

Untersuchungen zum Einfluss einer Air-Liquid-Interphase auf die Differenzierung von Alveolarepithelzellen Typ II

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Nektarios Sinis

aus Offenbach/a.M.

Giessen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik II

Leiter: Prof. Dr. med. W. Seeger

des Universitätsklinikums Giessen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Grimminger

Gutachter: Prof. Dr. Lindemann

Tag der Disputation: 15.09.2003

1	VORWORT	1
2	EINLEITUNG	1
2.1	Morphologie und Architektur der Alveole	1
2.1.1	Das Alveolarsystem	1
2.1.2	Alveolarepithelzellen Typ I	2
2.1.3	Alveolarepithelzellen Typ II	2
2.2	Funktion der Alveolarepithelzellen Typ II	4
2.2.1	Biosynthese des Surfactant	4
2.2.2	Surfactant als Komponente alveolärer Schutzmechanismen	6
2.2.3	Morphologie des Surfactant im Alveolarsystem	10
2.3	Bestandteile der epithelialen Barriere als Transdifferenzierungs- marker von Alveolarepithelzellen	12
2.3.1	Aufbau und Funktion der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	12
2.3.2	Der Widerstand im epithelialen Zellverband der Alveolar- epithelzellen	13
2.4	Differenzierung von Alveolarepithelzellen	14
2.4.1	Transdifferenzierung der Typ ₂ -Zellen	14
2.4.2	Einfluss von Air-Liquid-Interphase auf die Differenzierung	14

2.4.3	Surfactantsekretion und Surfactantproteine als Differenzierungsmarker der Zellen	15
2.4.4	Stellenwert der extrazellulären Matrix (Typ I Kollagen) bei der Kultivierung von Alveolarepithelzellen Typ II	17
2.5	Inflammatorischer Einfluss exogener Stimulie auf das Alveolarepithel	17
2.5.1	Lipopolysaccharid (LPS)	17
2.5.2	Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	18
2.5.3	Interleukin-1 (IL-1)	18
2.6	Chemotaktische Proteine, die von Alveolarepithelzellen synthetisiert werden	19
2.6.1	Physiologische Funktion des Monozyten-chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1) im Alveolarepithelzellverband	19
2.6.2	Einfluss des Makrophagen-inflammatorischen Proteins-2 (MIP-2) auf Alveolarepithelzellen	20
2.7	Hypoxie und ihre Folgen für die Lunge	20
2.8	Fragestellung	21
3	MATERIAL UND METHODIK	23
3.1	Inkubationsmedien und Zellkulturmaterial	23

3.2	Pharmaka und Agenzien	24
3.3	Kommerzielle Assay Systeme	26
3.3.1	Monozyten-chemotaktisches Protein-1 (MCP-1)	27
3.3.2	Makrophagen-inflammatorisches Protein-2 (MIP-2)	27
3.4	Geräte	28
3.5	Isolierung von Alveolarepithelzellen Typ II aus Rattenlungen	30
3.5.1	Versuchstiere und Tierhaltung	30
3.5.2	Zellisolierungsmethode nach Dobbs, Gonzales und Williams	31
3.5.3	Identifizierung isolierter Alveolarepithelzellen Typ II	33
3.5.4	Vitalitätstests	35
3.6	Kultivierung von Alveolarepithelzellen Typ II	36
3.6.1	Herstellen von Kollagengelen	36
3.6.2	Behandlung der isolierten Alveolarepithelzellen	37
3.6.3	Air-Liquid-Interphase im Zellkulturmodell	37
3.7	Kultivierung der Alveolarepithelzellen in Hypoxie	38
3.7.1	Verwendung der Hypoxiekammer	38
3.7.2	Kontrollexperimente für die Zellen in der Hypoxiekammer	39
3.8	Morphologische Untersuchung der Alveolarepithelzellen	40
3.8.1	Lichtmikroskopische Untersuchung von Alveolarepithelzellen	40
3.8.2	Elektronenmikroskopische Analyse der Alveolarepithelzellen	40

3.9	Sekretionsmessung von ³H-Phosphatidyl-Cholin aus Alveolar-epithelzellen Typ II	41
3.9.1	Sekretionsassay	41
3.9.2	Messung des Einbaus von ³ H-Methyl-Cholin in Alveolar-epithelzellen Typ II	42
3.10	Surfactantproteinbestimmung	43
3.10.1	Bestimmung der Surfactantproteine - B und - C (SP-B, SP-C)	44
3.11	Widerstandsmessung des Monolayers	45
3.12	Real-time PCR (TaqMan™PCR)	45
3.12.1	Extraktion der mRNA	46
3.12.2	Prozessierung der gewonnenen mRNA	46
3.12.3	cDNA-Synthese	47
3.12.4	Durchführung der Real-time PCR	47
3.13	Experimentelles Protokoll	49
3.14	Statistische Auswertung der dargestellten Ergebnisse	50
4	ERGEBNISSE	51
4.1	Übersicht	51
4.2	Morphologische Differenzierung der Alveolarepithelzellen in Abhängigkeit vom Kultivierungsverfahren	53

4.2.1	Lichtmikroskopische Unterschiede der Alveolarepithelzellen nach der Kultivierung im Air-Liquid-Interphasemodell	53
4.2.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Alveolarepithelzellen	54
4.3	Messung der Surfactantproteinsekretion und der Expression der α_1- Untereinheit der Na^+/K^+-ATPase als Differenzierungsmarker der Typ₂-Zellen	56
4.4	Betrachtung der Surfactantsekretion der Typ₂-Zellen als Marker ihrer Differenzierung	59
4.5	Widerstandsmessung: Indikator eines intakten Monolayers bei Kultivierung von Alveolarepithelzellen im Air-Liquid-Interphasemodell	62
4.6	Freisetzung inflammatorischer Proteine aus Alveolarepithelzellen	64
4.6.1	Proteinexpression des Monozyten-chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1)	64
4.6.2	Proteinexpression des Makrophagen-inflammatorischen Proteins-2 (MIP-2)	65
4.6.3	Effekt der Air-Liquid-Interphase auf die mRNA-Expression von MCP-1 in Alveolarepithelzellen	67
4.6.4	Pharmakologische Blockade der LPS-induzierten Sekretion von MCP-1	69
4.6.5	Pharmakologische Blockade der LPS-induzierten Sekretion von MIP-2	71

4.7	Einfluss von Hypoxie auf den Differenzierungszustand von Alveolarepithelzellen	73
4.7.1	Der Einfluss von Hypoxie auf die Surfactantsekretion	73
4.7.2	Auswirkung von Hypoxie auf die mRNA-Expression von SP-A, SP-C und MCP-1	75
4.7.3	Effekt von Hypoxie auf die Sekretion von MCP-1	77
4.7.4	Die Folgen von Hypoxie auf die Sekretion von MIP-2	79
4.7.5	Effekt von anti-CD-14, anti-TNF- α und von Hypoxie auf Alveolarepithelzellen	81
5.	DISKUSSION	83
5.1	Die Rolle des Kultivierungssystems auf die morphologische Differenzierung der Alveolarepithelzellen	83
5.2	Funktioneller Vergleich unterschiedlich kultivierter Typ₂-Zellen	85
5.3	Diskussion der inflammatorischen Potenz von Alveolarepithelzellen	87
5.4	Diskussion der Wirkung von Hypoxie auf die Differenzierung von Typ₂-Zellen	91
6.	ZUSAMMENFASSUNG	94

7. LITERATURVERZEICHNIS

8. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

8.1.1 Eigene Publikationen zum Dissertationsthema

8.1.2 Veröffentlichte Abstracts zum Dissertationsthema

LEBENS LAUF

DANKSAGUNG

1. VORWORT

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde in der Zeit vom September 1998 bis Januar 2000 in dem Laborbereich der klinischen Forschergruppe „Respiratorische Insuffizienz“, unter der Betreuung von Herrn Dr. F. Rose in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. F. Grimminger, am Zentrum für Innere Medizin durchgeführt. Das Thema der Arbeit bestand darin, den Einfluss von inflammatorischen Faktoren und von Hypoxie auf den Differenzierungszustand von Alveolarepithelzellen zu untersuchen. Aus diesem Grund entwickelten wir ein Air-Liquid-Interphasemodell als angewandtes Zellkulturmodell, um Differenzierungsmarker von Alveolarepithelzellen TypII zu untersuchen.

2. EINLEITUNG

2.1. Morphologie und Architektur der Alveole

2.1.1. Das Alveolarsystem

Der Aufbau der Lunge ist klar und einfach gegliedert. Sie ist unterteilt in das luftleitende System und das Alveolarsystem. Mit einer Gesamtfläche von ca. 140 m² (1) bildet es die größte Fläche des Organismus, die direkt mit der Außenwelt in Kontakt steht. Die Alveolen werden gleichmäßig von Epithelzellen ausgekleidet. Zwei Epithelzelltypen lassen sich nach der äußeren Form der zytoplasmatischen Differenzierung unterscheiden:

Die Alveolarepithelzellen Typ I und Typ II (Typ₁- und Typ₂-Zellen) (2).

2.1.2. Alveolarepithelzellen Typ I

Mit ca. 95% bedecken die Typ₁-Zellen den größten Teil der Alveolaroberfläche (3). Sie besitzen eine Flächenausdehnung von ca. 2300 μm^2 . Ihr Durchmesser beträgt etwa 50 μm . Die Zellen sind durch einen flach ausgebreiteten Zytoplasmaleib und ein organellenarmes Zytoplasma gekennzeichnet. Es enthält wenig endoplasmatisches Retikulum, vereinzelt finden sich Lysosomen, Mitochondrien und ein Golgfeld (4).

In großer Zahl finden sich Pinozytosebläschen in den Ausläufern der Zellen. Im Zentrum der Zellen liegt ein ovaler Zellkern. Über unterschiedlich breite Strecken liegen flache, sich überlappende zytoplasmatische Ausläufer, die sich in der Expirations- und Inspirationsphase gegeneinander verschieben.

Zwischen benachbarten Zellen sind Zellkontakte (tight-junctions) ausgebildet. Diese umgeben die Typ₂-Zellen kragenförmig (5). Die Epithelzellen bilden zusammen mit der Basallamelle, der sie über weite Strecken kontinuierlich anliegen, und mit dem Kapillarendothel der Alveolarkapillaren die Barriere für den Gasaustausch (6).

Im Falle einer Schädigung erfolgt die Regeneration und Erneuerung, dieser in der Alveole großflächig angelegten Zellen, aus den Typ₂-Zellen. In diesem Zusammenhang kann man von der Enddifferenzierung der Typ₂-Zellen zur Typ₁-Zelle sprechen. Die Typ₁-Zelle ist selbst nicht in der Lage zur Zellteilung. Autoradiographisch ist nur an den Typ₂-Zellen eine mitotische Aktivität nachgewiesen worden (7,8).

2.1.3. Alveolarepithelzellen Typ II

Die kubische Form ist ein morphologisches Charakteristikum der Alveolarepithelzellen TypII (Typ₂-Zellen). Ihr Durchmesser beträgt ca. 1 μm . Sie kommen nur gelegentlich in kleinen Gruppen aus zwei oder drei Zellen im Alveolarepithel vor (3). In der Regel liegen sie einzeln im Alveolarepithelzellverband verteilt. Auf ihrer Oberfläche tragen die Typ₂-Zellen einen Besatz aus 0,1 μm breiten Mikrovilli.

Das Zytoplasma der Zellen ist im Vergleich zu den Typ₁-Zellen reicher an Organellen. Es finden sich freie Ribosomen, Mitochondrien, Lysosomen, Multivesikulärkörper, ein ausgeprägtes Golgifeld und ein rauhes endoplasmatisches Retikulum (9).

Zentral angeordnet liegt der Zellkern, der einen prominent ausgeprägten Nukleolus besitzt. Breitbasig liegen die Zellen der Basallamelle auf. Seitlich werden die Typ₂-Zellen von Ausläufern der Typ₁-Zellen kragenförmig überlappt. So überragen sie das Niveau der Epitheloberfläche nur wenig (5).

Als weiteres besonderes morphologisches Kennzeichen der Typ₂-Zellen finden, sich in ihnen die großen Lamellarkörper, die 0,2 bis 2 µm im Durchmesser betragen. Sie nehmen etwa 18 bis 24% des Zytoplasmas der Zellen ein. Die Lamellarkörper sind als Substrat der Syntheseleistung dieser Zellen aufzufassen. Hier liegt der Ursprung der intrazytoplasmatisch gebildeten, oberflächenaktiven Substanzen, dem Surfactant (10).

Die Struktur des alveolären Surfactant und die elektronenmikroskopisch nachweisbaren Lamellarkörper zeigen in ihrer Zusammensetzung eine Ähnlichkeiten zu wässrigen Dispersionen von Phospholipid-Proteinmischungen oder Phospholipiden (9, 10).

Der Ursprung der Lamellarkörper sind wahrscheinlich die Multivesikulärkörper, die gleichartige lysosomale Enzyme enthalten. Sie haben eine enge Beziehung zu den Zisternen des endoplastischen Retikulums und bilden eine Vorstufe in der Entwicklung der Lamellarkörper (11). Multivesikulärkörper entstehen im Golgiapparat. Sie werden von einer ca. 90 Å dicken Membran umschlossen und enthalten von Membranen abgegrenzte Vesikel (9).

Über den Vorgang der merokrinen Sekretion können die in den Lamellarkörpern enthaltenen Substanzen aus dem Zytoplasma in die Alveolarlichtung sezerniert werden (12). Dabei nähern sich die Lamellarkörper von innen der Zellmembran an. Die Lamellarkörper legen sich der Zellmembran an, die sich über diesen öffnet, sodass der Inhalt durch die entstehenden Membranlücken auf die Zelloberfläche herausgeworfen werden kann (13). Dieser Vorgang, der für die Reduktion der Oberflächenspannung in der Alveole notwendig ist, kann als Charakteristikum der Typ₂-Zellen angesehen werden (14). Nur durch ihre Fähigkeit zur Synthese und Sekretion von Surfactant wird die Integrität der Alveole gesichert.

2.2. Funktion der Alveolarepithelzellen Typ II

2.2.1. Biosynthese des Surfactant

Die Ergebnisse aus autoradiographischen Untersuchungen führen zu der Erkenntnis, dass die Bausteine für das Surfactant den Typ₂-Zellen wahrscheinlich über das Blut zugeführt werden. Nach intravenöser Applikation von markiertem Palmitat und Cholin erscheinen diese Substanzen innerhalb weniger Minuten im endoplasmatischen Retikulum und im Golgifeld der Typ₂-Zellen (15, 16).

Neben der Speicherung findet möglicherweise auch eine fortgesetzte Synthese in den appositionell an Größe zunehmenden Lamellarkörpern statt. Die Biosynthese der oberflächenaktiven Substanzen konnte nach Lavagierung aus der Lunge verfolgt werden. Außerdem ist es möglich, die Typ₂-Zellen aus den Lungen von Versuchstieren zu isolieren, und den Ablauf der Biosynthese systematisch *in vitro* zu beobachten (17-19).

Chemisch stellt das Surfactant keine reine Substanz dar. Vielmehr ist es eine Mischung (Emulsion) aus Lipiden, bzw. Phospholipiden, Proteinen und Kohlenhydraten, wobei der Lipidanteil etwa 90% beträgt. Die Proteine machen etwa 10% der Gesamtmenge aus (siehe auch Tabelle 1) (17, 20, 21).

Der wesentliche Anteil der pulmonalen Lipide (Phosphatidylcholin) besteht zu fast 65% aus Lecithin. Jeweils 10% machen Cholesterol und Phosphatidylglycerol aus. Das Dipalmytylecithin ist unter den Lecithinen die funktionell wichtigste Komponente. Sein Anteil macht etwa 50% des gesamten Surfactantlipidgehaltes aus (22). Die hohe oberflächenaktive Wirkung dieser Substanz ist auf seine bipolare Struktur zurückzuführen. Die hydrophile Cholingruppe weist quarternäre Ammoniumionen in ihrer chemischen Struktur auf. Diese tauchen in die wässrige Phase der Alveolarfläche ein. Demgegenüber ragen die hydrophoben C-18-Fettsäureketten des Glycerids in d-Stellung in das Alveolarlumen (23) hinein.

Das Surfactantmaterial ist in der Lage, verschiedene Aggregatzustände einzunehmen. Dies ist auf den hohen Anteil des Lecithins am Gesamtphospholipid der Lunge zurückzuführen. Aufgrund der chemischen Struktur des Lecithins kann die Verbindung Gele, flüssige Kristalle, mono- und oligomolekulare Filme, Mizellen und Liposomen bilden (24, 25). Auch der Proteinanteil spielt eine besondere Rolle für die normale Surfactantfunktion, obwohl die Lipide den dominierenden Faktor des Surfactant darstellen (26).

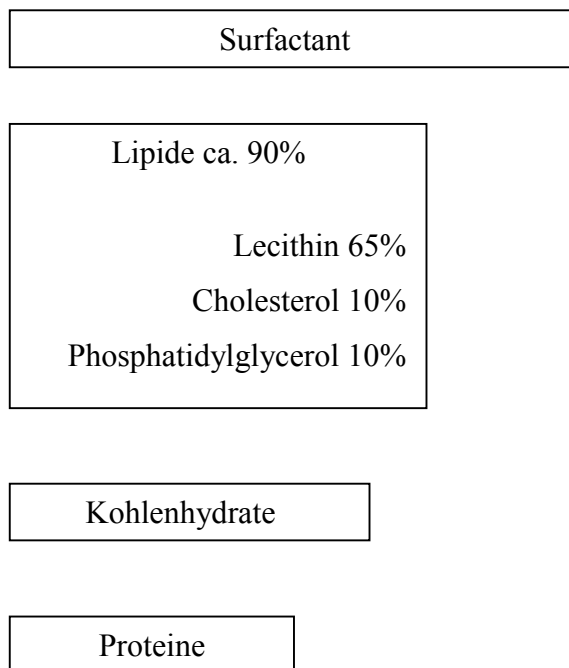


Tabelle 1: Zusammensetzung des Surfactant

Die Proteine sind für eine einwandfreie Funktion des Surfactantsystems unbedingt erforderlich (20).

Drei Proteine machen im wesentlichen den Proteinanteil im Surfactant aus. Dazu gehört Albumin mit einer Molekülmasse von 69000 sowie zwei Proteine mit einer Molekülmasse von 35000 und 10000 (27-31).

Eine wichtige Teilkomponente im Metabolismus des Surfactant ist die Reutilisation von ausgeschiedenen Phospholipidkomponenten. Die Feststellung, dass eine Reutilisation stattfindet, ergibt sich aus Messergebnissen der spezifischen Aktivität, nach intravaskulärer Applikation radioaktiv markierter Bausteine des Surfactant (32, 33).

Etwa 85% der Bausteine des Surfactant werden durch Recycling wieder verwendet. D.h. die Neusynthese ist nur in geringem Ausmaß notwendig (34).

Die genauen Abläufe, die bei dem Recycling-Prozess zum Tragen kommen, sind noch nicht eindeutig geklärt. Man nimmt an, dass einzelne Phospholipidmoleküle von den Zellen aufgenommen werden. Nur bei den Bestandteilen, die nicht an dem Recycling-Prozess beteiligt sind, erfolgt eine Resorption und ein Abtransport (35, 36).

2.2.2. Surfactant als Komponente alveolärer Schutzmechanismen

Das gespreitete Surfactant bildet auf der luminalen Oberfläche der Alveolen einen monomolekularen Film aus (37), wobei ca. 50 mm^3 Surfactant pro Quadratmeter in der Alveole oberflächlich aufliegen (1). Bei der In- und Expiration reduziert das Surfactant die Oberflächenspannung an der Grenzfläche zwischen Luft und Gewebe (38). Die amphiphile Struktur des Lecithins und des Phosphatidylglycerols sind der wesentliche Faktor für die Entwicklung der oberflächenaktiven Wirkung des Surfactant (39). Die "Antikollapsfunktion" des Surfactant ist auf die chemische Struktur des Bi- und Multilayers zurückzuführen (40). Durch diese ist die Stabilität und Integrität der Alveole, aber auch der Bronchiolen gewährleistet (41).

Als Grenzfläche bezeichnet man die Trennfläche zwischen zwei festen, flüssigen und gasförmigen Phasen. Wenn zur Vergrößerung der Oberfläche einer Flüssigkeit eine Trennung der Phasen stattfinden soll, muss gegen die wirkenden Kohäsionkräfte der vorhandenen Moleküle Arbeit geleistet werden. Diese Kräfte wirken sich auch auf das Innere einer Phase aus (42). Beim Transport der Moleküle aus dem Phaseninneren muss Energie aufgewendet werden. Die Moleküle an der Grenzfläche besitzen eine höhere potentielle Energie, als die

Moleküle im Phaseninnern (43). Synonyme dieser Energie sind die Grenzflächenspannung oder die Oberflächenspannung. Die Oberflächenspannung kann demnach als Formel ausgedrückt werden. Hierbei entspricht die Oberflächenspannung der Arbeit, die pro Flächeneinheit bei der Trennung zweier Flüssigkeiten zur Vergrößerung einer Oberfläche geleistet werden muss (44).

Die Position der energiereichen grenzflächigen Hypophasen nimmt das von den Alveolarepithelzellen produzierte Surfactant durch seinen Spreitungsdruck ein. Dies bewerkstelligt das Surfactant in dem es sich auf der Hypophase, wie ein Tropfen Öl auf einer Wasseroberfläche, ausbreitet (45). Diese Funktion des Surfactant wird durch seine amphiphile Struktur ermöglicht. Die amphiphile Struktur entsteht durch eine hydrophile Gruppe an einem Ende des Surfactantmoleküls und einer hydrophoben Gruppe am anderen Ende (46,47).

Die Oberflächenspannung ist durch folgende Eigenschaften charakterisiert (48):

- sie nimmt mit wachsender Temperatur ab,
- sie kann durch Zu- und Abnahme von Energie verändert werden,
- sie versucht stets Minimalflächen zu bilden.

Die Entwicklung einer Lungenatmung mit dem Prinzip des alveolären Gasaustausches war in der phylogenetischen Entwicklung nur durch die Bildung der oberflächenaktiven Phospholipide möglich, die zur Reduktion der Oberflächenspannung in den Lungenalveolen führten (49).

Mit dem Abnehmen des Durchmessers werden die Adhäsionskräfte, die auf die Alveolen wirken, bei der Expiration immer größer. Die Adhäsionskraft führt zur Reduktion der Grenzfläche zwischen Alveolarwand und Luft. Dies soll den Krümmungsradius im Alveolarepithel ausgleichen. Ein erhöhter Dehnungswiderstand wirkt bei der Inspiration auf die Lunge ein, während bei den Expirationphasen Retraktionskräfte entstehen, die sich auf das Parenchym auswirken (50).

Die Oberflächenspannung die zu einer Oberflächenverkleinerung führt erzeugt einen in-

traalveolären Druck (P), der eine Kompression der Atemluft erzeugt. Dieser Druck ist proportional der Oberflächenspannung (OSP) und umgekehrt proportional dem Krümmungsradius (r) der Alveole.

Diese Beziehung lässt sich nach dem *Laplace-Gesetz* für die kugelige Tropfenform zusammenfassen mit der Formel (1):

$$P=2*OSP/R$$

Der Druck (P) kann auch als Kollapsdruck bezeichnet werden, da er die Retraktion der Alveolen begünstigt. Die Wirkung der oberflächenaktiven Substanzen verringert sich bei Dehnung, bei Retraktion nimmt diese jedoch erheblich zu wodurch, die Oberflächenspannung sinkt (51, 52).

Auch zur Stabilisierung der peripheren Anteile des Bronchialsystems trägt die Oberflächenspannung aus der Alveole bei (53). Histologisch weist die Bronchialwand in diesen Abschnitten kein Knorpelgerüst auf. Sie besteht aus dem Bronchialepithel der Bronchiolen, aus einer lockeren, gefäßführenden Bindegewebszone und einer Schicht aus glatter Muskulatur (5). Nur durch die Mitwirkung des Surfactant, bei der Regulierung der Oberflächenspannung der Bronchiolen, wird eine Anpassung der Lichtungsweite in der Inspirations - und der Expirationsphase in diesen Arealen ermöglicht.

Das Surfactant ist nicht allein durch die Reduktion der Oberflächenspannung in der Alveole eine wichtige Komponente alveolärer Schutzmechanismen (54).

Ständig ist das Alveolarsystem der Lunge durch die inhalierte Luft und über die Gefäße der Einwirkung infektiöser und toxischer Agenzien ausgesetzt (55). Das Alveolarsystem kann nur dann funktionieren, wenn Abwehrmechanismen aufgebaut werden, die die Wirkung pathogener Agenzien neutralisieren können (56).

Das Surfactant stellt im Alveolarsystem, im Rahmen der ortsständigen Abwehrmechanismen, eine wichtige Teilkomponente dar (57). Es bildet eine gleichmäßige Schicht, die das gesamte Alveolarepithel bedeckt. Dadurch kann die Adhäsion partikulärer Bestandteile aus der

Atemluft verhindert werden (58, 59). Auf diese Weise entsteht ein Schutzmechanismus des Alveolarepithelzellverbandes, der ein Eindringen infektiöser Agenzien, wie Bakterien und Viren, in die Alveole verhindert (60, 61).

Weiterhin wird durch die zyklischen Veränderungen der Oberflächenspannung, während der Inspirations- und Expirationsphase der Atmung, ein atemabhängiger Clearancemechanismus unterhalten. Auf diese Weise werden Partikel aus der Alveole in das Bronchialsystem transportiert, und so mit dem Sekretstrom nach außen abgegeben (62).

Aus bronchoalveolären Lavagen lassen sich im Surfactant, durch Methoden der Zentrifugation, verschiedene Apoproteine nachweisen. Diese werden als Bestandteil der körpereigenen Abwehr aufgefasst (63, 64).

Weiterhin reguliert das Surfactant die Zahl der in die Alveolen einwandernden Makrophagen. Bereits in der postnatalen Phase dokumentiert sich diese Surfactantfunktion, indem durch die Makrophagen das im Überschuss vorhandene Surfactantmaterial eliminiert wird (65,66).

Aus *in vitro* Untersuchungen von Lavageflüssigkeiten mit biochemisch definiertem Surfactantanteil geht hervor, dass Surfactant direkt mit Bakterien reagiert. Aufgrund dieser Wirkungsweise charakterisiert es sich als direkter Faktor der lokalen Abwehr (65).

Bakterien, die in den Alveolarraum eingedrungen sind, wie z.B. Staphylokokken, werden von Surfactant eingehüllt (Precoating der Bakterien) und so unschädlich gemacht. Durch dieses Precoating wird die Phagozytoseleistung der Makrophagen gesteigert und der intrazelluläre Abbau der Bakterien in den Makrophagen signifikant erhöht (60).

Schutzfunktion des Surfactant:

1. Abdeckung der Zellmembran des Alveolarepithels
2. Oponierung von Bakterien
3. Einhüllung anorganischer Staubteilchen
4. Zyklische Veränderungen der Oberflächenspannung
=>Clearance der Alveole
5. Aktivierung der Alveolarmakrophagen

Tabelle 2: Schutzfunktion des Surfactant

2.2.3. Morphologie des Surfactant im Alveolarsystem

Das morphologische Substrat des Surfactant im Alveolarsystem kann elektronenmikroskopisch als Auflage einer Doppelflüssigkeitsschicht über dem Alveolarepithel beschrieben werden (67).

Direkt an der Zellmembran liegt eine lockere Basisschicht von verschiedener Dicke den Alveolarepithelzellen an. So werden Unebenheiten auf der Epitheloberfläche ausgeglichen (68).

Über dieser Schicht findet sich an der Luft-Flüssigkeitsgrenze ein dünner, fester Oberflächenfilm. Dieser Film bildet eine Basisschicht, welche die Region zwischen den Zellmembranen und dem Oberflächenfilm ausfüllt. Der Oberflächenfilm ist mehr oder weniger kontinuierlich und einheitlich. Die Basisschicht ist homogen und enthält osmiophile Einschlüsse unterschiedlicher Dicke (69).

An der luminalen Oberfläche der Grenzfläche zur Alveolarluft liegen die Flüssigkeitsmoleküle der Hypophase. Diese enthalten, energetisch betrachtet, eine höhere Energie als die Flüssigkeitsmoleküle im Inneren der Hypophase. Die Grenzflächenspannung ist auf diese energiereichen Oberflächenmoleküle an der Grenzfläche der alveolären Hypophase zurückzuführen (20, 22)

Diese Grenzflächenmoleküle versuchen, einen weniger energiereichen Zustand einzunehmen. In der alveolären Hypophase besteht, aufgrund der Oberflächenspannung, die Tendenz zur Tropfenbildung. Bekanntermaßen stellt die Tropfenform die energetisch günstigste Form jeder Flüssigkeit dar, da der Tropfen die größte Flüssigkeitsmenge im Verhältnis zu seiner Oberfläche und somit zur Anzahl seiner grenzflächenaktiven Moleküle beinhaltet (70).

Wie bereits erwähnt, nimmt das Surfactant die Position der energiereichen und grenzflächigen Hypophase durch seinen Spreitungsdruck ein. Dafür breitet es sich auf der Hypophase wie ein Tropfen Öl auf einer Wasseroberfläche aus. Diese Eigenschaft des Surfactant erklärt sich durch seine chemische Struktur. Diese weist einen amphiphilen Charakter, mit einer hydrophilen Gruppe an einem Ende des Moleküls und einer hydrophoben Gruppe am anderen Ende, auf (71).

Durch die Anwesenheit dieser hydrophilen Gruppe in der Struktur des Surfactant entsteht der Spreitungsdruck, der die Grenzflächenenergie der Hypophase verringert (72).

Dieser Hypophase liegt das Surfactant mit seiner hydrophilen Seite auf und bildet so die Grenzfläche zum Alveolarlumen (siehe oben).

Eine Doppelschicht hydrophiler Moleküle, mit dazwischen liegenden hydrophoben Molekülen, bildet so eine geschlossene Membran (73).

Auch das Surfactant strebt eine energetisch günstige Form an, wenn es nicht gespreitet wird. Wenn genügend Surfactant auf der Oberfläche der Alveolen ausgebreitet ist und kein passender Untergrund für die Spreitung vorhanden ist, fällt das Surfactantmaterial aus (74). Wie für jede andere Flüssigkeit stellt die Tropfenform für das Surfactant die energetisch günstigste Form dar (75).

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen gleichen diese Surfactantkugeln kreisrunden Flächen oder Löchern. Durch das Präparieren des Materials in den Ultradünnschnittpräparaten sind die Surfactantkugeln nur noch als Kugelabschnitte sichtbar (67). Auch bei dieser Form des Surfactant ist die molekulare Anordnung so, wie beim gespreiteten Surfactant (76). Betrachtet man die Alveole als Ganzes, ist diese von einer großen Surfactantkugel ausgegossen. Diese drückt die Hypophase in Nischen und Krypten, die durch Typ₂-Zellen ausgebildet werden (77).

Zusammenfassend können dem Surfactant in der Alveole folgende Aufgaben zugeordnet werden:

- Surfactant muss an die Hypophasenoberfläche gelangen und deren Grenzfläche ersetzen. Dadurch sinkt die Oberflächenspannung in den Alveolen.
- Surfactant erhält eine Restoberflächenspannung, die eine alveoläre Expiration ohne deren Kollaps ermöglicht.
- Durch den Spreitungsdruck des Surfactant wird die Hypophase “dünn gedrückt“, um so den alveolären Gasaustausch zu erleichtern.

- Surfactant schützt die alveoläre Hypophase vor der Austrocknung. Durch den intensiven Gasaustausch würde die Alveole schnell austrocknen und könnte von exogenen Noxen direkt angegriffen werden. Dem Surfactant kommt so auch eine Abwehrfunktion zu.
- Schutzfunktionen, die das Surfactant für die alveoläre Abwehrmechanismen aufbaut (siehe Tabelle 2)

2.3. Bestandteile der epithelialen Barriere als Transdifferenzierungsmarker von Alveolarepithelzellen

2.3.1. Aufbau und Funktion der Na^+/K^+ -ATPase

Eine wichtige Aufgabe der Alveolarepithelzellen besteht darin, überschüssige Flüssigkeit aus den Alveolen zu transportieren und so den Gasaustausch zu gewährleisten (78). Es handelt sich um komplexe Mechanismen, die für die Einhaltung des Gleichgewichts zwischen alveolär- interstitieller und der intravasalen Flüssigkeit verantwortlich sind. Dabei finden sich neben *passiven* Transportmechanismen, auch Mechanismen des *aktiven* Transportes (79).

Die Na^+/K^+ -ATPase liegt von basolateral den Alveolarepithelzellen an (80). Apikal weisen die Zellen einen Amilorid-sensitiven Na^+ -Kanal auf (81). Die Na^+/K^+ -ATPase spielt eine zentrale Rolle beim vektoriellen Transport von Na^+ -Ionen. Sie hält einen transzellulären, elektrischen Gradient aufrecht, der durch den gegenseitigen Transport von Na^+ - und K^+ -Ionen entsteht (82). Dieser aktive Transport kommt durch die Hydrolyse von ATP zustande.

Die Na^+/K^+ -ATPase ist ein heterodimeres Protein, welches aus zwei Untereinheiten, der α - und der β -Untereinheit, besteht. Die ATP-Bindungsstelle befindet sich an der katalytischen α -Untereinheit (83). Es sind drei Isoformen dieser α -Untereinheit bekannt: α_1 , α_2 und α_3 . Jede Isoform zeigt eine differierende Na^+ -Affinität und eine ungleiche Organverteilung. Ebenso existieren drei Isoformen der β -Untereinheit, von der man annimmt, sie sei für die Membranintegration der α -Untereinheit verantwortlich (84).

Bei den Typ₂-Zellen der Lunge findet sich hauptsächlich die α_1 - sowie die β_1 -Isoform. Demgegenüber ist die α_2 -Isoform bei den Typ₁-Zellen zu finden. Die übrigen Isoformen (α_3 , β_2 und β_3) sind in der Lunge nicht vertreten (85).

Infolgedessen eignet sich die Analyse des Verteilungsmusters der α_1 -/ α_2 - Isoformen zur Charakterisierung der Alveolarepithelzelltypen.

2.3.2. Der Widerstand im epithelialen Zellverband der Alveolarepithelzellen

Der epitheliale Widerstand ist eine Größe, die als Ausdruck eines funktionierenden zellulären Monolayers zu bewerten ist (86). Aufgrund der ausgebildeten interzellulären Kontakte kann durch das Epithel ein elektrischer Strom fließen (87). Nach dem Ohmschen Gesetz ist der dabei auftretende elektrische Widerstand direkt proportional zur Spannung (U) und umgekehrt proportional zur Stromstärke (I) (88).

Daraus folgt, dass bei Messung des epithelialen Widerstandes, bei definierter Spannung und Stromstärke, eine qualitative Aussage über das vorliegende Epithel, anhand des Vergleichs des gemessenen Widerstandes(89), möglich ist. So kann bei epithelialen, konfluierenden Zellverbänden (z.B. Typ₁-Zellen) ein hoher epithelialer Widerstand gemessen werden, während Zellen, die nicht zur Ausbildung eines solchen Monolayers neigen (Typ₂-Zellen), niedrige epitheliale Widerstände aufweisen (86).

Auf dem Hintergrund des epithelialen Charakters von Typ₁-Zellen lässt sich durch dieses Verfahren eine Aussage über den Hauptanteil des vorliegenden Zelltyps der Alveolarepithelzellen, im untersuchten Well, formulieren (82).

Da die Typ₂-Zellen eine kuboidale Zellform aufweisen (10) und vorwiegend vereinzelt vorkommen (7), ist bei ihnen die Fähigkeit einen epithelialen Monolayer, mit den dafür nötigen Zellkontakten aufzubauen geringer ausgeprägt, als bei den Typ₁-Zellen (90). Aus diesem Grund fällt bei den Typ₂-Zellen der epitheliale Widerstand rasch ab.

2.4. Differenzierung von Alveolarepithelzellen

2.4.1. Transdifferenzierung der Typ₂-Zellen

Typ₂-Zellen gelten als potente Zellen, die in der Lage sind zu proliferieren, und sich zu Typ₁-Zellen zu differenzieren (7). Die Typ₁-Zellen hingegen stellen das Endstadium der Differenzierung dar. Der Vorgang der Differenzierung von einer hoch differenzierten Zelle, wie der Typ₂-Zelle zu einer weniger differenzierten Zelle (Typ₁-Zelle), bezeichnet man auch als Transdifferenzierung (8).

Der Vorgang der Transdifferenzierung stellt einen wichtigen physiologischen Prozess dar, der es den Typ₂-Zellen ermöglicht, im Falle einer Schädigung des Alveolarepithels, dieses durch reparative und proliferative Prozesse zu ersetzen (7).

Bei Primärkulturen von Typ₂-Zellen, die *in vitro* kultiviert werden, kann man nach einer gewissen Zeit eine Transdifferenzierung beobachten. Die Zellen zeigen nach dieser Transdifferenzierung einen Verlust von Typ₂-zellspezifischen Charakteristika (z.B. Verlust der kuboidaler Zellform und der Lamellarkörper) (91). Diese Beobachtungen bestätigen den Vorgang der Transdifferenzierung von Typ₂-Zellen auch *in vitro*, die in diesem Zusammenhang auch als Dedifferenzierung bezeichnet werden kann.

2.4.2. Einfluss von Air-Liquid-Interphase auf die Differenzierung

Ein wesentliches Problem bei der Kultivierung von Typ₂-Zellen lag bisher in der Dedifferenzierung der Zellen und dem Verlust ihrer sowohl morphologischen als auch metabolischen Charakteristika (92). Aus diesem Grund scheiterte in der Vergangenheit auch die Kultivierung von spezialisierten Zellen anderer Organsysteme immer wieder an mangelnden Zellkulturmodellen, die es unmöglich machten, diese Zellen über einen längeren Zeitraum auf ihrem Differenzierungsniveau zu erhalten.

Aus dieser Notwendigkeit heraus entstand das Air-Liquid-Interphasemodell, welches für differenzierte Zellen auch anderer Organsystemen zur Verfügung steht (93). Mit diesem neuartigen Zellkulturmodell ist es möglich, spezialisierte Zellen über einen längeren Zeitraum (ca. drei Wochen) in Kultur zu erhalten, ohne einen Verlust ihrer zellspezifischen Besonderheiten zu bewirken.

Wir nutzten für unsere Experimente mit den Typ₂-Zellen das Air-Liquid-Interphasemodell, da es zur Zeit das einzige Zellkulturmodell ist, welches ein *in vitro* -Modell der Alveole darstellt, in dem Typ₂-Zellen ihre Charakteristika für die Dauer der Kultivierung konservieren können (94).

2.4.3. Surfactantsekretion und Surfactantproteine als Differenzierungsmarker der Zellen

Surfactant ist eine aus Lipoproteinen bestehende, oberflächenaktive Substanz, die zur Reduktion der Oberflächenspannung in der Alveole dient (17, 44). Dadurch wird die Retraktionstendenz der Alveole antagonisiert und das Surfactant unabdingbar für jeden Atemzug (siehe auch 2.2.3.) (42, 43). Surfactant besteht zum größten Teil aus Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), welches ein gesättigtes Glycerophospholipid ist und über eigene oberflächenaktive Eigenschaften verfügt (35, 39). Es bildet eine die Alveole auskleidende Schicht aus (58, 59).

Die Typ₂-Zellen synthetisieren lungenspezifische, surfactantassoziierte Proteine, SP-A, SP-B, SP-C und SP-D, welche als kleinste Teilkomponente des Surfactant (<10%) eine Reihe wichtiger Aufgaben besitzen (26, 27). Bestandteile dieser Proteine sind für die Entstehung eines Bilayers verantwortlich (Lipoproteinkomplexe), der aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften dem Monolayer (DPPC) anliegen kann (45). Die Surfactantproteine unterscheiden sich sowohl in ihrer chemischen Beschaffenheit, als auch in ihren Aufgaben (26). SP-A und SP-D stellen große wasserlösliche Polypeptide dar, während SP-B und SP-C lipophile, kleine Polypeptide sind (28-31).

Das SP-A liegt als 18-mer einer 26kDa Polypeptidkette vor, welches zusätzlich Oligosaccharide am N-Terminus aufweist (28). Gemeinsam mit SP-B wird das SP-A für die Konversion von sezerniertem, endogenem Surfactant zu tubulärem Myelin im Alveolarepithelzellverband benötigt (38). Ferner ist SP-A an der Regulation der Surfactantsekretion und Surfactantreutilisation durch Typ₂-Zellen beteiligt (36). Es wird angenommen, dass diese Funktionen des SP-A rezeptorvermittelt sind (95).

Das SP-D besteht aus einem 12-mer einer 39kDa Polypeptidkette und ist ein kollagenes Glykoprotein mit struktureller Ähnlichkeit zum C-Typ Lektin (31). Sowohl das SP-A, als auch das SP-D stimulieren Alveolarmakrophagen und beteiligen sich somit als Opsonine an der lokalen Immunabwehr (54).

Das SP-B ist ein aus 79 Aminosäuren bestehendes hydrophobes Polypeptid, welches drei intramolekulare Disulfidbrücken aufweist. Es liegt vorwiegend als Dimer vor und ist stark positiv geladen (70). SP-B beseitigt selektiv anionische und ungesättigte Lipide aus dem alveolären Oberflächenfilm (32).

Das SP-C ist ebenfalls ein hydrophobes Polypeptid und besteht aus 35 Aminosäuren. Es liegt überwiegend in einer alpha-helikalen Struktur vor, an der kovalent Palmitoylgruppen gebunden sind (30). Die alpha-helikale Struktur des SP-C führt zu einem Eintauchen dieses Surfactantproteins in den Surfactantbilayer. Es steigert die Adsorption der Lipide aus dem Bilayer und die Formation dieser zu einem interphasischen Monolayer, der sich dem Bilayer anlegen kann (45).

Die Surfactantsekretion ist ein sehr komplex regulierter Prozess, der durch voneinander unabhängige Mechanismen initiiert werden kann (Oberflächenrezeptoren, Signalkaskaden, usw.) (13). An diesen komplexen Regulationsmechanismen beteiligen sich die Surfactantbestandteile im Sinne einer Feedbacksteuerung selbst. SP-A und DPPC können die Surfactantsekretion inhibieren und so im Falle eines Überangebots die Surfactantsekretion bremsen (96, 97). So spielen die Surfactantproteine, trotz ihres geringen Anteils am Surfactant, eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung und Regulation des Surfactantsystems (21).

2.4.4. Stellenwert der extrazellulären Matrix (Typ I Kollagen) bei der Kultivierung von Alveolarepithelzellen Typ II

Ein weiterer elementarer Faktor bei der Konstruktion eines *in vitro* Alveolarmodells ist das verwendete extrazelluläre Matrixprotein (91). Typ₂-Zellen stimulieren die Typ I Kollagen-Sekretion aus Fibroblasten, wahrscheinlich durch die Synthese von Wachstumsfaktoren (98). Demnach ist der physiologische Bezug eines solchen *in vitro* Modells zur extrazellulären Matrix das Typ I Kollagen (99).

Typ₂-Zellen, die nicht auf Typ I Kollagen kultiviert werden, sondern auf Plastik, verlieren ihre Typ₂-zellspezifischen Differenzierungsmarker früher als die Zellen, die auf Typ I Kollagen kultiviert werden (94). D.h. die Kollagenmatrix wirkt der Dedifferenzierung der Zellen entgegen (100).

2.5. Inflammatorischer Einfluss exogener Stimuli auf das Alveolarepithel

2.5.1. Lipopolysaccharid (LPS)

Lipopolysaccharide sind Bestandteile der Zellwand von gramnegativen Bakterien. Das LPS ist in der äußeren Schicht der äußeren Membran der Bakterien verankert. Es besteht aus dem *Lipid A*, dem *Kernpolysaccharid* (Core) sowie einer *O-spezifischen Polysaccharidkette*. Es wird auch als Endotoxin bezeichnet (101). Das durch die Bakterien in die Alveole eingebrachte LPS führt bei Alveolarepithelzellen, insbesondere den Typ₂-Zellen, zu einer Freisetzung von TNF- α (102).

2.5.2. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

Das TNF- α ist ein Zytokin, welches von Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen sezerniert wird. Zielzellen für das TNF- α sind Granulozyten, Gewebezellen und

Makrophagen. Es besitzt ein Molekulargewicht von 50 000 (103).

Bei Entzündungsreaktionen in der Lunge wird TNF- α auch von Typ₂-Zellen liberiert (102). Es führt zu einer Sekretion von Chemokinen und Zytokinen, die ebenfalls von Typ₂-Zellen synthetisiert werden und die zur Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen führen (104). In diesem Zusammenhang spricht man auch von einer autokrinen Schleife, die bei ablaufenden inflammatorischen Prozessen in der Alveole zu einer Schädigung der Lungen führt (65,104).

Für die vorliegende Arbeit wurde TNF- α im Rahmen seiner inflammatorischen Rolle, als potenter Stimulus zur Induktion inflammatorischer Reaktionen der Alveolarepithelzellen verwendet. Aufgrund der immunologischen Antwort der so behandelten Alveolarepithelzellen ist eine Differenzierung zwischen Typ₁- und Typ₂- Zellen möglich (siehe hierzu 2.6.).

2.5.3. Interleukin-1 (IL-1)

IL-1 ist ein Zytokin mit einem Molekulargewicht von 17500. Es wird von vielen Zellen des Immunsystems synthetisiert (z.B. Endothelzellen, B-Zellen, und Makrophagen) (105). IL-1 stimuliert B- und T-Zellen und induziert so Entzündungsreaktionen, bei denen es zur Produktion von Prostaglandinen und katabolen Enzymen (z.B. Kollagenase) kommt (106).

In der Lunge führt das IL-1 zur Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, sowie zur Stimulation der Lymphozytenaktivierung. Es wirkt proliferativ auf Fibroblasten ein. Somit erhält das IL-1 als Chemokin, welches für die Entwicklung inflammatorischer Reaktionen in der Lunge verantwortlich ist, eine zentrale Rolle bei der Pathogenese des ARDS (107).

Das IL-1 wurde für die vorliegende Arbeit als Stimulus zur Untersuchung des inflammatorischen Verhaltens von Alveolarepithelzellen ausgewählt, da IL-1, im Rahmen von Entzündungsreaktionen, zur Freisetzung von Zytokinen aus den beteiligten Zellen führt (106). Somit kann, aufgrund der Zytokinfreisetzung nach IL-1- Inkubation, eine Aussage über die Immunkompetenz der untersuchten Zellpopulation gemacht werden. Daraus kann auf den Differenzierungsgrad der Zellen geschlossen werden (siehe 2.6.).

2.6. Chemotaktische Proteine, die von Alveolarepithelzellen synthetisiert werden

Akute und chronische Lungenerkrankungen sind durch die Präsenz von aktivierten Makrophagen und anderen Entzündungszellen gekennzeichnet. Diese Makrophagen werden hauptsächlich aus dem Pool peripherer Monozyten des Blutes rekrutiert (63). Der chemotaktische Gradient für diese Rekrutierung wird von immunkompetenten Zellen hergestellt, zu denen auch die Typ₂-Zellen gerechnet werden.

Typ₂-Zellen sind ebenfalls in der Lage bioaktive Faktoren zu produzieren, die eine inflammatorische Situation initiieren und unterhalten können (66).

Von verschiedenen Agenzien ist bekannt, dass sie Typ₂-Zellen zur Produktion inflammatorischer Zytokine induzieren. Zu diesen Zytokinen gehören CINC (cytokin-induced neutrophil chemoattractant), INF (Interferone), IL (Interleukine, insbesondere IL-1 und IL-6), *MIP-2* (Makrophagen-inflammatorisches Protein-2), *MCP-1* (Monozyten-chemotaktisches Protein-1), u.a. (108).

2.6.1. Physiologische Funktion des Monozyten-chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1) im Alveolarepithelzellverband

Das MCP-1 ist ein chemotaktisches Polypeptid, welches aus 33 Aminosäuren besteht. Es ist reich an Arginin und Cystin und besitzt ein Molekulargewicht von 14-15 kDa. MCP-1 wird zu den kationischen Proteinen gezählt (109).

Die mRNA-Expression von MCP-1 kann in Typ₂-Zellen durch verschiedene Stimuli induziert werden. Dazu gehören Lipopolysaccharid (LPS), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), u.a. Alveolarmakrophagen können ebenfalls MCP-1 produzieren. MCP-1 wirkt chemotaktisch und aktivierend auf die im Blut zirkulierenden Monozyten. So kommt es zur Akkumulation von mononukleären Phagozyten in der Alveole. Ferner interagiert MCP-1 mit der Zellwand der Erreger, indem es bei gramnegativen Bakterien an LPS bindet (110).

Auf diese Weise wird die Permeabilität der Zellwand gesteigert und die Integrität der Erreger gestört. Außerdem verstärkt es die Phagozytoseleistung der Alveolarmakrophagen und wirkt folglich als Opsonin.

MCP-1 beteiligt sich an der antimikrobiellen Wirkung anderer kationischer, chemotaktischer Proteine. Durch die Sekretion von MCP-1 und anderer chemotaktischer Proteine nehmen die Typ₂-Zellen eine wesentliche Rolle im Verlauf entzündlicher Prozesse der Lunge ein (109).

2.6.2. Einfluss des Makrophagen-inflammatorischen Proteins-2 (MIP-2) auf Alveolar-epithelzellen

Das MIP-2 wurde erstmals aus einer Makrophagenzelllinie von Mäusen gewonnen und gereinigt. Es handelt sich dabei um ein 7,9-kD messendes Peptid, welches, durch Endotoxin induziert, von Entzündungszellen produziert wird. Das MIP-2 zeigt eine dosisabhängige, chemotaktische Wirkung auf polymorphkernige, neutrophile Granulozyten (PMN) (111). Diese Wirkung des MIP-2 ist auch in der Lunge verschiedener Tiermodelle beschrieben worden. So wurde in diesen Modellen, nach intratrachealer Instillation von *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas Aeruginosa*, LPS oder verschiedener Staubpartikel, eine Erhöhung der messenger RNA (mRNA) - und der Proteinexpression von MIP-2 festgestellt (112).

Folge einer erhöhten MIP-2- Expression ist eine Infiltration des Parenchyms und der interstitiellen Räume der Alveole mit polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (111). Somit nimmt das MIP-2 bei der Chemotaxis von Entzündungszellen, im Rahmen akuter inflammatorischer Prozesse in der Lunge, ebenso wie das MCP-1, eine zentrale Rolle ein.

2.7. Hypoxie und ihre Folgen für die Lunge

Weite Bereiche der zellulären Prozesse werden durch Veränderung des Sauerstoffpartialdrucks beeinflusst. Klinisch finden sich solche Veränderungen des herrschenden Sauerstoffpartialdrucks, insbesondere bei der Sepsis (113). Hypoxie als Ausdruck eines inadäquaten Sauerstoffangebotes beeinflusst auch die Lunge. Der hypoxiebedingte Untergang von Typ₂-Zellen im Rahmen eines ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) führt zum akuten Organversagen der Lunge (114).

Bei Hypoxie, im Rahmen eines akuten Lungenversagens, ist der Mangel an Surfactant ein maßgeblicher pathogenetischer Faktor (115).

Die Gründe für diesen Mangel können vielfältig sein (Aspiration, Schockzustand, etc.) (116).

Ziel dieser Arbeit war es, auch die Alveolarepithelzellen hinsichtlich ihres Verhaltens unter Hypoxie zu studieren, um so Rückschlüsse auf die *in vivo* ablaufenden Prozesse im Krankheitsbild des ARDS zu gewinnen. Die Ergebnisse dieser Studien sollen ein Beitrag, zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, bei der Behandlung des akuten Lungenversagens leisten.

2.8. Fragestellung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Frage nach den Auswirkungen einer Air-Liquid-Interphase auf den Differenzierungsgrad von Alveolarepithelzellen.

Marker, die für den Differenzierungsgrad der Zellen charakteristisch sind, sollten herausgearbeitet werden, um so den kausale Zusammenhang zwischen Kultivierungsverfahren der Zellen und deren Transdifferenzierungstendenz zu demonstrieren.

Hierfür wurden insbesondere die Charakteristika der Typ₂-Zellen analysiert. Auf diese Weise sollte der Nachweis einer möglichen Konservierung der Typ₂-Zellmorphologie und ihrer Fähigkeiten (Surfactantsynthese, Surfactantsekretion, inflammatorisches Verhalten, etc.) im Air-Liquid-Interphasemodell erfolgen.

Hierfür wurden die Zellen auf speziellen kollagenbeschichteten Transwells kultiviert. Mit Hilfe dieser Transwells wurde es möglich die Zellen von basal mit Medium zu versorgen, bei gleichzeitiger apikaler Exposition an Luft (Air-Phase).

In einem anderen Modell wurde den Zellen zusätzlich zu dem basalen Medium auch von apikal Medium zugesetzt, sodass diese Zellen vollständig mit Medium versorgt waren (Liquid-Phase).

Um den Differenzierungsgrad der Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierung zu beurteilen, wurden die Zellen sowohl auf morphologische als auch auf funktionelle Gesichtspunkte hin geprüft.

Abschließend kultivierten wir die Zellen unter hypoxischen Bedingungen, um die Auswirkungen der Hypoxie auf den Differenzierungsgrad zu untersuchen.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Welche Auswirkungen hat das Air-Liquid-Interphasemodell auf den Differenzierungsstatus von Typ₂-Zellen (funktionelle und morphologische Gesichtspunkte)?
 2. Was hält bei der Primärkultur von Typ₂-Zellen, die Surfactanthomöostase der Zellen aufrecht und mit welcher Potenz wirken sich verschiedene Sekretagoga auf die Surfactantsekretion aus?
 3. Auf welche Weise verändert sich der elektrische Widerstand der Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierungsmethode?
 4. Wie verändert sich das inflammatorische Verhalten durch die unterschiedliche Kultivierungsweise der Typ₂-Zellen und wo liegen die Ansatzpunkte für eine Antagonisierung der beobachteten Zytokinexpression?
 5. Wie weit lässt sich das erstellte Zellkulturmodell auf Typ₂-Zellen übertragen, die in Hypoxie kultiviert wurden und welchen Effekt hat die Hypoxie auf den Vorgang der Transdifferenzierung?
-

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Inkubationsmedien und Zellkulturmaterial

- Adenosintriphosphat (ATP), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Antibiotika (Gentamycin) lyophilisiert, carbonatgepuffert, steril, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Aqua tridestillata – im Milli Q Wasseraufbereitungssystem, Millipore (Eschborn, Deutschland) entionisiert und filtriert
- Kollagen, TypI, Rat Tail, Collaborative Biomedical Products, Bedford (U.S.A.)
- Kollagen, TypI, Bovine, Collaborative Biomedical Products, Bedford (U.S.A.)
- D-[+]-Glucose, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- DMEM: Dulbecco's modified Eagle Medium Gibco; (Karlsruhe, Deutschland)
- FCS, fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56°C, steril filtriert, PAA, (Linz, Österreich)
- Filter (0,2 µm), Nalgene (Hereford, U.K.)
- Gasgemisch 10 % CO₂, 1 % O₂, Messer - Griesheim (Siegen, Deutschland)
- Glove – Bags, Roth GmbH, (Karlsruhe, Deutschland)
- Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) (10x), 100 ml, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Hypoxiekammer, Merck GmbH (Frankfurt, Deutschland)
- Immunglobulin G (Ratten- IgG, lyophilisiert; Sigma, U.S.A.)
- Keratinocyte Growth Factor (KGF), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- L-Glutamin, Gibco, (Karlsruhe, Deutschland)

- Lipid-Farbstoff Phosphin 3R, ICN Flow Biochemicals (Mannheim, Germany)
- Natronlauge (1N NaOH), Merck, Darmstadt (Deutschland)
- Objektträger aus Polystyren mit je 8 Kammern für die Extraktion der Sekretionsversuche Nunc, (Biebrich, Deutschland)
- Transwell - Clear, 12-well-Platten: 12 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße, Corning Costar Corporation (Cambridge, USA)
- Trypsin-EDTA-Lösung, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Ultrosor G, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)

3.2. Pharmaka und Agenzien

- A 23187 (Calciumionophor), Chalbionchem – Novabiochem (Bad Soden, Germany)
- Anti-CD-14 monoklonale Antikörper, Coulter Klone
- Anti-TNF- α monoklonale Antikörper
- BSA (Bovines Serum Albumin, fettsäurefrei, lyophilisiert), Paesel und Lorei (Frankfurt, Deutschland)
- Calciumchlorid, "cell culture tested", Sigma (Deisenhofen)
- Chloroform (CHCl₃), pro analysi, Fluka AG (Bern, Schweiz)
- 5-Carboxy-Fluoreszeindiacetat (5-CFDA), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Diethylether (C₂H₅-O-C₂H₅) destilliert in Glas, pro analysi, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Desoxyribonuklease I (DNAse I) Typ DN 25, lyophilisiert, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Di-Natriumhydrogenphosphat "cell culture tested", Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

- Ecoszint, Szintillatoremulsion, Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- EGTA (Chelator mit erhöhter Calcium-Selektivität), Ethylenglycol-bis-(2-amino-äthyläther)-N,N-tetraessigsäure pro analysi, Serva Feinbiochemica, (Heidelberg, Deutschland)
- Elastase Typ EC 134 aus Schweinepankreas, chromatographisch gereinigt, salzfrei, lyophilisiert, wasserlösliches Pulver, spezifische Aktivität 135 U/mg Protein (Orcein-Elastin), Elastin Products Company, (St. Louis, Missouri, U.S.A.)
- Erythrosin B, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol pro analysi, J.T. Baker Chemicals (Deventer, Holland)
- Glucose "cell culture tested", Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- ³H-methyl-Cholin (spez. Aktivität 1 GBq/mmol) in Ethanol, Amersham-Bucher (Dreieich, Deutschland)
- Haematoxylin, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Hank's balanced salt solution; Gibco (Parsley, Schottland)
- HEPES (Gewegekulturrpuffer) N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulphonsäure „für Zellkultur getestet“, Roth GmbH, (Karlsruhe, Deutschland)
- Isotonische Kochsalzlösung und Ringerlösung, steril und pyrogenfrei, Braun KG (Melsungen, Deutschland)
- Interleukin-1, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Kaliumchlorid-Lösung 100 mM, Merck AG, (Darmstadt, Deutschland)
- Kaliumchlorid, "cell culture tested", Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Lactat Dehydrogenase-Test (LDH-Test), Boehringer (Mannheim, Deutschland)
- LPS, Lipopolysaccharid von Salmonella Typhimurium, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

- Liquemin N 25.000 (Antikoagulans) Heparin, Hoffmann La Roche, Grenzach-Whylen
- Magnesiumsulfat, "cell culture tested", Sigma (Deisenhofen)
- Methanol (CH₂OH) destilliert in Glas, Burdick & Jackson Lab. Inc.; Fluka AG (Bern, Schweiz)
- Nembutal (Narkotikum) Pentobarbital-Natrium 6g/100 ml, Sanofi-CEVA Importgesellschaft, Hannover
- Palmitinsäure, Natriumsalz, gelöst in 50% Ethanol; Paesel (Frankfurt, Deutschland)
- Palmitoyl-oleyl-phosphatidylcholin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- PBS: Phosphate buffered saline, Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Phosphatidylethanolamin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Phosphatidylglycerol, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Sphingomyelin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- TRIS, Trishydroxyaminomethan p. A. (Merck, Darmstadt)
- Trypsin Typ III aus Rinderpankreas, kristallisiert, dialysiert, lyophilisiert

3.3. Kommerzielle Assay Systeme

- Monozyten Chemotaktisches Protein-1 (MCP-1) Immunoassay, code KRC 1010, Biosource International (Nivelles, Belgien)
- Makrophagen Inflammatorisches Protein-2 (MIP-2) Immunoassay, code KRC 1021, Biosource International (Nivelles, Belgien)

3.3.1. Monozyten Chemotaktisches Protein-1 (MCP-1)

Der zur quantitativen Bestimmung des Monozyten chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1) verwendete Kit, war ein sogenannter "solid Phase sandwich" ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay).

Mit einem polyklonalen Antikörper, der spezifisch MCP-1 bindet, wurde der Boden der Wells beschichtet, auf den später die zu analysierenden Proben oder Standards gegeben wurden.

Anschließend wurde ein zweiter, biotinylierter Antikörper in jedes Well hinzugegeben. Auf diese Weise wurde das MCP-1 in der ersten Inkubationsphase an die feste Phase des Wells gebunden. Zusätzlich wurde ein zweiter, biotinylierter Antikörper an das MCP-1 gebunden.

Der Überschuss des biotinylierten Antikörpers wurde abgespült und das Enzym Streptavidin-Peroxidase hinzugegeben. Dieses wurde an den biotinylierten Antikörper gebunden.

Nach einer weiteren Inkubationsphase und gründlichem Waschen der Wells, um das nichtgebundene Enzym zu entfernen, wurde dem Enzym ein Substrat angeboten (stabilisiertes Chromogen, Tetramethylbenzidin, TMB), das zu einem Farbumschlag führte. Die Intensität dieses Farbprodukts war direkt proportional zu der Menge an gebundenem MCP-1 in den Wells.

Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Proben wurden stets im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Zur Ermittlung einer Eichkurve wurden 11,7 bis 750 pg/ml eines authentischen Standards dem Messansatz zugesetzt. Die tatsächliche Konzentration der gemessenen Proben ergab sich aus der Übertragung der optischen Dichte auf die Eichkurve.

3.3.2. Makrophagen Inflammatorisches Protein-2 (MIP-2)

Der zur quantitativen Bestimmung des Makrophagen Inflammatorischen Proteins-2 (MIP-2) verwendete Kit, war ein sogenannter "solid Phase sandwich" ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay). Mit einem polyklonalen Antikörper, der spezifisch MIP-2 bindet, wurde der Boden der Wells beschichtet, auf den später die zu analysierenden Proben oder Standards gegeben wurden. Anschließend wurde ein zweiter, biotinylierter Antikörper in jedes Well hinzugegeben. Auf diese Weise wurde das MIP-2 in der ersten Inkubationsphase an die feste Phase des Wells gebunden. Zusätzlich wurde ein zweiter, biotinylierter

Antikörper an das MIP-2 gebunden. Der Überschuss des biotinylierten Antikörpers wurde abgespült und das Enzym Streptavidin-Peroxidase hinzugegeben. Dieses wurde an den biotinylierten Antikörper gebunden.

Nach einer weiteren Inkubationsphase und gründlichem Waschen der Wells, um das ungebundene Enzym zu entfernen, wurde dem Enzym ein Substrat angeboten (stabilisiertes Chromogen, Tetramethylbenzidin, TMB), das zu einem Farbumschlag führte. Die Intensität dieses Farbprodukts war direkt proportional zu der Menge an gebundenem MIP-2 in den Wells. Die Messung erfolgte mit einer Wellenlänge von 450 nm. Die Proben wurden stets im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnt. Zur Ermittlung einer Eichkurve wurden 10 bis 640 pg/ml eines authentischen Standards dem Messansatz zugesetzt. Die tatsächliche Konzentration der gemessenen Proben ergab sich aus der Übertragung der optischen Dichte auf die Eichkurve.

3.4. Geräte

- Abdampfvorrichtung für 100 Proben (Eigenbau) mit Strömungsregler für Druckluft, Messer Griesheim (Darmstadt, Deutschland)
- Säure-Base-Messgerät, ABL 330, Acid Base Laboratory, Radiometer GmbH, Frankfurt (Deutschland)
- Biofuge A, Heraeus (Hanau, Deutschland)
- Chromatographietank; Schott (Mainz; Deutschland)
- CO₂-Inkubator IR 1500, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Cytospin: Kleincentrifuge zum direkten Sedimentieren von Zellen auf Objektträger: Eigenbau. Filter dazu von Shandon, Ohio, U.S.A.
- Duran-Gläser 16 x 180mm, mit Schliffstopfen; Schott (Mainz, Deutschland)
- Dünnschicht-Chromatographieplatten Kieselgel F264; Machery & Nagel, Düren
- Endohm, tissue resistance measurement chamber. World Precision Instruments, Inc., (U.S.A.)

- Glaspipetten mit abgeknicktem Auslauf, Brand KG (Giessen, Deutschland)
- Hettich Rotanda RP Kühlzentrifuge mit Schwingbecherrotor, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
- Olympus-Mikroskop, Inverted Research Microscope (IMT-2), Olympus Optical Co. GmbH (Hamburg, Deutschland)
- IKA-Schüttler, IKA-Werke GmbH (Staufen, Deutschland)
- Liquidszintillationscounter, Philips (Hamburg, Deutschland)
- Milli Q Wasseraufbereitungsanlage, Millipore (Eschborn, Deutschland)
- Nylon Filtergewebe, 150 µm, 20 µm und 10 µm von Reichelt Chemie (Linz, Österreich)
- Olympus-Kamera OM 4 mit Objektiv 2/35 mm, Kodak Ektachrome 160 ASA EPT
- Petrischalen, bakteriologisch 100 x 15 mm, aus Polysterol, Falcon (Nr.1029)
- pH-Meter von Mettler, Essex (England)
- Pipetten für Zellkultur: Becton & Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
- Pipettus, elektrische Pipettierhilfe; Laboserv GmbH
- Polypropylenbecher und -erlenmeyerkolben: 250 ml Brand KG
- Polypropylenröhrchen, 15 ml; Falcon, Becton & Dickinson, (Heidelberg, Deutschland)
- Präparierbesteck und Scheren zur Gewebezerkleinerung: Aesculap GmbH
- Präparierbrett: Größe 20 x 20 cm
- Probenauftragevorrichtung für DC; Jet
- Radioaktivitätsdetektor und Monitor (Modell Ramona-5-LS), Raytest (Streubenhardt, Deutschland)
- Reagenzglasschüttler, REAX top, Heidolph – Instruments GmbH, (Kelheim, Deutschland)
- Spraygun-Sprühgerät für Indikatorlösung, DESAGA (Heidelberg, Deutschland)
- Spritzen: 1 ml, 10 ml und 20 ml: Terumo Plastics, (Tokio, Japan)

- Sterilbank (laminar air flow) Typ BSB, 4a, Flow Laboratories (Meckenheim, Deutschland)
- Szintillationsgefäße, 20 ml; Zinsser Analytik (Frankfurt, Deutschland)
- Trachealtuben aus V2A-Stahl, 2 mm: MSZ, Uniklinik Giessen Hettich Rotanta RP
- W-Lampe für DC, 254 nm + 366 nm Wellenlänge; Köttermann
- Wägezelle, Hottinger Baldwin Messtechnik (Langen, Deutschland)
- Wasserbad, Memmert GmbH (Schwalbach, Deutschland)
- Zellkulturschalen Falcon Multiwell 6- und 12-fach
- Zentrifuge RPC Rotanta, Kühlzentrifuge mit Schwingbecherrotor Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen Falcon “Blue Max“ 50 ml aus Polypropylen mit konischem Boden (NQ 2097)

3.5. Isolierung von Alveolarepithelzellen Typ II aus Rattenlungen

3.5.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Spezifische pathogenfreie männliche Ratten, der Art *Rattus norvegicus familiaris* und Zuchtlinie Sprague-Dawley (CD 18), mit einem Gewicht von 180-200g, lieferte die Firma Charles River WIGA (Sulzfeld/Main). Sie wurden mit Futter ad libitum versorgt und innerhalb von 48 Stunden nach Lieferung verwendet.

3.5.2. Zellisolierungsmethode nach Dobbs, Gonzales und Williams

Die zur Zellisolierung verwendeten Lösungen wurden kurz vor Verwendung aus Stammlösungen hergestellt und setzten sich wie folgt zusammen:

Lösung 1: 140 mM NaCl, 5,5 mM KCl, 2,6 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 6 mM Glucose, 0,5 mM EGTA, pH 7,42.

Lösung 2: 140 mM NaCl, 5,5 mM KCl, 2,6 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 6 mM Glucose, 2,2 mM CaCl₂, 1,3 mM MgSO₄, pH 7,42.

TRISpuffer: 50 mM Trishydroxyaminomethan in Aqua dest. gelöst und mit 1 N HCL auf pH 9,5 eingestellt.

DMEM: Dulbecco's modified Eagle Medium (Gibco), 2 mM Glutamin, 50 µg/ml Gentamycin (Gibco); carbonatgepuffert, im Inkubator äquilibriert.

PBS: Phosphate buffered saline (Gibco) hergestellt aus 10fach-Konzentrat, mit 2 mM Calcium und 1,3 mM Magnesium, eingestellt auf pH 7,2

Zum Trennen von Zellsuspensionen wurden Kunststoff-Petrischalen mit Antikörper beschichtet. Hierzu wurde gereinigtes Immunglobulin G (rat IgG, lyophilisiert; SIGMA, Deisenhofen), 500 µg/ml in 50 mM TRISpuffer pH 9,5 gelöst.

Zur Vorbereitung der Isolierung wurden die Lösungen 1 und 2 sowie physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Immunglobulin G wurde mit einer Konzentration von 500 µg/ml in 15 ml 50 mM TRISpuffer mit pH 9,5 gelöst und filtriert (Filter 0,2 µm, Nalgene). Es wurden drei bakteriologische 100 mm-Petrischalen (Falcon), mit je 5 ml dieser Lösung gefüllt und geschwenkt.

Sobald der Boden voll benetzt war, blieben die Platten drei Stunden lang bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wurde die IgG-Lösung abgegossen und die Platten fünfmal mit PBS sowie einmal mit DMEM gespült.

Für die Betäubung der Tiere wurde eine Mischung aus 0,35 ml Nembutal, 0,5 ml Ringerlösung und 0,05 ml Heparinlösung in einer Insulinspritze (1 ml) aufgezogen.

Eine männliche Sprague-Dawley-Ratte, mit einem Gewicht unter 200 g, wurde durch eine intraperitoneale Injektion, mit 0,7-0,8 ml des Nembutal-Heparin-Gemischs, betäubt.

Das Tier schlief nach 5 min. ein und durfte auf einen Schmerzreiz hin nicht mehr reagieren.

Anschließend wurde es auf dem Rücken liegend auf einem Brett an den Pfoten fixiert.

Das Fell wurde vom Bauch bis zur Schnauzenspitze längs aufgeschnitten. Der Bauchraum wurde eröffnet, die linke Nierenarterie durchtrennt und das Blut mit mehreren Tupfern aufgenommen. Daraufhin wurde am Hals die Trachea freigelegt, mit einer feinen Pinzette unterfahren, ein Faden unterlegt und zu $\frac{3}{4}$ quer, zwischen den Knorpelspannen eingeschnitten. Ein 2 mm-Tubus (mit Luer-Adapter) wurde fest eingebunden. Anschließend wurde der Thorax längs dem Sternum mit einer Schere geöffnet, das Thymusgewebe wurde entfernt und das Perikard eröffnet.

Der linke Ventrikel, der linke Vorhof und der rechte Vorhof wurden eingeschnitten. Eine auf das Infusionsbesteck adaptierte Pipettenspitze wurde in die Arteria pulmonalis vorgeschoben und die Lunge mit 50 ml warmer Lösung 2 perfundiert. Während dessen wurde die Lunge mit Hilfe einer auf den Trachealtubus aufgesetzten Spritze viermal mit je 5 ml Raumluft beatmet.

Dann wurde die Lunge herausgenommen und zwischen Mull abgetupft. Zum Entfernen von Alveolarmakrophagen wurde die Lunge acht mal mit je 5 ml Lösung 1 lavagiert; Dazu wurde eine leichtgängige 10 ml-Spritze verwendet.

Anschließend wurde zweimal mit je 6 ml Lösung 2, sowie einmal mit 6 ml einer Elastase/Trypsinlösung (9 mg Elastase EC 134 und 2 mg Trypsin in 40 ml Lösung 2, entsprechend 30 U/ml Orcein-Elastin) lavagiert. Als Ausdruck einer intakt präparierten Lunge durfte diese hierbei nicht tropfen.

Nach Instillation eines Volumens von etwa 8 ml Elastaselösung wurde die Lunge in eine auf 37 °C temperierte Kochsalzlösung gehängt und die restliche Elastaselösung, unter einem hydrostatischen Druck von 7 cm, über einen Zeitraum von 20 min instilliert.

Später wurden größere Bronchien und Nicht-Lungen-Gewebe entfernt und die Lunge in 4 ml DNase-Lösung (2,5 mg/ml) mit zwei parallel geführten Scheren in einem spitz-konischen Kunststoffbecher in Stücke von etwa 1 mm³ zerkleinert. Diese Suspension wurde mit Lösung 2 auf 20 ml aufgefüllt, 2 min. im Plastik-Erlenmeyerkolben bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt.

Um die enzymatische Gewebeauflösung zu unterbrechen, wurden dann 10 ml FCS (fötales Kälberserum) hinzugegeben und weitere 2 min. geschüttelt. Das resultierende Gemisch aus Lungenstücken und freien Zellen wurde durch mehrere Filterlagen aus Mull sowie durch 150 µm, 20 µm und 10 µm Nylongaze aufgetrennt.

Das Filtrat wurde mit Lösung 2 in einem Falcon-Röhrchen auf ein Gesamtvolumen von 50 ml eingestellt. Anschließend wurde es 8 min. lang bei 130 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Sedimentierte Zellen wurden in DMEM (mit 10 µg/ml DNase I-Zusatz) resuspendiert und auf eine Zellzahl von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Zum Entfernen von Alveolarmakrophagen und Granulozyten wurden je 10 ml dieser Suspension auf die vorbereiteten, mit IgG beschichteten Petrischalen gegeben und eine Stunde lang bei 37 °C in 8 % CO₂ inkubiert. Danach wurde jede Petrischale dreimal vorsichtig geschwenkt, um nicht haftende Zellen zu resuspendieren.

Die Typ₂-Zellen befanden sich nach diesem Schritt im Überstand, während Nicht-Typ₂-Zellen an den IgG-beschichteten Petrischalen adhärten. Die Zellsuspension wurde in sterile Zentrifugenröhrchen übertragen und wiederum 8 min. lang bei 130 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in DMEM mit 10 % FCS resuspendiert und auf Zellkulturschalen über Nacht im Inkubator mit 8 % CO₂ kultiviert. Dieser Adhärenzschritt diente der weiteren Reinigung der Typ₂-Zell-Präparation von kontaminierenden Zellen.

Routinemäßig wurden für eine Zellisolierung die Lungen von zwei bis drei Ratten entnommen und parallel nach diesem Protokoll aufgearbeitet.

3.5.3. Identifizierung isolierter Alveolarepithelzellen Typ II

Eine einfache und schnell durchführbare Identifizierung der Typ₂-Zellen konnte durch Inkubation der Zellen mit dem Lipid-Farbstoff Phosphin 3R (ICN Flow Biochemicals, Mannheim) erreicht werden.

Dazu wurden einige Milliliter der verdünnten Zellsuspension mit 10 µl/ml einer Cytospin-Zentrifuge direkt auf einen Objektträger sedimentiert. Nach Eindecken mit PBS konnten die Typ₂-Zellen im Fluoreszenzmikroskop unter Blaulichtanregung durch das goldgelbe Aufleuchten der für sie charakteristischen Lamellarkörper erkannt werden. Phagozytierte

Lipide und Vesikel in Makrophagen erschienen dagegen in einem grüngelben, gut unterscheidbaren Farbton.

Andere Zellen färbten sich nur schwach und diffus an. Zum Vergleich wurden Ausstriche der Zellpräparationen der modifizierten Papanicolaou-Färbung (KIKKAWA und YONEDA, 1974) unterworfen. Die Phospholipide wurden dabei sauer oxydiert und bildeten einen im alkalischen Milieu blau-schwarzen Farbtonkomplex mit Hämatein:

Durchführung:

1. Zellsuspension im Cytospin auf Objektträgern sedimentieren und 1 Stunde trocknen
2. 2,5 min. in Harris Haematoxylin (Merck, Darmstadt) inkubieren
3. zweimal in Aqua dest. tauchen, um Farblösung abzuspülen
4. 10 min. in 0,03 %iger LiCO_3 -Lösung inkubieren
5. einmal in Aqua dest. abspülen
6. Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe führen
7. Kurz in Xylol tauchen und Eindecken mit Entellan (Merck).

Die Lamellarkörper kultivierter Typ_2 -Zellen werden außerdem mit der Tanninsäure-Plychrom-Färbung nach MASON et al. (1985) dargestellt.

Durchführung:

1. Kulturschalen dreimal mit PBS waschen
2. Fixieren mit 1,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer; pH 7,3, 30 min. bei 4 °C
3. Zweimal mit 3,4% Saccarose in 0,1 M Cacodylatpuffer; pH 7,3 waschen
4. Postfixation mit 1% Osmiumtetroxyd in 0,1 M Cacodylat; pH 7,3, 90 min. bei 4 °C
5. Dreimal waschen mit 3,4% Saccarose in 0,1 M Cacodylat; pH 7,3
6. Färben mit 1,0% Tanninsäure in 0,1 M Cacodylat; pH 6,8, 16 Stunden bei 4 °C
7. Zweimal waschen mit 0,1 M Cacodylat; pH 7,0, zweimal waschen mit Aqua dest.
8. Gegenfärbung mit Polychromatblau 10 sec.; Polychromatrot 10 sec.
9. Waschen mit Aqua dest.; Lagerung in 0,1% Natriumazid

3.5.4. Vitalitätstests

Erythrosin B. Eine einfache und mit wenig apparativem Aufwand durchführbare Technik des Vitalitätstests beruht auf der Beobachtung, dass die Oberflächenmembran lebender Zellen fähig ist, selektiv gewisse Substanzen auszuschließen, während tote Zellen diese Substanzen leicht ins Zellinnere durchlassen.

Zum Test wurde eine Lösung von Erythrosin B (Merck, Darmstadt; 2,5 mg in 100 ml PBS) im Verhältnis 1:100 der Zellsuspension oder den Zellen auf Kulturschalen zugemischt und 5 min. lang inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert, bzw. der Zellmonolayer gewaschen und floureszenzmikroskopisch, unter Grünlichtanregung, die Zahl der leuchtenden und damit toten Zellen ermittelt.

5-CFDA. Ein alternativer optischer Vitalitätstest ermittelt die Membranintegrität aufgrund der Fähigkeit der Zellen, zuvor eingebrachte Farbstoffe zurückzuhalten. Der nichtfluoreszierende Farbstoff 5-Carboxy-Fluorescein-diacetat ist membranpermeabel und wird durch intrazelluläre Esterasen zum stark fluoreszierenden und nicht-permeablen 5-Carboxy-Fluorescein hydrolysiert. Vitale Zellen leuchten daher bei Blaulichtanregung im Fluoreszenzmikroskop.

Für den Test wurden eine Stammlösung von 5-Carboxy-Fluoresceindiacetat (Sigma; 1mg/ml) 1:1000 verdünnt und den Zellen zugesetzt. Nach einer Inkubationsdauer von ca. 15 Minuten wurde das Medium gewechselt und die Zahl der leuchtenden und damit lebenden Zellen ermittelt. Aufgrund der geringen, zum Nachweis erforderlichen Farbstoffmenge in der Zelle, kann diese Methode auch bei Langzeitinkubationen mit Toxinen und Zellstimuli eingesetzt werden.

LDH. Als weitere Methode zur Bestimmung der Membranintegrität wurde der Überstand stimulierter Typ₂-Zellen auf Anwesenheit des zytoplasmatischen Markers Lactatdehydrogenase getestet und dieses Enzym quantifiziert (mittels LDH-Test von Boehringer, Mannheim- Deutschland).

3.6. Kultivierung von Alveolarepithelzellen Typ II

Die bei der Zellisolierung gewonnenen Typ₂-Zellen wurden auf speziell vorbereitete Transwells (12-Well, Transwell-Clear von Costar) mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/Well gegeben. Die Membraneinlagen dieser Transwells wurden vor der Zellisolierung mit einem speziellen Kollagenbett beschichtet.

3.6.1. Herstellen von Kollagengelen

Die verwendeten Kollagengele bestanden aus 80 Vol% 3,85 mg/ml Kollagen. 10 Vol% Hanks-Salzlösung (10x konzentriert mit Phenolrot) und 10 Vol% FCS. Die Endkonzentration an Kollagen Typ I betrug somit 3,2 mg/ml.

Die eingesetzten Volumina errechnen sich nach der Empfehlung des Herstellers wie folgt:

Hanks-Salzlösung in ml = Zielvolumen/10

Kollagenlösung in ml = $\frac{\text{Zielvolumen} \times \text{gewünschter Kollagenkonzentration}}{\text{Kollagenkonzentration des verwendeten Produkts}}$

Somit errechnete sich für das angestrebte Zielvolumen von 13 ml ein benötigtes Volumen Hanks-Salzlösung von 1,3 ml. Die nötige Kollagenmenge berechnete sich nach der obigen Formel, aus dem Zielvolumen (13 ml) multipliziert mit der gewünschten Kollagenkonzentration (3,2 mg/ml), dividiert durch die Kollagenkonzentration des verwendeten Produktes. Daraus ergab sich das Volumen der eingesetzten Kollagenlösung mit 10,8 ml.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt:

Zunächst wurden zu 10,8 ml der Kollagenlösung (Rat tail Collagene, Type I) 1,3 ml Hanks-Lösung in ein steriles Zentrifugenröhrchen (Greiner) pipetiert. Bei diesem Arbeitsschritt verfärbte sich die klare Kollagenlösung aufgrund der Abnahme des pH-Werts gelb.

Zur Neutralisation wurden 180 µl einer 1 N Natronlauge (NaOH) hinzugegeben. Nach vorsichtigem Schwenken (vermeiden von Bläschenbildung) entstand eine rosa Lösung, der abschließend 1,3 ml FCS beigefügt wurde.

300 µl des so entstandenen Kollagengemischs wurden in jedes Transwell pipetiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur zur Polymerisation belassen. Danach wurden die polymerisierten Kollagengele mit serumfreiem DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, Gibco) benetzt, um ein Austrocknen der Gele zu vermeiden. Die so, vor Beginn einer Isolierung, vorbereiteten 12-well-Platten verblieben zur Äquilibration, bis zum Ende der Zellisolierung, im CO₂-Inkubator (37 °C, 10% CO₂, 90% Raumluft). Unmittelbar vor dem Auftragen der frisch isolierten Zellen auf die Transwells wurden diese fünfmal mit serumfreiem DMEM (37 °C) gewaschen.

Um eine Kontamination zu vermeiden wurden alle Arbeitsschritte unter einer Sterilbank durchgeführt.

3.6.2. Behandlung der isolierten Alveolarepithelzellen

Unmittelbar nach der Zellisolierung verblieben die Alveolarepithelzellen für 48 Stunden in einem Inkubator bei 37 °C mit 10% CO₂ und 90% Raumluft. Vorsichtiges Beklopfen der 12-well-Platten ca. 24 Stunden nach dem Aussähen der Zellen auf die Kollagenkissen, unterstütze die gleichmäßige Verteilung und Adhäsion der Zellen und verhinderte das Entstehen von Zellkonglomeraten. In diesem Zeitraum wurde der größte Teil der Zellen auf der Kollagenmatrix adhären.

3.6.3. Air-Liquid-Interphase im Zellkulturmodell

Zwei Tage nach dem Aussähen der Zellen wurden die Zellen erstmals mit 500 µl serumfreien DMEM (37 °C) gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurden jeweils 6 Wells einer 12-Well-Platte der Kultivierung in der Air-Liquid-Interphase zugeführt, die übrigen Wells wurden weiterhin unter Liquid-Bedingungen belassen.

Zur Herstellung der Air-Liquid-Interphase wurden 500 µl DMEM unter den Membraneinsatz des Transwells pipetiert. So konnten die Zellen von ihrer basalen Seite mit Nährmedium versorgt werden. Apikal fehlte das Medium, sodass die Luft die direkte Grenzfläche (Air-Liquid-Interphase) der Zellen darstellte.

Im Gegensatz dazu, wurde den Wells, die unter Liquid-Verhältnissen kultiviert wurden, von basal her 1500 µl und zusätzlich von apikaler Seite 500 µl Nährmedium zugeführt (Liquid-Liquid-Interphase).

Das Waschen der einzelnen Wells mit serumfreiem Medium und das Wechseln des Mediums in den Transwells wurde standardisiert jeden Tag durchgeführt. Nur so konnten die Zellen über einen längeren Zeitraum, frei von Kontamination kultiviert werden. Der Ausschluss von Kontaminationen erfolgte durch lichtmikroskopische Kontrollen der Zellen, wobei die betroffenen Platten sofort ausgesondert wurden.

3.7. Kultivierung der Alveolarepithelzellen in Hypoxie

3.7.1. Verwendung der Hypoxiekammer

Für die Kultivierung der Alveolarepithelzellen unter hypoxischen Verhältnissen wurden die Zellen nach der Zuordnung in das jeweilige Kultivierungsverfahren (Air/Liquid) in eine Hypoxiekammer (Merck, Labor Vertrieb, GmbH, Frankfurt) gestellt. In diese Kammer wurde eine offene, mit steriler Ringerlösung benetzte Petrischale (100 x 15 mm) gelegt. Dadurch wurde die Luftfeuchtigkeit in der Kammer so beeinflusst, dass die Zellen in den Transwells nicht austrockneten. Die Kammer wurde anschließend in einem Hypoxiesack (Sekuroka-Glove Bags, Carl Roth GmbH) solange mit Stickstoff begast, bis eine Messung der Gasanalyse des Luft-/Gasgemisches in der Hypoxiekammer einen Wert unter 1% O₂ ergab. Nun wurde den Zellen, unter hypoxischen Bedingungen, vorher auf die entsprechenden Gasverhältnissen äquilibriertes Medium, zugeführt. Zuvor wurde das nichtäquilibrierte Medium abgesaugt. Auch bei den Experimenten mit Alveolarepithelzellen in der Hypoxiekammer wurden die Zellen standardisiert jeden Tag gewaschen und mit neuem,

äquiliertem Medium versorgt (siehe dazu 3.6.2.).

Damit eine konstante Temperatur von 37 °C in der Kammer gewährleistet war, wurde die Hypoxiekammer in ein vorgewärmtes Wasserbad gestellt.

Über ein in die Kammer zuführendes Schlauchsystem konnte das Luft-/Gasgemisch in der Kammer mittels einer entsprechenden Gasflasche, dauerhaft auf unter 1% O₂ gehalten werden.

Die Hypoxiekammer wurde durch eine vorgeschaltete Zeitschaltuhr, in regelmäßigen Intervallen, mit einem speziellen Gasgemisch (1% O₂, 10% CO₂) begast. Die Dauer der Intervalle wurde abhängig von dem in der Hypoxiekammer herrschenden Sauerstoffpartialdruck gewählt, der über ein abführendes Schlauchsystem gemessen wurde.

So konnten die Alveolarepithelzellen unter hypoxischen Sauerstoffpartialdrücken ohne Kontaminationen über mehrere Tage kultiviert werden.

3.7.2. Kontrollexperimente für die Zellen in der Hypoxiekammer

Nach Abschluss der Experimente mit den Alveolarepithelzellen aus der Hypoxiekammer wurden die verwendeten Wells mit einer Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. So konnten die Zellen vom Kollagenkissen gelöst und gezählt werden, um eine identische Zellzahl, im Vergleich zu den unter Normoxie kultivierten Zellen, für die vergleichenden Versuche nachzuweisen.

Darüber hinaus wurden alle verwendeten Wells nach deren Verbrauch auf mögliche Kontaminationen unter dem Lichtmikroskop geprüft. Die Proben kontaminierter Wells wurden verworfen und schieden so für die Experimente aus. Weiterhin wurde mittels Lactatdehydrogenase-Messung die Vitalität der kultivierten Alveolarepithelzellen festgestellt (siehe 3.5.4.).

3.8. Morphologische Untersuchung der Alveolarepithelzellen

3.8.1. Lichtmikroskopische Untersuchung von Alveolarepithelzellen

Für die lichtmikroskopische Untersuchung der Typ₂-Zellen wurde ein Olympus-Mikroskop (Inverted Research Microscope (IMT-2)) verwendet. Dabei war die tägliche lichtmikroskopische Kontrolle der Zellen ein methodischer Standard, der die Qualität der Versuche sichern sollte.

3.8.2. Elektronenmikroskopische Analyse der Alveolarepithelzellen

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Zellen erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Dr. Leander Ermert, Institut für Pathologie, Justus-Liebig-Universität Giessen.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden die verwendeten Kollagengele mit den darauf kultivierten Zellen für zwei Stunden in einer frisch hergestellten Lösung aus 1% Paraformaldehyd und 2% Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (7,4) fixiert. Die Proben wurden in phosphatgepuffertem Osmiumtetroxyd (1%) nachfixiert und durch eine Serie von Waschgängen mit Alkohol dehydriert. Abschließend wurden die Zellen in Epon eingebettet.

Es wurden Ultradünnschnitte angefertigt (70-80 nm) und auf ein 200-Maschen-Kupfernetz gelegt. Diese wurden mit 5% Uranylacetat und 0,8% Bleizitrat gefärbt und anschließend unter dem Transmissionselektronenmikroskop (LEO-906, Zeiss Oberkochen, Deutschland) untersucht.

3.9. Sekretionsmessung von ³H-Phosphatidyl-Cholin aus Alveolarepithelzellen Typ II

3.9.1. Sekretionsassay

Zur Markierung des Surfactantpools wurde frisch isolierten Typ₂-Zellen in Suspension 1 µCi/ml ³H-methyl-Cholin zugesetzt. Daraufhin wurden diese, in einer Dichte von 1 x 10⁶ Zellen pro Well, auf 12-Well Transwellplatten ausgesät und für die Dauer der Kultivierung im CO₂-Inkubator (37 °C, 10% CO₂, 90 % Raumluft) inkubiert.

Nach 24 Stunden wurden die adhärennten Typ₂-Zellen fünfmal gewaschen und das Medium durch 500 µl serumfreies DMEM ohne radioaktive Vorstufe ersetzt. Durch mikroskopische Kontrollen wurde sichergestellt, dass keine frei schwimmenden Zellen mehr vorhanden waren.

Zum Start des Experiments wurden die gelösten Testsubstanzen (ATP, A-23187 und PMA) zugegeben und durch Schwenken im Medium verteilt. Nach einer dreistündigen Inkubation wurde das Medium in Eppendorf-Cups überführt und die Zellen mit weiteren 500 µl DMEM gespült. Diese 500 µl wurden mit dem ersten Überstand vereinigt und zentrifugiert, um so abgelöste Typ₂-Zellen zu sedimentieren. Die Kollagengele, und damit die darauf befindlichen Zellen, wurden mit einem Schaber abgelöst und in Extraktionsröhrchen überführt.

Die Extraktion der radioaktiven Lipide aus Überstand und Zellen erfolgte nach der Methode von FOLCH et al. (1957) nach Zugabe von 1 mg DPPC zu jeder Probe als Lipidcarrier.

Dazu wurde Chloroform und Methanol dem wässrigen Medium im Verhältnis 8: 4: 3 zugegeben und durch Schütteln vermischt. Nach dem Zentrifugieren trennte sich das Gemisch in zwei Phasen.

Die obere, wässrige Phase wurde verworfen und zweimal durch ein Gemisch aus 48 Teilen Methanol, 47 Teilen 100 mM Kaliumchloridlösung und 3 Teilen Chloroform ersetzt. Dieser Schritt diente dem Entfernen wasserlöslicher Substanzen aus der Chloroformphase. Letztere

wurde dann in Szintillationsgefäße überführt und das Lösemittel durch einen Luftstrom restlos abgedampft. Der Lipidrückstand wurde in Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und die Radioaktivität im β -Counter bestimmt.

Die Berechnung der dpm aus den gemessenen cpm erfolgte durch Ermittlung der Zählausbeute des externen Standards (automatic efficiency control) in jeder Probe.

Die Wiederfindungsrate nach der Lipidextraktion konnte durch Einsatz von markiertem ^3H -DPPC überprüft werden. Zur qualitativen Analyse der Lipide wurde der Extrakt unter Stickstoff eingeengt und auf Chromatographieplatten aufgetragen.

Die Höhe der Phosphatidylcholin-Sekretion wurde berechnet als der prozentuale Gehalt von ^3H -Phosphatidylcholin im Medium relativ zum Gehalt in Zellen und Medium nach der Formel:

$$\text{dpm Medium} \times 100 \% \text{ Sekretion} = \text{dpm Medium} + \text{dpm Zellen}$$

Die zum Zeitpunkt t_0 , dem Start der Stimuluszugabe, ermittelte Sekretion wurde von allen Proben subtrahiert.

3.9.2. Messung des Einbaus von ^3H -Methyl-Cholin in Alveolarepithelzellen Typ II

Zur Messung der Synthese von Surfactantlipiden wurden isolierte Typ₂-Zellen auf Multiwellplatten für 18 Stunden in DMEM mit 10% Serum kultiviert. Die adhären Zellen wurden fünfmal gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 500 μl Medium gegeben. Die Zugabe von 1 μCi ^3H -Cholin/Well und 55 μM Palmitinsäure startete das Experiment. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde das Medium entfernt, der Monolayer mehrfach ab gespült und anschließend mit 500 μl einer 1%igen Trypsinlösung abgelöst.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Suspension entnommen. In Extraktionsröhrchen erfolgte dann die Isolierung der markierten Lipide nach der oben beschriebenen Methode.

Die in Phosphatidylcholin inkorporierte Menge des zugesetzten ^3H -Cholins wurde bezogen auf die Zellzahl und als $\text{dpm } ^3\text{H-PC} / 10.000 \text{ Zellen}$ dargestellt.

Zur Untersuchung der stimulierten Synthese von $^3\text{H-PC}$ wurde $100 \mu\text{M}$ Terbutalin (SIGMA, Deisenhofen) eingesetzt und zeitgleich mit dem Tracer zu den Zellen gegeben. Der Einsatz der Inkubationsmedien geschah zu verschiedenen Zeiten vor und nach Tracerzugabe.

3.10. Surfactantproteinbestimmung

Die Bestimmung der Surfactantproteine erfolgte jeweils mit einem Immunassay aus eigener Herstellung nach der von Kramer beschriebenen Methode. Dabei wurden die Surfactantproteine zu verschiedenen Zeiten im Überstand der Zellen nachgewiesen. Bei den untersuchten Surfactantproteinen handelte es sich um das Surfactantprotein-B und -C.

Es wurde unterschieden zwischen einem Überstand der vor Versuchsbeginn abgenommen wurde und einem nach 6 stündiger Inkubation mit Adenosintriphosphat (ATP). Dabei sollte der erste Überstand den aktuellen Stand an Surfactantproteinsekretion ohne Stimulation durch Sekretagoga widerspiegeln.

Da die Air-kultivierten Wells keinen Überstand aufwiesen, mussten diese Wells gründlich mit $500 \mu\text{l}$ Medium gewaschen werden, um die auf der Kollagenoberfläche befindlichen Surfactantproteine auszuwaschen. Dieses Volumen galt als deren Überstand, der zentrifugiert wurde. Das entstandene Pellet wurde verworfen.

Danach wurden die Zellen mit ATP stimuliert und der Überstand nach 6 Stunden abgenommen, ebenso zentrifugiert und das entstandene Pellet verworfen. Die verwendeten Konzentrationen von ATP lagen zwischen 10 und $100 \mu\text{M}$.

Danach wurden die Zellen auf den Kollagengelen mit jeweils $500 \mu\text{l}$ eines PBS-Propanolgemischs im Verhältnis 1:1 für 30 min. behandelt. Auch hier wurden die Überstände anschließend zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der gewonnene Überstand entsprach dem Surfactantproteinbestand der Zellen.

3.10.1 Bestimmung der Surfactantproteine - B und - C (SP-B, SP-C)

Das Surfactantprotein- B (SP-B) ist ein essentieller Bestandteil des alveolären Surfactantsystems. Es liegt hauptsächlich in Form eines Dimers vor.

Die quantitative Bestimmung des SP-B-Dimers wurde lange Zeit durch dessen hydrophobe Beschaffenheit und die hohe Affinität zu den Surfactantlipiden erschwert.

Durch den für die Analyse verwendeten Immunoassay war es möglich dieses hydrophobe Protein in den wässrigen Überständen nachzuweisen. Der verwendete ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) nutzte die hydrophobe Wirkung des SP-B zur Bindung des Proteins an Polyesterol-Immunsorbent-Platten.

Die Proben wurden mit Propanol im Verhältnis 1:1 gemischt, um so eine homogene Dispersion der lipophilen Bestandteile vor der Bindung auf den Platten zu gewährleisten.

Nachdem die wässrige Phase durch Evaporation abgedampft war, wurde den Zellen Trifluorethanol zugesetzt, um die SP-B-Polyesterolbindung zu optimieren. Zur selektiven Entfernung der Phospholipide wurden die Zellen mehrfach mit einem Disopropylether-Buthanolgemisch und PBS gewaschen. Das an der festen Phase befindliche SP-B wurde durch einen monoklonalen Mäuseantikörper gegen SP-B gebunden.

Für die Amplifikation des Signals wurden ein biotinylierter Anti-Mäuseantikörper und die Avidin/Biotin-Peroxidasetechnik angewandt.

Eine reproduzierbare Eichkurve für das SP-B-Dimer lag im Bereich zwischen 0,3125 und 40 ng/Well vor. Das Monomer konnte mit einer vergleichbaren Effizienz nachgewiesen werden. Kreuzreaktionen zum SP-A oder -C, sowie zu Albumin waren vernachlässigbar gering.

Die Messung des SP-C erfolgte mit derselben Methode. Die Bestimmung des SP-B/C erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Dr. Reinhold Schmidt, Institut für Pathologie an der Justus-Liebig-Universität in Giessen.

3.11. Widerstandsmessung des Monolayers

Die Messung des elektrischen Widerstandes des Monolayers erfolgte mit Hilfe eines Endohms (tissue resistance measurment) der Firma World Precision Instruments, Inc., (U.S.A.). Nach dem Ohmschen Gesetz errechnet sich der Widerstand (R) den ein Leiter dem Strom entgegenhält aus dem Quotienten der Spannung (U) und der Stromstärke (I): $R = U/I$, gemessen in Ohm.

Wenn konfluierende Zellen sich zu einem Monolayer zusammenfinden kann aufgrund eines durchgängigen Stroms ein Widerstand an diesem Monolayer gemessen werden, der dessen epithelialen Charakter dokumentiert.

Im Gegensatz dazu wäre ein verminderter Widerstand in all jenen Wells zu erwarten, in denen es nicht zur Ausbildung epithelialer und damit zusammenhängender Zellstrukturen kommt.

3.12. Real-time PCR (TaqManTMPCR)

Bei dem TaqManTM PCR Assay wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter- Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist.

Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge von (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenzenergietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an den Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase nun auf diese Sonde und beginnt sie zu verdrängen.

Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der

AmpliTaq DNA Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird. Eine freie, nicht-hybridisierte Sonde wird hingegen nicht hydrolysiert. Kommt es jedoch zur Sondenhydrolyse, so wird die räumliche Nähe - und damit auch der FRET - zwischen Reporter und Quencher unterbrochen.

Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Das dabei entstandene Signal ist streng sequenzspezifisch, da nicht vollständig gebundene Sondenmoleküle verdrängt werden, noch bevor die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase aktiviert wird.

Die Veränderung der Fluoreszenz gibt somit einen direkten Hinweis auf die Akkumulation von PCR-Produkt.

3.12.1. Extraktion der mRNA

Für die Extraktion der mRNA wurde ein MPG Guanidin mRNA Purification Kit verwendet, der die mRNA auf der Basis einer magnetischen Separation durch Anlagerung an oligo-dT Fragmente extrahiert. Nach Angabe des Herstellers wurden diese oligo-dT Fragmente an Streptavidin gebunden, welches wiederum kovalent an der Oberfläche von supermagnetischen Glaspartikeln gebunden ist.

Für jede Probe wurden 150 µg MPG-streptavidin an 1,5 µl biotinyliertem oligo-dT gebunden. Die isolierte mRNA wurde schließlich in 20 µl DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen.

3.12.2. Prozessierung der gewonnenen mRNA

Das Prozessieren der gewonnenen mRNA erfolgte mit 10 µl First Strand Buffer (FSB). Der FSB wurde wie folgt behandelt: 4% RNase-Inhibitor (Perkin Elmer; Überlingen, Deutschland) wurden zu 52 mM Tris-HCL, pH 8,3, 78 mM KCL und 3,1 mM MgCl₂ gegeben. Nichtionische Detergentien wurden nicht hinzugegeben. Der FSB wurde mit den lysierten Zellen für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde jede Probe in flüssigem Stickstoff gefroren.

3.12.3. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde ein Kit von Perkin Elmer verwendet (10 x PCR-Puffer II, MgCl₂, Random Hexamere, RNase-Inhibitor, MULV Reverse Transkriptase), sowie von Eurobio (dNTPs; Raunheim, Deutschland).

Die vorbereiteten Proben, wurden 10 min. lang auf eine Temperatur von 70 °C erhitzt und anschließend für 5 min. auf Eis gekühlt. Für die Synthese der cDNA aus der extrahierten mRNA, wurden 4 µl MgCl₂ (5 mM), 2µl des 10 x PCR-Puffers II, 1µl dNTP (10 mM in jede Probe), 1 µl Random Hexamere (50µM), 0,5 µl (10 U) RNase-Inhibitor und 1 µl (50 U) MULV Reverse Transkriptase auf ein Gesamtvolumen von 19,5 µl gegeben. Die Proben wurden für 10 min. bei 20 °C und danach für 60 min. bei 43 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Erhitzen für 5 min. auf 99 °C beendet.

3.12.4. Durchführung der Real-time PCR

Wie bereits unter Punkt 3.12. beschrieben wird aufgrund der Abspaltung einer sequenzspezifischen Probe durch die Exonukleaseaktivität der TaqPolymerase, der Reporter-Farbstoff freigesetzt wodurch ein Anstieg der Fluoreszenzemission entsteht, der in einem bestimmten Wellenlängenbereich zu messen ist.

Mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detector Systems (SDS) ist es möglich diese Fluoreszenzemission kontinuierlich zu messen und den Verlauf einer solchen PCR 'On-Line' zu verfolgen.

Das gemessene Signal wird an einem internen Standard angeglichen (ΔR_n) und die Software setzt den Schwellenzyklus C_T fest, wenn ΔR_n das 10fache der Standardabweichung erreicht hat. C_T wird verwendet für die Quantifizierung der Input Zielanzahl.

Für eine relative Quantifizierung von C_T , wurde ein endogener Referenzbereich herangezogen, der auch als Kalibrator bezeichnet werden kann. Dieser kann z.B. ein passendes Housekeeping Gene sein. In diesem Verhältnis normalisiert sich die Größe der Kopien des Zielgens.

Basierend auf der exponentiellen Amplifikation des Zielgens, als auch des Kalibrators, wird die Anzahl der amplifizierten Moleküle zum Zeitpunkt des Schwellenzyklus berechnet nach der Formel:

$$X_T = X_0 * (1+E_X)^{CT} = K_X$$

X_T : Anzahl der Moleküle im Zyklus; X_0 : Initiale Anzahl der Moleküle; E_X : Effizienz der Zielgenamplifikation; CT: Threshold Zyklus für die Amplifikation; und K_X : Konstante.

Für den relativen Vergleich zwischen der Anzahl der Kopien des Zielgens (T) und der Anzahl der Kopien des Standardgens (R, Kalibratorgen) zum Schwellenzyklus normalisiert sich die Expression des Zielgens nach der folgenden Formel:

$$T_0/R_0 * (1+E)^{(CT,T - CT,R)} = K$$

Zusammenfassend ergibt sich aus der Effizienz der Zielgen- und der Standardgenamplifikation die folgende Gleichung:

$$T_T/R_T = T_0/R_0 * (1+E_T)^{CT,T}/(1+E_R)^{CT,R} = K_X/K_R = K$$

$$T_0/R_0 = K * (1+E)^{CT,R - CT,T}$$

Nach der Synthese der cDNA wurde jede Probe mit je 8 μ l in zwei Aliquots aufgeteilt (eins für das Zielgen und eins für das Standardgen).

Der verwendete TaqMan PCR Kit (Perkin Elmer) wurde bis auf einige kleine Modifikationen gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Modifiziert wurden: dUTP wurde durch dTTP in derselben Konzentration ersetzt. Die Inkubation mit AmpErase wurde weggelassen.

In den Voruntersuchungen erwiesen sich 4 mM $MgCl_2$ und 0,5 μ l (2,5 U) AmpliTaq Gold Polymerase als optimale Konzentrationen für die Untersuchungen. Die Endkonzentration der Oligonukleotidprimer betrug 300 nM und die der Hybridisierungsproben 200 nM konzentriert auf ein Volumen von 50 μ l in jeder Probe.

Die Oligonukleotide wurden synthetisiert durch PE ABI (Weiterstadt, Deutschland). Die Einstellungen der einzelnen Zyklen wurden wie folgt modifiziert: 2,45 min. bei 94°C, gefolgt von 60 Zyklen mit 94°C für 45 sek., 62°C für 45 sek. und 73°C für 45 sek.

3.13. Experimentelles Protokoll

Für die Experimente wurden 12-Well-Platten mit einer Kulturfläche von 1 cm² pro Well benutzt. Für die Untersuchungen wurden Typ₂-Zellen verwendet, die 48 Stunden nach der Zellisolierung entweder in der Air-Liquid-Interphase oder unter Liquid-Verhältnissen kultiviert wurden (siehe 3.6.3.).

Die Zellen wurden in diesem System mindestens drei Tage kultiviert, bevor sie zu Experimenten herangezogen wurden.

Die Versuche in der Hypoxiekammer erfolgten erst nachdem die Zellen verschiedene Phasen der Kultivierung durchlaufen hatten. In der ersten Phase (0-48 Stunden) wurde den Zellen die Zeit zur Adhäsion an die Kollagenmatrix und zur Regeneration nach der Zellisolierung gegeben. In der zweiten Phase (48-72 Stunden) wurde ein Teil der Zellen der Air-Liquid-Interphase zugeführt. Die übrigen Zellen wurden weiterhin unter Liquid-Bedingungen kultiviert. Danach wurden die Zellen in der dritten Phase für weitere drei Tage in Hypoxie oder Normoxie im jeweiligen Kultivierungsverfahren (Air oder Liquid) inkubiert.

Sowohl in der Air-Liquid-Interphase, als auch unter Liquid-Bedingungen zeigten sich ca. drei Tage nach der Differenzierung in dem jeweiligen Kultivierungssystem Fibroblasten, die einen konfluenten Monolayer ausbildeten.

Nach einer Reihe von Vorversuchen wurden die folgenden Konzentrationen für die verschiedenen Agenzien ausgewählt: LPS, 1-20 ng/ml; TNF- α , 1-10 ng/ml; IL-1, 1-10 U/ml; PMA, 1-100ng/ml; ATP, 1-100 μ g/ml und A23187, 0,1-10 μ M. Die Konzentrationen von ATP und A-23187 deckten den für diese Agenzien *in vitro* -Experimenten allgemein anerkannten Dosisbereich ab.

3.14. Statistische Auswertung der dargestellten Ergebnisse

Zur statistischen Auswertung erfolgte eine Varianzanalyse. Der Student-Newman-Keuls-Test wurde als à posteriori-Test verwendet. Die Signifikanzgrenze der durchgeführten Tests wurde mit $p=0,05$ festgelegt ($p<0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert).

4. ERGEBNISSE

4.1. Übersicht

Im Mittelpunkt der eingereichten Dissertationsarbeit steht der Einfluss des Air-Liquid-Interphasemodells auf die Differenzierung von Typ₂-Zellen. Die Wirkung dieses Zellmodells wurde anhand der Expression von spezifischen Differenzierungsparametern der beiden Alveolarepithelzelltypen (Typ₁- und Typ₂-Zellen) untersucht.

Zu den untersuchten Größen gehören:

- Lichtmikroskopische Charakterisierung der Zellen
- Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Zellen
- Surfactantproteine
- Surfactantsekretion
- Expression der α_1 -Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase
- Widerstandsmessung des zellulären Monolayers
- Inflammatorisches Verhalten der Alveolarepithelzellen

Weiterhin wurde in der vorliegende Dissertationsarbeit die Wirkung von Hypoxie auf diese Differenzierungsmerkmale untersucht.

Ausgehend von den bekannten Unterschieden der Differenzierungsmerkmale von Typ₁- und Typ₂-Zellen wurde der Zusammenhang zwischen der Kultivierung der Zellen im Air-Liquid-Interphasemodell und deren Differenzierung, sowie Konservierung von Typ₂-zellspezifischen Charakteristika nachgewiesen. Dieser Nachweis erfolgte sowohl für die Kultivierung der Zellen im Air-Liquid-Interphasemodell unter Normoxie, als auch unter Hypoxie.

Die Bearbeitung der Fragestellung erfolgte nach einer Reihe von Vorversuchen, in denen die folgenden Konzentrationen für die verschiedenen Agenzien ausgesucht wurden:

LPS, 1-20 ng/ml; TNF- α , 1-10 ng/ml; IL-1, 1-10 U/ml; PMA, 1-100ng/ml; ATP, 1-100 μ g/ml und A23187, 0,1-10 μ M.

Die Isolierung und Kultivierung der Alveolarepithelzellen erfolgte nach dem im Methodenteil beschriebenen Verfahren. Die Alveolarepithelzellen wurden routinemäßig nach 48 Stunden der Air-Phase ausgesetzt, in der sie 72 Stunden kultiviert wurden bevor sie für die Experimente verwendet wurden.

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist nach folgenden Gesichtspunkten gegliedert:

Darstellung der morphologischen Unterschiede zwischen Typ₁- und Typ₂-Zellen in Abhängigkeit vom verwendeten Kultivierungssystem (Lichtmikroskopie/Elektronenmikroskopie).

Einfluss der Air-Liquid-Interphase auf die Sekretionsleistung von alveolärem Surfactant und Surfactantproteinen. Expression der α_1 -Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase in den Zellen.

Untersuchung des elektrischen Verhaltens (Widerstandsmessung) des Monolayers in der Air-Liquid-Interphase.

Im Anschluss daran wird auf die Sekretionsprofile der inflammatorischen Mediatoren (MCP-1 und MIP-2) eingegangen.

Zur Interpretation dieser Ergebnisse dienen auch die pharmakologischen Interventionsexperimente.

Die darauf folgenden Abschnitte des Ergebnisteils beinhalten die Auswirkungen von Hypoxie auf die Differenzierung und Konservierung der untersuchten Charakteristika von Typ₂-Zellen.

In den sich anschließenden Kontrollexperimenten werden Zytotoxizitätseffekte und Verunreinigungen mit LPS ausgeschlossen.

4.2. Morphologische Differenzierung der Alveolarepithelzellen in Abhängigkeit vom Kultivierungsverfahren

Die morphologische Differenzierung, der bei der Zellisolierung gewonnenen Typ₂-Zellen, lässt sich durch das gewählte Kultivierungsverfahren (Air-Liquid-Interphase) deutlich beeinflussen. Sowohl die täglichen lichtmikroskopischen Untersuchungen, als auch die elektronenmikroskopische Analyse von Typ₂-Zellen, die in einem Air-Liquid-Interphasemodell kultiviert wurden, zeigten bereits nach 48 Stunden Kultur den beträchtlichen Einfluss des Kultivierungsverfahrens auf die Erhaltung von Typ₂-zellspezifischen Charakteristika.

4.2.1. Lichtmikroskopische Unterschiede der Alveolarepithelzellen nach der Kultivierung im Air-Liquid-Interphasemodell

Die Typ₂-Zellen die 48 Stunden nach der Zellisolierung an ihrer apikalen Oberfläche der Luft ausgesetzt wurden behielten langfristig (für die Dauer der Versuche) ihre zellspezifische Morphologie. Die Zellen, die hingegen auf konventionelle Weise kultiviert wurden (Liquid) wiesen bereits nach 48 Stunden einen Verlust der Typ₂-zellspezifischen Charakteristika auf.

Bei den täglichen lichtmikroskopischen Analysen, die auch zum Ausschluss von Kontaminationen durchgeführt wurden, stellten sich die *luftexponierten Zellen* als kuboidale Zellen, die monozytenähnlich auf den Kollagenkissen sitzen, dar. Zum Teil lagen diese Zellen einzeln oder in Gruppen von je zwei bis drei Zellen zusammen. Beim Fokussieren mit dem Lichtmikroskop lässt sich der Organellenreichtum des Zytoplasmas mit den Lamellarkörpern, die nahe der Zelloberfläche liegen, darstellen.

Anders verhalten sich die lichtmikroskopisch untersuchten Typ₂-Zellen, die nach der Zellisolierung nicht der Air-Phase ausgesetzt wurden. Bei den Liquid-kultivierten Zellen findet sich ein Verlust der zuvor beschriebenen lichtmikroskopischen Merkmale. Die Zellen der Primärkultur wirken nach ca. 48 Stunden Kultivierung in der Liquid-Phase deutlich größer als unmittelbar nach der Zellisolierung. Sie entwickeln sich weg von der runden Form

der Typ₂-Zellen, hin zur länglichen Form einer Typ₁-Zelle. Es sind nur noch vereinzelt runde Zellen zu sehen. Im direkten Vergleich zu diesen kreisrunden kleineren Zellen erscheint beim Durchfokussieren das Zytoplasma der Typ₁-Zellen heller, was den Verlust der wichtigen Typ₂-Zell-Organellen unterstreicht. Zwischen den breitflächig angeordneten Zellverbänden der Typ₁-Zellen liegen vereinzelt Fibroblasten.

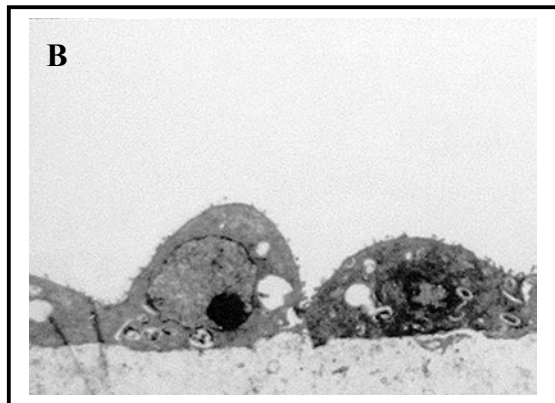
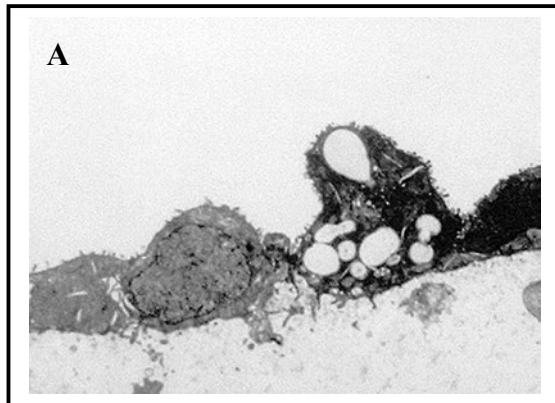
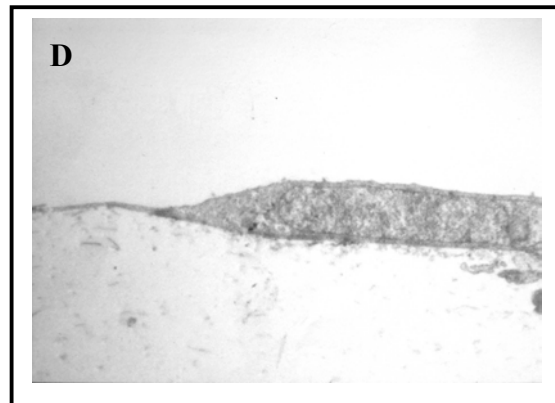
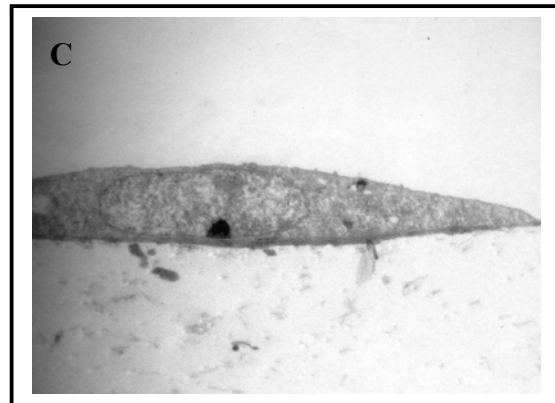
4.2.2. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Alveolarepithelzellen

Die unter dem Lichtmikroskop beobachteten morphologischen Veränderungen der Typ₂-Zellen ließen sich auch unter dem Elektronenmikroskop nachweisen.

Als charakteristisches Kennzeichen sind hier die bereits oben beschriebene kuboidale Zellform, sowie das Vorhandensein von Lamellarkörpern in den in der Air-Phase kultivierten Typ₂-Zellen zu erwähnen. In diesen Zellen kann man gelegentlich die Sekretion von Surfactant durch oberflächliche Exozytose morphologisch erfassen (siehe folgende Abb.). Auf der Oberfläche zeigt sich ein Bürstensaum, der bei den Typ₁-Zellen nicht zu finden ist. Der Zellkern stellt sich rund dar mit einem großen Nucleolus.

Bei den Liquid-kultivierten Typ₂-Zellen liegt hingegen ein Verlust dieser Merkmale vor.

Die Zellen wirken abgeflacht und das Zytoplasma weist keine Lamellarkörper mehr auf. Die so kultivierten Zellen liegen unmittelbar auf dem Niveau der Basallamelle, wo sie vereinzelt von Fibroblasten umfasst werden (siehe Abb.).

AIR**LIQUID**

Elektronenmikroskopische Darstellung der kultivierten Alveolarepithelzellen: A) und B) Kultivierung in der Air-Phase. C) und D) Kultivierung in der Liquid-Phase.

Die für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen verwendeten Typ₂-Zellen wurden 24 Stunden nach der Isolierung der Air-, bzw. Liquid-Kultivierung zugeführt. Hier wurden die Zellen für 72 Stunden kultiviert, bevor sie weiteren morphologischen Untersuchungen zugeführt wurden. Wie man aus der Abbildung entnehmen kann, behielten die unter Air-kultivierten Zellen ihre morphologischen Charakteristika, während die Liquid-kultivierten Zellen sich zu Typ₁-Zellen differenzierten. Abbildung A) und B) zeigen typische Charakteristika der Typ₂-Zellen. Die kuboidale Zellform ist eines dieser Charakteristika. Weiterhin sind die Lamellarkörper im Zytoplasma der Zellen deutlich zu erkennen. Sehr prominent ist auch der chromatinreiche Zellkern.

Die Zellen die unter C) und D) abgebildet sind, haben die morphologischen Aspekte der Typ₂-Zellen verloren. Es handelt sich um Typ₁-Zellen, die durch eine flache Zellform gekennzeichnet sind. Das Zytoplasma dieser Zellen ist organellenarm. D. h. die Kultivierung der Zellen in der Liquid-Phase hat zu einem Verlust der Typ₂-Zellspezifischen Morphologie geführt. Die Zellen haben sich zu Typ₁-Zellen entwickelt.

4.3. Messung der Surfactantproteinsekretion und der Expression der α_1 - Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase als Differenzierungsmarker der Typ₂-Zellen

Die Surfactantproteine (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D) sind unabdingbar für die Homoöstase des Surfactantsystems (siehe 2.2.).

Sie dienen unter anderem als Sekretagoga zur Steigerung der Surfactantsekretion. Weiterhin können sie als Inhibitoren die Sekretionsleistung der Zellen reduzieren.

Da die Surfactantproteinsynthese und die Sekretion dieser Proteine im Surfactantsystem eine spezifische Leistung der Typ₂-Zellen darstellt, lässt sich ihr Stellenwert für die Charakterisierung der Typ₂-Zellen daraus herleiten.

Als Indikator für die Präsenz der Typ₂-Zellen und zur eindeutigen Abgrenzung gegenüber den Typ₁-Zellen wurden die Surfactantproteine untersucht, die besonders lipophil waren. Zu diesen gehören das SP-B und das SP-C.

Zu weiterführenden Untersuchungen wurde auch das hydrophile SP-A herangezogen.

Der Nachweis der α_1 - Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase erfolgte als zusätzliche Kontrolle, da diese als besonders spezifischer Marker der Typ₂-Zellen anzusehen ist (siehe 2.3.1.).

Das SP-A hat eine zentrale Rolle bei der Regulation des Surfactantsystems inne. Gemeinsam mit den Lipidanteilen des Surfactants ist es in der Lage, einer überhöhten Surfactantsekretion entgegenzuwirken.

Die Hauptaufgabe des SP-B besteht in der Adsorption von neuen Lipiden aus dem alveolären Raum und deren Deposition in den Interphasebereich. Damit hat das SP-B eine wesentliche Bedeutung bei der Reutilisation und der Synthese von Surfactant.

Das SP-C hingegen schließt nicht-DPPC-Lipide aus der Alveole aus und sorgt für den Kontakt des Bilayers (Lipoproteinkomplex) mit dem Monolayer (DPPC).

Der Nachweis der Surfactantproteine und der α_1 - Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase erfolgte durch die Messung der mRNA-Produkte, die mit Hilfe der Real-time PCR bestimmt wurden.

Außerdem wurden die Surfactantproteine -B und -C direkt im Überstand der Zellen unter Verwendung eines ELISA nachgewiesen (siehe 3.9.).

Abbildung 1 zeigt die Expression der verschiedenen mRNA-Produkte, sowie die Proteinexpression und Sekretion von SP-B und SP-C in der Air-Fraktion im Vergleich zu den Liquid-kultivierten Zellen.

Aus der folgenden Abbildung geht hervor, dass die Expression der mRNA von SP-A und SP-C um den Faktor ~6 bei den Zellen höher lag, die unter Air-Bedingungen kultiviert wurden, verglichen mit den Liquid-kultivierten Wells.

Die Expression der mRNA für die α_1 - Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase lag bei den Air-kultivierten Zellen um das zweifache höher als bei den Zellen, die unter Liquid kultiviert wurden. Ebenso verhielt es sich mit der Proteinexpression von SP-B (Faktor ~2) und SP-C (Faktor 2,5).

Alle diese Typ_2 -zellspezifischen Marker lagen somit um ein mehrfaches höher in den Zellen vor, die unter Air-Bedingungen kultiviert wurden. Die Zellen, die unter Liquid-Verhältnissen kultiviert wurden, zeigten ausnahmslos niedrigere Werte bei der Expression dieser spezifischen Marker.

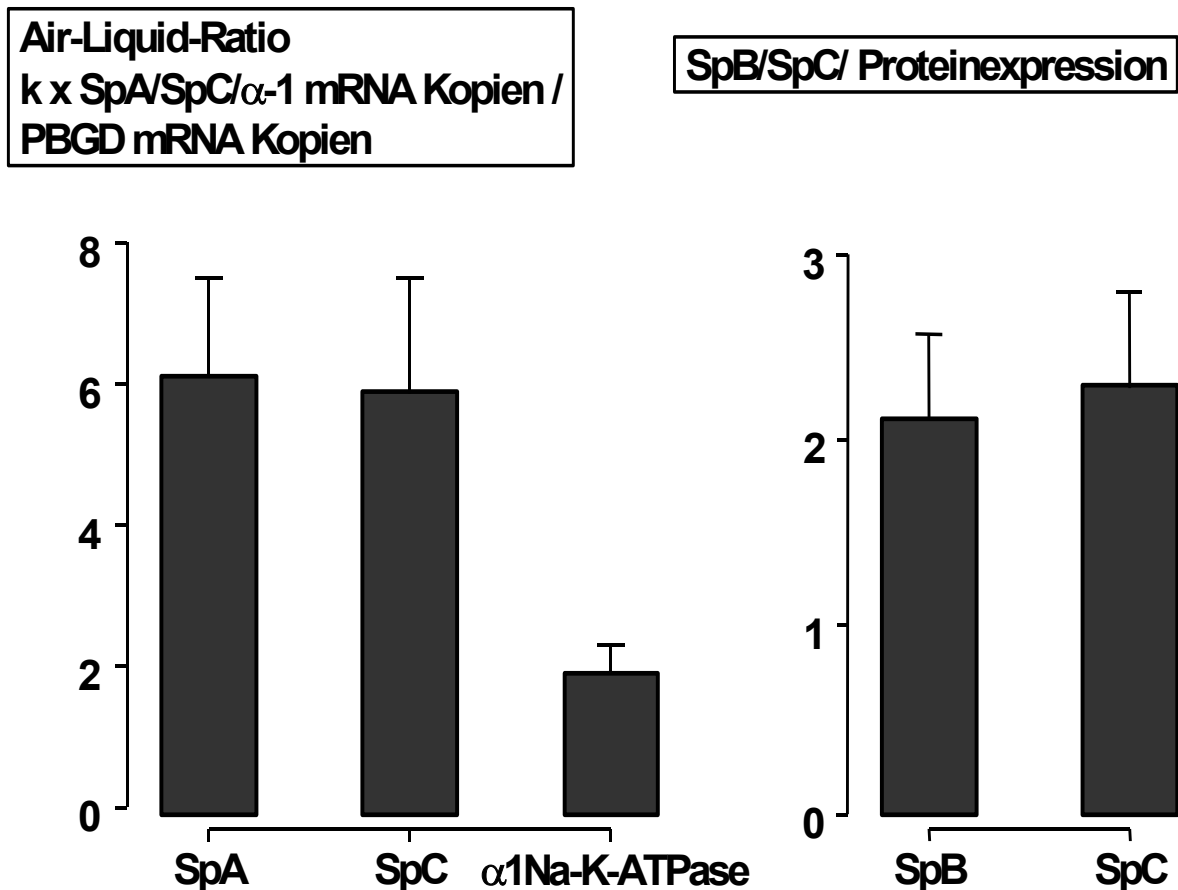


Abbildung 1: Effekt der Air-Liquid-Interphase auf die mRNA- und Proteinexpression spezifischer Differenzierungsmarker der Alveolarepithelzellen Typ II.

Abgebildet ist das relative Verhältnis der Expression der mRNA, des jeweiligen Differenzierungsparameters zwischen den Air-kultivierten Zellen und den Liquid-kultivierten Zellen. Die verwendeten Zellen wurden 48 Stunden im Air-Liquid-Interphasemodell kultiviert, bevor die mRNA extrahiert wurde. Außerdem ist die Expression und Sekretion der Surfactantproteine- B und -C im Verhältnis der Air-Liquid-Fractionen dargestellt. Die Vitalität und die Zahl der Zellen wurden regelmäßig überprüft. Kontaminierte Zellen wurden von den Versuchen ausgeschlossen. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

4.4. Betrachtung der Surfactantsekretion der Typ₂-Zellen als Marker ihrer Differenzierung

Die Fähigkeit zur Synthese, Sekretion und Reutilisation von Surfactant verleiht den Typ₂-Zellen eine herausragende Rolle unter den Zellen des Alveolarepithels. Nur so kann die Kollapstendenz der Alveole gemindert und die physiologische Ventilation der Alveole sowie die Oxygenierung des Blutes gewährleistet werden.

Wie bereits unter 2.2. beschrieben existieren verschiedene Möglichkeiten zur Aktivierung des Surfactantsystems.

Das wohl bekannteste Verfahren zur Aktivierung der Lungenreife *in vivo* ist der Einsatz von Glucocorticoiden. Weiterhin kann die Surfactantsekretion *in vivo* durch ein hohes Atemzugvolumen oder durch Hyperventilation ausgelöst werden. Diese Kenntnisse kommen bei der Therapie von Patienten mit akutem Lungenversagen (ARDS) zum Tragen.

Für die vorliegende Arbeit wurden zur Stimulation der Surfactantsekretion Adenosin-triphosphat (ATP), A-23187 und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) verwendet. Dabei handelt es sich um allgemein anerkannte Sekretagoga, die unabhängig voneinander durch unterschiedliche Mechanismen die Sekretion von Surfactant aus den Typ₂-Zellen aktivieren können.

Das ATP aktiviert die merokrine Sekretion von Surfactant aus den Typ₂-Zellen durch Induktion der Adenylatzyklase. Hierdurch entsteht zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), worauf aus dem endoplasmatischen Retikulum Calcium (Ca^{2+}) freigesetzt wird und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt.

Durch einen direkten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum wirkt das Calciumionophor A23187 ebenfalls sekretionssteigernd auf die Typ₂-Zellen ein.

Für die Messung der Sekretionsleistung wurden die Zellen mit radioaktiv markiertem Cholin (³H-Cholin) inkubiert (siehe 3.9.1.). Dabei war nicht nur die Sekretion von Surfactant das Ziel der Untersuchungen, sondern ebenso der Einbau des radioaktiven Markers in die Zellen.

Wie in Abbildung 2 dargestellt, verfügt bereits die Kontrolle der unter Air-kultivierten Zellen über eine ca. 100 % höhere Sekretionsleistung als die Liquid-kultivierten Zellen.

Mit allen verwendeten Sekretagoga konnte in den Zellen der Air-Fraktion eine um mindestens 200 % gesteigerte Sekretionsleistung gegenüber der Liquid-Fraktion nachgewiesen werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Wirkungsmechanismen (siehe oben) und Dosisbereiche der eingesetzten Sekretagoga lässt sich nur schwer ein direkter Vergleich hinsichtlich der Wirkpotenz der eingesetzten Substanzen treffen.

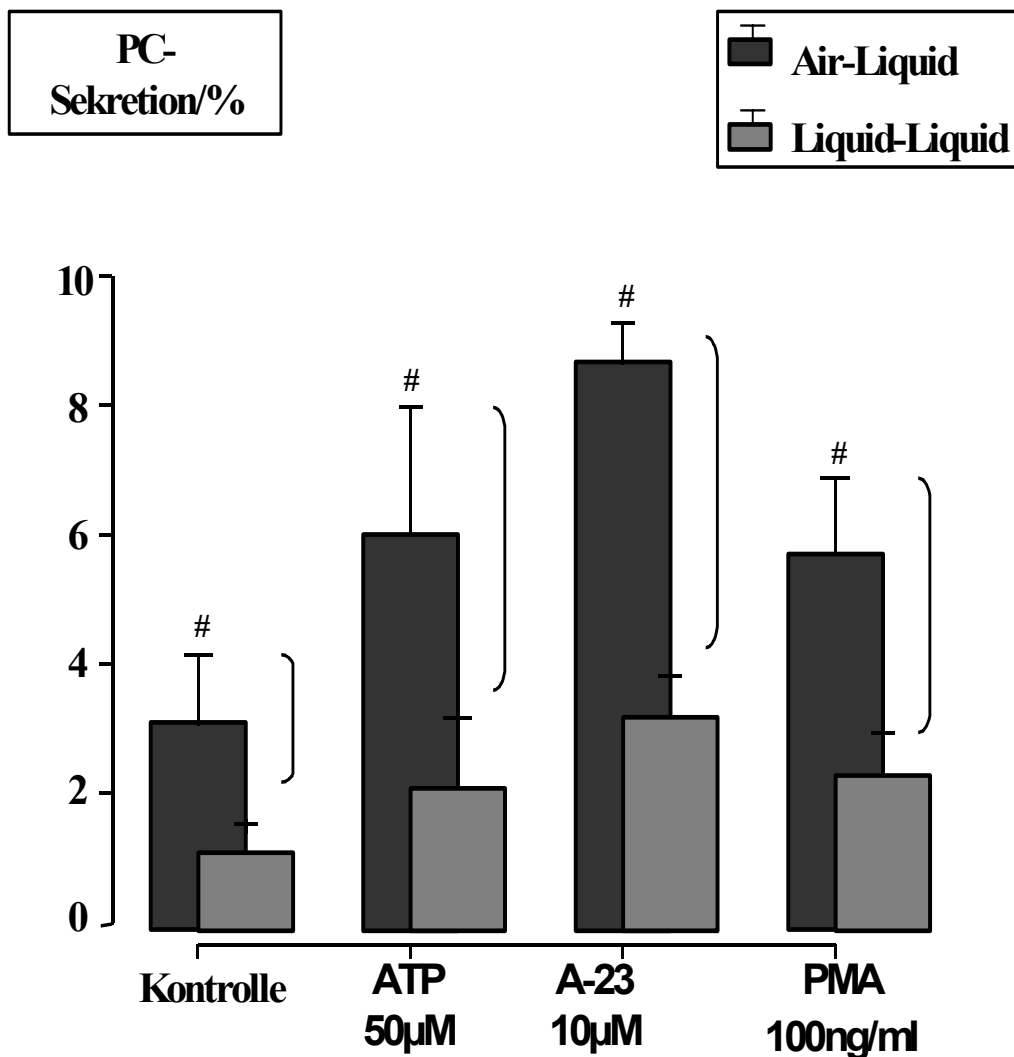


Abbildung 2: Auswirkung der Air-Liquid-Interphase auf die Sekretionsleistung in Alveolarepithelzellen.

Die Typ₂-Zellen wurden mit ³H-methyl-Cholin inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die adhärennten Typ₂-Zellen gewaschen und das Medium durch serumfreies DMEM ohne radioaktive Vorstufe ersetzt. Durch lichtmikroskopische Kontrollen wurde sichergestellt, dass keine frei schwimmenden Zellen mehr vorhanden waren. Zum Start des Experiments wurden die gelösten Testsubstanzen (ATP, A-23187 und PMA) hinzugegeben. Nach der Inkubationsphase mit den Testsubstanzen wurden die Überstände von den Zellen separiert, um so die Differenzierung zwischen sezerniertem Surfactant und in den Surfactantpool der Zelle eingebautem ³H-methyl-Cholin treffen zu können. # unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle. Die Mittelwerte ± SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

4.5. Widerstandsmessung: Indikator eines intakten Monolayers bei Kultivierung von Alveolarepithelzellen im Air-Liquid-Interphasemodell

Der epitheliale Widerstand wurde als Typ₁-zellspezifische Größe gemessen, um den Verlust der Typ₂-zellspezifischen Charakteristika in Abhängigkeit vom Kultivierungsverfahren zu dokumentieren. Da die Typ₂-Zellen keinen epithelialen Zellverband aufbauen, bleibt hier der epitheliale Widerstand niedrig. Somit deutet ein niedriger epithelialer Widerstand in einer intakten Zellkultur mit Typ₂-Zellen auf eine Konservierung der Zellen mit deren typischen Charakteristika.

Bei frisch isolierten Alveolarepithelzellen TypII, die nach 48 Stunden dem jeweiligen Kultivierungsverfahren zugeführt wurden (Air-Liquid oder Liquid-Liquid), boten die Zellen nach 24 stündiger Kultivierung in den Air-kultivierten Wells einen signifikanten Abfall des gemessenen Widerstandes um über 80% gegenüber den Liquid-kultivierten Zellen. Bei letzteren war der epitheliale Widerstand sogar um über 30% im Vergleich zum Ausgangswert am Vortag gestiegen.

Bei den Zellen der Air-Phase blieb der epitheliale Widerstand niedrig. Als Ausdruck der Reversibilität des Transdifferenzierungsprozesses wurden die Typ₂-Zellen anschließend (5. Tag) in Form der Liquid-Wells weiter kultiviert.

So stieg der epitheliale Widerstand in den zuvor Air-kultivierten jetzt ebenfalls Liquid-kultivierten Wells auf Werte, die in der Größenordnung der kontinuierlich unter Liquid-gehaltenen Zellen lagen.

Die Typ₂-Zellen, die kontinuierlich in einer Liquid-Phase kultiviert wurden, boten in den ersten drei Tagen einen stetigen Anstieg des epithelialen Widerstands. Ab dem vierten Tag fiel jedoch der Widerstand ebenfalls ab (siehe Abb. 3).

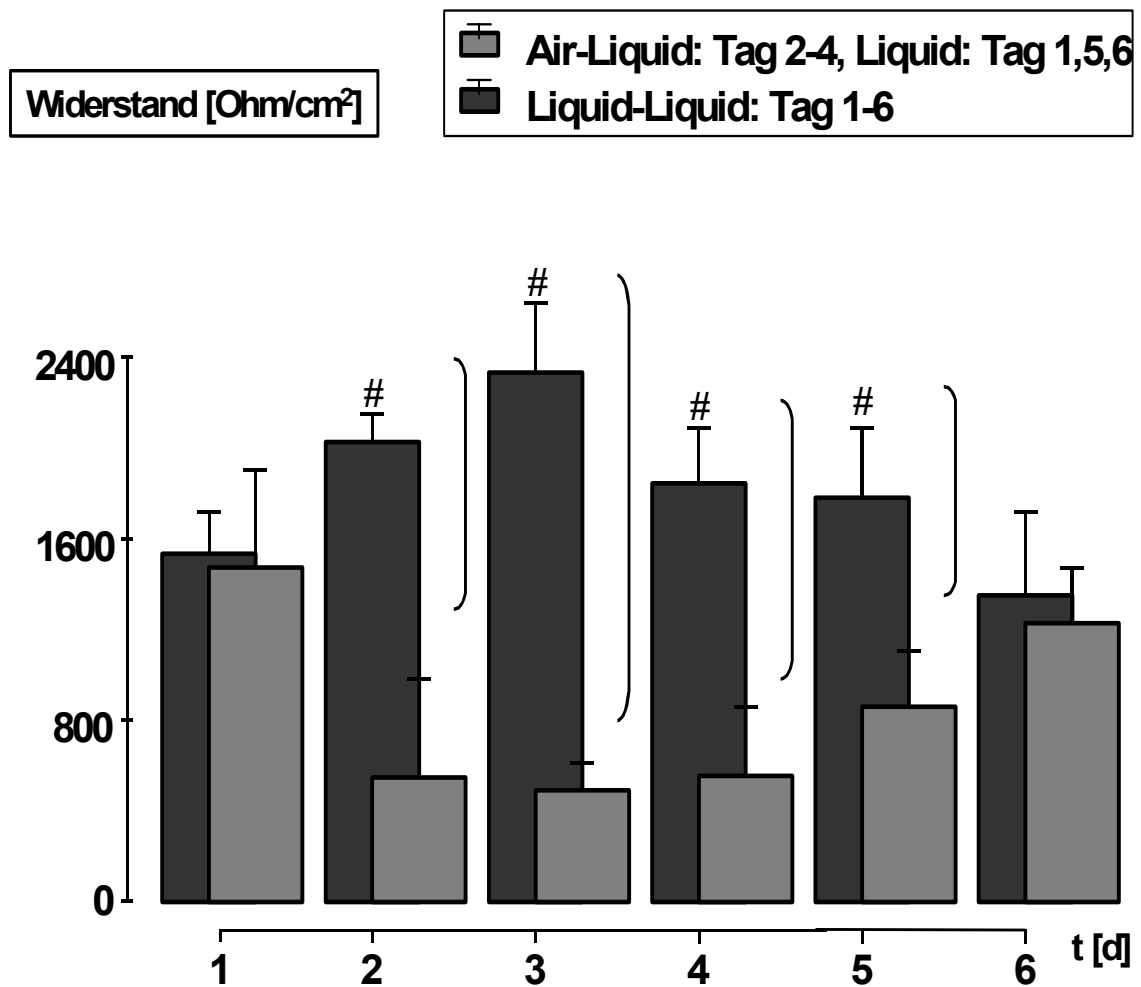


Abbildung 3: Folge der Air-Liquid-Kultivierung auf den epithelialen Widerstand von Alveolarepithelzellen.

Die Alveolarepithelzellen TypII wurden 48 Stunden nach ihrerer Isolierung dem jeweiligen Kultivierungsverfahren zugeführt. Der erste Tag der Messung entspricht exakt 48 Stunden nach Primärisolierung der Zellen. Zu diesem Zeitpunkt lagen überwiegend Typ₂-Zellen vor. Nach der ersten Messung erfolgte die Zuteilung der Zellen zum jeweiligen Kultivierungsverfahren. Der zweite Tag der Messung erfolgte somit 24 Stunden nachdem die Typ₂-Zellen im jeweiligen Verfahren kultiviert wurden. # unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

4.6. Freisetzung inflammatorischer Proteine aus Alveolarepithelzellen

Die Lunge stellt eine Grenzfläche des Organismus dar. Durch die Ventilation der Alveolen findet hier der Gasaustausch statt. Auf diese Weise können jedoch auch potentiell toxische Substanzen oder die Integrität des Organismus gefährdende Mikroorganismen in die Blutbahn übertreten.

Der Organismus schützt sich vor diesen Gefahren durch ein eigenes System einer lokalen Immunabwehr (siehe 2.5.). An dieser lokalen Abwehr sind auch Zellen des Alveolarepithels beteiligt (siehe 2.6.).

Die Typ₂-Zellen heben sich durch ihre Fähigkeiten zur aktiven Teilnahme an diesen immunmodulierenden Abwehrmechanismen aus diesem Zellverband hervor. Sie sind, ebenso wie andere Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, Granulozyten, u.a.) in der Lage zur Synthese und Sekretion von Zytokinen. Dies ist ein zentraler Punkt, der sie von den Typ₁-Zellen unterscheidet.

Als inflammatorische Differenzierungsparameter wurden für die vorliegende Arbeit das Monozyten-chemotaktische Protein-1 (MCP-1) und das Makrophagen-inflammatorische Protein-2 (MIP-2) analysiert.

Die Identifizierung und Quantifizierung von MCP-1 und MIP-2 erfolgte sowohl durch den Nachweis des Proteins mit einem kommerziellen ELISA (Catalog #KRC1010-SB), als auch durch den Nachweis der entsprechenden mRNA mit Hilfe der TaqMan PCR (mit freundlicher Unterstützung von Dr. L. Fink, Institut für Pathologie, Justus-Liebig Universität, Giessen).

4.6.1. Proteinexpression des Monozyten-chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1)

Die Sekretion von MCP-1 zeigt eine direkte Korrelation zur inflammatorischen Potenz der untersuchten Zellen. Da bekannt ist, dass die Typ₂-Zellen ein größeres inflammatorisches Potential besitzen als die Typ₁-Zellen, die nicht in der Lage sind MCP-1 zu synthetisieren,

diente der direkte Nachweis dieses Zytokins als Differenzierungsmarker für die kultivierten Typ₂-Zellen in der Air-Liquid-Interphase.

Ebenso wie bei den Versuchen zum Nachweis von MIP-2 (siehe 4.6.2.) wurden als Stimuli Lipopolysaccharid (LPS), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) eingesetzt. Bei allen drei verwendeten Stimuli zeigte sich in einer Zeitreihe von 0 bis 48 Stunden ein signifikant erhöhter Anteil von MCP-1 in den Überständen der Zellen, die unter Air-Verhältnissen kultiviert wurden (siehe Abb. 4).

4.6.2. Proteinexpression des Makrophagen-inflammatorischen Proteins-2 (MIP-2)

Das MIP-2 ist wie das MCP-1 ein Zytokin, welches als Marker für das Vorhandensein von Typ₂-Zellen anzusehen ist. Unter den Alveolarepithelzellen sind nur diese zur Synthese und Sekretion von MIP-2 in der Lage, nicht jedoch die Typ₁-Zellen.

Mit allen eingesetzten Stimuli ließ sich, im Vergleich zu den Liquid-kultivierten Wells, eine signifikant erhöhte Menge MIP-2 in den Air-kultivierten Wells im Überstand nachweisen (siehe Abb. 4).

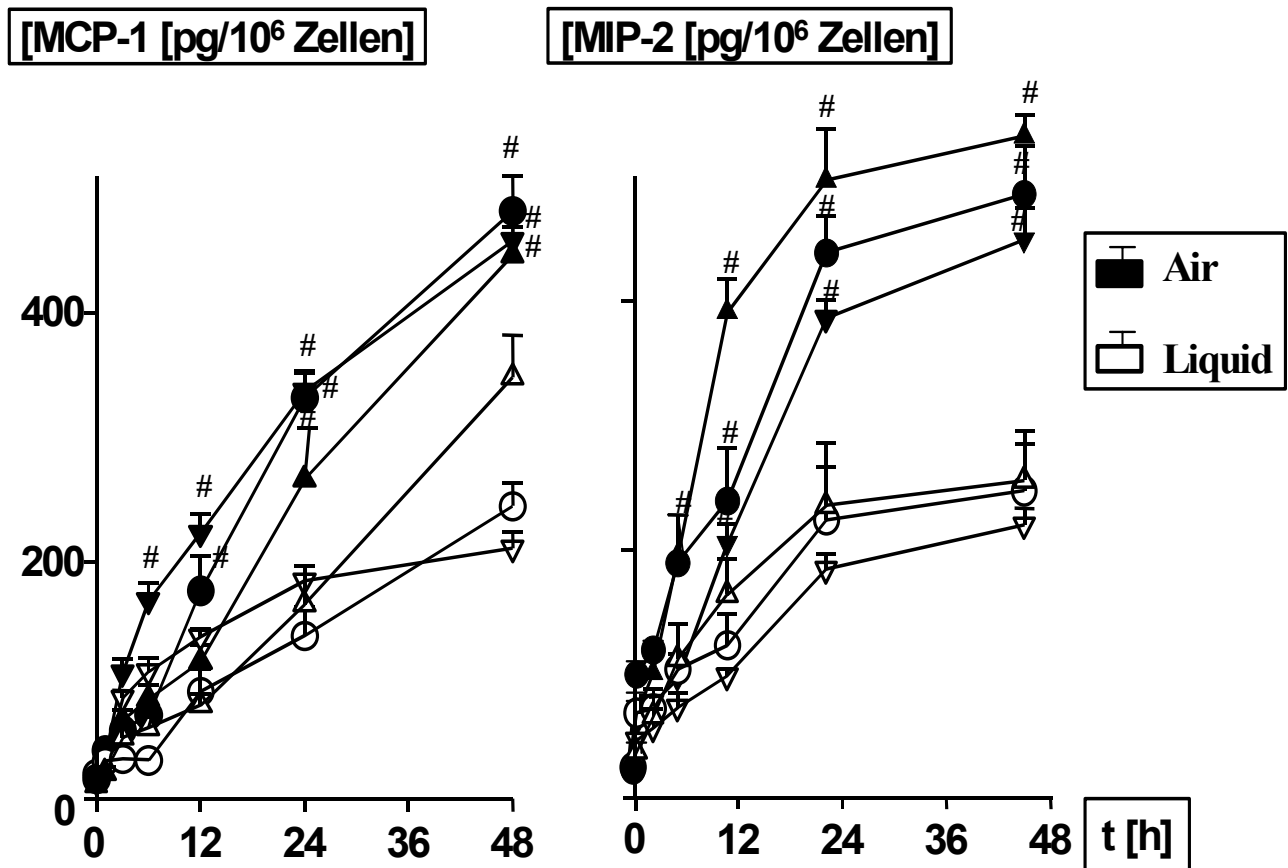


Abbildung 4: Effekt von Air-Liquid-Interphase auf die Sekretion von MCP-1 und MIP-2 aus Alveolarepithelzellen nach Inkubation mit IL-1 Δ , TNF \circ und LPS ∇ .

Die Quantifizierung von MCP-1 und MIP-2 erfolgte mittels kommerzieller Immunassaysysteme von Biosource International (Nivelles, Belgien). Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Isolierung der unterschiedlichen Kultivierungsform zugeführt. Die Zellen wurden mit 20 ng/ml LPS, 10 ng/ml TNF- α und 10 U/ml IL-1 inkubiert. Danach wurden die Überstände von den Wells entfernt und zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand analysiert. Die Vitalität und die Anzahl der Zellen wurden regelmäßig untersucht.

unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

4.6.3 Effekt der Air-Liquid-Interphase auf die mRNA-Expression von MCP-1 in Alveolarepithelzellen

Das Monozyten-chemotaktische Protein-1 (MCP-1) ist ein Zytokin, das besonders auf Entzündungszellen wie polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) und Makrophagen seine Wirkung entfaltet. Unter LPS-Einwirkung wird es von diesen Entzündungszellen, aber auch von Typ₂-Zellen synthetisiert und freigesetzt. Dies führt zu einer Akkumulation von weiteren inflammatorischen Zellen in der Alveole und zu einer lokalen Entzündungsreaktion (siehe 2.6.1.).

Nachdem das MCP-1 in den Vorversuchen mit einem kommerziellen ELISA direkt in den Überständen der Zellen nachgewiesen werden konnte, ließ sich die Herkunft des Zytokins durch Analyse der mRNA, mit der TaqMan PCR (mit freundlicher Unterstützung von Dr. L. Fink, Institut für Pathologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen) aus den Typ₂-Zellen nachweisen.

Da auch Makrophagen MCP-1 synthetisieren und sezernieren können, war bei den durchgeführten Versuchen die Reinheit der Zellen von zentraler Bedeutung.

Eine Kontamination der verwendeten Zellen mit Makrophagen wurde nach jeder Zellisolierung lichtmikroskopisch ausgeschlossen. Die Reinheit der Typ₂-Zellen wurde aufgrund eines spezifischen Reinigungsschrittes bei der Zellisolierung (Antikörper zur Entfernung von Makrophagen, siehe 3.5.2.) auf 99% beziffert.

Bereits vier Stunden nach apikaler Luftexposition der Typ₂-Zellen ließ sich eine höhere (ca. 45%) mRNA-Expression für MCP-1 in diesen Zellen nachweisen als in den unter Liquid-kultivierten Zellen.

Im weiteren Verlauf der Kultivierung der Zellen wurde dieser Unterschied zwischen Air- und Liquid immer deutlicher.

So lag nach 48 Stunden der Gehalt an MCP-1-mRNA in den Zellen, die in der Air-Phase kultiviert wurden, um den Faktor 10 über den Typ₂-Zellen, die unter Liquid-Bedingungen kultiviert wurden (siehe Abb. 5).

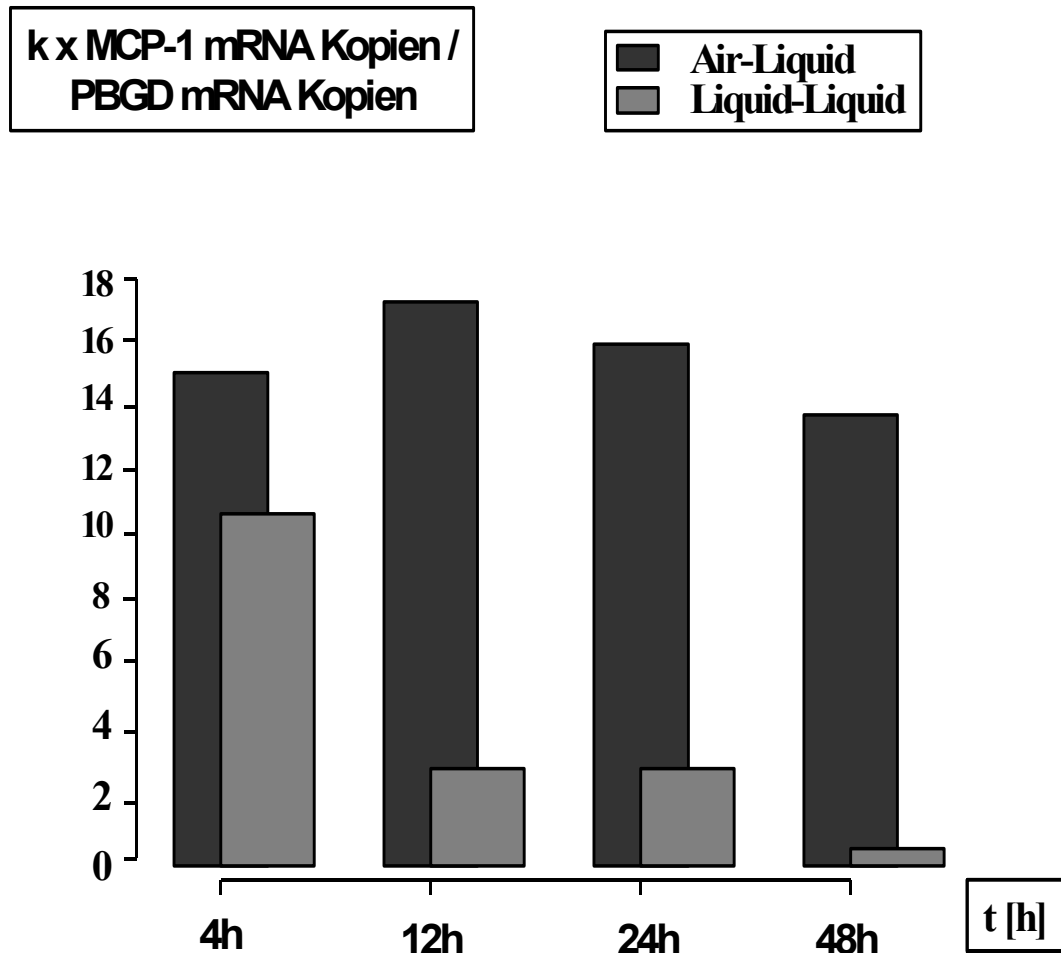


Abbildung 5: Auswirkung der Air-Liquid-Interphase auf die mRNA-Expression von MCP-1 in Alveolarepithelzellen.

Dargestellt ist die mRNA-Expression von MCP-1, nachdem die Typ₂-Zellen 4, 12, 24 und 48 Stunden in der Air-Liquid-Interphase kultiviert wurden. Diesen Werten ist die mRNA-Expression der Typ₂-Zellen gegenüber gestellt, die unter Liquid-Bedingungen kultiviert wurden.

Bereits vier Stunden nach Trennung der zuvor isolierten Zellen, zeigten sich Unterschiede in der mRNA-Expression des untersuchten Markers. Je länger die Typ₂-Zellen im jeweiligen Kultivierungsmilieu belassen wurden, umso deutlicher zeigte sich ein Überwiegen an MCP-1-mRNA in den Typ₂-Zellen der Air-Liquid-Interphase.

4.6.4. Pharmakologische Blockade der LPS-induzierten Sekretion von MCP-1

Um einen Einblick in die Mechanismen zu erhalten, die zur Synthese und Sekretion von MCP-1 führen, wurde der Versuche unternommen die LPS-induzierte Liberierung von MCP-1 aus Typ₂-Zellen zu hemmen.

Dafür wurden spezifische Antikörper eingesetzt, die zu einer kompetitiven Hemmung des LPS führen sollten. Zur Antagonisierung der ablaufenden inflammatorischen Reaktion wurden ein anti-CD-14-Antikörper (MY-4, 1 µg/ml) und ein anti-TNF- α -Antikörper (5 µg/ml) verwendet. Als Versuchszeitpunkt wurde $t = 24$ Stunden gewählt, um auftretende kurzfristige Effekte der Antikörper auszuschließen.

Bei beiden Antikörpern zeigte sich eine deutliche Abnahme der LPS-induzierten Sekretion von MCP-1.

Die Freisetzung von MCP-1 ließ sich bei den in der Air-Phase kultivierten Typ₂-Zellen durch den Einsatz des anti-CD-14-Antikörpers bis auf 90% reduzieren. Bei den Liquid-kultivierten Zellen betrug die Hemmung ca. 80%.

Durch Zugabe des anti-TNF- α -Antikörpers ließ sich die Freisetzung von MCP-1 bei den Air-kultivierten Typ₂-Zellen ebenfalls reduzieren (ca. 95%).

In den Liquid-behandelten Typ₂-Zellen kam es zu einer Abnahme der Sekretion von MCP-1 um ca. 90%, nach Zusatz des anti-TNF- α -Antikörpers (siehe Abbildung 6).

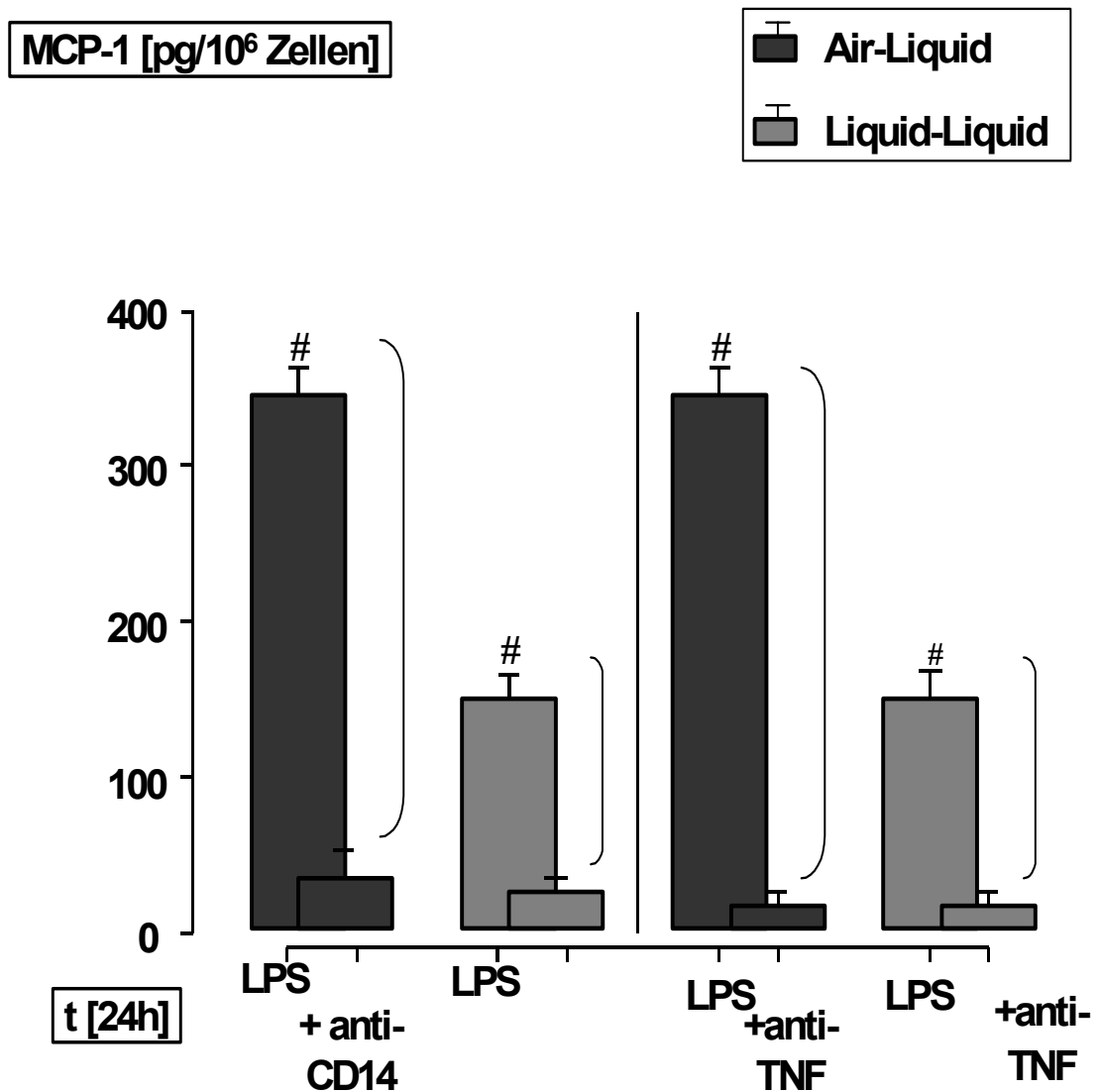


Abbildung 6: Effekt von anti-CD 14 und anti-TNF- α auf die LPS-induzierte Sekretion von MCP-1 aus Alveolarepithelzellen.

Die Abbildung verdeutlicht den Effekt der verwendeten Antikörper auf die Sekretion von MCP-1 aus Typ₂-Zellen. Sowohl der anti-CD-14-Antikörper, als auch der anti-TNF- α Antikörper führen zu einer Reduktion der Sekretion von MCP-1 nach 24-stündiger Inkubation der Typ₂-Zellen mit LPS. Die Sekretion von MCP-1 ließ sich durch den anti-TNF- α – Antikörper stärker hemmen als durch den anti-CD-14-Antikörper. Bei allen Versuchen boten die Typ₂-Zellen, die in der Air-Liquid-Interphase kultiviert wurden trotz der verwendeten Antikörper weiterhin eine höhere MCP-1-Sekretion, gegenüber den ausschließlich Liquid-kultivierten Zellen. # unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

4.6.5. Pharmakologische Blockade der LPS-induzierten Sekretion von MIP-2

Wie bereits unter 4.6.4. beschrieben wurden spezifische Antikörper verwendet, um die MCP-1-Sekretion nach LPS-Inkubation aus Typ₂-Zellen zu hemmen.

Auch die Synthese und Sekretion von MIP-2 nach Stimulation mit LPS aus Typ₂-Zellen wurde auf diese Weise gehemmt.

Auch bei diesen Versuchen wurden zur pharmakologischen Hemmung der LPS-Wirkung an den Typ₂-Zellen ein anti-CD-14-Antikörper (MY-4, 1µg/ml) und ein anti-TNF-α-Antikörper (5µg/ml) verwendet. Die Versuchsdauer betrug ebenfalls 24 Stunden.

Die Sekretion von MIP-2 aus Typ₂-Zellen, die über 24 Stunden mit 20 ng LPS inkubiert wurden, ließ sich durch den anti-CD-14-Antikörper um ca. 95% bei den Zellen reduzieren, die in der Air-Phase kultiviert wurden.

Ebenso hoch (ca. 95%) lag die Hemmung der MIP-2-Sekretion nach Einsatz des anti-CD-14-Antikörpers bei den Typ₂-Zellen, die in der Liquid-Phase kultiviert wurden. Damit ließ sich mit dem verwendeten Antikörper die Sekretion von MIP-2 stärker antagonisieren als die Sekretion von MCP-1 (siehe 4.6.4.).

Auch bei Verwendung des anti-TNF-α-Antikörpers zur Hemmung der MIP-2-Sekretion boten die Typ₂-Zellen eine Reduktion der zuvor gemessenen Sekretion (Air-kultivierte Zellen: ca. 82%, Liquid-kultivierte Zellen: ca. 91%).

Die Antagonisierung der MIP-2-Sekretion mit dem TNF-α-Antikörper lag im prozentualen Vergleich niedriger, als die Hemmung der Sekretion von MCP-1 aus Typ₂-Zellen mit demselben Antikörper (siehe 4.6.4.).

Sowohl bei den Versuchsbedingungen unter 4.6.4., als auch bei der Gestaltung dieses Protokolls wurden die Antikörper zu Beginn der LPS-Inkubation den Zellen apikal zugeführt. So konnten eventuell auftretende Soforteffekte des LPS durch die Antikörper antagonisiert werden.

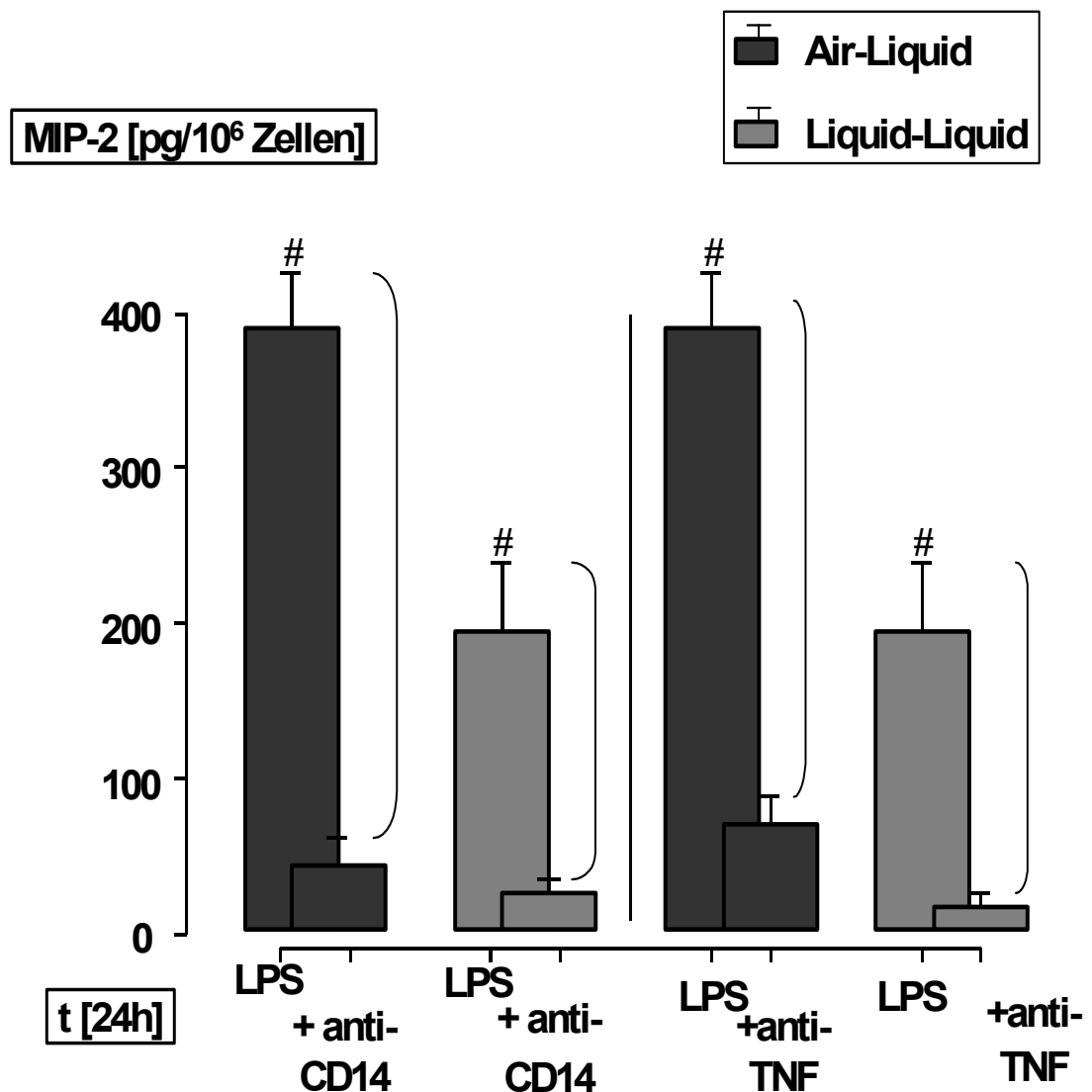


Abbildung 7: Effekt von anti-CD 14 und anti-TNF- α auf die LPS-induzierte Sekretion von MIP-2 aus Alveolarepithelzellen.

Für die Antagonisierung der inflammatorischen Antwort der Typ₂-Zellen nach Inkubation mit LPS wurden, wie bereits unter 4.6.5. beschrieben, anti-CD-14 und anti-TNF- α verwendet. Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, lässt sich die Sekretion von MIP-2 durch die verwendeten Antikörper deutlich reduzieren. Im Vergleich zu den Versuchen zur Hemmung der MCP-1-Sekretion zeigt sich hier unter anti-CD-14-Wirkung eine stärkere Antagonisierung des sezernierten Zytokins.

unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

4.7. Einfluss von Hypoxie auf den Differenzierungszustand von Alveolarepithelzellen

4.7.1. Der Einfluss von Hypoxie auf die Surfactantsekretion

Hypoxie stellt für die Zellen vieler Organe einen proliferativen Stimulus dar. Dennoch lässt sich die Wirkung eines niedrigen Sauerstoffpartialdrucks auf verschieden strukturierte und spezialisierte Zellverbände nicht verallgemeinern.

In unseren Versuchen galt es auch die Hypoxie als Faktor auf Einfluss und Wirkung zweier verschiedener Kultivierungsformen und damit verbundener Transdifferenzierungsprozesse zu untersuchen.

Bei den Untersuchungen in der Hypoxiekammer war es für das Erreichen einer hohen Reliabilität der Ergebnisse nötig, die aktuelle Zellzahl zu ermitteln. Aus diesem Grunde wurden auf den verwendeten Zellkulturplatten Wells mit Typ₂-Zellen ausgesucht, die eigens für eine Zellzahlbestimmung vorgesehen waren. So konnte nach jedem Versuch ermittelt werden, ob die Zellzahl durch die verschiedenen Sauerstoffpartialdrücke (Hypoxie /Normoxie) beeinflusst wurde, um so überhaupt den Vergleich zwischen Normoxie und Hypoxie möglich zu machen.

Die Zellzahl variierte zwischen Hypoxie und Normoxie nur sehr selten (+/- 50000 Zellen). Versuche bei denen eine Diskrepanz in der Zellzahl vorlag (Unterschied >10%), wurden aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

In Abbildung 8 ist die Surfactantsekretion in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck dargestellt, wobei jeweils die in der Air-Liquid-Interphase kultivierten Typ₂-Zellen für den Vergleich zwischen Hypoxie und Normoxie herangezogen wurden. Als Sekretagoga wurden die unter 4.4. beschriebenen Substanzen (ATP, A-23187 und PMN) verwendet.

Die unter hypoxischen Bedingungen kultivierten Zellen zeigten einen signifikant verminderten Einbau der radioaktiv markierten Trägersubstanz (³H-Cholin). Sie sezernierten nach Stimulation durch die verwendeten Sekretagoga weniger Surfactant. Die Kontrollen zeigten ebenso eine geringere Surfactantsekretion.

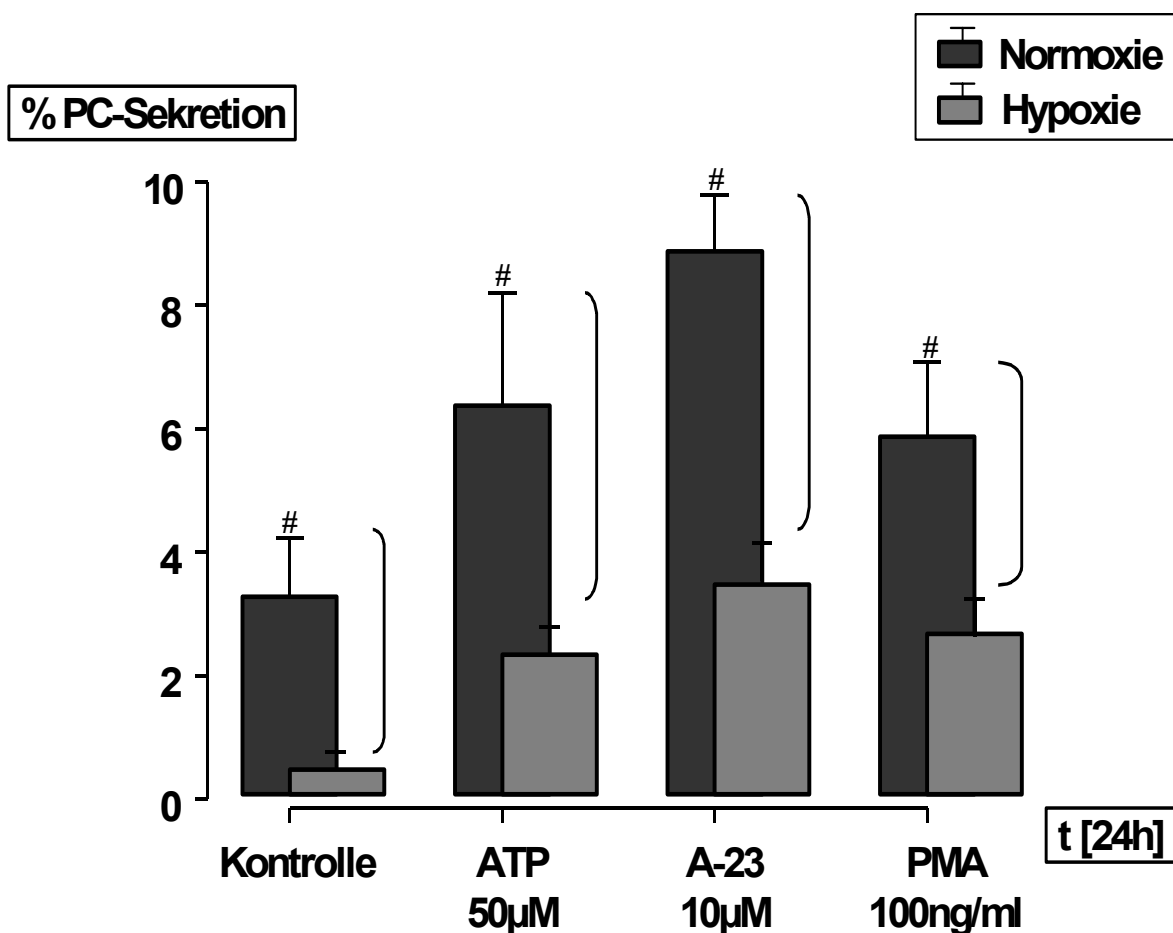


Abbildung 8: Einfluss von Hypoxie auf die Sekretion von Surfactant aus Alveolar-epithelzellen nach Stimulation mit verschiedenen Sekretagoga.

Unter Einwirken von Hypoxie manifestierte sich eine signifikante Abnahme der Surfactantsekretion. Während bei der unstimulierten Kontrolle die Abnahme der Sekretion fast 90 % betrug, ließ sich durch Inkubation der Zellen mit den Sekretagoga die Sekretion auf 60 % der Normoxiekontrollen reduzieren. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden für diese Abbildung nur die Werte miteinander verglichen, die durch die Air-kultivierten Zellen unter Normoxie und Hypoxie ermittelt wurden. # unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

4.7.2. Auswirkung von Hypoxie auf die mRNA-Expression von SP-A, SP-C und MCP-1

Als Differenzierungsparameter für die untersuchten Typ₂-Zellen eignet sich besonders die Analyse der Surfactantproteine und der inflammatorischen Aktivität der Zellen (siehe 2.2. und 2.6.).

Auch für die weiterführenden Untersuchungen zur Analyse des Verhaltens der kultivierten Zellen in Hypoxie wurden diese Parameter herangezogen. Dabei wurde die mRNA-Expression des untersuchten Markers mit der TaqMan-PCR bestimmt (siehe 3.12.).

Als Versuchszeitpunkt wurden 12 Stunden und 3 Tage nach Beginn der Kultivierung der Typ₂-Zellen im Air-Liquid-Interphasemodell definiert.

Nach 3 Tagen zeigte sich eine signifikant höhere mRNA-Expression der untersuchten Surfactantproteine in den normoxisch-kultivierten Typ₂-Zellen gegenüber den hypoxisch kultivierten Typ₂-Zellen. Dieser Unterschied fiel beim SP-A deutlicher aus als beim SP-C.

Bei der Untersuchung der MCP-1-mRNA-Expression zeigte sich bereits nach einem halben Tag ein mehrfaches an MCP-1-mRNA in den Typ₂-Zellen, die bei normoxischen Sauerstoffgehalt kultiviert wurden, gegenüber denen die in Hypoxie gehalten wurden.

Die in der Abbildung 9 dargestellte Graphik zeigt den relativen Vergleich der mRNA-Expression der untersuchten Marker in den Typ₂-Zellen, die unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden, gegenüber den Zellen die für die Dauer der Kultivierung in der Hypoxiekammer waren.

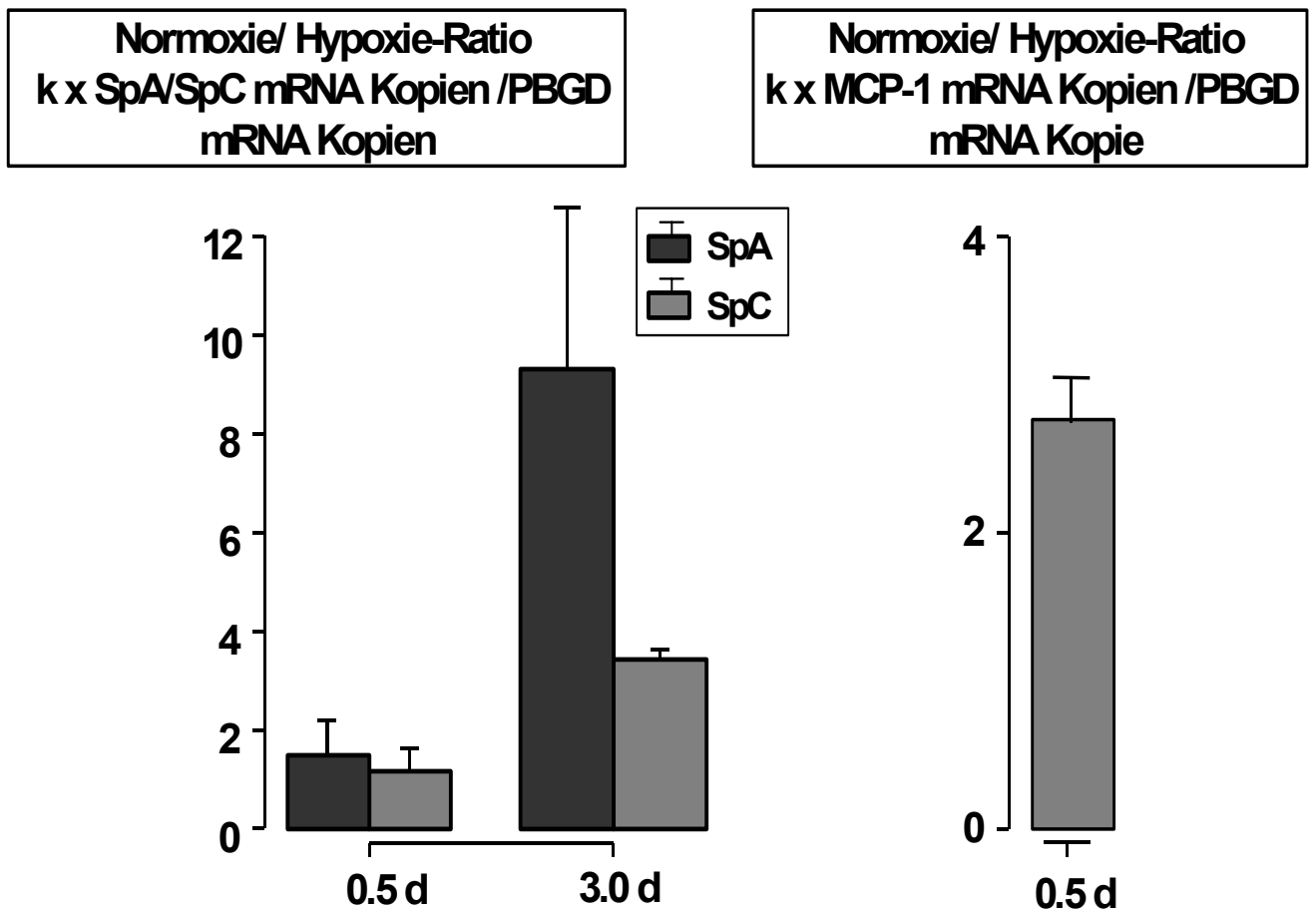


Abbildung 9: Auswirkungen von Hypoxie auf die mRNA- Expression von SP-A, SP-C und MCP-1 in Alveolarepithelzellen.

Die verwendeten Zellen wurden sobald sie 48 Stunden nach ihrer Isolierung dem Air-Liquid-Interphase-Modell zugeführt wurden in die Hypoxiekammer gestellt. Hier herrschte ein Sauerstoffgehalt von <1%. Die Zellen wurden in der Hypoxiekammer genauso behandelt, wie die Zellen, die als Kontrolle unter Normoxie kultiviert wurden. Das tägliche waschen der Zellen in der Hypoxiekammer erfolgte in einem "Hypoxiesack", der durch Stickstoffbegasung auf den gewünschten Sauerstoffgehalt eingestellt wurde. Die verwendeten Medien wurden vorher ebenfalls durch Stickstoffbegasung äquilibriert.

4.7.3. Effekt von Hypoxie auf die Sekretion von MCP-1

Nach der Analyse der mRNA-Expression des Monozyten-chemotaktischem Proteins-1 (MCP-1) (4.7.2.) aus Typ₂-Zellen in Abhängigkeit vom herrschenden Sauerstoffpartialdruck wurde zusätzlich die Proteinexpression von MCP-1 im apikalen Medium der kultivierten Typ₂-Zellen untersucht.

Bevor die Typ₂-Zellen zu den Versuchen herangezogen wurden, mussten diese für drei Tage in der Hypoxiekammer kultiviert werden. Dies erfolgte, nachdem die Zellen 48 Stunden nach ihrer Isolierung dem jeweiligen Kultivierungsverfahren zugeführt und anschließend für drei Tage unter Normoxie kultiviert worden waren.

In der Hypoxiekammer verblieben die Typ₂-Zellen bei <1% Sauerstoffgehalt für drei Tage. Erst nach dieser Zeit wurden die Zellen mit den verschiedenen Substanzen inkubiert. Zuvor wurden die verwendeten Medien für den Gebrauch in der Hypoxiekammer äquilibriert. Zur Induktion der Sekretion von MCP-1 wurden die Typ₂-Zellen für 24 Stunden mit LPS, TNF- α oder IL-1 inkubiert.

Die Analyse der so gewonnenen Überstände demonstrierte eine signifikante Minderung der MCP-1-Sekretion bei den Zellen, die in der Hypoxiekammer kultiviert wurden. Demgegenüber wiesen die Typ₂-Zellen, die bei normoxischen Sauerstoffbedingungen gehalten wurden weiterhin hohe Sekretionsraten für MCP-1 auf (Abb. 10).

Diese Abnahme der MCP-1-Sekretion unter Hypoxie manifestierte sich sowohl unter den Zellen die in der Air-Phase kultiviert wurden, als auch bei denen die unter Liquid-Bedingungen kultiviert wurden.

Das unterschiedliche inflammatorische Potential, welches sich hinsichtlich der Sekretion von MCP-1 und der Kultivierung der Zellen im Air-Liquid-Interphasemodell manifestierte war nicht nur bei den Versuchen unter Normoxie vorzufinden. Auch bei den Zellen, die in der Hypoxiekammer kultiviert wurden war dieser Unterschied im Bezug auf die Air- oder Liquid-Kultivierung deutlich. In beiden Fällen lag die Sekretion des Zytokins in den Air-kultivierten Zellen über der Sekretion der Liquid-behandelten Zellen.

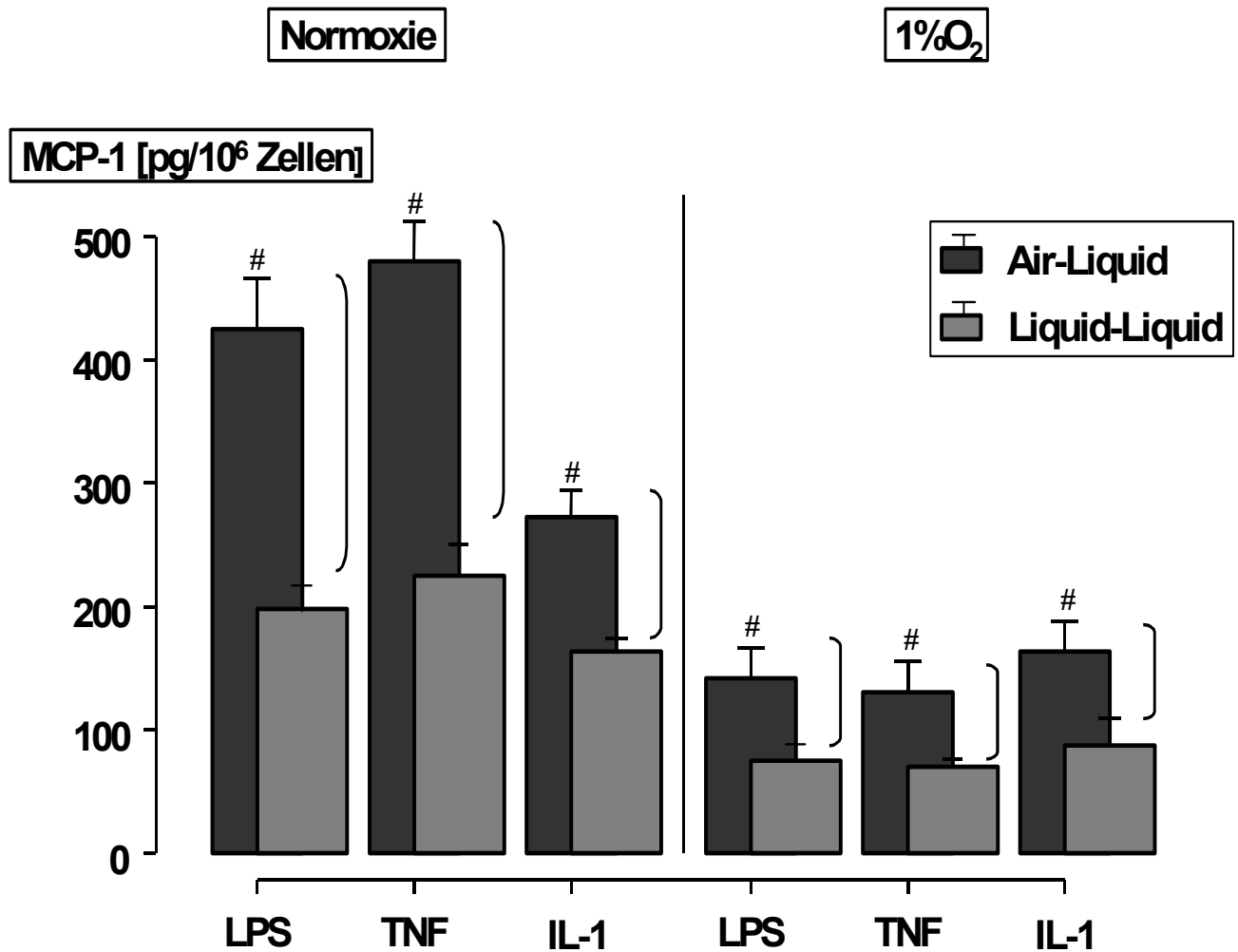


Abbildung 10: Auswirkung von Hypoxie auf die Sekretion von MCP-1 aus Alveolar-epithelzellen.

Die Inkubationszeit für die verwendeten Substanzen lag bei 24 Stunden. Bevor die Zellen den Versuchen in der Hypoxiekammer zugeführt wurden, mussten diese zunächst für drei Tage nach ihrer Zuteilung in das jeweilige Kultivierungsverfahren, dort bei normalem Sauerstoffgehalt verbleiben. Anschließend wurde ein Teil der Zellen in die Hypoxiekammer gestellt, wo die Zellen für weitere drei Tage belassen wurden.

unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

4.7.4. Die Folgen von Hypoxie auf die Sekretion von MIP-2

Ebenso wie für MCP-1 wurden für das Makrophagen-inflammatorische Protein-2 (MIP-2) Untersuchungen an den Alveolarepithelzellen in Hypoxie durchgeführt, bei denen neben der TaqMan PCR zum Nachweis der spezifischen mRNA-Expression auch ein kommerzieller ELISA zur Sondierung des Proteins im Überstand eingesetzt wurde.

Als Probe für den durchgeführten Immunassay diente der Überstand der Wells, durch den die Inkubation der Zellen erfolgte. Die so gewonnenen Überstände wurden zentrifugiert und das Pellet wurde verworfen.

Nach Kalibrierung mit der durch den Hersteller gelieferten Standardreihe, konnte das in den Überständen enthaltene MIP-2, wie auch zuvor das MCP-1 bestimmt werden.

Auch hier lag eine signifikante Abnahme der Zytokinsekretion nach Kultivierung der Zellen unter Hypoxie vor, verglichen mit den Kontrollen unter Normoxie.

Weiterhin war die Mehrsekretion in den Air-kultivierten Typ₂-Zellen, gegenüber den Liquid-behandelten Zellen, auch hier vorzufinden.

Aufgrund der unterschiedlichen Natur und Dosisbereiche der verwendeten Agenzien war ein direkter Vergleich der Wirksamkeit auf der Basis molekularer Konzentrationen nicht möglich. Dennoch ist festzuhalten, dass eine Abnahme der Sekretion beider untersuchter inflammatorischer Parameter (MCP-1 und MIP-2) unter Hypoxie zwischen 30 und 70 % im Vergleich zur Normoxie mit den verwendeten Agenzien erreicht wurde.

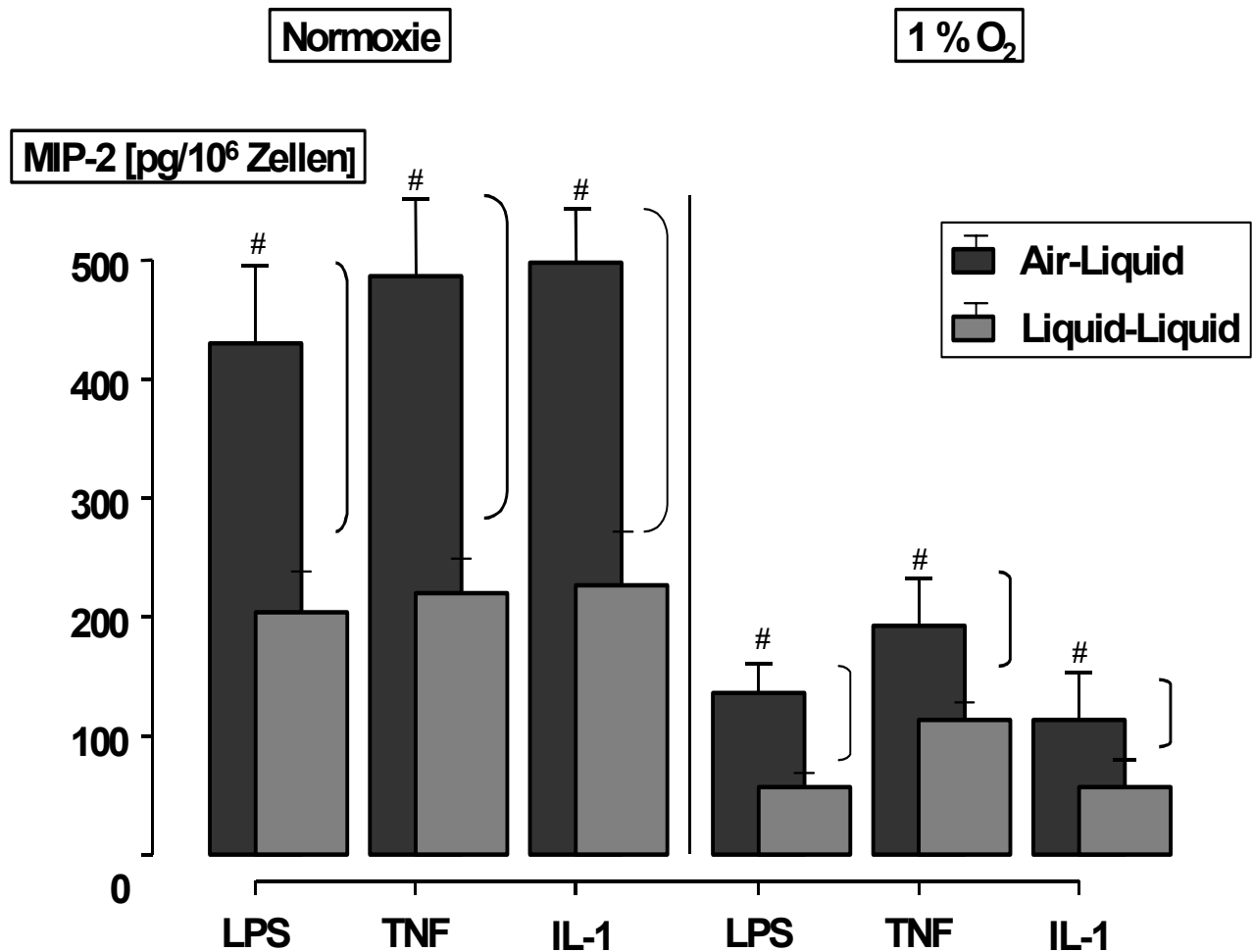


Abbildung 11: Auswirkung von Hypoxie auf die Sekretion von MIP-2 aus Alveolar-epithelzellen.

Die Inkubationszeit für die verwendeten Substanzen lag bei 24 Stunden. Bevor die Zellen den Versuchen in der Hypoxiekammer zugeführt wurden, mussten sie zunächst für drei Tage nach ihrer Zuteilung in das jeweilige Kultivierungsverfahren, dort unter normalen Sauerstoffbedingungen verbleiben. Dann wurde ein Teil der Zellen in die Hypoxiekammer gestellt, wo die Zellen für weitere drei Tage belassen wurden.

unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle. Die Mittelwerte \pm SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

4.7.5. Effekt von anti-CD-14, anti-TNF und von Hypoxie auf Alveolarepithelzellen

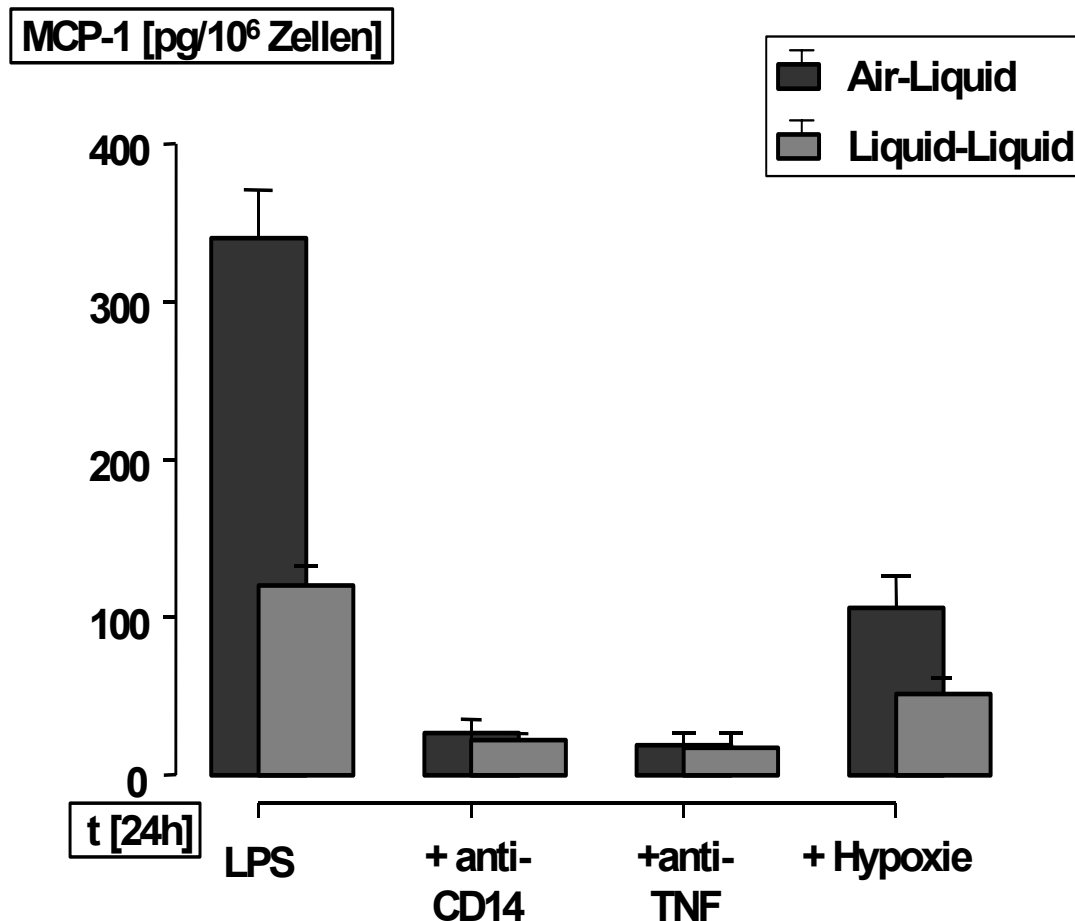


Abbildung 12: Effekt von anti-CD-14, anti-TNF- α und von Hypoxie auf die LPS-induzierte Sekretion von MCP-1 aus Alveolarepithelzellen.

Die Abbildung soll die Sekretion des untersuchten inflammatorischen Differenzierungsparameters in Abhängigkeit von LPS, anti-CD-14, anti-TNF und Hypoxie im Air-Liquid-Interphasemodell zusammenfassend veranschaulichen. Aus der Abbildung geht die inflammatorische Wirkung von LPS hinsichtlich der Sekretion von MCP-1 hervor. Eine Verringerung der Sekretion von MCP-1 lässt sich durch Hypoxie erreichen.

Noch potenter als Hypoxie wirken die verwendeten Antikörper anti-CD-14 und anti-TNF auf die Reduktion der Zytokinsekretion nach Inkubation der Zellen mit LPS. Die Mittelwerte + SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

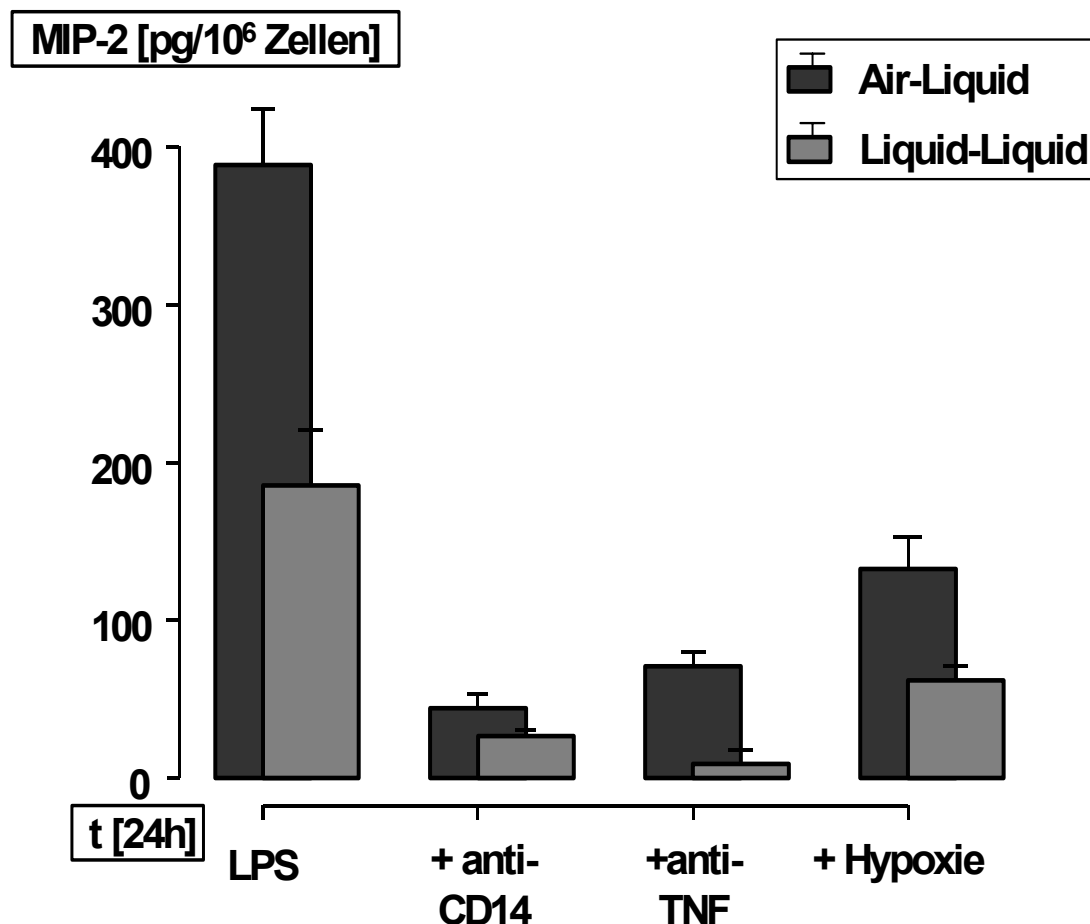


Abbildung 13: Effekt von anti-CD-14, anti-TNF- α und von Hypoxie auf die LPS-induzierte Sekretion von MIP-2 aus Alveolarepithelzellen.

Die Abbildung soll die Sekretion des untersuchten inflammatorischen Differenzierungsparameters in Abhängigkeit von LPS, anti-CD-14, anti-TNF- α und Hypoxie im Air-Liquid-Interphase-Modell zusammenfassend veranschaulichen. Aus der vorliegenden Abbildung geht die inflammatorische Wirkung von LPS hinsichtlich der Sekretion von MIP-2 hervor. Eine Verringerung der Sekretion von MIP-2 lässt sich durch Hypoxie erreichen. Noch potenter als Hypoxie wirken die verwendeten Antikörper anti-CD-14 und anti-TNF- α auf die Reduktion der Zytokinsekretion nach Inkubation der Zellen mit LPS. Die Mittelwerte + SEM stammen aus 4 unabhängigen Experimenten.

5. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die Bedeutung des Kultivierungssystems auf die Differenzierung von Typ₂-Zellen. Dies konnte sowohl morphologisch als auch funktionell in den durchgeführten Versuchen aufgezeigt werden.

So konnten wir bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von Typ₂-Zellen, die an einer Air-Interphase kultiviert wurden, eine langfristige Konservierung der Typ₂-zellspezifischen Charakteristika nachweisen. Demgegenüber zeigten Typ₂-Zellen, welche unter Liquid-Bedingungen kultiviert wurden, einen frühzeitigen Verlust ihrer spezifisch-morphologischen Charakteristika.

Diese Beobachtung konnte durch die elektronenmikroskopische Darstellung der Zellen bestätigt werden. Die enddifferenzierten Zellen, die an einer Liquid Phase kultiviert wurden, entwickelten die Charakteristika von Typ₁-Zellen (abgeflachte Zellen ohne Bürstensaum, etc.), während die an Air kultivierten Typ₂-Zellen ihre spezifische Morphologie für die gesamte Dauer der Versuche konservierten (kuboidale Zellform, großer Zellkern, etc.).

Für weitere Aussagen hinsichtlich des Differenzierungsstatus der Zellen erfolgte der Nachweis von Typ₂-zellspezifischen Markern. Hierbei handelt es sich um die Surfactantproteine SP-A, SP-B und SP-C sowie um die α_1 - Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase. Diese Marker kommen ausschließlich bei Typ₂-Zellen vor (26, 27, 83, 84).

Wir konnten mit unseren Versuchen am Air-Liquid-Interphasemodell demonstrieren, dass bei Typ₂-Zellen, welche nach ihrer Isolierung in einer Liquid-Phase kultiviert wurden eine signifikante Abnahme der Expression dieser spezifischen Typ₂-Zellmarker vorliegt.

So zeigte sich bei Zellen, die 48 Stunden in einer Liquid-Phase kultiviert wurden, eine Abnahme der mRNA-Expression von SP-A und SP-C um den Faktor sechs im Vergleich zu den Air-kultivierten Zellen. Die Expression der mRNA für die α_1 - Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase lag bei den Air-kultivierten Zellen um den Faktor zwei höher als bei den Zellen, die unter Liquid kultiviert wurden. Ebenso verhielt es sich mit der Proteinexpression von SP-B (Faktor ~2) und SP-C (Faktor ~2,5).

Die Messung der Surfactantsekretion wurde als weiterer Marker für die Differenzierung der Typ₂-Zellen im Air-Liquid-Interphasemodell herangezogen. Im Vergleich zu den Liquid-kultivierten Zellen zeigte sich nach Stimulation der Zellen mit den Sekretagoga ATP, PMA und A-23 eine 2-3fach höhere Sekretionsrate bei den Typ₂-Zellen, die 48 Stunden in der Air-Phase kultiviert wurden.

Die Messung des epithelialen Widerstandes sollte als Typ₁-zellspezifische Größe (89) den Verlust der Typ₂-Zellcharakteristika in Abhängigkeit vom Kultivierungsverfahren demonstrieren. Hierbei fanden wir einen signifikanten Anstieg des Widerstandes bei den Liquid-kultivierten Zellen (3. Tag: 2240±316 [Ohm/cm²]). Die Air-kultivierten Zellen hingegen boten einen deutlichen Abfall des gemessenen Widerstandes am dritten Kultivierungstag (416±188 [Ohm/cm²]).

Wurden die Air-kultivierten Zellen in die Liquid-Phase überführt, kam es zu einer Umkehrung des beschriebenen Effektes. So steigt der epitheliale Widerstand in den zuvor Air-kultivierten Wells auf Werte, die in der Größenordnung der kontinuierlich unter Liquid-gehaltenen Zellen liegen.

Auch das inflammatorische Verhalten der Typ₂-Zellen wurde zur Charakterisierung der Zellen untersucht. Hierbei wurden als inflammatorische Differenzierungsparameter das Monozyten-chemotaktische Protein-1 (MCP-1) und das Makrophagen-inflammatorische Protein-2 (MIP-2) analysiert. Diese inflammatorischen Proteine werden nachweislich von Typ₂-Zellen synthetisiert (109, 111). Bei allen verwendeten Stimuli (LPS, IL-1 und TNF- α) lag die Sekretion von MCP-1 und MIP-2 in den Überständen Air-kultivierter Zellen deutlich über den der Liquid-kultivierten Typ₂-Zellen (Faktor 2-3 in Abhängigkeit vom verwendeten Stimulus und Zeitpunkt der Messung nach der Stimulation). Diese Effekte ließen sich ebenfalls auf mRNA-Ebene nachweisen. Mit spezifischen Antikörpern wurde der Versuch unternommen, die inflammatorischen Effekte zu hemmen. Zur Antagonisierung der ablaufenden inflammatorischen Reaktionen wurden ein anti-CD-14-Antikörper (MY-4, 1µg/ml) und ein anti-TNF- α -Antikörper (5µg/ml) verwendet.

Sowohl die unter Air-Kultivierung beobachtete Sekretion von MCP-1 und MIP-2 (nach

Stimulation mit LPS und TNF- α), als auch die Effekte bei den Liquid-kultivierten Typ₂-Zellen ließen sich mit den verwendeten Antikörpern deutlich hemmen (Abnahme der Sekretion zwischen 80-95%). Zu einem signifikanten Unterschied zwischen Air- oder Liquid-kultivierten Typ₂-Zellen, hinsichtlich der Sekretion von MCP-1 und MIP-2 nach Inhibition mit den entsprechenden Antikörpern kam es nur beim MIP-2.

Abschließend wurden alle unternommenen Versuche unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurden die Typ₂-Zellen in einer Hypoxiekammer (O₂ = 1%) kultiviert. Bei dieser Versuchsserie konnten wir eine signifikante Abnahme der *Surfactantsekretion* um den Faktor 2-3 in den hypoxisch kultivierten Zellen nachweisen. Sowohl bei Air- als auch bei den Liquid-kultivierten Typ₂-Zellen kam es zu der beschriebenen Abnahme der Surfactantsekretion unter Hypoxie.

Noch deutlicher fiel die *mRNA-Expression von MCP-1, SP-A und SP-C* ab. Nach drei Tagen Kultivierung in der Hypoxiekammer kam es zu einer Verringerung der mRNA der erwähnten Typ₂-Zellmarker um das 9fache der Normoxiegruppe. Parallel dazu lag auch eine verminderte *MCP-1- und MIP-2-Sekretion* aus den hypoxisch kultivierten Typ₂-Zellen (Abnahme um mindestens 50% des Normoxiewertes in Abhängigkeit vom Stimulans im Überstand der Zellen) vor.

5.1. Die Rolle des Kultivierungssystems in der morphologischen Differenzierung der Alveolarepithelzellen

Durch die elektronen- und die lichtmikroskopische Analyse der Typ₂-Zellen haben wir den Einfluss der Air-Liquid-Interphase auf die morphologische Differenzierung der Zellen aufgezeigt.

Durch die Kultivierung der Typ₂-Zellen mit einer apikalen Exposition an Luft ist eine Konservierung von spezifisch-morphologischen Charakteristika bis zu zwei Wochen nach deren Isolierung möglich. Demgegenüber findet sich ein rascher Verlust der Typ₂-Zell-Morphologie bei Typ₂-Zellen, die in einer Liquid-Phase kultiviert wurden.

Damit kommt der Oberfläche, an der Typ₂-Zellen *in vitro* kultiviert werden, eine zentrale Rolle für deren Differenzierung zu.

Die Typ₂-Zelle stellt den Ursprung des Alveolarepithels dar (8). Aus ihr können sich im Falle einer Schädigung des Parenchyms neue Typ₁-Zellen differenzieren (7). Dabei zeigt sich durch die Transdifferenzierungsfähigkeit dieser Zellen die Möglichkeit der morphologisch-funktionellen Variation (Typ₂-Zelle/Typ₁-Zelle) in Abhängigkeit von dem gebotenen Kultivierungsmilieu (117).

Das Phänomen der Transdifferenzierung der Zellen ließ sich ebenfalls durch die täglichen lichtmikroskopischen Untersuchungen der kultivierten Typ₂-Zellen verdeutlichen. Zeigten die Typ₂-Zellen nach der Isolierung ihre typischen, morphologischen Charakteristika (kuboidale Zellform, Lammelarkörper, etc.) so gingen diese nach ca. 72 Stunden Kultivierung in der Liquid-Phase verloren (flache Zellform, keine Lammelarkörper).

Darüber hinaus sprechen unsere Ergebnisse auch für die Fähigkeit der Zellen zu einer Rückdifferenzierung bei erneuter Kultivierung in der Air-Phase nach erfolgter Liquid-Kultivierung. So konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass nach dem Verlust der typischen Typ₂-Zellmorphologie bei Liquid-kultivierten Typ₂-Zellen, spezifisch-morphologische Charakteristika nach erneuter Air-Kultivierung wieder auftreten können.

Die Möglichkeit der Kausalität zwischen der Transdifferenzierung der Zellen und dem verwendeten Kultivierungssystem wurde deutlich, als auch die funktionellen Unterschiede zwischen den unterschiedlich kultivierten Typ₂-Zellen herausgearbeitet wurden (Surfactantsekretion/Surfactantproteitnsynthese).

Gegenstand weiterer Untersuchungen waren darüber hinaus auch die funktionellen Unterschiede der Typ₂-Zellen auf inflammatorischer Ebene, die sich in Abhängigkeit des verwendeten Kultivierungsverfahrens deutlich aufzeigten (siehe 5.3.). Anhand pharmakologischer Interventionsversuche wurde weiterhin geprüft, ob selektiv in die epithelialen Signaltransduktionswege im Rahmen der toxin-induzierten inflammatorischen Prozesse eingegriffen werden kann.

Abschließend wurde der Einfluss des herrschenden Sauerstoffpartialdrucks an der apikalen Oberfläche der Zellen auf die Transdifferenzierungsfähigkeit der Zellen untersucht.

Der pathophysiologische Hintergrund dieser Überlegung war die Erörterung der Wirkung von Hypoxie auf die intraalveolär ablaufenden Mechanismen im Rahmen eines ARDS.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, die Kausalität zwischen dem angebotenen Milieu und der Transdifferenzierung der Typ₂-Zellen *in vitro* aufzuzeigen.

Die komplexen Mechanismen, die dem Vorgang der Transdifferenzierung zugrunde liegen, sollen beleuchtet werden, um mögliche therapeutische Ansätze in der Behandlung einer Schädigung der alveolären Integrität jeglicher Genese in naher Zukunft zu ermöglichen.

5.2. Funktioneller Vergleich unterschiedlich kultivierter Typ₂-Zellen

Neben den morphologischen Veränderungen konnten wir deutliche funktionelle Differenzen zwischen den unterschiedlich kultivierten Typ₂-Zellen in unseren Versuchen aufzeigen. Bei diesen Untersuchungen kam der Analyse der Surfactantproteine und die Surfactantsekretion, als wesentliches Charakteristikum der Typ₂-Zellen, eine zentrale Rolle zu.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir darstellen, dass durch eine Kultivierung der Zellen in einer Liquid-Phase eine Abnahme der Surfactantproteinsynthese und der Surfactantsekretion stattfindet. Dies spricht dafür, dass die so kultivierten Zellen in ihrer überwiegenden Zusammensetzung sich weg von der Typ₂-Zelle hin zur Typ₁-Zelle entwickelt hatten.

Demgegenüber ließ sich bei den Typ₂-Zellen, die weiterhin in der Air-Phase kultiviert wurden durch die Sekretagoga Adenosine 5'-triphosphat, dem Calciumionophor A-23187 und TPA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) ein Sekretionseffekt hervorrufen, der um das zwei- bis dreifache über dem in den Liquid-kultivierten Zellen lag (siehe Ergebnisteil).

Zudem ließ sich bei den Air-kultivierten Typ₂-Zellen eine höhere Expression von mRNA für die Surfactantproteine SP-A und SP-C (Faktor 6), sowie für die α_1 -Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase (Faktor 2) nachweisen.

Die Synthese der Surfactantproteine und die Sekretion von Surfactant ließen sich steigern, wenn die Zellen, die unter Liquid-Bedingungen kultiviert wurden, der Kultivierung an einer Air-Interphase zugeführt wurden. So waren diese Zellen in der Lage, in einem Zeitraum von ca. 24 Stunden eine Surfactantsekretionsrate zu erreichen, die den Typ₂-Zellen entsprach, welche ausschließlich an der Air-Interphase kultiviert wurden.

Auch diese Ergebnisse sprechen für die Fähigkeit der Typ₂-Zellen zur Rückdifferenzierung nach vorheriger Kultivierung in der Liquid-Phase.

Durch Messung des epithelialen Widerstandes, konnten wir ebenfalls die Transdifferenzierung der Typ₂-Zellen hin zur Typ₁-Zelle belegen.

Nach Kultivierung der Typ₂-Zellen für 24 Stunden in der Air-Phase konnten wir einen signifikanten Abfall des epithelialen Widerstandes um über 80% (Ausgangswerte wurden 48 Stunden nach der Primärisolierung gemessen) in diesen Zellen nachweisen.

Typ₂-Zellen hingegen, die unter Liquid-Bedingung gehalten wurden, zeigten 24 Stunden nach der ersten Messung (entspricht 48 Stunden nach der Primärisolierung) einen Anstieg des epithelialen Widerstandes auf über 30%.

Typ₁-Zellen können im Gegensatz zu Typ₂-Zellen durch die flächenhafte Ausbildung von interzellulären Zellkontakten einen Monolayer aufbauen (91). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich Typ₂-Zellen, die über einen Zeitraum von 72 Stunden unter Liquid-Bedingungen kultiviert werden, zu Zellen differenzieren, die einen Monolayer ausbilden (Typ₁-Zellen).

Der Vorgang der Rückdifferenzierung, also das erneute Auftreten von Typ₂-Zellen in einer überwiegenden Typ₁-Zellpopulation, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (117).

Der erwähnte Wechsel des Differenzierungszustandes der Zellen lässt sich in unseren Untersuchungen nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell eindeutig nachweisen.

Die Transdifferenzierung der Alveolarepithelzellen *in vitro* ist bisher nicht ausreichend untersucht worden. Unsere Ergebnisse sprechen für eine Transdifferenzierung der untersuchten Typ₂-Zellen zu Typ₁-Zellen.

Darüber hinaus weisen unsere Ergebnisse auf die Fähigkeit der Zellen zur Rückdifferenzierung hin. Dies bedeutet, dass in einer überwiegenden Typ₁-Zellpopulation nach Veränderung des Kultivierungsmilieus (Air anstatt Liquid) erneut Zellen mit Charakteristika der Typ₂-Zellen auftreten.

In den Liquid-kultivierten Wells traten unter vielen Typ₁-Zellen vereinzelt Typ₂-Zellen auf. Dies konnten wir durch unsere morphologischen Untersuchungen belegen (Elektronenmikroskopie, Lichtmikroskopie).

Fraglich ist, ob für eine Rückdifferenzierung der Zellen die Präsenz vereinzelter Typ₂-Zellen, inmitten der Typ₁-Zellen zwingend notwendig ist.

Als denkbare Induktion eines Wechsels des Differenzierungsstatus kommt auch der

veränderte mechanische Druck in Frage, der auf den Liquid-kultivierten Typ₂-Zellen lastet. Nach Überführung von Liquid-kultivierten Zellen in die Air-Phase nimmt dieser Druck durch das Entfernen des Mediums von der Oberfläche der Zellen ab.

Eine weitere Möglichkeit für das Phänomen der Rückdifferenzierung könnten Stoffwechselprodukte sein, die auf die apikale Oberfläche der Zellen sezerniert werden und für die Persistenz der Typ₂-Zellen und deren Charakteristika verantwortlich sind. Bei Zellen, die unter Liquid-Bedingungen kultiviert werden, sind diese Stoffwechselprodukte im Medium verdünnt. Die Surfactantproteine könnten diese Stoffwechselprodukte sein, die über einen Rezeptor an der Oberfläche der Zelle den Differenzierungsstatus Typ₂-Zellen mit modulieren. Auch wenn einige Fragen hinsichtlich der Rückdifferenzierung der Zellen weiterhin unbeantwortet bleiben, so konnten wir doch anhand unserer Ergebnisse demonstrieren, dass das äußere Milieu, in dem die Zellen kultiviert werden, maßgeblich für den Differenzierungsstatus der Zellen ist.

5.3. Diskussion der inflammatorischen Potenz von Alveolarepithelzellen

Die inflammatorische Aktivität der Typ₂-Zellen zeichnet diese als immunologisch aktive Zellen im alveolären Zellverband aus (65). Durch Messung der inflammatorischen Antwort nach Stimulation der Zellen mit verschiedenen Agenzien (LPS, TNF- α , IL-1) war es uns möglich, bei der Analyse der kultivierten Typ₂-Zellen einen Rückschluss auf den Differenzierungszustand der Zellen zu erhalten.

Untersucht wurden Zytokine (MCP-1, MIP-2), die unter inflammatorischen Bedingungen *in vivo* durch Typ₂-Zellen, nicht aber durch Typ₁-Zellen synthetisiert werden (104).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Kultivierung der Zellen für 12 Stunden unter Liquid-Bedingungen zu einer Abnahme der MCP-1-Sekretion von ca. 20% führt. Ebenso verhält es sich mit der MIP-2-Sekretion.

Demgegenüber war in den Typ₂-Zellen die unter Air-Bedingungen kultiviert wurden die Sekretion der untersuchten Zytokine bis zu sieben Tage voll erhalten.

Arbeiten, bei denen die Sekretion von MCP-1 und MIP-2 als Typ₂-zellspezifische inflammatorische Antwort auf entsprechende Stimuli in der Alveole aufgeführt werden, stehen mit unseren Ergebnissen im Einklang (110).

Beide oben genannten Zytokine werden durch inflammatorische Stimuli (z.B. LPS) induziert, in den immunologisch aktiven Typ₂-Zellen synthetisiert und sezerniert. Sie können direkt oder im Rahmen einer autokrinen Schleife aktiviert werden (110).

Wenn LPS aus einwandernden Bakterien freigesetzt wird und auf das Alveolarepithel trifft, wird aus den Typ₂-Zellen TNF- α freigesetzt (102). Das TNF- α führt in den benachbarten Typ₂-Zellen zur Synthese und Liberierung von MIP-2 und MCP-1. Diese Zytokine aktivieren neutrophile Granulozyten und Monozyten, die in die Alveolen übertreten. Durch diesen Mechanismus können Entzündungszellen an den Ort der Entzündung gerufen werden (112).

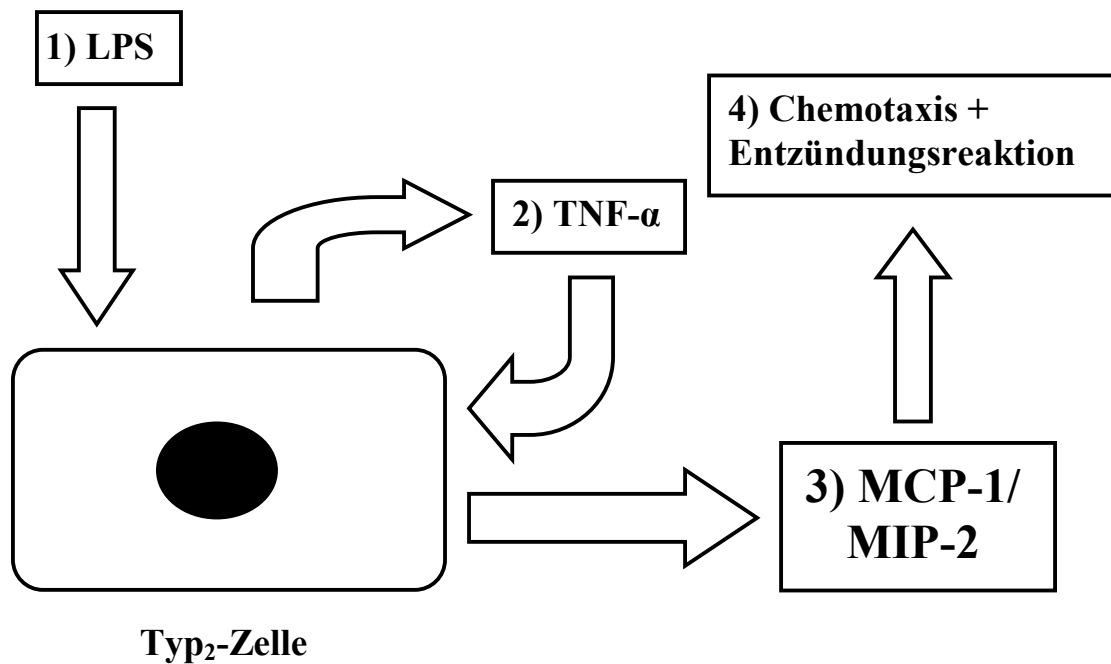


Abbildung 14: Autokriner Loop der Typ₂-Zelle bei Inkubation mit LPS

- 1) LPS wird aus einwandernden Bakterien freigesetzt und wirkt auf die Typ₂-Zellen ein.
- 2) Die Typ₂-Zellen setzen TNF- α frei, welches im Sinne einer autokrinen Schleife auf die Zelle erneut einwirkt. Auch benachbarte Zellen werden so induziert.
- 3) Das TNF- α führt zu einer Freisetzung von MCP-1 und MIP-2 aus den Typ₂-Zellen.
- 4) Es entsteht ein chemotaktischer Gradient, der zur Migration von Entzündungszellen in die Alveole führt. Durch eine überschießende Liberierung von freien Radikalen kann es dabei zu einer Schädigung der Alveole und der gesamten Lunge kommen (ARDS).

Genau wie bei den zuvor untersuchten Markern der Typ₂-Zellen zeigt sich eine Regeneration des inflammatorischen Potentials nach Rekultivierung in der Air-Phase von zuvor Liquid-kultivierten Zellen.

Somit stellt die immunologische Antwort auf den inflammatorischen Stimulus einen weiteren Marker für den Differenzierungsstatus der untersuchten Zellen dar.

Die genauen Mechanismen durch die LPS oder TNF- α ihre Wirkung an den inflammatorisch aktiven Zellen entfalten, sind bis heute nicht im Detail geklärt. Die Transduktionswege auf denen das LPS zu einer Freisetzung von Zytokinen aus den Zellen führt sind nur zum Teil bekannt (102).

Das LPS interagiert offensichtlich mit Oberflächenrezeptoren, von denen der CD-14-Rezeptor am bekanntesten ist.

Innerhalb einer Minute nach Exposition der Zellen mit LPS wird es an diesen spezifischen Oberflächenrezeptor gebunden und nach ca. fünf Minuten in die Zelle internalisiert (118). Die Zellen führen nach der Internalisierung zu einer Freisetzung von TNF- α (119).

Darüber hinaus sind einige Proteinfaktoren im Serum bekannt, an die LPS bindet (LPS-bindendes Protein, etc.). Weitere Oberflächenproteine sind als spezifische LPS-Rezeptoren an Zellen charakterisiert worden (CD-11, u.a.) (118).

Nach der Bindung des LPS am spezifischen Rezeptor an der Oberfläche der Zielzelle wird das Signal transzellulär übertragen. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht bekannt. Man nimmt jedoch an, dass der überwiegende Teil der LPS-Wirkung über eine frühe Phosphorylierung durch eine Tyrosin-Kinase zustande kommt. So führt eine Hemmung dieser Tyrosin-Kinase durch das Toxin Herbimycin A nach LPS-Gabe zu einem Ausbleiben des Anstieges von TNF- α (120).

Ein weiterer Transduktionsweg wird in Form einer Aktivierung von spezifischen Genen durch das LPS postuliert. Auch hier soll eine Phosphorylierung zur Induktion der Transkription der mRNA durch eine Tyrosin-Kinase vorausgehen (121).

Da jedoch CD-14 keine intrinsische Aktivität am CD-14-Rezeptor hinsichtlich einer Tyrosin-Kinase-Aktivierung ausübt, liegen die genauen Schritte im zellulären Transduktionsweg nach LPS-Induktion weiterhin im Unklaren.

Um die Rolle des TNF- α in der LPS-induzierten Liberierung von MCP-1 und MIP-2 zu verdeutlichen, wurden die untersuchten Zellen in unseren Versuchen mit einem spezifischen Antikörper (anti-TNF- α) vorbehandelt. Weiterhin verwendeten wir einen anti-CD14-Antikörper.

Dadurch kam es sowohl bei Verwendung des anti-CD14-Antikörpers, als auch beim anti-TNF- α -Antikörper zu einer Reduktion der gemessenen Zytokinsekretion für MCP-1 und MIP-2 von bis zu 95 Prozent. Diese Ergebnisse fanden sich sowohl im ELISA als auch in der Analyse der mRNA dieser Produkte in der PCR.

Zudem konnte durch die pharmakologische Intervention nicht nur die Zytokinsekretion unter Normoxie bedeutend gesenkt werden. Auch unter Hypoxie zeigten die untersuchten Zellen eine deutliche Abnahme der Zytokinsekretion nach Vorbehandlung mit den verwendeten Antikörpern (siehe 5.4.).

Wie bereits oben erwähnt stellt die Aktivierung und Rekrutierung von Entzündungszellen (z.B. Monozyten, neutrophile Granulozyten) einen physiologischen Prozess dar, der für die lokale Abwehr von Bakterien und anderen Pathogenen in der Lunge wirksam ist. Eine Überaktivierung dieses lokalen Abwehrmechanismus kann zu einem akuten Lungenversagen (ARDS) führen (114).

Durch unsere Versuche haben wir bewiesen, dass Typ₂-Zellen in der Lage sind Zytokine zu synthetisieren und zu sezernieren, welche zu einem akuten Lungenversagen beitragen können. Hierin liegt die klinische Relevanz unserer Studien, die einen Beitrag in der Therapiefindung des akuten Lungenversagens leisten sollen.

Obwohl Alveolarmakrophagen ebenfalls MCP-1 und MIP-2 synthetisieren und sezernieren (108), können wir aufgrund der Reinheit unserer Primärkulturen ausschließen, dass die gemessenen Zytokine aus Alveolarmakrophagen stammen (ca. 1% Kontamination mit Makrophagen).

Daher gilt es als sicher, dass die gemessenen Zytokine aus den Typ₂-Zellen stammen. Dies wird zusätzlich bekräftigt durch die Beobachtung, dass die Liquid-kultivierten Typ₂-Zellen schnell (nach 24 Stunden) die Fähigkeit zur Synthese von MCP-1 und MIP-2 verloren. Wären Makrophagen die Quelle der gemessenen Zytokine, so würde man trotz Liquid-Bedingungen die unter Air-Kultivierung beobachteten Effekte erwarten.

Unsere Ergebnisse sprechen demnach dafür, dass Typ₁-Zellen nicht in der Lage sind MCP-1

oder MIP-2 zu synthetisieren. Wie bei den übrigen Zellen des Immunsystems besitzen die Typ₂-Zellen einen speziellen Rezeptor (CD-14), der durch die Verwendung des oben beschriebenen Antiserums blockiert wurde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen also, die bereits in der Literatur beschriebene Immunkompetenz der Typ₂-Zellen, die in dieser Form den Typ₁-Zellen fehlt (65). Weiterhin verweisen unsere Ergebnisse auf die zentrale Rolle der Typ₂-Zellen bei der Entstehung des ARDS. Die chemotaktische Wirkung der sezernierten Zytokine kann durch die Freisetzung saurer Radikale zu einer Denaturierung des Surfactant in den Alveolen führen.

Durch den Verlust des Surfactants und seiner reduzierenden Wirkung auf die Oberflächenspannung kommt es zum Kollaps der Alveole mit den bekannten weitreichenden Folgen für die Lunge und den gesamten Organismus.

5.4. Diskussion der Wirkung von Hypoxie auf die Differenzierung von Typ₂-Zellen

Die Auswirkung von Hypoxie auf die Differenzierung der kultivierten Typ₂-Zellen war ein zentraler Punkt weiterführender Untersuchungen dieser Arbeit.

Typ₂-Zellen, die im Air-Liquid-Interphasesystem kultiviert wurden und zusätzlich einem reduziertem Sauerstoffgehalt (1%) ausgesetzt wurden, zeigten eine deutliche Abnahme der Sekretionsleistung nach Stimulation mit ATP, A-23187 und dem Phorbolster TPA, verglichen mit den normoxischen Kontrollen (Abnahme um den Faktor 2-3).

Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei der Untersuchung der mRNA für SP-A und SP-C unter Normoxie versus Hypoxie. Auch hier kam es bei der Kultivierung der Typ₂-Zellen im Air-Liquid-Interphasemodell zu einer massiven Abnahme (Faktor 9) der Expression der untersuchten mRNA, wenn die Zellen in einem hypoxischen Milieu kultiviert wurden.

Die Sekretion von MCP-1 und MIP-2 ließ sich bei Kultivierung der Zellen unter hypoxischen Bedingungen ebenfalls drastisch reduzieren. Bei der Air-Kultivierung von Typ₂-Zellen unter hypoxischen Bedingungen kam es zu einer Reduktion der Sekretion von MCP-1 und MIP-2 von mehr als 50% im Vergleich zur Normoxiegruppe bei allen drei verwendeten Agenzien (LPS, TNF- α , IL-1).

Bei lichtmikroskopischer Kontrolle der Zellen nach den Versuchen zeigte sich stets eine morphologische Prädominanz der Typ₂-Zellen in den Air-kultivierten Wells.

Die Rolle, die dem reduzierten Sauerstoffpartialdruck im ARDS zukommt, wurde bereits oben besprochen. Nicht nur die Lunge ist als Organ durch die Hypoxie in ihrer Funktion alteriert und gefährdet.

Das Multiorganversagen (MOV) ist neben der Schädigung weiterer Organe charakterisiert durch das Auftreten eines akuten Lungenversagens, welches häufig der limitierende Faktor des Geschehens ist (122).

Klinische und experimentelle Studien haben u.a. die neutrophilen Granulozyten, den oxidativen Burst, den sie durch ihre Radikalfreisetzung bewirken können und die Hypoxie im Gewebe als pathogenetischen Faktor, der das MOV und das ARDS initiiert und aufrechterhält, identifiziert (114).

Eine große Anzahl von potenten Mediatoren ist in der Lage den Prozess zu aktivieren, der zur Liberierung von reaktiven Sauerstoffradikalen, wie z.B. dem Wasserstoffperoxid und dem Superoxid, führt. Zu diesen Mediatoren gehören Zytokine wie das TNF- α und das IL-1 (107). Diese Zytokine werden auch durch LPS freigesetzt, welches durch einwandernde Bakterien in die Alveole eingebracht wird (102).

Eine lokale Verringerung des Sauerstoffpartialdrucks führt zur Entstehung von Radikalen. Der Zustand in den die Zellen in diesem Milieu im einzelnen versetzt werden, kann auch als *Dysoxie* beschrieben werden. Die *dysoxisch* geschädigte Zelle kann nicht dauerhaft in sauerstoffreduzierter Form die enzymatischen Prozesse in der Atmungskette der Mitochondrien katalysieren. Auf diese Weise sinkt der Gehalt an ATP, wodurch sich eine intrazelluläre Azidose aufbaut. Der Gehalt an sauren Metaboliten und Sauerstoffradikalen steigt.

Mit Zunahme der Hypoxie nimmt auch die zelluläre Schädigung zu. Durch Abnahme des intrazellulären pH-Wertes und Zunahme der Sauerstoffradikale entsteht eine Störung der zellulären Membranintegrität (113).

Weiterhin können durch die Abnahme des ATP-Gehaltes in der Zelle die ATP-abhängigen Ionenkanäle nicht mehr dauerhaft aufrechterhalten werden. Es kommt zu einer pathologischen Umverteilung der Elektrolyte mit dem Resultat der zellulären Lyse.

Aufgrund der beschriebenen zellulären Prozesse war es unabdingbar für die Bearbeitung der Fragestellung, den Sauerstoffpartialdruck bei der Untersuchung der Transdifferenzierungsfähigkeit der Typ₂-Zellen mit einzubeziehen.

Viele Studien, die sich mit diesem Thema auseinandersetzen, zielen auf die Untersuchung der Endprodukte hin. Die Transduktionswege wurden dabei bisher weitgehend außer Acht gelassen.

Wir haben einen Teil dieser Transduktionswege für unsere Versuche herausgegriffen, indem wir die Versuche mit antisensebehandelten Zellen (anti-TNF- α , anti-CD-14) auch unter Hypoxie unternommen haben. Überdies wurden sämtliche Versuche die in normoxischen Verhältnissen unternommen wurden ebenso in Hypoxie durchgeführt.

Mit unseren Ergebnissen können wir belegen, dass die Transdifferenzierungsfähigkeit der Typ₂-Zellen auch unter Hypoxie weiterhin besteht.

So konnten die unter Normoxie durchgeführten Versuche hinsichtlich der funktionellen und morphologischen Differenzierung von Typ₂-Zellen im Air-Liquid-Interphasemodell weitgehend auch unter Hypoxie reproduziert werden.

Bei reduziertem Sauerstoffangebot zeigten die Zellen eine Abnahme der Surfactantproteinsynthese, sowie der Surfactantsekretion im Vergleich zu den Zellen, die unter Normoxie gehalten wurden. Dies steht in Übereinstimmung mit den oben beschriebenen intrazellulär ablaufenden Prozessen, die bei reduziertem ATP-Angebot zu einer Verminderung der Syntheseleistung in der Zelle führen.

Ebenso verhielt es sich mit der Synthese und Sekretion von Zytokinen nach Stimulation mit den entsprechenden inflammatorischen Agenzien:

Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie fand sich eine stärkere Zytokinsekretion in den Air-kultivierten Wells verglichen mit denen, die unter Liquid kultiviert wurden. Dennoch lag eine höhere Freisetzung von Zytokinen unter Normoxie als unter sauerstoffreduzierten Bedingungen vor.

Außerdem konnten wir durch die morphologische Analyse der Zellen auch unter Hypoxie den Erhalt der Typ₂-zellspezifischen Charakteristika nachweisen, gleichwohl es zu einem Abfall der inflammatorischen Aktivität der Zellen kam (verringerte Zytokinsekretion).

6. Zusammenfassung

Die Kultivierung von Typ₂-Zellen in konventionellen Kultivierungssystemen war bisher zeitlich nur in sehr begrenztem Maße möglich. Aufgrund einer auftretenden Dedifferenzierung (Verlust von morphologischen und funktionellen Charakteristika) der Typ₂-Zellen war die Kultivierung der Zellen auf einen Zeitraum von ca. 48 Stunden beschränkt. Fragestellungen, die eine längere Kultivierung der Typ₂-Zellen notwendig machen, waren aus diesem Grund lange Zeit nicht zu beantworten.

Das Ziel unserer Arbeitsgruppe war es, ein Kultivierungssystem zu erarbeiten, in dem Typ₂-Zellen über einen längeren Zeitraum kultiviert werden konnten, ohne dass es zu einer Dedifferenzierung der Zellen kam.

Um den Differenzierungsstatus der Zellen zu beurteilen, wurden verschiedene morphologische und funktionelle Marker ausgewählt, die als allgemein anerkannte Charakteristika der Typ₂-Zellen in der Literatur beschrieben werden.

Der Differenzierungsstatus wurde anhand folgender Parameter untersucht:

- Licht- und elektronenmikroskopische Unterschiede der Typ₁-/Typ₂-Zellen (Typ₁-Zellen: flache Zellform, Typ₂-Zellen: kubiodale Zellform)
- Surfactantproteinsynthese und Surfactantsekretion der untersuchten Alveolarepithelzellen (Typ₂-Zellmarker)
- Der epitheliale Widerstand als Indikator eines intakten Monolayers (Typ₁-Zellmarker)
- Immunkompetenz von Typ₂-Zellen als Ausdruck ihres inflammatorischen Potentials

Für die Versuche wurden Typ₂-Zellen aus männliche Ratten, der Art *Rattus norvegicus familiaris* und Zuchtlinie Sprague-Dawley (CD 18), mit einem Gewicht von 180-200g (Firma Charles River WIGA-Sulzfeld/Main) isoliert. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen gehalten und erhielten Futter und Wasser ad libitum. Die Isolierung der Zellen erfolgte innerhalb 48 Stunden nach Lieferung.

Zur Kultivierung der isolierten Typ₂-Zellen erfolgte die Etablierung eines neuen Kultivierungssystems (Air-Liquid-Interphasesystem). Diesbezüglich wurden die frisch isolierten Typ₂-Zellen zunächst für 48 Stunden unter konventioneller Kultivierung in einer Liquid-Phase gehalten (entspricht den herkömmlichen Kultivierungsverfahren). Danach wurde ein Teil der Zellen (jeweils 6 Wells einer 12-Wellplatte) an der apikalen Grenzfläche der Luft exponiert. Hierfür wurden die Zellen nach ihrer Isolierung auf Kollagenkissen in einem Transwellsystem kultiviert, sodass die Zellen bei Luftexposition weiterhin von basal mit Medium versorgt werden konnten.

Zur Kultivierung wurden die Zellen nach ihrer Isolierung mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/Well ausgesät. Das Medium wurde täglich gewechselt. Im Anschluss an die Versuche erfolgte jeweils eine Zählung der Zellen in den verwendeten Wells.

Nach Etablierung des Air-Liquid-Interphasesystems konnten wir eine Konservierung der typischen morphologischen Aspekte der Zellen bei Kultivierung unter Air-Bedingungen nachweisen. Nach 48stündiger Kultivierung der Typ₂-Zellen in einer Air-Phase lag elektronenmikroskopisch eine kuboidale Zellform in weiten Teilen der vorhandenen Zellen vor. Ebenfalls konnten wir eine Konservierung weiterer morphologischer Aspekte der Typ₂-Zellen belegen (Mikrovilli und Lamellarkörper). Demgegenüber verloren Zellen, die in einer Liquid-Phase kultiviert wurden, nach ca. 48 Stunden diese Merkmale. Es zeigte sich eine Dedifferenzierung der Typ₂-Zellen mit Manifestation von Typ₁-Zellspezifischer Morphologie (flache Zellform, ovaler Zellkern).

Darüber hinaus konnten wir aufzeigen, dass Typ₂-Zellen nach Kultivierung in der Air-Phase auch funktionelle Gesichtspunkte über einen längeren Zeitraum konservieren konnten.

Die Surfactantsynthese und die Surfactantproteinsynthese, sowie die Fähigkeit zur Sekretion inflammatorischer Zytokine, die als spezifische Typ₂-Zell-Marker angesehen werden, blieben durch die Air-Kultivierung der Zellen erhalten.

Die Kultivierung der Typ₂-Zellen unter Air-Bedingungen hatte ebenfalls eine Abnahme des epithelialen Widerstandes (Typ₁-Zellmarker) zur Folge, was als Hinweis für den Erhalt von Typ₂-zellspezifischen Charakteristika zu bewerten ist (Liquid 2389 \pm 361, Air 562 \pm 112 Ohm/cm² am 3. Tag nach Kultivierung der Zellen im Air-Liquid-Interphasemodell, n=4).

Weiterhin ließ sich eine Abnahme der Sekretion von Surfactant bei 72-stündiger Liquid-Kultivierung der Zellen, auch nach Stimulation mit den entsprechenden Sekretagoga, nachweisen. Typ₂-Zellen, die unter Air-Bedingungen kultiviert wurden, behielten demgegenüber die Fähigkeit zur Surfactantsynthese und Surfactantsekretion (Air 5,98 \pm 1,75, Liquid 1,82 \pm 1,02 bei Stimulation mit 50 μ M ATP; Air 9,45 \pm 1,13, Liquid 3,67 \pm 0,65 bei Stimulation mit 10 μ M A-23; Air 5,46 \pm 1,19, Liquid 2,7 \pm 0,78 bei Stimulation mit 100 ng PMA, n=4).

Ferner lag eine deutliche Reduktion in der Sekretion von Surfactantproteinen (SpB und SpC) nach Kultivierung der Zellen über einen Zeitraum von 72 Stunden in der Liquid-Phase vor. Bei Kultivierung der Typ₂-Zellen unter Air-Bedingungen zeigte sich hingegen ein Erhalt dieser Marker (SpB: Air 15,1 \pm 3,91 μ g/ml, Liquid: 7,33 \pm 1,42 μ g/ml, n=4; SpC: Air 8,24 \pm 1,11 μ g/ml, Liquid: 3,52 \pm 0,87 μ g/ml, n=4).

Die inflammatorische Aktivität der Zellen, die ebenfalls einen spezifischen Typ₂-Zellmarker darstellt, wurde durch Untersuchung der Zytokinexpression von MCP-1 (Monozyten Chemotaktisches Protein-1) und MIP-2 (Makrophagen Inflammatorisches Protein-2) untersucht. Diese Zytokine werden von Typ₂-Zellen synthetisiert, nicht aber von Typ₁-Zellen. Nach dreitägiger Kultivierung von Typ₂-Zellen in der Liquid-Phase zeigte sich eine deutliche Reduktion der Synthese und Sekretion von MCP-1 und MIP-2 im Vergleich zu den Air-kultivierten Zellen (MCP-1 in pg/10⁶ Zellen nach 48 Stunden mit 20 ng LPS: Air 420,3 \pm 25,7, Liquid 201,5 \pm 12,5, n=4; MIP-2 in pg/10⁶ Zellen nach 48 Stunden mit 20 ng LPS: Air 431,3 \pm 25,7 Liquid 206 \pm 12,5, n=4).

Nach erfolgreicher Etablierung des Air-Liquid-Interphasesystems erfolgten weiterführende Untersuchungen mit der Zielsetzung, die Auswirkung des herrschenden Sauerstoffpartialdrucks auf die Differenzierung der Typ₂-Zellen zu analysieren.

Weiterhin sollte eine Möglichkeit gefunden werden, die oben beschriebenen inflammatorischen Prozesse *in vitro* zu antagonisieren.

Zur Bearbeitung der Fragestellung der Auswirkung des herrschenden Sauerstoffpartialdrucks wurden die Typ₂-Zellen nach Kultivierung und Zuordnung in das Air-Liquid-Interphasemodell in einer Hypoxiekammer inkubiert. Durch ständige Kontrollen über ein zu- und abführendes Schlauchsystem konnte der Sauerstoffpartialdruck in der Kammer dauerhaft bei 1% aufrechterhalten werden.

Nach dreitägiger Inkubation der Typ₂-Zellen in der Hypoxiekammer kam es zu einer massiven Verringerung der Sekretion von Surfactant im direkten Vergleich zu den weiterhin unter Normoxie kultivierten Zellen (Air-Phase: *Normoxie* 5,98 +/- 1,75, *Hypoxie* 2,14 +/- 0,67 bei Stimulation mit 50 µM ATP; *Normoxie* 9,45 +/- 1,13, *Hypoxie* 3,71 +/- 0,68 bei Stimulation mit 10 µM A-23; *Normoxie* 5,46 +/- 1,19, *Hypoxie* 2,63 +/- 0,73 bei Stimulation mit 100 ng PMA, jeweils n=4).

Ebenso lag die Expression der mRNA für die Surfactantproteine A und C nach Kultivierung der Zellen in

Ferner zeigte sich auch eine Abnahme der Synthese der untersuchten Zytokine nach Kultivierung der Zellen in Hypoxie im Vergleich zur Normoxie (MCP-1-Sekretion nach Inkubation mit 20 ng LPS für 24 Stunden [pg/10⁶ Zellen]: *Normoxie* Air 411 +/- 84,9, Liquid 196,4 +/- 22,7, *Hypoxie* Air 146,7 +/- 26, Liquid 88,4 +/- 12,9; MIP-2-Sekretion nach Inkubation mit 20 ng LPS für 24 Stunden [pg/10⁶ Zellen]: *Normoxie* Air 434 +/- 98,7, Liquid 212 +/- 57,2, *Hypoxie* Air 133,5 +/- 42,1, Liquid 41,9 +/- 12,1).

Trotz Abnahme der beschriebenen Parameter nach Kultivierung der Zellen in Hypoxie, fand sich bei morphologischer Untersuchung der Zellen eine Persistenz der Typ₂-Zellcharakteristika.

Eine pharmakologische Blockade ließ sich sowohl bei den Typ₂-Zellen, die unter Normoxie kultiviert wurden, als auch unter Hypoxie erreichen. Zur Blockade wurde anti-CD14 (1 µg/ml) und anti-TNF-α (10 µg/ml) verwendet. Hierunter zeigte sich eine deutliche Reduktion der

Sekretion von MCP-1 und MIP-2 in der Air- und in der Liquid-Phase (ca. 90 % der Ausgangswerte).

Fazit:

Das Air-Liquid-Interphase-Modell eröffnet neue Möglichkeiten bei der Kultivierung und Untersuchung von Typ₂-Zellen. Die Aussicht, die isolierten Zellen über einen längeren Zeitraum *in vitro* funktionsfähig zu erhalten, macht es möglich, Fragestellungen aufzugreifen, die zeitlich nicht auf die Dauer von 48 Stunden limitiert sind.

Die Differenzierung der Typ₂-Zellen kann durch das gewählte Kultivierungssystem maßgeblich beeinflusst werden.

Dabei hat die Hypoxie keinen Einfluss auf die Transdifferenzierungstendenz der Zellen, obwohl sie zu einer Abnahme der Sekretion von Surfactantproteinen und Surfactant sowie der inflammatorischen Produkte führt. Die Morphologie der untersuchten Typ₂-Zellen hatte sich trotz dieser Veränderungen im Surfactantmetabolismus und des inflammatorischen Verhaltens nicht geändert.

Die ablaufenden inflammatorischen Prozesse in Typ₂-Zellen können durch pharmakologische Intervention (anti-CD14, anti-TNF- α) gehemmt werden. Ob dies jedoch ein möglicher Ansatz für die pharmakologische Therapie eines ARDS sein kann, bei dem die Zellen ihre inflammatorische Potenz gegen den Organismus richten, kann angesichts der Komplexität der ablaufenden Signalkaskaden zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

7. Literaturverzeichnis

1. R. F. Schmidt, G. Thews. Physiologie des Menschen. 26. Auflage, 568-571, 1995.
2. Macklin CC: The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumocytes. *Lancet* 1954; 1099-1104
3. Carpo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123:533-541.
4. Haies DM, Gil J, Weibel ER. Morphometric study of rat lung cells. I. Numerical and dimensional characteristics of parenchymal cell populations. *Am Rev Respir Dis* 1981; 123:533-541
5. L. C. Junqueira, C. Carneiro. Histologie. Springer-Verlag, 3. Auflage, 409-414, 1996.
6. Shannon, J. M. , J. A. Emrie, J. H. Fisher, Y. Kuroki, S. D. Jennings, and R. J. Mason. Effect of a reconstituted basement membrane on expression of surfactant apoproteins in cultured adult rat alveolar type II cells. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 2: 183-192, 1990.
7. Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, Freeman G. Transformation of alveolar type II cells to type I cells following exposure to nitrogen dioxide. *Exp Mol Pathol* 1975;22:145-150.
8. H. Fehrenbach, M. Kasper, T. Tscherning, T. Pan, D. Schuh, J. M. Shannon, M. Müller, R. J. Mason. Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis. *Eur Reptsir J* 1999; 534-544ol.
9. Risco C, Romero C, Bosch MA, Pinto dSP. Type II pneumocytes revisited: intracellular membranous systems, surface characteristics, and lamellar body secretion. *Lab Invest* 1994;70:407-417.

10. Young SL, Fram EK, Craig BL. Three-dimensional reconstruction and quantitative analysis of rat lung type II cells: a computer-based study. *Am J Anat* 1985;174:1-14.
11. Suzuki Y, Fujita Y, Kogishi K. Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:75-81.
12. Williams MC. Endocytosis in alveolar type II cells: effect of charge and size of tracers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:6054-6058.
13. Dobbs LG, Mason RJ, Williams MC, Benson BJ, Sueishi K. Secretion of surfactant by primary cultures of alveolar type II cells isolated from rats. *Biochim Biophys Acta* 1982 Oct 14;713(1):118-27.
14. Dobbs LG, Mason RJ. Stimulation of secretion of disaturated phosphatidylcholine from isolated alveolar type II cells by 12-o-tetradecanoyl-13-phorbol acetate. *Am Rev Respir Dis* 1978;118:705-733.
15. Post M, Batenburg JJ, Smith BT, Van Golde LM. Pool sizes of precursors for phosphatidylcholine formation in adult rat lung type II cells. *Biochim Biophys Acta* 1984;795:552-557.
16. Post M, Shuurmans EA, Batenburg JJ, Van Golde LM. Mechanisms involved in the synthesis of disaturated phosphatidylcholine by alveolar type II cells isolated from adult rat lung. *Biochim Biophys Acta* 1983;750:68-77.
17. Burkhard R, Van Golde LMG. Lipids and lipid metabolism in the lung. In: Messaro D, eds. *Lung cell biology*. New York: Marcel Dekker, 1988;591-653.
18. Crecelius CA; Longmore WJ. A study of the molecular species of diacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine and of cholinephosphotransferase and ethanolaminephosphotransferase activities in the type II pneumocytes. *Biochim Biophys Acta* 1984;795: 247-256.

19. Bleasdale JE, Tyler NE, Snyder JM. Subcellular site of synthesis of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol in type II pneumocytes. *Lung* 1985;163:345-359.
20. Hamm H, Fabel H, Bartsch W. The surfactant system of the adult lung: physiology and clinical perspectives (review). *Clin Invest* 1992;70:637-657.
21. Kuroki Y, Voelker DR. Pulmonary surfactant proteins. *J Biol Chem* 1994;269:25943-25946.
22. Hildebran JN, Goerke J, Clements JA. Pulmonary surface film stability and composition. *J Appl Physiol* 1979;47:604-611.
23. Cytosol-stimulated remodeling of phosphatidylcholine in rat lung microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1986;875:450-457.
24. Jobe AH, Ikegami M. Surfactant metabolism (review). *Clin Perinatol* 1993;20:683-696.
25. Batenburg JJ, Langmore WJ, Klazinga W, Van Golde LMG. Lysolecithin acyltransferase and lysolecithin: lysolecithin acyltransferase in adult rat lung alveolar type II cells. *Biochim Biophys Acta* 1979;573:136-144.
26. Johansson J, Curstedt T, Robertson B. The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J* 1994;7:372-391.
27. Voorhout WF, Weaver TE, Haagsman H, Geuze HJ, Van Golde LMG. Biosynthetic routing of pulmonary surfactant proteins in alveolar type II cells. *Microsc Res Tech* 1993;26:366-373.
28. Ryan RM, Morris RE, Rice WR, Ciruolo G, Whitsett JA. Binding and uptake of pulmonary surfactant protein A (SP-A) by pulmonary type II epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 1989;37:429-440.

29. Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, et al. Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment. *Am J Physiol* 1992;263:L479-L486.
30. Kalina M, Mason RJ, Shannon JM. Surfactant protein C is expressed in alveolar type II cells but not in Clara cells of rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;6:595-600.
31. Crouch E, Parghi D, Kuan S-F, Persson A. Surfactant protein D: subcellular localisation in nonciliated bronchiolar epithelial cells. *Am J Physiol* 1992;263:L60-L66.
32. Wright JR, Clements JA. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:4260444.
33. Rüstow B, Nakagawa Y, Rabe H, Waku K, Kunze D. Species pattern of phosphatidylinositol from lung surfactant and a comparison of the species pattern of phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol synthesized de novo in lung microsomal fractions. *Biochem J* 1988;254:67-71.
34. Mason RJ, Voelker DJ. Role of intracellular glycerol-3-phosphate in the synthesis of phosphatidylglycerol by freshly isolated adult rat alveolar type II cells. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:519-524.
35. Tsuzuki A, Kuroki Y, Akino T. Pulmonary surfactant protein A-mediated uptake of phosphatidylcholine by alveolar type II cells. *Am J Physiol* 1993;265:L193-L199.
36. Wright, J. R., R. E. Wager, S. Hawgood, L. Dobbs, and J. A. Clements. 1987. Surfactant apoprotein Mr = 26.000 - 36.000 enhances uptake of liposomes by type II cells. *J. Biol. Chem.* 262: 2888-2894.
37. Barylá NE, Melanson JE, McDermott MT, Lucy CA. Characterization of surfactant coatings in capillary electrophoresis by atomic force microscopy. *Anal Chem* 2001 Oct 1;73(19):4558-65.

38. Veldhuizen EJ, Haagsman HP. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta* 2000 Aug 25;1467(2):255-70.
39. Veldhuizen R, Nag K, Orgeig S, Possmayer F. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta* 1998 Nov 19;1408(2-3):90-108.
40. Almgren M. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants. *Biochim Biophys Acta* 2000 Nov 23;1508(1-2):146-63.
41. Bachofen H, Schurch S, Possmayer F. Disturbance of alveolar lining layer: effects on alveolar microstructure. *J Appl Physiol* 1994 May;76(5):1983-92.
42. King, R. J., and J. A. Clements. Surface active materials from dog lung. II. Composition and physiological correlations. *Am. J. Physiol.* 223: 715-726, 1972.
43. Possmayer, F. Physico-chemical aspects of pulmonary surfactant. In: *Fetal and Neonatal Physiology*, edited by R. A. Polin, and W. W. Fox. New York: Saunders, 1997, p. 1259-1275.
44. Goerke J, Clements JA (1986). Alveolar surface tension and lung surfactant. In: Macklem PT, Mead J (eds) *Handbook of physiology, section 3: the respiratory system, vol III*. American Physiological Society, Bethesda, S 247.
45. Mackie AR, Gunning AP, Ridout MJ, Wilde PJ, Rodriguez Patino J. In situ measurement of the displacement of protein films from the air/water interface by surfactant. *Biomacromolecules* 2001 Fall;2(3):1001-6.
46. Banerjee R, Bellare JR. Ultrastructure of exogenous surfactants using cryogenic scanning electron microscopy. *J Biomater Appl* 2001 Jan;15(3):230-40.
47. Haque ME, McIntosh TJ, Lentz BR. Influence of lipid composition on physical properties and peg-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles: "nature's own" fusogenic lipid bilayer. *Biochemistry* 2001 Apr 10;40

48. Heerklotz H, Seeling J. Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. *Biochim Biophys Acta* 2000 Nov 23;1508(1-2):69-85.
49. Farrell, PM (1982). Lung development: Biological and clinical aspects. *1/2 Academic Press*.
50. Sanderson, R.J., Paul, G.W., Vatter, A.E., Filley, G.G. (1976). Morphological and physical basis for lung surfactant action. *Resp. Physiol.* 27,379-386.
51. Schurch S, Bachofen H, Goerke J, Possmayer F. A captive bubble method reproduces the in situ behavior of lung surfactant monolayers. *J Appl Physiol* 1989 Dec;67(6):2389-96.
52. Schurch S, Bachofen H, Possmayer F. Surface activity in situ, in vivo, and in the captive bubble surfactometer. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001 May;129(1):195-207.
53. Ebert, R. (1978). Small airways of the lung. *Annals of Internal Med.*88,1-9.
54. Wright JR, Hawgood S. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev* 1997 Oct;77(4):931-62.
55. Miller BE, Dethloff LA, Hook GER. Silica-induced hypertrophy of type II cells in the lungs of rats. *Lab Invest* 1986;55:153-163.
56. Jarstrand, C. (1985). Role of surfactant in pulmonary defense system. In: Robertson, B., van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J. Eds. *Pulmonary surfactant*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford 187-202.
57. Strunk RC, Eidlen DM, Mason RJ. Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. *J Clin Invest* 1988;81:1419-1426.

58. Williams, M. C. Morphologic aspects of the surfactant system. In: *Pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practice*, edited by B. Robertson, L. M. G. van Golde, and J. J. Batenburg. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1992, p. 87-107.
59. Stratton, C. J. 1984. Morphology of surfactant producing cells and the alveolar lining. In *Pulmonary Surfactant*. B. Robertson, L. M. G. Van Golde, and J. J. Batenburg, editors. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 76-118.
60. U. Pison, M. Max, A. Neuendank, S. Weissbach, and S. Pietschmann. 1994. Host defense capacities of pulmonary surfactant: evidence for 'non-surfactant' functions of the surfactant system. *Eur. J. Clin. Invest* 24: 586-599.
61. Mastrangeli, A., C. Danel, M. A. Rosenfeld, L. Stratford-Perricaudet, M. Perricaudet, A. Pavirani, J. P. Lecocq, and R. G. Crystal. 1993. Diversity of airway epithelial cell targets for in vivo recombinant adenovirus-mediated gene transfer. *J. Clin. Invest.* 91: 225-234.
62. Irvani, J., van Ass, A. (1972). Mucustransport in the tracheobronchial tree of normal and bronchitic rats. *J. Path.* 106, 81-86.
63. O'Neil, S., Lesperance, E., Klaas, D. J. (1984). Rat lung lavage enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130, 225-230.
64. Rothmann BL, Merrow M, Masahiro B, Kennedy T, Kreutzer DL. Biosynthesis of the third and fifth complement components by isolated human lung cells. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:212-220.
65. Simon RH, Paine R 3rd. Participation of pulmonary alveolar epithelial cells in lung inflammation. *J Lab Clin Med* 1995 Aug;126(2):108-18.
66. Eckert, M., Lux, M., Lachmann, B. (1983). The role of alveolar macrophages in surfactant turnover. *Lung* 161,213-218.

67. Nag K, Munro JG, Hearn SA, Rasmusson J, Petersen NO, Possmayer F. Correlated atomic force and transmission electron microscopy of nontubular structures in pulmonary surfactant. *J Struct Biol* 1999 Jun 1;126(1):1-15.
68. Morgenroth, K. Das Surfactantsystem, der Lunge: morphologische Grundlagen und klinische Bedeutung. Berlin, New York: De Gruyter, 1986.
69. Johannson, J., and F. Possmayer. Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *Eur. J. Biochem.* 244: 675-693, 1997.
70. Cruz A, Worthmann LA, Serrano AG, Casals C, Keough KM, Perez-Gil J. Microstructure and dynamic surface properties of surfactant protein SP-B/dipalmitoylphosphatidylcholine interfacial films spread from lipid-protein bilayers. *Eur Biophys J* 2000;29(3):204-13.
71. Przystalski S, Sarapuk J, Kleszczynska H, Gabrielska J, Hladyszowski J, Trela Z, Kuczera J. Influence of amphiphilic compounds on membranes. *Acta Biochem Pol* 2000;47(3):627-38.
72. Yu SH, Possmayer F. Adsorption, compression and stability of surface films from natural, lipid extract and reconstituted pulmonary surfactants. *Biochim Biophys Acta* 1993 Apr 23;1167(3):264-71.
73. Yu SH, Possmayer F. Dipalmitoylphosphatidylcholine and cholesterol in monolayers spread from adsorbed films of pulmonary surfactant. *Lipid Res* 2001 Sep;42(9):1421-9.
74. Puligandla PS, Gill T, McCaig LA, Yao LJ, Veldhuizen RA, Possmayer F, Lewis JF. Alveolar environment influences the metabolic and biophysical properties of surfactant. *J Appl Physiol* 2000 Mar;88.
75. Memoli A, Annesini MC, Petralito S. Surfactant-induced leakage from liposomes: a comparison among different lecithin vesicles. *Int J Pharm* 1999 Jul 20;184(2):227-35.
76. Fosnarić M, Kralj-Iglic V, Hagerstrand H, Iglic A. On stability of circular hole in membrane bilayer. *Cell Mol Biol Lett* 2001;6(2):167-71.

77. Yu SH, Posmayer F. Interaction of pulmonary surfactant protein A with dipalmitoylphosphatidylcholine and cholesterol at the air/water interface. *J Lipid Res* 1998 Mar;39(3):555-68.
78. Krochmal, E. M., S. T. Ballard, J. R. Yankaskas, R. C. Boucher, and J. T. Gatzky. Volume and ion transport by fetal rat alveolar and tracheal epithelial in submersion culture. *Am J. Physiol.* 256 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 25): F397-F407,1989.
79. Mason, R. J., M. C. Williams, J. H. Widdicombe, M. J. Sanders, J. S. Misfeldt, and L. C. Berry, Jr. Transepithelial transport by pulmonary typ II cells in primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6033-6037,1982.
80. Schneeberger, E. E., and K. M. McCarthy. Cytochemical localization of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in rat type II pneumocytes. *J. Appl. Physiol.* 60: 1584-1589,1986.
81. Russo, R. M., R. L. Lubman, and E. D. Crandall. Evidence for amilorid-sensitive sodium channels in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 262 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 6): L405-L411,1992.
82. Cheek, J. M., K.-J. Kim, and E.D. Crandall. Tight monolayers of rat alveolar epithelial cells: bioelectric properties and active sodium transport. *Am. J. Physiol.* 256 (*Cell Physiol.* 25): C688-C693,1989.
83. Cantley, L. C. Structure and mechanism of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. *Curr. Top. Bionerget.* 11:201-237,1981.
84. Shyjan, A. W., and R. Levenson. Antisera specific for the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, and β subunits of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$: differential expression of α and β subunits in rat tissue membranes. *Biochemistry* 28: 4531-4535,1989.
85. Ridge, K., D. H. Rutschman, P. Factor, A. I. Katz, A. M. Bertorello, and J.I. Sznajder. Differential expression of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ isoforms in rat alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 273 (*Lung Cell. Mol. Physiol.* 17): L246-L255,1997.

86. Madara, J. L. and K. Dharmasathaphorn. Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer. *J. Cell Biol.* 2124-2133,1985.
87. Coleman, D. L., I. K. Tuet, and J. H. Widdecombe. Electrical properties of dog tracheal cells grown in monolayer culture. *Am. J. Physiol.* 246 (Cell Physiol. 19): C355-359,1984.
88. Physik für Mediziner, Rainer Ludwig, Justus-Liebig-Universität Gießen, 6/1-6/12, 1994.
89. Ballard, S. T., and J. T. Gatzky. Microelectrode analysis of the transepithelial PD of liquid-filled alveoli of rat lung (Abstract). *FASEB J.* 2: A706,1988.
90. Bartels H, Ostern H-J, Voss-Wermbter G. Communicating-occluding junction complexes in the alveolar epithelium. *Am Rev Respir Dis* 1980;121:1017-1024.
91. Shannon, J. M., R. J. Mason, and S. D. Jennings. 1987. Functional differentiation of alveolar type II epithelial cells in vitro: effects of cell-shape, cell-matrix, and cell-cell interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 931:143-156.
92. Diglio, C. A., and Y. Kikkawa. The type II epithelial cells of the lung. IV. Adaptation and behavior of isolated type II cells in culture. *Lab. Invest.* 37: 622-631, 1977.
93. Ootani A, Toda S, Fujimoto K, Sugihara H. An air-liquid interface promotes the differentiation of gastric surface mucous cells (GSM06) in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 May.
94. Dobbs LG, Pian MS, Maglio M, Dumars S, and Allen L. Maintenance of the differentiated type II cell phenotype by culture with an apical air surface. *Am Physiol Soc.* 1997;L347-L356.
95. Ryan RM, Morris RE, Rice WR, Ciruolo G, Whitsett JA. Binding and uptake of pulmonary surfactant protein (SP-A) by pulmonary type II epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 1989;37:429-440.

96. Rice WR, Ross GF, Singelton FM, Dingle S, Whitsett JA, Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type II cells. *J Appl Physiol* 1987;692-698.
97. Dobbs LG, Wright JR, Hawgood S, Gonzalez R, Venstrom K, Nellenbogen J. Pulmonary surfactant and its components inhibit secretion of phosphatidylcholine from cultured rat alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1010-1014.
98. Yangita, K., M. Nagaike, H. Ishibashi, Y. Niho, K. Matsumoto and T. Nakamura. 1992. Lung may have an endocrine function producing hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182:802-809.
99. Geppert, E. F., M. C. Williams, and R. J. Mason. Primary cultures of rat alveolar type II cells on floating collagen membranes. *Exp. Cell Res.* 128:363-374,1980.
100. Rannels, D. E., and S. R. Rannels. Influence of the extracellular matrix on type 2 cell differentiation. *Chest* 96:165-173,1989.
101. F. H. Kayser, K. A. Bienz, J. Eckert, J. Lindemann. *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage. Thieme 1993.
102. McRichie. D.I., J. Edelson, A. S. Slutsky, H. Y. Man, Y. T. Wang, S. Keshavjee, and M. Liu. 1997. Lipopolysaccharide-induced TNF alpha release from rat type II pneumocytes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:A754.(Abstr.).
103. Luster, A. D. 1998. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338:436-445.
104. Paine, R., III, M. W. Rolfe, T. J. Standiford, M. D. Burdick, B. J. Rollins, and R. M. Strieter. 1993. MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture. *J. Immunol.* 150:4561-4570.
105. Dinarello CA: Interleukin-1. *Rev Infect Dis* 1984;6:51-95.

- 106.Kuno K, Matsushima K. The IL-1 receptor signaling pathway. *Leukoc Biol* 1994 Nov;56(5):542-7.
- 107.Siler TM, Swierkosz JE, Hyers TM, Fowler AA, Webster RO. Immunoreactive interleukin-1 in bronchoalveolar lavage fluid of high-risk patients and patients with adult respiratory distress syndrome. *Exp Lung Res* 1989 Dec;15(6):881-94.
- 108.Driscoll, KE. Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Exp. Lung Res.* 20:473-490,1994.
- 109.Selsted ME, Brown DM, DeLange RJ, Lehrer RI. Primary structure of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J Biol Chem* 1983 Dec 10;258(23):14485-9.
- 110.Koyoma S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Miura M, Yamashita T, Nagai S, Izumi T. Monocyte chemotactic factors released from type II pneumocyte-like cells in response to TNF-alpha and IL-1alpha. *Eur Respir J* 1999 Apr;13(4):820-8.
- 111.Discroll, K. E., D. G. Hassenbein, B. W. Howard, R. J. Isfort, D. Cody, M. H. Tindal, M. Suchanek, and J. M. Carter. Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. *J. Leukoc. Biol.* 58: 359-364, 1995.
- 112.Gupta S, Feng L, Yoshimura T, Redick J, Fu SM, Rose CE Jr. Intra-alveolar macrophage-inflammatory peptide 2 induces rapid neutrophil localization in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996 Nov;15(5):656-63.
- 113.West M. A., Wilson C. Hypoxic alterations in cellular signal transduction in shock and sepsis. *Soc Crit Care Med.* 1996:168-177.
- 114.Luce, J. M. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 26:369-376,1998.

115. Lewis, J. F., Ikegami, and A. H. Jobe. Altered surfactant function and metabolism in rabbits with acute lung injury. *J. Appl. Physiol.* 69:2303-23013.
116. Lewis, J. F., and A. H. Jobe. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147:218-233,1993.
117. S. I. Danto, J. M. Shannon, Z. Borok, S. M. Zabski, and E. D. Crandell. Reversible Transdifferentiation of Alveolar Epithelial Cells. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. Vol. 12. Pp. 497-502,1995*
118. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, et al: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 199;1431-1433
119. Mathison J, Wolfson E, Steinemann S, et al: Lipopolysaccharide (LPS) recognition in macrophages. Participation of LPS-binding protein and CD14 in LPS-induced adaptation in rabbit peritoneal exsudate macrophages. *J Clin Invest* 1993;92:2053-2059
120. Geng Y, Zhang B, Lotz M: Protein tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of cytokines in human blood monocytes. *J Immunol* 1993; 151:6692-6700
121. Manthey CL, Perera P-Y, Henricson BE, et al: Endotoxin-induced early gene expression in C3H/HeJ (LPS) macrophages. *J Immunol* 1994; 153:2653-2663
122. Rinaldo JE, Rogers RM: Adult respiratory distress syndrome – Changing concepts of lung injury and repair. *N Engl J Med* 1980;306:900-909

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- ARDS Acute Respiratory Distress Syndrome
- ATP Adenosintriphosphat
- BSA Bovines Serum Albumin
- cDNA Copy-Deoxyribonukleinsäure
- 5-CFDA 5-Carboxy-Fluoreszeindiacetat
- DMEM Dulbeccos Modified Eagle Medium
- DNase I Deoxyribonuklease I
- DPPC Dipalmitoylphosphatidylcholin
- ELISA Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
- FCS Fetales Kälberserum
- FET Fluoreszenzenergietransfer
- FSB First Strand Buffer
- HBSS Hanks Balanced Salt Solution
- IgG Immunglobulin G
- IL-1 Interleukin-1
- LPS Lipopolysaccharid
- M mol/l, z.B. in M, mM, μ M oder nM
- MCP-1 Monozyten Chemotaktisches Protein-1
- MIP-2 Makrophagen Inflammatorisches Protein-2
- mRNA Messenger Ribonukleinsäure
- PBS Phosphate Buffered Saline
- PMA Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
- PMN Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
- RNase Ribonuklease
- SP-x Surfactantprotein-, z.B. -B.
- TNF- α Tumornekrosefaktor- α
- Typ₁-Zellen Alveolarepithelzellen Typ 1
- Typ₂-Zellen Alveolarepithelzellen Typ 2

Lebenslauf Nektarios Sinis

**Geboren am 23.01. 1975
In Offenbach am Main**

6/1981 – 7/1985	Grundschule/Erich-Kestner-Schule, Wetzlar
8/1985 – 6/1991	Integrierte Gesamtschule/Erich-Kestner-Schule, Wetzlar
8/1991 – 7/1994	Gymnasiale Oberstufe/Goethe-Schule, Wetzlar
10/1994 – 4/1995	Studium der Rechtswissenschaften/Justus-Liebig-Universität, Giessen
5/1995 – 5/2001	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Giessen
01.06.01 – 31.10.02	Arzt im Praktikum in der Abteilung für Hand- und Plastische Chirurgie, Evangelisches Krankenhaus Oldenburg, Chefarzt Dr. Reimer Hoffmann
01.11.02 – 30.11.02	Arzt im Praktikum in der Abteilung für Hand-, Plastische-, Rekonstruktive- und Verbrennungschirurgie, BG-Unfallklinik Tübingen, Chefarzt Prof. Dr. Eberhard Schaller
seit 12/2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Hand-, Plastische-, Rekonstruktive- und Verbrennungschirurgie, BG-Unfallklinik Tübingen, Chefarzt Prof. Dr. Eberhard Schaller. Derzeitiges Forschungsthema: „Verwendung einer bioresorbierbaren Nervenleitschiene zur Überbrückung langstreckiger Nervendefekte in Ratten“.

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Dr. Frank Rose und Prof. Dr. Dr. F. Grimminger bedanken, die mir mit dieser Arbeit den Einstieg in Forschung und Wissenschaft ermöglicht haben. Ihrer fachlichen Unterstützung habe ich den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit zu verdanken.

Bedanken möchte ich mich ferner bei Dr. Bernd Guthmann, mit dem ich häufig viel Zeit bei der Isolierung der Zellen verbracht habe.

Auch bei den übrigen Mitarbeitern des Labors möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle und moralische Unterstützung. Durch ihre Hilfe war ich in der Lage mich ausschließlich auf die Arbeit im Labor zu konzentrieren.

Besonderen Dank verdient meine Lebensgefährtin Tanja Greeb. Ohne den Rückhalt und die Unterstützung, die ich durch sie erfahren habe wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.