

# Ca<sup>2+</sup>-signaling in glatten Muskelzellen der Luftwege in T-bet Knock-Out Mäusen

## Ca<sup>2+</sup>-signaling in Smooth Muscles Cells of the Airways in T-bet Knock-Out Mice

### Autoren

A. Bergner, J. Kellner, F. Gamarra, R. M. Huber

### Institut

Pneumologie, Medizinische Klinik-Innenstadt der Ludwig-Maximilians Universität München (Leiter: Prof. R. M. Huber)

### Bibliografie

DOI 10.1055/s-2006-944300  
Pneumologie 2006; 60; 711–715  
© Georg Thieme Verlag KG  
Stuttgart · New York  
ISSN 0934-8387

### Korrespondenzadresse

**Dr. med. Albrecht Bergner**  
Pneumologie, Medizinische  
Klinik-Innenstadt  
Ziemssenstr. 1  
80336 München  
albrecht.bergner@  
med.uni-muenchen.de

### Zusammenfassung

**Hintergrund:** Glatte Muskelzellen der Luftwege (ASMC) spielen in der bronchialen Hyperreagibilität eine entscheidende Rolle. Kalzium ist der wichtigste Faktor in der Signalkaskade, die die Kontraktion der ASMC bewirkt. T-bet knock-out (KO)-Mäuse zeigen spontan eine Dominanz von T<sub>H2</sub>-Lymphozyten sowie histologische und funktionelle Eigenschaften des Asthma bronchiale. Ziel unserer Untersuchung war die Beantwortung der Frage, ob die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase in ASMC von T-bet KO-Mäusen als einem experimentellen Modell für das Asthma bronchiale verändert ist.

**Methode:** Lungenschnitte von 100–200 µm Dicke wurden von T-bet KO- und Wildtyp-Mäusen kultiviert. Die Azetylcholin (ACH)-induzierte bronchiale Kontraktion wurde mittels Video-Mikroskopie quantifiziert und das ACH-induzierte Ca<sup>2+</sup>-signaling einzelner ASMC in den Lungenschnitten mittels 2-Photonen-Mikroskopie analysiert.

**Ergebnisse:** Bronchien von T-bet KO-Mäusen zeigten einen erhöhten basalen Tonus, der mit vermehrten spontanen Änderungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration der ASMC verbunden war. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen waren Bronchien von T-bet KO-Mäusen zudem hyperreagibel. Dies korrelierte mit erhöhten ACH-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Transienten und einem erhöhten Prozentsatz von ASMC, die ACH-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen aufwiesen. Nach der Entleerung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher durch Caffeine or Cyclopiazonic Acid war der Ca<sup>2+</sup>-Anstieg in ASMC von T-bet KO-Mäusen höher als in Wildtyp-Mäusen.

**Schlussfolgerungen:** Eine veränderte Ca<sup>2+</sup>-Homöostase von ASMC trägt zu dem erhöhten basalen Bronchotonus und zur bronchialen Hyperreagibilität in Lungenschnitten von T-bet KO-Mäusen bei. Dem liegt wahrscheinlich ein erhöhter Ca<sup>2+</sup>-Gehalt der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher zu Grunde.

### Abstract

**Background:** Airway smooth muscle cells (ASMC) play a key role in bronchial hyperresponsiveness (BHR). A major component of the signaling cascade leading to ASMC contraction is calcium. T-bet knock-out (KO) mice show the key features of allergic asthma such as a shift towards T<sub>H2</sub>-lymphocytes and display a broad spectrum of asthma-like histological and functional characteristics. In this study, we aimed at investigating whether Ca<sup>2+</sup>-homeostasis of ASMC is altered in T-bet KO-mice as an experimental model of asthma.

**Methods:** Lung slices of 100 to 200 µm thickness were obtained from T-bet KO- and wild-type mice. Airway contractions in response to acetylcholine (ACH) were measured by video-microscopy and Ca<sup>2+</sup>-signaling in single ASMC of lung slices was assessed using two-photon microscopy.

**Results:** Airways from T-bet KO-mice showed increased baseline airway tone (BAT) and BHR compared to those of wild-type mice. The increased BAT was correlated with an increased incidence of spontaneous changes in intracellular Ca<sup>2+</sup>-concentrations, whereas BHR correlated with higher ACH-induced Ca<sup>2+</sup>-transients and an increased proportion of ASMC showing Ca<sup>2+</sup>-oscillations. Emptying intracellular Ca<sup>2+</sup>-stores using caffeine or cyclopiazonic acid induced higher Ca<sup>2+</sup>-elevations in ASMC from T-bet KO compared to wild-type mice.

**Conclusions:** Altered Ca<sup>2+</sup>-homeostasis of ASMC contributes to increased BAT and BHR in lung slices from T-bet KO mice as a murine asthma model. We propose that a higher Ca<sup>2+</sup>-content of the intracellular Ca<sup>2+</sup>-stores is involved in the pathophysiology of these changes.

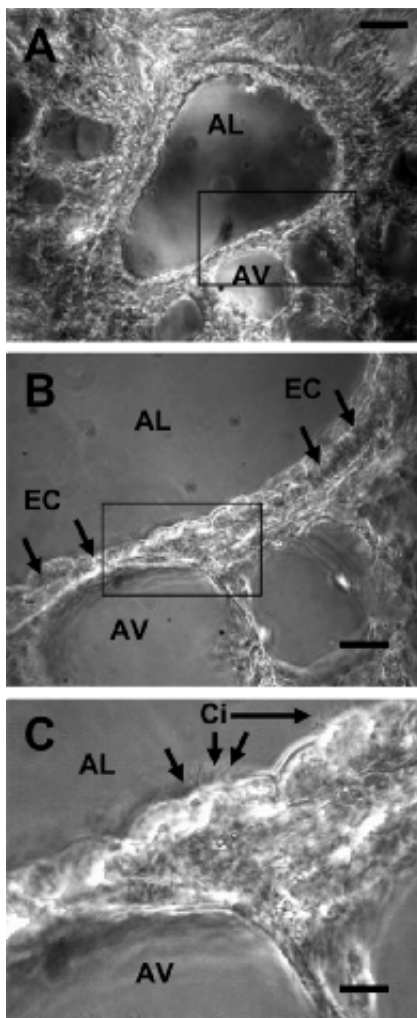
## Einleitung

Asthma ist charakterisiert durch Entzündung, Airway Remodelling und bronchiale Hyperreagibilität (BHR). Glatte Muskelzellen der Luftwege (ASMC) vermitteln die Bronchokonstriktion und spielen daher eine Schlüsselrolle in der BHR. Eine erhöhte Masse der ASMC ist bei Asthma nachgewiesen worden [1], darüber hinaus stellt sich jedoch die Frage, ob die Kontraktilität der einzelnen ASMC ebenfalls verändert ist. In diesem Zusammenhang ist die Rolle von Signalmolekülen, die die agonist-induzierte Kontraktion vermitteln, in den Mittelpunkt des Interesses gerückt [2]. Kalzium ist ein ubiquitäres Signalmolekül, das in der Regulation einer Vielfalt von Prozessen in nahezu allen Säugetierzellen involviert ist [3]. Kontraktile Stimuli erhöhen die Konzentration des zytosomatischen  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_c$ ) in ASMC und induzieren dadurch die Kontraktion. Auf diesem Hintergrund wird das agonist-induzierte  $Ca^{2+}$ -signaling als ein mögliches Target in

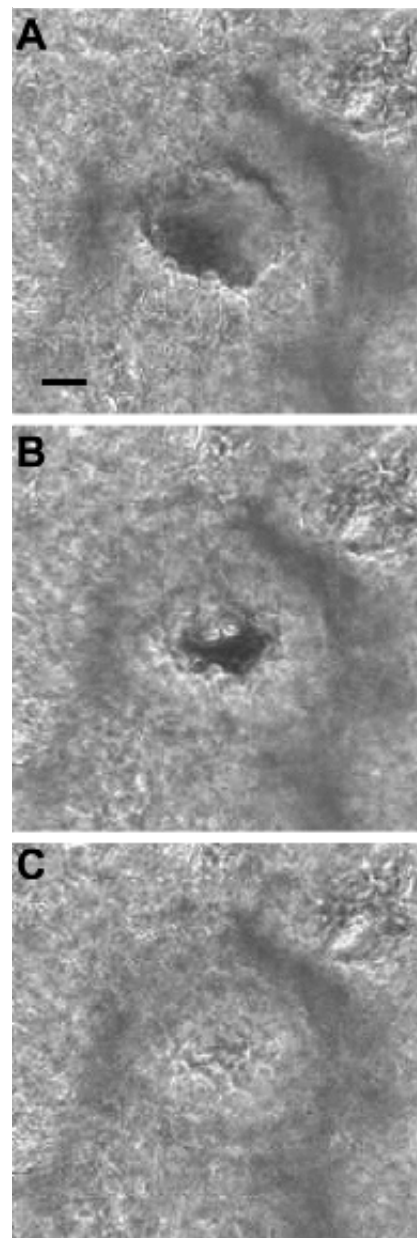
der Pathophysiologie der BHR angesehen. Ziel unserer Untersuchung war die Beantwortung der Frage, ob die  $Ca^{2+}$ -Homöostase von ASMC bei BHR verändert ist.

T-bet ist ein  $T_{H1}$ -spezifischer Transkriptionsfaktor, der die Eigenschaft hat, die Differenzierung von  $T_{H2}$ - in  $T_{H1}$ -Lymphozyten initiieren zu können [4]. Naïve Mäuse, bei denen das T-bet Gen target deleted ist (T-bet KO-Mäuse), entwickeln spontan ein Airway Remodelling, das multiple inflammatorische wie auch funktionelle Charakteristiken des Asthmas aufweist [5]. T-bet KO-Mäuse stellen daher ein vielschichtiges, auf der anderen Seite aber auch einfach zu handhabendes Asthma-Modell dar, da die Notwendigkeit einer Allergenprovokation entfällt.

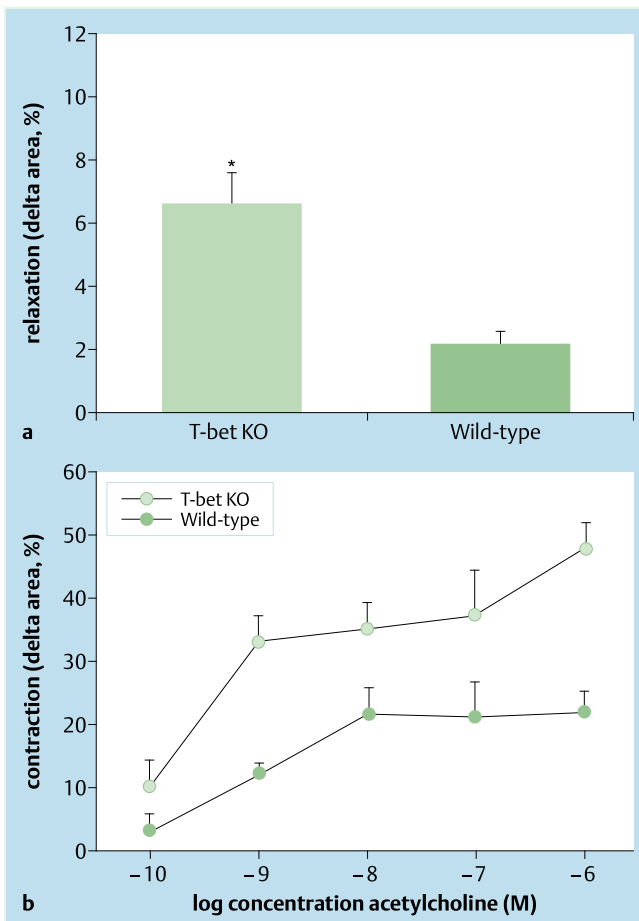
Lungenschnitte von 100–200  $\mu$ m Dicke erhalten in Kultur die in situ Organisation der Lunge sowie die Kontraktilität der ASMC über mehrere Tage (● **Abb. 1** u. **2**, für Details siehe [6–8]) und sind daher hervorragend geeignet, um eine Vielzahl von Fragestellungen in einem in vivo nahen Modell zu untersuchen. Die



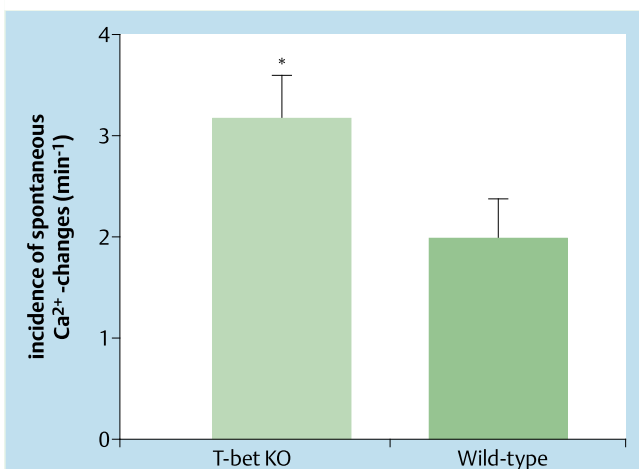
**Abb. 1** Phasenkontrastbild eines Lungenschnittes. **(A)** Querschnitt eines Luftweges mit deutlich sichtbarem Lumen (AL), AV = Alveolen. **(B)** Eine Vergrößerung des Ausschnitts in **(A)** zeigt Epithelzellen (EC), die das Lumen auskleiden. **(C)** In der Vergrößerung des Ausschnitts in **(B)** sind Zilien (Ci) der EC zu erkennen, ASMC sind unter den EC verborgen. Balken: **(A)** 50, **(B)** 20 und **(C)** 8  $\mu$ m.



**Abb. 2** Phasenkontrast-Bild eines Bronchus in einem Lungenschnitt **(A)** unmittelbar vor **(B)** 10 sec und **(C)** 90 sec nach der Zugabe von  $10^{-7}$  M Azetylcholin. Balken = 90  $\mu$ m.



**Abb. 3** (a) Bronchien in Lungenschnitten wurden einer Relaxationslösung ausgesetzt, und die resultierende Bronchodilatation wurde als basaler Tonus definiert. Bronchien von T-bet KO-Mäusen zeigten einen erhöhten basalen Tonus (\* =  $P < 0,01$ ). (b) Bronchien in Lungenschnitten von T-bet KO-Mäusen kontrahieren nach Exposition zu Acetylcholin (ACH) stärker als Bronchien von Wildtyp-Mäusen ( $P < 0,01$ ).



**Abb. 4** Der erhöhte basale Ton in Bronchien von T-bet KO-Mäusen korrelierte mit einer erhöhten Inzidenz von spontanen Änderungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration in den ASMC von T-bet KO-Mäusen (\* =  $P < 0,05$ ).

$[Ca^{2+}]_c$  in den ASMC wird mittels  $Ca^{2+}$ -Indikatoren gemessen, wobei die Fluoreszenzintensität mit der  $[Ca^{2+}]_c$  korreliert. Konventionelle Fluoreszenz-Mikroskopie kann in Lungenschnitten nicht verwendet werden, da in dem dreidimensionalen Modell Fluoreszenz einzelner Zellen nicht unterschieden werden kann. Bei einem 2-Photonen-Laser-Mikroskop wird Fluoreszenz nur in der optischen Ebene erzeugt, wo durch Fokussierung des Laserstrahles die Dichte von Photonen hoch genug ist, damit Fluoreszenzmoleküle durch 2 Photonen gleichzeitig angeregt werden [9]. Dies ist Voraussetzung für eine ausreichende Anregungsenergie. Hierdurch kann Emissionslicht aus einer optischen Schicht mit einer Dicke von ca. 100 nm detektiert und Fluoreszenz einzelner Zellen diskriminiert werden.

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass eine veränderte  $Ca^{2+}$ -Homöostase von ASMC zur BHR beiträgt und dass diesem Phänomen wahrscheinlich ein erhöhter  $Ca^{2+}$ -Gehalt der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher zu Grunde liegt. Kalzium als intrazelluläres Signalmolekül könnte daher in Zukunft einen neuen, bislang vernachlässigten therapeutischen Ansatzpunkt darstellen.

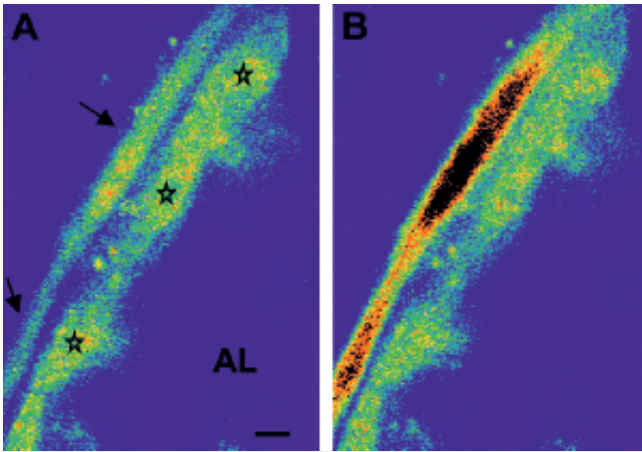
## Material und Methoden

Für Details der Methodik siehe [6,10,11]. Zur Herstellung der Lungenschnitte wurden Mäuselungen mit bei 37 C flüssiger Agarose gefüllt, die Lungen durch Verfestigung der Agarose bei 4 C versteift und mittels eines Tissue Slicers Schnitte von 100–200  $\mu$ m Dicke angefertigt. Die Lungenschnitte wurden freischwimmend im Medium kultiviert und erhielten so die in situ Organisation des Lungengewebes und die Kontraktilität der ASMC für mindestens 5 Tage (● **Abb. 1**). Die Acetylcholin (ACH)-induzierte Bronchokonstriktion (● **Abb. 2**) und die durch eine Relaxationslösung ( $10^{-3}$  M  $\beta$ -Escin und  $10^{-7}$  M ATP in  $Ca^{2+}$ -freiem Phosphat-gepuffertem NaCl 0,9% mit 0,02% EDTA) induzierte Bronchorelaxation wurden mittels Videomikroskopie quantifiziert. Für  $Ca^{2+}$ -Messungen wurden die Lungenschnitte mit dem  $Ca^{2+}$ -Indikator Fluo-4-AM inkubiert und die Fluoreszenz einzelner ASMC mittels eines 2-Photonen-Mikroskopes quantifiziert. Zur statistischen Auswertung wurden der One-way beziehungsweise Two-way ANOVA oder ANOVA On Ranks (kombiniert mit Pairwise Multiple Comparisons) benutzt. Ein P-Wert von  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet.

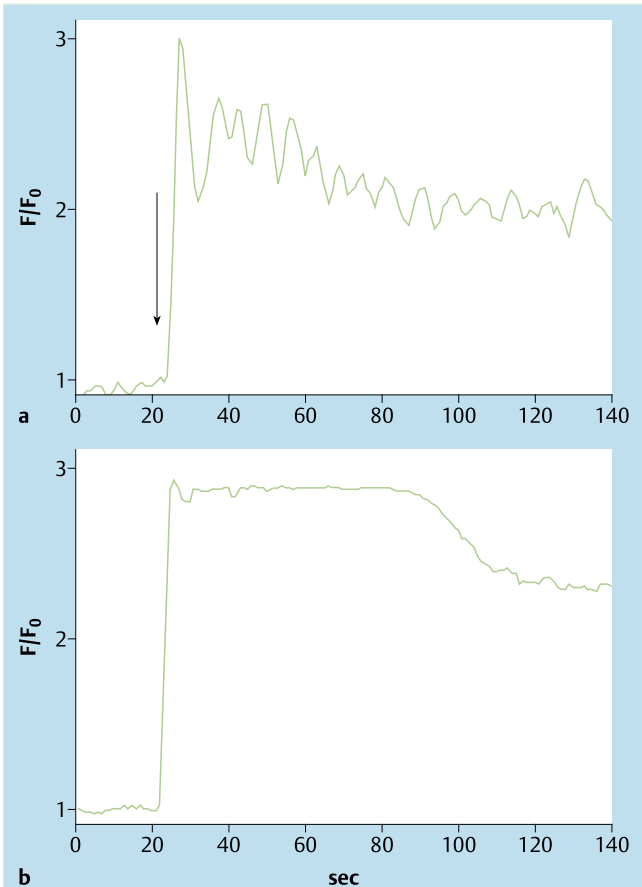
## Ergebnisse

Bronchien in Lungenschnitten wurden einer Relaxationslösung ausgesetzt, mittels Videomikroskopie aufgezeichnet und die resultierende Bronchodilatation wurde als basaler Tonus definiert. Bronchien von T-bet KO-Mäusen zeigten einen erhöhten basalen Tonus (● **Abb. 3a**). Weiterhin wurde die Acetylcholin (ACH)-induzierte Kontraktion von Bronchien in Lungenschnitten quantifiziert. Es zeigte sich, dass Bronchien von T-bet KO-Mäusen stärker kontrahierten als von Wildtyp Mäusen (● **Abb. 3b**).

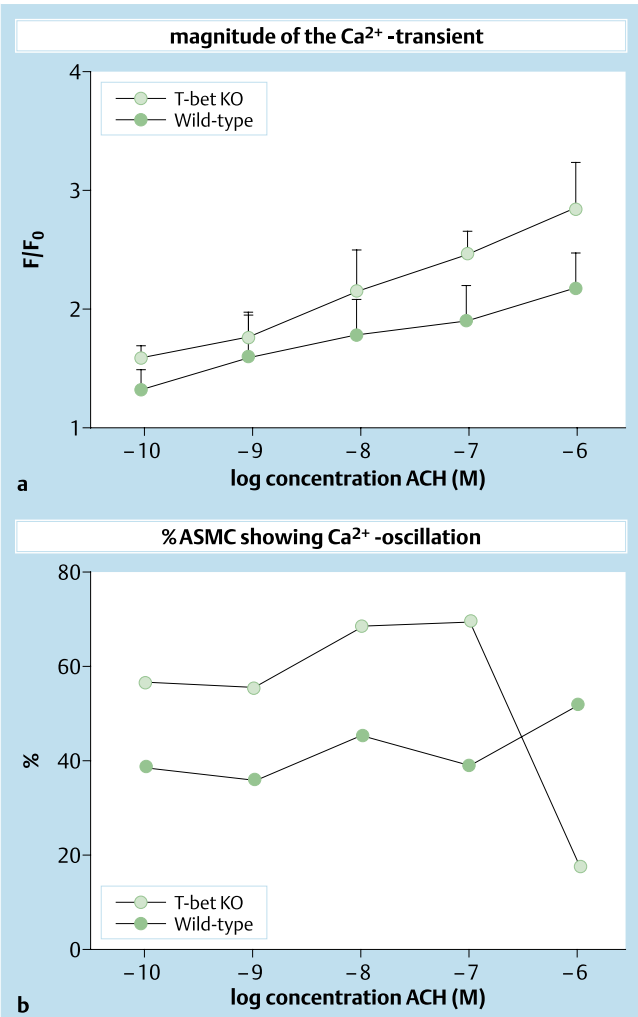
Um das dem basalen Tonus und der Kontraktion zu Grunde liegende  $Ca^{2+}$ -signaling zu messen, wurden die Lungenschnitte mit dem  $Ca^{2+}$ -Indikator Fluo-4-AM inkubiert und die Fluoreszenz in einzelnen ASMC in den Lungenschnitten mittels 2-Photonen Laser-Mikroskopie gemessen. Der erhöhte basale Tonus in den Bronchien von T-bet KO-Mäusen korrelierte mit einer erhöhten Inzidenz von spontanen Änderungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ) in den ASMC (● **Abb. 4**). Das ACH-



**Abb. 5** Die Pseudofarben, 2-Photonen-Aufnahmen zeigen einen Ausschnitt einer Bronchialwand in einem Lungenschnitt **(A)** unmittelbar vor und **(B)** 5 sec nach der Zugabe von  $10^{-7}$  M ACH. „Warme“ Farben bedeuten hohes  $[Ca^{2+}]_i$ . Pfeile = ASMC, Sterne = Epithelzellen, AL = Airway Lumen, Balken = 10  $\mu$ m.



**Abb. 6** Das ACH-induzierte (Pfeil)  $Ca^{2+}$ -signaling in ASMC in Lungenschnitten bestand aus einem  $Ca^{2+}$ -Transienten, gefolgt von **(a)**  $Ca^{2+}$ -Oszillationen oder **(b)** einem  $Ca^{2+}$ -Plateau (repräsentative Kurven).



**Abb. 7** **(a)** ASMC von T-bet KO-Mäusen zeigten einen höheren ACH-induzierten  $Ca^{2+}$ -Transienten ( $P < 0,05$ ). **(b)** Ein höherer Prozentsatz von ASMC von T-bet KO-Mäusen wies  $Ca^{2+}$ -Oszillationen anstelle eines  $Ca^{2+}$ -Plateaus auf ( $P < 0,01$ ). Bei  $10^{-6}$  M ACH zeigten nur noch 19% der ASMC von T-bet KO-Mäusen  $Ca^{2+}$ -Oszillationen, während 81% ein  $Ca^{2+}$ -Plateau aufwiesen.

induzierte  $Ca^{2+}$ -signaling (● **Abb. 5**) bestand aus einem initialen  $Ca^{2+}$ -Transienten, gefolgt von  $Ca^{2+}$ -Oszillationen oder einem  $Ca^{2+}$ -Plateau (● **Abb. 6**). Die stärkere ACH-induzierte Kontraktion der Bronchien von T-bet KO-Mäusen korrelierte mit einem höheren  $Ca^{2+}$ -Transienten und einem höheren Prozentsatz an ASMC, die  $Ca^{2+}$ -Oszillationen zeigten (● **Abb. 7**). Bei  $10^{-6}$  M ACH zeigten jedoch nur noch 19% der ASMC von T-bet KO-Mäusen  $Ca^{2+}$ -Oszillationen, während 81% ein  $Ca^{2+}$ -Plateau aufwiesen. Die Frequenz der  $Ca^{2+}$ -Oszillationen war nicht unterschiedlich.

Um die dem veränderten  $Ca^{2+}$ -signaling zu Grunde liegenden Mechanismen zu untersuchen, wurde der  $Ca^{2+}$ -Gehalt der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher bestimmt, indem mittels Caffeine Ryanodine-Rezeptoren geöffnet oder mittels Cyclopiazonic Acid (CPA) SERCA-Pumpen inhibiert wurden. In beiden Fällen war der zu beobachtende  $Ca^{2+}$ -Anstieg in ASMC von T-bet KO-Mäusen höher im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (● **Abb. 8**). Dies lässt auf einen höheren  $Ca^{2+}$ -Gehalt der  $Ca^{2+}$ -Speicher im asthmatischen Phänotyp schließen.



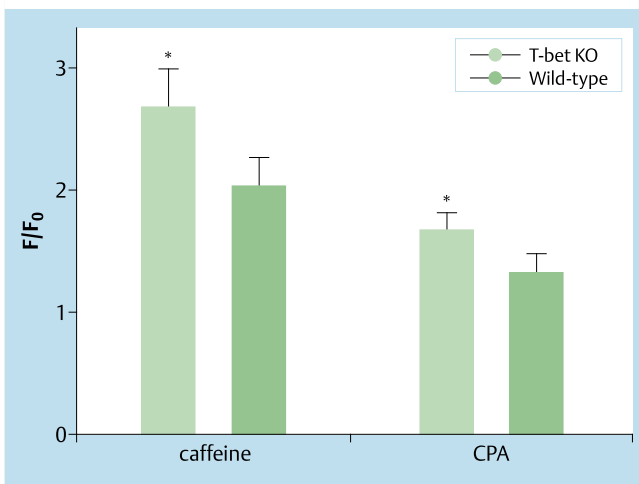


Abb. 8 Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher der ASMC wurde bestimmt, indem mittels Caffeine Ryanodine-Rezeptoren geöffnet oder mittels Cyclopiazonic Acid (CPA) SERCA-Pumpen inhibiert wurden. In beiden Fällen war der zu beobachtende  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in ASMC von T-bet KO-Mäusen höher im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (\* =  $P < 0,05$ ).

## Diskussion

Lungenschnitte erhalten in vitro die dreidimensionale Struktur der Lunge, die Zell-Zell-Interaktionen der verschiedenen pulmonalen Zelltypen und insbesondere der Kontraktilität der ASMC, eingebettet im bronchialen Gewebeverband. In unserer Untersuchung zeigte sich, dass Lungenschnitte von T-bet KO-Mäusen asthmatische Charakteristiken im Sinne eines erhöhten basalen Tonus und bronchialer Hyperreagibilität beibehalten.

Die Kontraktilität von Bronchien in Lungenschnitten ist bereits in der Vergangenheit mithilfe von Videomikroskopie untersucht worden (z. B. [12, 13]). Allerdings verhinderte die Dicke der Lungenschnitte, die andererseits deren „in vivo Nähe“ ausmacht, Untersuchungen einzelner Zellen in dem dreidimensionalen Modell. Die 2-Photonen-Laser-Mikroskopie ist nun in der Lage, optisch dünne Schichten im Gewebe sichtbar zu machen [9]. Ein selbst zusammengestelltes 2-Photonen-Laser-Mikroskop ermöglichte es uns, das  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling in einzelnen ASMC in den Lungenschnitten zu untersuchen (für Einzelheiten siehe [11, 14, 15]). Hierbei zeigte es sich, dass auch ohne Stimulation mit Agonisten die ASMC spontane Schwankungen in der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aufweisen, und wir konnten demonstrieren, dass der erhöhte basale Tonus mit einer erhöhten Inzidenz dieser spontanen Schwankungen korrelierte. Nach Stimulation mit Azetylcholin kommt es in den ASMC zu einem initialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg ( $\text{Ca}^{2+}$ -Transient), der gefolgt ist von  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen oder einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Plateau. In einer früheren Arbeit konnten wir zeigen, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient die Kontraktion bewirkt, während die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen die Kontraktion aufrechterhalten [6]. Tatsächlich korrelierte die bronchiale Hyperreagibilität mit einem erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und mit einem erhöhten Prozentsatz an ASMC, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen zeigten. Weiterhin legen unsere Daten nahe, dass ein erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher diesen Phänomenen zu Grunde liegt.

Für  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker wie zum Beispiel Nifedipin konnte in der Vergangenheit kein therapeutischer Nutzen beim Asthma bronchiale nachgewiesen werden [16]. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Zellmembran spielt bei der Kontraktion von ASMC jedoch allenfalls eine untergeordnete Rolle [6]. Daher ist die mangelnde Effektivität von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blockern verständlich. Unsere Daten zeigen jedoch, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase von ASMC und hier insbesondere die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher eine zentrale Rolle in der bronchialen Hyperreagibilität spielen, und dies könnte in der Zukunft einen neuen therapeutischen Ansatz bilden.

## Danksagung

Unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durch die Sachbeihilfen BE 2356/2 – 1 und BE 2356/2 – 3 an A. Bergner.

## Literatur

- Martin JG, Duguet A, Eidelman DH. The contribution of airway smooth muscle to airway narrowing and airway hyperresponsiveness in disease. *Eur Respir J* 2000; 16: 349 – 354
- Amrani Y, Tliba O, Deshpande DA et al. Bronchial hyperresponsiveness: insights into new signaling molecules. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 230 – 234
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 517 – 529
- Mullen AC, High FA, Hutchins AS et al. Role of T-bet in commitment of  $T_{H1}$  cells before IL-12-dependent selection. *Science* 2001; 292: 1907 – 1910
- Finotto S, Neurath MF, Glickman JN et al. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 2002; 295: 336 – 338
- Bergner A, Sanderson MJ. Acetylcholine-induced calcium signaling and contraction of airway smooth muscle cells in lung slices. *J Gen Physiol* 2002; 119: 187 – 198
- Bergner A, Sanderson MJ. Airway hyperresponsiveness: From molecules to bedside – Selected contribution: Airway contractility and smooth muscle  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling in lung slices from different mouse strains. *Journal of Applied Physiology* 2003; 95: 1325 – 1332
- Bergner A, Sanderson MJ. ATP stimulates  $\text{Ca}^{2+}$ -oscillations and contraction in airway smooth muscle cells of mouse lung slices. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L1271 – L1279
- Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 1990; 248: 73 – 76
- Bergner A, Kellner J, Kemp da Silva A et al. Bronchial hyperreactivity is correlated with increased baseline airway tone. *Eur J Med Res* 2006; 11: 77 – 84
- Bergner A, Kellner J, Kemp da Silva A et al.  $\text{Ca}^{2+}$ -signaling in airway smooth muscle cells is altered in T-bet knock-out mice. *Respir Res* 2006; 7: 33
- Dandurand RJ, Wang CG, Phillips NC et al. Responsiveness of individual airways to methacholine in adult rat lung explants. *J Appl Physiol* 1993; 75: 364 – 72
- Martin C, Uhlig S, Ullrich V. Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *Eur Respir J* 1996; 9: 2479 – 2487
- Nguyen QT, Callamaras N, Hsieh C et al. Construction of a two-photon microscope for video-rate  $\text{Ca}^{2+}$  imaging. *Cell Calcium* 2001; 30: 383 – 393
- Sanderson MJ, Parker I. Video-rate confocal microscopy. In: *Biophotonics, a 2-Volume issue in Methods in Enzymology*. Edited by Gerard Mariott and Ian Parker, 2002
- Massey KL, Hendeles L. Calcium antagonists in the management of asthma: breakthrough or ballyhoo? *Drug Intell Clin Pharm* 1987; 21: 505 – 509