturverzeichnis

- ABBOTT, N. J., RONNBACK, L. & HANSSON, E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7, 41-53.
- ADAMSON, I. Y. & BOWDEN, D. H. 1975. Derivation of type 1 epithelium from type 2 cells in the developing rat lung. *Lab Invest*, 32, 736-45.
- BALDA, M. S. & MATTER, K. 1998. Tight junctions. *J Cell Sci*, 111 ( Pt 5), 541-7.
- BEERS, M. F. & MORRISEY, E. E. 2011. The three R's of lung health and disease: repair, remodeling, and regeneration. *J Clin Invest*, 121, 2065-73.
- BRODIE, D. & BACCHETTA, M. 2011. Extracorporeal membrane oxygenation for ARDS in adults. *N Engl J Med*, 365, 1905-14.
- CAMPBELL, L., HOLLINS, A. J., AL-EID, A., NEWMAN, G. R., VON RUHLAND, C. & GUMBLETON, M. 1999. Caveolin-1 expression and caveolae biogenesis during cell transdifferentiation in lung alveolar epithelial primary cultures. *Biochem Biophys Res Commun*, 262, 744-51.
- CARNESECCHI, S., PACHE, J. C. & BARAZZONE-ARGIROFFO, C. 2012. NOX enzymes: potential target for the treatment of acute lung injury. *Cell Mol Life Sci*, 69, 2373-85.
- CHRONEOS, Z. C., SEVER-CHRONEOS, Z. & SHEPHERD, V. L. 2010. Pulmonary surfactant: an immunological perspective. *Cell Physiol Biochem*, 25, 13-26.
- CLAUDE, P. 1978. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol*, 39, 219-32.
- CLEGG, G. R., TYRRELL, C., MCKECHNIE, S. R., BEERS, M. F., HARRISON, D. & MCELROY, M. C. 2005. Coexpression of RT140 with alveolar epithelial type II cell proteins in lungs following injury: identification of alveolar intermediate cell types. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289, L382-90.
- COYNE, C. B., GAMBLING, T. M., BOUCHER, R. C., CARSON, J. L. & JOHNSON, L. G. 2003. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285, L1166-78.
- CRAPO, J. D., BARRY, B. E., GEHR, P., BACHOFEN, M. & WEIBEL, E. R. 1982. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis*, 126, 332-7.
- CRYSTAL, R. G., RANDELL, S. H., ENGELHARDT, J. F., VOYNOW, J. & SUNDAY, M. E. 2008. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc*, 5, 772-7.
- DAUGHERTY, B. L., MATEESCU, M., PATEL, A. S., WADE, K., KIMURA, S., GONZALES, L. W., GUTTENTAG, S., BALLARD, P. L. & KOVAL, M. 2004. Developmental regulation of claudin localization by fetal alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287, L1266-73.

- ERICKSON, S. E., MARTIN, G. S., DAVIS, J. L., MATTHAY, M. A. & EISNER, M. D. 2009. Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005. *Crit Care Med*, 37, 1574-9.
- FANNING, A. S., JAMESON, B. J., JESAITIS, L. A. & ANDERSON, J. M. 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 273, 29745-53.
- FEHRENBACH, H. 2007. [Development of the pulmonary surfactant system]. *Pneumologie*, 61, 488-9.
- FERNANDEZ, A. L., KOVAL, M., FAN, X. & GUIDOT, D. M. 2007. Chronic alcohol ingestion alters claudin expression in the alveolar epithelium of rats. *Alcohol*, 41, 371-9.
- FLOROS, J., PHELPS, D. S., DEMELLO, D. E., LONGMATE, J., HARDING, H., BENSON, B. & WHITE, T. 1991. The utility of postmortem lung for RNA studies; variability and correlation of the expression of surfactant proteins in human lung. *Exp Lung Res*, 17, 91-104.
- FREISSMUTH, M., OFFERMANN, S. & BÖHM, S. 2012. *Pharmakologie & Toxikologie von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie ; mit 129 Tabellen*, Heidelberg, Springer.
- FUCHS, S., HOLLINS, A. J., LAUE, M., SCHAEFER, U. F., ROEMER, K., GUMBLETON, M. & LEHR, C. M. 2003. Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C. *Cell Tissue Res*, 311, 31-45.
- GEHR, P., BACHOFEN, M. & WEIBEL, E. R. 1978. The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir Physiol*, 32, 121-40.
- GORIN, A. B. & STEWART, P. A. 1979. Differential permeability of endothelial and epithelial barriers to albumin flux. *J Appl Physiol*, 47, 1315-24.
- GREGORY, T. J., LONGMORE, W. J., MOXLEY, M. A., WHITSETT, J. A., REED, C. R., FOWLER, A. A., 3RD, HUDSON, L. D., MAUNDER, R. J., CRIM, C. & HYERS, T. M. 1991. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*, 88, 1976-81.
- GUMBLETON, M., ABULROB, A. G. & CAMPBELL, L. 2000. Caveolae: an alternative membrane transport compartment. *Pharm Res*, 17, 1035-48.
- HERMANN, M. I., FUCHS, S., BOCK, M., WENZEL, K., MAYER, E., KEHE, K., BITTINGER, F. & KIRKPATRICK, C. J. 2009. Primary human coculture model of alveolo-capillary unit to study mechanisms of injury to peripheral lung. *Cell Tissue Res*, 336, 91-105.
- HERMANN, M. I., KASPER, J., DUBRUEL, P., POHL, C., UBOLDI, C., VERMEERSCH, V., FUCHS, S., UNGER, R. E. & KIRKPATRICK, C. J. 2010. An impaired alveolar-capillary barrier in vitro: effect of proinflammatory cytokines and consequences on nanocarrier interaction. *J R Soc Interface*, 7 Suppl 1, S41-54.
- HERMANN, M. I., UNGER, R. E., KEHE, K., PETERS, K. & KIRKPATRICK, C. J. 2004. Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary

- microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. *Lab Invest*, 84, 736-52.
- JOHANSSON, J. & CURSTEDT, T. 1997. Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur J Biochem*, 244, 675-93.
- KAARTEENAHO, R., MERIKALLIO, H., LEHTONEN, S., HARJU, T. & SOINI, Y. 2010. Divergent expression of claudin -1, -3, -4, -5 and -7 in developing human lung. *Respir Res*, 11, 59.
- KAARTEENAHO-WIIK, R. & SOINI, Y. 2009. Claudin-1, -2, -3, -4, -5, and -7 in usual interstitial pneumonia and sarcoidosis. *J Histochem Cytochem*, 57, 187-95.
- KAPANCI, Y., WEIBEL, E. R., KAPLAN, H. P. & ROBINSON, F. R. 1969. Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxicity in monkeys. II. Ultrastructural and morphometric studies. *Lab Invest*, 20, 101-18.
- KASPER, M., REIMANN, T., HEMPEL, U., WENZEL, K. W., BIERHAUS, A., SCHUH, D., DIMMER, V., HAROSKE, G. & MULLER, M. 1998. Loss of caveolin expression in type I pneumocytes as an indicator of subcellular alterations during lung fibrogenesis. *Histochem Cell Biol*, 109, 41-8.
- KOVAL, M. 2013. Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions. *Annu Rev Physiol*, 75, 551-67.
- KRAUSE, G., WINKLER, L., MUELLER, S. L., HASELOFF, R. F., PIONTEK, J. & BLASIG, I. E. 2008. Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778, 631-645.
- KRUMP-KONVALINKOVA, V., BITTINGER, F., UNGER, R. E., PETERS, K., LEHR, H. A. & KIRKPATRICK, C. J. 2001. Generation of human pulmonary microvascular endothelial cell lines. *Lab Invest*, 81, 1717-27.
- KUSTERMANN, J., GEHRMANN, A., KREDEL, M., WURMB, T., ROEWER, N. & MUELLENBACH, R. M. 2013. [Acute respiratory distress syndrome and septic cardiomyopathy : successful application of veno-venoarterial extracorporeal membrane oxygenation]. *Anaesthesist*, 62, 639-43.
- LADENBURGER, A., SEEHASE, M., KRAMER, B. W., THOMAS, W., WIRBELAUER, J., SPEER, C. P. & KUNZMANN, S. 2010. Glucocorticoids potentiate IL-6-induced SP-B expression in H441 cells by enhancing the JAK-STAT signaling pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 299, L578-84.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LECRUX, C. & HAMEL, E. 2011. The neurovascular unit in brain function and disease. *Acta Physiologica*, 203, 47-59.
- LI, C., WRIGHT, M. M. & JACKSON, R. M. 2002. Reactive species mediated injury of human lung epithelial cells after hypoxia-reoxygenation. *Exp Lung Res*, 28, 373-89.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2012. *Taschenlehrbuch Histologie 10 Tabellen*, Stuttgart [u.a.], Thieme.
- MATTHAY, M. A., WARE, L. B. & ZIMMERMAN, G. A. 2012. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*, 122, 2731-40.

- MATTHAY, M. A. & WIENER-KRONISH, J. P. 1990. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis*, 142, 1250-7.
- MITCHELL, L. A., OVERGAARD, C. E., WARD, C., MARGULIES, S. S. & KOVAL, M. 2011. Differential effects of claudin-3 and claudin-4 on alveolar epithelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 301, L40-9.
- MORITA, K., SASAKI, H., FURUSE, M. & TSUKITA, S. 1999. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol*, 147, 185-94.
- NEUHAUS, W., PLATTNER, V. E., WIRTH, M., GERMANN, B., LACHMANN, B., GABOR, F. & NOE, C. R. 2008. Validation of in vitro cell culture models of the blood-brain barrier: tightness characterization of two promising cell lines. *J Pharm Sci*, 97, 5158-75.
- NEUHAUS, W., SAMWER, F., KUNZMANN, S., MUELLENBACH, R. M., WIRTH, M., SPEER, C. P., ROEWER, N. & FORSTER, C. Y. 2012. Lung endothelial cells strengthen, but brain endothelial cells weaken barrier properties of a human alveolar epithelium cell culture model. *Differentiation*, 84, 294-304.
- ORNSTEIN, L. 1964. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci*, 121, 321-49.
- OVERGAARD, C. E., DAUGHERTY, B. L., MITCHELL, L. A. & KOVAL, M. 2011. Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxid Redox Signal*, 15, 1179-93.
- PERL, M., LOMAS-NEIRA, J., VENET, F., CHUNG, C. S. & AYALA, A. 2011. Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury. *Expert Rev Respir Med*, 5, 115-26.
- PHELPS, D. S. & FLOROS, J. 1991. Dexamethasone in vivo raises surfactant protein B mRNA in alveolar and bronchiolar epithelium. *Am J Physiol*, 260, L146-52.
- PUGIN, J., VERGHESE, G., WIDMER, M. C. & MATTHAY, M. A. 1999. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, 27, 304-12.
- R. KLINKE, H.-C. P., ST. SILBERNAGL 2005. *Lehrbuch der Physiologie*, Georg Thieme Verlag.
- RAGHAVENDRAN, K., WILLSON, D. & NOTTER, R. H. 2011. Surfactant therapy for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Clin*, 27, 525-59.
- RAMIN, S. M., VIDAEFF, A. C., GILSTRAP, L. C., 3RD, BISHOP, K. D., JENKINS, G. N. & ALCORN, J. L. 2004. The effects of dexamethasone and betamethasone on surfactant protein-B messenger RNA expression in human type II pneumocytes and human lung adenocarcinoma cells. *Am J Obstet Gynecol*, 190, 952-9.
- RANIERI, V. M., RUBENFELD, G. D., THOMPSON, B. T., FERGUSON, N. D., CALDWELL, E., FAN, E., CAMPOROTA, L. & SLUTSKY, A. S. 2012. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*, 307, 2526-33.

- SAUNDERS, M. 2009. Transplacental transport of nanomaterials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 1, 671-84.
- SAWADA, N., MURATA, M., KIKUCHI, K., OSANAI, M., TOBIOKA, H., KOJIMA, T. & CHIBA, H. 2003. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc*, 36, 147-56.
- SCHIEBLER, T. H. & KORF, H.-W. 2007. *Anatomie Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; mit 111 Tabellen*, [Heidelberg], Steinkopff.
- SCHNEEBERGER, E. E. 1978. Structural basis for some permeability properties of the air--blood barrier. *Fed Proc*, 37, 2471-8.
- SCHNEEBERGER, E. E. & LYNCH, R. D. 1984. Tight junctions. Their structure, composition, and function. *Circ Res*, 55, 723-33.
- SEEGER, W., HANSEN, T., ROSSIG, R., SCHMEHL, T., SCHUTTE, H., KRAMER, H. J., WALMRATH, D., WEISSMANN, N., GRIMMINGER, F. & SUTTORP, N. 1995. Hydrogen peroxide-induced increase in lung endothelial and epithelial permeability--effect of adenylate cyclase stimulation and phosphodiesterase inhibition. *Microvasc Res*, 50, 1-17.
- SHLYONSKY, V., GOOLAERTS, A., VAN BENEDEN, R. & SARIBAN-SOHRABY, S. 2005. Differentiation of epithelial Na<sup>+</sup> channel function. An in vitro model. *J Biol Chem*, 280, 24181-7.
- SIEBENMANN, C., BLOCH, K. E., LUNDBY, C., NUSSBAMER-OCHSNER, Y., SCHOEB, M. & MAGGIORINI, M. 2011. Dexamethasone improves maximal exercise capacity of individuals susceptible to high altitude pulmonary edema at 4559 m. *High Alt Med Biol*, 12, 169-77.
- SIMIONESCU, M. 1980. Ultrastructural organization of the alveolar-capillary unit. *Ciba Found Symp*, 78, 11-36.
- SIMON, R. H., EDWARDS, J. A., REZA, M. M. & KUNKEL, R. G. 1991. Injury of rat pulmonary alveolar epithelial cells by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: dependence on phenotype and catalase. *Am J Physiol*, 260, L318-25.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- ULFIG, N. 2011. *Kurzlehrbuch Histologie*, Stuttgart [u.a.], Thieme.
- UMBERTO MEDURI, G., BELL, W., SINCLAIR, S. & ANNANE, D. 2011. Pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. Glucocorticoid receptor-mediated regulation of inflammation and response to prolonged glucocorticoid treatment. *Presse Med*, 40, e543-60.
- UNGER, R. E., KRUMP-KONVALINKOVA, V., PETERS, K. & KIRKPATRICK, C. J. 2002. In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvasc Res*, 64, 384-97.
- VAN MEER, G. & SIMONS, K. 1986. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J*, 5, 1455-64.

- WANG, F., DAUGHERTY, B., KEISE, L. L., WEI, Z., FOLEY, J. P., SAVANI, R. C. & KOVAL, M. 2003. Heterogeneity of claudin expression by alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29, 62-70.
- WANG, S. & HUBMAYR, R. D. 2011. Type I alveolar epithelial phenotype in primary culture. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 44, 692-9.
- WARD, R. M. 1994. Pharmacologic enhancement of fetal lung maturation. *Clin Perinatol*, 21, 523-42.
- WARE, L. B. & MATTHAY, M. A. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 342, 1334-49.
- WARE, L. B. & MATTHAY, M. A. 2001. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 163, 1376-83.
- WEAVER, T. E., SARIN, V. K., SAWTELL, N., HULL, W. M. & WHITSETT, J. A. 1988. Identification of surfactant proteolipid SP-B in human surfactant and fetal lung. *J Appl Physiol*, 65, 982-7.
- WEIBEL, E. R. 1973. Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange. *Physiol Rev*, 53, 419-95.
- WEIBEL, E. R. & GOMEZ, D. M. 1962. Architecture of the human lung. Use of quantitative methods establishes fundamental relations between size and number of lung structures. *Science*, 137, 577-85.
- WEKSLER, B. B., SUBILEAU, E. A., PERRIERE, N., CHARNEAU, P., HOLLOWAY, K., LEVEQUE, M., TRICOIRE-LEIGNEL, H., NICOTRA, A., BOURDOULOUS, S., TUROWSKI, P., MALE, D. K., ROUX, F., GREENWOOD, J., ROMERO, I. A. & COURAUD, P. O. 2005. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J*, 19, 1872-4.
- WHITSETT, J. A. & WEAVER, T. E. 2002. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med*, 347, 2141-8.
- WIENER-KRONISH, J. P., ALBERTINE, K. H. & MATTHAY, M. A. 1991. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin. *J Clin Invest*, 88, 864-75.
- WILLIAMS, M. C. 2003. Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annu Rev Physiol*, 65, 669-95.
- WRAY, C., MAO, Y., PAN, J., CHANDRASENA, A., PIASTA, F. & FRANK, J. A. 2009. Claudin-4 augments alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 297, L219-27.

## 7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1	Anatomie der Atemwege.	1
Abbildung 1.2	Histologischer Querschnitt der Lunge.	2
Abbildung 1.3	Schematische Darstellung des Alveolarseptums und der Blut-Luft-Schranke.	3
Abbildung 1.4	Schematischer Aufbau einer Verbindung zwischen zwei Epithelzellen.	6
Abbildung 2.1	Transwellinsert in einem Well (Saunders, 2009).	17
Abbildung 3.1	H441 Zellen, Tag 7 nach Aussaat, Beschichtung mit Gelatine 0,5 %.	33
Abbildung 3.2	Tag 14 nach Zellaussaat, Beschichtung mit Kollagen I.	34
Abbildung 3.3	Entwicklung der TER-Werte in Abhängigkeit der Dexamethasonkonzentration. Zellen mit H441 Medium auf Transwellinserts gezüchtet.	36
Abbildung 3.4	TER-Werte in Abhängigkeit der Dexamethasonkonzentration an dem Tag 15, dem Höhepunkt der funktionellen Barriere.	37
Abbildung 3.5	Fluoreszeinpermeabilität am Tag 7 mit und ohne Dexamethason.	38
Abbildung 3.6	Wirkung von Dexamethason auf die mRNA Expression von Caveolin-1.	39
Abbildung 3.7	Wirkung von Dexamethason auf die mRNA Expression von SP-B.	40
Abbildung 3.8	Nachweis auf der Proteinebene von SP-B (Bild A) und Caveolin-1 (Bild B) mittels Immunfluoreszenz am Tag 15.	41
Abbildung 3.9	Immunfluoreszenz an Tag 15 mit 100 nM Dexamethason.	42
Abbildung 3.10	Beeinflussung des TER-Wertes durch verschiedene Medien.	44
Abbildung 3.11	Beeinflussung der Fluoreszeinpermeabilität durch verschiedenen Medien.	45
Abbildung 3.12	Claudin-1 Expression durch verschiedene Medien.	47
Abbildung 3.13	Claudin-3 Expression durch verschiedene Medien.	49
Abbildung 3.14	Claudin-4 Expression durch verschiedene Medien.	51
Abbildung 3.15	Claudin-5 Expression durch verschiedene Medien.	53
Abbildung 3.16	Claudin-5 Lokalisation in Zellkulturen mit verschiedenen Medien.	54
Abbildung 3.17	Occludin Expression durch verschiedene Medien.	55

Abbildung 3.18	ZO-1 Expression durch verschiedene Medien.	57
Abbildung 3.19	TER-Entwicklung unter Hypoxie/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bezogen auf die Normoxie unter konditioniertem St-1 Medium.	59
Abbildung 3.20	Fluoreszeinpermeabilität nach Hypoxie/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Wirkung bezogen auf die Normoxie unter konditioniertem ST1 Medium.	60

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Zelllinien und deren Medien	13
Tabelle 2.2	Primäre Antikörper Fluoreszenzmikroskopie	13
Tabelle 2.3	Sekundäre Antikörper Fluoreszenzmikroskopie	14
Tabelle 2.4	Primäre Antikörper Western Blotting	14
Tabelle 2.5	sekundäre Antikörper, HRP-gekoppelt, Western Blotting	15
Tabelle 2.6	Primer (MWG Eurofins)	15
Tabelle 2.7	Sonden (Taqman®, Applied Biosystems)	16
Tabelle 2.8	Reaktionsansatz für 20 µl cDNA	30
Tabelle 2.9	Reaktionsansatz qPCR	31
Tabelle 3.1	Zusammenfassung der Regulation der Tight Junction Proteine.	58
Tabelle 4.1	Zusammenfassung Regulation der Tight Junction-Proteine und des TER- beziehungsweise Fluoreszeinpermeabilitätswertes.	66

## **9 Anhang**

### **Danksagung**

Für die Bereitstellung des interessanten Themas, der nötigen Ressourcen und das Vertrauen auf dem Gebiet zu forschen, danke ich Frau Prof. Dr. Förster sehr. Die regelmäßigen Besprechungen mit vielen Ideen, Anregungen sowie offener und konstruktiver Kritik werde ich stets in guter Erinnerung behalten.

Ein sehr großes Dankeschön gebührt meinem Betreuer Dipl.-Ing. Dr. Winfried Neuhaus, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich in die täglichen Kniffe der wissenschaftlichen Forschung mit den unterschiedlichen Aspekten einweihte. Die von ihm geschaffene angenehme Arbeitsatmosphäre und Ermutigungen nach ungewollten Ereignissen waren immer wieder motivierend.

Herrn Prof. Dr. Kunzmann möchte ich für die freundliche Zusammenarbeit bzw. die Rolle als Zweitgutachter danken.

Für eine hervorragende und freundliche technische Unterstützung danke ich Bianca Schneiker und Elisabeth Wilken. Sie waren mir während der Versuche im Labor eine große Hilfe und haben zu dem Erfolg einiger Experimente maßgeblich beigetragen. Ebenso danke ich Frau Dr. Malgorzata Burek, Katerina Pech, Anja Neuhoff für eine harmonische Zusammenarbeit im Labor. Frau Sabine Adam danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft, Koordination und eine reibungslose Organisation.

Herrn PD Dr. Kunzmann und der Abteilung der Pädiatrie unter Leitung von Herrn Prof. Speer danke ich für eine gelungene Kooperation und Zusammenarbeit. Herrn Dr. Julian Küstermann bin ich für einen gelungenen gemeinsamen Vortrag und sehr konstruktive Ratschläge zum Thema ARDS dankbar.

Zu guter Letzt möchte ich ganz herzlich meinen Eltern und meiner Familie danken. Die Unterstützung in allen Lebenslagen in jeglicher Hinsicht und die Gewissheit eines sicheren Zusammenhalts sind von unschätzbarem Wert. Ich bin Ihnen unendlich dankbar dafür.

## **Lebenslauf**

Name Fabian Hans Viktor Samwer

### Ausbildung

2007-11/2013 Absolvierung des Staatsexamen der Humanmedizin an der Universität Würzburg

10/2011- 02/2012 Studium der Humanmedizin an der Universität Salamanca, Spanien

2006 Abitur am Gymnasium Rodenkirchen, Köln

2003-2004 Bromsgrove School, England mit Abschluss der AS-Levels

### Berufserfahrung und Praktika

04-07/2013 Pj-Tertial der Neurologie (Wahlfach)  
Caritas Krankenhaus Bad Mergentheim, Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg

12/2012-03/2013 Pj-Tertial der Inneren Medizin,  
Universitätsspital Zürich, Schweiz

08-12/2012 Pj-Tertial der Chirurgie in der Abteilung Trauma, Chris Hani Baragwanath Hospital in Soweto, Johannesburg, Südafrika

02/2012 Famulatur in der Abteilung für Neurologie,  
Universitätsklinikum Salamanca, Spanien

03/2011 Famulatur im Lungenkrebszentrum,  
DRK Klinik Wedding in Berlin

09/2010 Famulatur in der Abteilung für Radiologie,  
Universitätsklinikum Würzburg

04/2010 Famulatur in der „Chest Pain Unit“, Kardiologie,  
Deutsches Herzzentrum in München

09/2009 Famulatur in der Praxis für Orthopädie und Unfallchirurgie,  
Dr. med. Uli Schleicher in Berlin

2009-2011 Tutor am Institut der Physiologie der Universität Würzburg

2007-2009 Freier Mitarbeiter bei „factx“, Gesellschaft für  
Marktforschungsunternehmen in Köln

06/2006-03/2007 Zivildienst in der Abteilung für Kinder-Onkologie,  
Universitätsklinikum Köln