

Aus dem Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Etablierung und Charakterisierung primärer equiner Trachealepithelzellen:  
Ein in vitro-Modell zur Untersuchung der Expression und Funktion pulmonaler  
 $\beta$ -adrenerger Rezeptoren

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Workineh Shibeshi Alemayehu  
aus Gimjabet Mariam /Äthiopien

Leipzig, 2010

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Arwid Dauschies

Betreuer: Professor Dr. Fritz Rupert Ungemach  
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie  
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Gutachter: Professor Dr. Fritz Rupert Ungemach  
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie  
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Professor Dr. Manfred Kietzmann  
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie  
Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 17. November 2009

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	vii
Tabellenverzeichnis.....	vii
Publikationen und Vorträge.....	viii
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
2.1 Das Atemwegsepithel.....	3
2.1.1 Allgemeiner Überblick.....	3
2.1.2 Aufbau und strukturelle Besonderheiten der Atemwege des Pferdes.....	3
2.1.3 Funktion des Atemwegsepithels.....	5
2.2 Pathophysiologische Bedeutung des Atemwegsepithels bei Atemwegserkrankungen.....	7
2.2.1 Recurrent Airway Obstruction des Pferdes.....	7
2.2.2 Das humane Asthma bronchiale und chronisch obstruktive Lungenerkrankung.....	7
2.2.3 Zystische Fibrose des Menschen.....	9
2.3 Zellkulturmodelle des Atemwegsepithels.....	10
2.3.1 Primärkulturen.....	10
2.3.1.1 Primäre tracheobronchiale Epithelzellen.....	10
2.3.1.2 Primäre Alveolarepithelzellen.....	10
2.3.2 Permanente Zelllinien.....	11
2.3.2.1 Tracheobronchiale Epithelzelllinien.....	11
2.3.2.2 Alveolarepithel-Zelllinien.....	11
2.3.3 Verwendung und Grenzen zell-basierter Systeme.....	12
2.4 Isolierung und Charakterisierung primärer Epithelzellen der Atemwege.....	13
2.4.1 Methoden der Zellisolation und Kultivierung.....	13
2.4.2 Charakterisierung epithelialer Zelleigenschaften.....	14
2.4.2.1 Zelluläre Zusammensetzung des Atemwegsepithels.....	14
2.4.2.2 Biochemische Marker zur Differenzierung von Epithelzellen.....	16
2.4.2.2.1 Zytokeratine.....	16
2.4.2.2.2 Muzin-Antigene.....	16
2.4.2.2.3 Lektin-Bindungsstellen.....	17
2.4.2.3 Differenzierungsverhalten.....	17
2.4.2.4 Bioelektrische Eigenschaften.....	18
2.5 Pharmakologische Bedeutung des Atemwegsepithels.....	19
2.5.1 Atemwegsepithelzellen als pharmakologisches Target.....	19
2.5.2 Pharmakologische Beeinflussung der Funktionen der Atemwegsepithelzellen.....	19
2.5.2.1 Schleimbildung.....	19
2.5.2.2 Ionen- und Flüssigkeitstransport.....	20
2.5.2.3 Modulation der Funktion der glatten Muskulatur der Atemwege.....	21
2.5.3 Expression und Funktion $\beta$ -adrenerger Rezeptoren in den Atemwegen.....	22
2.5.3.1 Struktur, Lokalisation und Regulation.....	22
2.5.3.2 Signaltransduktionswege.....	26
2.5.3.3 Rolle der $\beta$ -adrenergen Rezeptoren bei entzündlichen Atemwegserkrankungen.....	31
2.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	33

<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>34</b>
3.1	Tiere	34
3.2	Material	34
3.2.1	Einmalartikel	34
3.2.2	Verbrauchsmaterial für Zellkultur	34
3.2.3	Zellkulturmedien, Pufferlösungen und Enzyme	34
3.2.4	Chemikalien	36
3.2.5	Antikörper	37
3.2.6	Kits	38
3.2.7	Zelllinien	38
3.2.8	Geräte	38
3.3	Methoden	39
3.3.1	Gewebeentnahme und Aufbereitung	39
3.3.2	Isolierung und Kultivierung der equinen Trachealepithelzellen	39
3.3.2.1	Enzymverdau	39
3.3.2.2	Zellseparierung	40
3.3.2.2.1	Filtration und Zentrifugation	40
3.3.2.2.2	Bestimmung der Zellzahl und -vitalität	40
3.3.3	Anreicherung der Epithelzellfraktion	40
3.3.3.1	Kollagenbeschichtung der Kulturgefäße	40
3.3.3.2	Matrigelbeschichtung der Kulturgefäße	41
3.3.3.3	Adhäsionsverhalten	41
3.3.3.4	Verfahren der magnetischen Zellseparation (MACS)	41
3.3.4	Kultivierung, Passagierung und Konservierung der primären equinen Trachealepithelzellen	44
3.3.4.1	Zellkultivierung auf Kulturschalen	44
3.3.4.2	Differenzierung in Air-Liquid-Interface (ALI)	45
3.3.4.3	Populationsverdopplungszeit	45
3.3.4.4	Passagierung der primären equinen Trachealepithelzellen	46
3.3.4.4.1	Trypsinisierung	46
3.3.4.4.2	Dispase II-vermittelte Ablösung der Trachealepithelzellen	46
3.3.4.5	Kryokonservierung	46
3.3.5	Kultivierung permanenter Zelllinien und Fibroblasten	47
3.3.5.1	Kultivierung der 16HBE14o- und Cos-1 Zellen	47
3.3.5.2	Isolierung und Kultivierung der equinen Trachealfibroblasten	47
3.3.6	Charakterisierung von primären equinen Trachealepithelzellen und Trachealgewebe	48
3.3.6.1	Morphologische Untersuchung primärer Gewebe und Zellen	48
3.3.6.1.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Trachealgewebe	48
3.3.6.1.2	Hämatoxylin-Eosin -Färbung der primären Trachealepithelzellen	48
3.3.6.1.3	Lichtmikroskopie	48
3.3.6.1.4	Rasterelektronenmikroskopie	48
3.3.6.2	Immunzytochemie	49
3.3.6.2.1	Immunfluoreszenz	49
3.3.6.2.2	Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Färbung	50
3.3.7	Charakterisierung $\beta$ -adrenerger Rezeptoren in primären equinen Trachealepithelzellen	51
3.3.7.1	Radioligandenbindungsstudien	51
3.3.7.1.1	Sättigungsexperimente	51
3.3.7.1.2	Verdrängungsexperimente	52
3.3.7.2	Gelelektrophorese und Westernblot	52

3.3.7.3	Immunzytochemische Färbung der Trachealepithelzellen für $\beta$ -adrenerge Rezeptoren.....	53
3.3.7.4	Funktionelle Charakterisierung $\beta$ -adrenerger Rezeptoren an equinen Trachealepithelzellen.....	54
3.3.7.4.1	cAMP -Assay .....	54
3.4	Datenanalyse und statistische Auswertung .....	55
3.4.1	Kinetik der Rezeptorbindung .....	55
3.4.2	Analyse der Bindungsdaten und Statistik.....	58
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>60</b>
4.1	Morphologische Befunde der Trachealgewebe und Trachealepithelzellen .....	60
4.2	Isolation und Kultivierung der equinen Trachealepithelzellen.....	62
4.2.1	Zellausbeute nach Trypsinverdau .....	62
4.2.2	Morphologie und Kulturverhalten der equinen Trachealepithelzellen.....	62
4.2.3	Populationsverdopplungszeit .....	65
4.2.4	Magnetische Separierung der equinen Trachealepithelzellen .....	66
4.2.5	Expression von Epithelzellmarkern .....	68
4.2.6	Kulturbedingungen und Passagierung der equinen Trachealepithelzellen.....	72
4.2.7	Vitalität nach Kryokonservierung .....	73
4.3	Identifizierung und Charakterisierung $\beta$ -adrenerger Rezeptoren in equinen Trachealepithelzellen .....	74
4.3.1	Radioligandenbindungsstudien .....	74
4.3.1.1	Rezeptordichte und Ligandenaffinität .....	74
4.3.1.2	Subtypisierung $\beta$ -adrenerger Rezeptoren .....	77
4.3.2	Expression $\beta$ -adrenerger Rezeptoren in equinen Trachealepithelzellen .....	79
4.3.3	cAMP-Bildung in equinen Trachealepithelzellen .....	81
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>84</b>
5.1	Isolation und Kultivierung primärer equiner Trachealepithelzellen .....	84
5.2	Expression und Funktion $\beta$ -adrenerger Rezeptoren in primären equinen Trachealepithelzellen .....	91
5.3	Ausblick.....	96
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>123</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
AECGM	Airway epithelial cell growth medium
ALI	Air-liquid-interface
ALPHA-Screen	Amplified luminescent proximity homogeneous assay
Arg <sup>16</sup> Gln <sup>27</sup>	Arginin-Glutamin
B <sub>max</sub>	maximale Rezeptordichte
BS	Bindungsstelle
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca	Calcium
CaM	Calmodulin
cAMP	Zyklisches Adenosin -3',5' monophosphat
CGP 12177	(±)-4-(3-Tertiärbutylamino-2-hydroxypropoxy)-benzimidazol-2-ol
CGP 20712A	1-[2-((3-Carbamoyl-4-hydroxy)phenoxy)ethylamino]-3-[4-(1-methyl-4-trifluoromethyl-imidazolyl)-phenoxy]-2-propanol
Cl	Chlor
CK	Zytokeratin
CK AE1/AE3	Zytokeratin Klon AE1/AE3
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Cos-1	African green monkey kidney cell line
cpm	counts per minute
cps	counts per second
d.h.	Das heißt
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC <sub>50</sub>	mittlere Effektivkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
ETEZ	primäre equine Trachealepithelzellen
ETF	equine Trachealfibroblasten
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
fmol	femtomol
G-Protein	Guaninnukleotid bindendes Protein
g	Beschleunigungsfaktor der Erde (9,81 m · s <sup>-2</sup> )
g	Gramm
GAPs	GTPase-aktivierende Proteine
GDP	Guanosindiphosphat
G <sub>i</sub>	inhibierendes G-Protein
GPCR	G-protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinase
G <sub>s</sub>	stimulierendes G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphat hydrolysierendes Enzym

h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	[N-(2-hydroxyethyl) piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)]
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC <sub>50</sub>	Konzentration mit 50% Inhibition
ICI 118,551	Erythro-(+/-)-1-(7-methylindan-4-yloxy)-3-isopropylaminobutan-2-ol
ICYP	(-)-[ <sup>125</sup> I]-Iodocyanopindolol
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IGF	insulinähnliche Wachstumsfaktoren
IL	Interleukin
K	Kalium
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo Dalton
K <sub>i</sub>	Dissoziationskonstante für Antagonisten
l	Liter
Log	dekadischer Logarithmus
m	milli
M	Molar (mol/l)
MACS	Magnetic activated cell sorting
max.	maximal
MEM	Eagle's minimum essential medium
Mg	Magnesium
min.	Minute(n)
mM	millimol
mm	millimeter
Muc	Muzin
n	Anzahl
n	nano
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-Natriumhydrogenphosphat
nM	nanomol
P	Passage
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potentia hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration einer Lösung)
pM	picomol
RAO	Recurrent airway obstruction
RGS	Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.	siehe

S.E.M	standard error of the mean
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung-Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Th2	Subpopulationen von T-Helfer-Zellen
Tris	Tris- (hydroxymethylaminomethan)
U	Unit
u. a.	unter anderem
V	Volumen
vs.	versus
$\beta_2$ -AR	$\beta_2$ -adrenerger Rezeptor
$\mu$	mikro
$\mu$ M	mikromol
$\mu$ m	mikrometer
$\mu$ l	Mikroliter
15-HETE	Hydroxyeicosatetraen-Säure
16HBE14o-	humane bronchiale Epithelzelllinien

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Pferdelage mit Tracheobronchialbaum .....	5
Abb. 2: Zelltypen des Atemwegepithels.....	15
Abb. 3: Struktur des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors.....	23
Abb. 4: Struktur des menschlichen $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors (blau) .....	24
Abb. 5: Schema der GRK-abhängigen Modulation von GPCR-vermittelter Signaltransduktion .....	25
Abb. 6: Der G-Protein-Zyklus .....	28
Abb. 7: G-Protein-abhängige Aktivierung der Adenylatzyklase .....	29
Abb. 8: Schematische Darstellung des AlphaScreen-Signals.....	31
Abb. 9: Ablauf der magnetischen Separation von Fibroblasten .....	43
Abb. 10: Schematischer Ablauf zur Isolierung equiner Trachealepithelzellen .....	44
Abb. 11: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Trachealgewebe und isolierten und kultivierten Epithelzellen .....	60
Abb. 12: Immunperoxidase-Färbung von Paraffinschnitten aus nativen Trachealgeweben ...	61
Abb. 13: Wachstumsverhalten equiner Trachealepithelzellen in den Transwel-Inserts .....	63
Abb. 14: Wachstumsverhalten equiner Trachealepithelzellen auf Kulturschalen .....	64
Abb. 15: Ultrastrukturelle Darstellung des Verbandes der in Transwel-Inserts kultivierten Trachealepithelzellen.....	65
Abb. 16: Wachstumskurve der primären equinen Trachealepithelzellen.....	66
Abb. 17: Differenziertes Adhäsionsverhalten der equinen Trachealfibroblasten (ETF) und der humanen bronchialen Epithelzelllinien (16HBE14o) .....	67
Abb. 18: Immunfluoreszenzfärbung frisch isolierter equiner Trachealepithelzellen.....	69
Abb. 19: Immunfluoreszenzfärbung equiner Trachealepithelzellen in der Primärkultur.....	70
Abb. 20: Nachweis des Epithelzellmarker-Zytokeratin in equinen Trachealepithelzellen mit Hilfe der Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Färbung.....	71
Abb. 21: Wachstumsverhalten passagierter equiner Trachealepithelzellen (P <sub>1</sub> ) .....	72
Abb. 22: Repräsentative immunzytochemische Färbung passagierter equiner Trachealepithelzellen (P <sub>1</sub> ) .....	73
Abb. 23: Bindung von ICYP an frisch isolierte equine Trachealepithelzellen.....	75
Abb. 24: Bindung von ICYP an kultivierte equine Trachealepithelzellen. ....	76
Abb. 25: Konzentrationsabhängige Hemmung der ICYP-Bindung durch $\beta$ -adrenerge Rezeptorantagonisten an primären equinen Trachealepithelzellen .....	78
Abb. 26: Westernblot-Analyse des $\beta$ -AR-Proteinlevels in Trachealepithelzellen.....	79
Abb. 27: Immunfluoreszenzfärbung des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in equinen Trachealepithelzellen. ....	80
Abb. 28: Konzentrationsabhängige Stimulation der cAMP-Bildung in equinen Trachealepithelzellen durch $\beta$ -adrenerge Rezeptoragonisten.....	81
Abb. 29: Hemmung der Isoproterenol-induzierten cAMP-Bildung in primären equinen Trachealepithelzellen durch $\beta$ -adrenerge Rezeptorantagonisten.....	83

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der durch MACS separierten equinen Trachealfibroblasten .....	67
Tabelle 2: Maximale Rezeptordichte und Dissoziationskonstante der ICYP-Bindung an frisch isolierten und kultivierten equinen Trachealepithelzellen.....	74

## **Publikationen und Vorträge**

- Shibeshi W, Abraham G, Ungemach FR (2009). Identification and characterization of beta-adrenergic receptors in primary equine tracheal epithelial cells. *J Vet Pharmacol Ther.* ; 32 (supp.1):115.
- Shibeshi W, Abraham G, Kneuer C, Ellenberger C, Seeger J, Schoon HA, Ungemach FR. (2008). Isolation and culture of primary equine tracheal epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 44:179-84.
- Shibeshi W, Abraham G, Kneuer C, Ungemach FR (2008). Isolation and culture of primary equine tracheal epithelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 377(suppl):18.
- Shibeshi W, Abraham G, Ungemach FR (2008). Beta-adrenergic receptor characterization in primary equine tracheal epithelial cells. Oral presentation. 18. VETPHARM-Symposium der deutschsprachigen Veterinärpharmakologen und -toxikologen. 15-16 September, Gießen, Deutschland.
- Shibeshi W, Abraham G, Kneuer C, Ungemach FR (2007). Establishment of primary culture model of equine tracheal epithelial cells. 17. VETPHARM-Symposium der deutschsprachigen Veterinärpharmakologen und -toxikologen. 27-28 September, Berlin, Deutschl

## 1 EINLEITUNG

Bei dem Kontakt zwischen dem Organismus und seiner Umwelt spielen neben der Haut die Atemwege aufgrund ihrer großen Oberfläche eine bedeutende Rolle. Das Epithel der Atemwege aller Säuger einschließlich Pferd stellt somit die Trennfläche zwischen externen Umwelteinflüssen und der Atemwegswand dar, und ist kontinuierlich gegenüber zahlreichen chemischen und physikalischen Noxen (Allergenen wie Milben, Pollen, Pilze, Bakterien, Viren) exponiert. Die zentrale Aufgabe des tracheobronchialen Epithel ist es also, trotz der unterschiedlichen Zusammensetzung der Zellpopulation, im Zusammenwirken sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Zustand, die Funktion des Respirationstrakts zu unterstützen.

Neben der gut bekannten physikochemischen Barrierefunktion spielt das Atemwegsepithel auch bei der Entstehung und Aufrechterhaltung zahlreicher Erkrankungen der Atemwege eine wichtige Rolle. Atemwegsepithelzellen tragen maßgeblich zur mukosalen Immunität bei. Die physiologische, pathogenetische sowie pharmakologische Bedeutung der Epithelzellen der Atemwege ist beim bronchialen Asthma des Menschen bekannt, jedoch deren Rolle im Respirationstrakt des Pferdes sowohl im gesunden als auch im RAO-erkrankten (equine Recurrent Airway Obstruction) Zustand kaum untersucht. Bei allergischem Asthma des Menschen geht die Entzündungsreaktion im Wesentlichen durch Einwanderung der Th<sub>2</sub>-Zellen (CD4-positive T-Lymphozyten) einher, die wiederum proinflammatorische Mediatoren freisetzen und somit die asthmatische Immunreaktion durch Aktivierung und Rekrutierung von Entzündungszellen sowie von Epithelzellen der Atemwege einleiten. Die Epithelzellen tragen zur Morbidität der Erkrankung auch durch Freisetzung von Entzündungsmediatoren sowie durch die Umwandlung dieser Zellen zu schleimbildenden Epithelzellen und anschließende vermehrte Schleimproduktion und Obstruktion der Atemwege bei. Jedoch wurde bisher diese Rolle der Epithelzellen bei RAO nicht untersucht, da Epithelzellen für solche In-vitro-Untersuchungen fehlen. Dabei ist RAO in der Pferdehaltung von großer Bedeutung und führt häufig zu einem erheblichen Schaden und zur Unreitbarkeit des Pferdes.

Als in vitro-Zellmodell wurden primäre Epithelzellen der Atemwege unterschiedlicher Tierarten und des Menschen isoliert und charakterisiert jedoch gibt es bisher keine verlässliche Technik zur Isolation primärer equiner Atemwegsepithelzellen. Zur Untersuchung von zellulären, metabolischen und molekularen Veränderungen dieser Zellen, somit zur Untersuchung ihrer Rolle bei RAO des Pferdes und ihrer pharmakologischen

Beeinflussung, sollte eine effiziente Technik zur Isolation primärer Epithelzellen aus der Pferdtrachea etabliert und optimiert werden. Bei Trypsinverdau des Trachealgewebes sollten homogene Epithelzellen mit hoher Ausbeute und Zellvitalität isoliert werden. Bei Kultivierung auf Kulturschale und -Flaschen und unter Air-Liquid-Interface-Kulturbedingungen sollen die Proliferation, Differenzierung und Polarisation dieser Zellen untersucht werden. Durch immunzytochemische, morphologische und ultrastrukturelle Differenzierung sollte nachgewiesen werden, dass diese isolierten primären Trachealepithelzellen in der Tat epitheliale Eigenschaften besitzen. Darüber hinaus sollte in diesen Zellen die Expression funktionsfähiger  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren untersucht werden. Mit dieser Arbeit soll deshalb ein in vitro-Zellmodell des equinen Atemwegs geschaffen werden, das zur Untersuchung der Pathogenese der RAO des Pferdes sowie deren pharmakologischen Beeinflussung durch Pharmaka dient. Des Weiteren könnten solche Primärepithelzellen des equines des Respirationstrakts als Zellmodell zur Untersuchung des humanen Asthmas bronchiale verwendung finden.

## **2 LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 Das Atemwegsepithel**

#### **2.1.1 Allgemeiner Überblick**

Das Atemwegsepithel stellt die Trennfläche zwischen externen Umwelteinflüssen und der Atemwegswand dar. Die Atemwegsepithelzellen sind somit kontinuierlich gegenüber zahlreichen chemischen, physikalischen Substanzen und infektiösen Erregern exponiert (RADI u. ACKERMANN 2004). Gegenwärtig ist bekannt, dass die Epithelzellen der Atemwege eine wichtige Rolle bei der Pathogenese obstruktiver Erkrankungen der Atemwege spielen können, darunter fallen die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Asthma bronchiale und zystische Fibrose (CRYSTAL et al. 2008). In Anbetracht der Beteiligung des Atemwegsepithels bei entzündlicher Atemwegserkrankung soll der Kenntnisstand über die verschiedenen Funktionen dieser Zellen dargestellt werden.

In den nächsten Kapiteln wird ein kurzer Überblick über die einschlägige Literatur zum Atemwegsepithel gegeben, der die Schwerpunkte Struktur, Ionentransport, sekretorische und metabolische Funktionen sowie die Rolle des Epithels bei der Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen beleuchtet. Es werden in diesem Zusammenhang Methoden zur Isolation, Kultivierung und Charakterisierung primärer Epithelzellen von Atemwegen sowie derzeit vorhandene primäre Zellkulturen und Zelllinien des Respirationstrakts vorgestellt werden. Ferner wird die Bedeutung des Epithels als pharmakologisches Target beschrieben, unter besonderer Berücksichtigung der G-Proteingekoppelten  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren (GPCR) und der Rolle des Epithels in der Atmungsfunktion sowie bei der Pathophysiologie zahlreicher Atemwegserkrankungen.

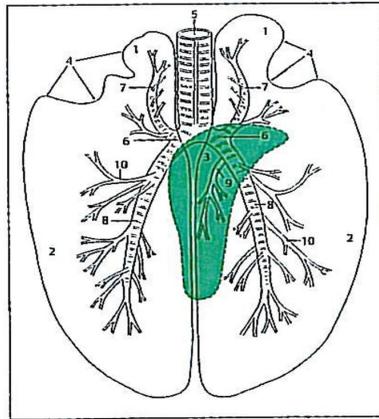
#### **2.1.2 Aufbau und strukturelle Besonderheiten der Atemwege des Pferdes**

Aufgrund bronchialer Verästelungen gliedert sich die Lunge des Pferdes (Abb. 1) in die kranialen, mittleren, kaudalen und akzessorischen Lobi. Sie weisen auf jeder Seite vier Bronchialsysteme auf: dorsal, lateral, ventral und medial (NAKAKUKI 1993). Der Tracheobronchialbaum hat bis zu 24 Verzweigungen, wobei die Anzahl der luftführenden Wege zur Peripherie der Lunge hin dramatisch zunimmt (ROBINSON 1992). Die Trachea ist eine luftleitende Röhre und gehört zum konduktiven Teil des Respirationstrakts. Hierbei erfüllt die Trachea drei Funktionen: Anwärmen, Weiterleiten und Reinigen der Atemluft. Sie ist mit einem elastischen Rohr zu vergleichen. Sie erstreckt sich vom Larynx bis zur Aufteilung an der Bifurkation in die beiden Hauptbronchien mit einer Länge von 75-80

Zentimetern. Das Lumen der Trachea ist mit dem respiratorischen hochprismatischen, mehrreihigen Flimmerepithel ausgekleidet (PIRIE et al. 1990). Die dorsale Trachea ist bis zum Hauptbronchus mit hochprismatischen einschichtigen Flimmerepithelzellen ausgekleidet, die vorwiegend Becherzellen und gelegentlich Zellen mit Mikrovilli enthalten (PIRIE et al. 1990).

Histologisch betrachtet handelt es sich bei dem respiratorischen Epithel um ein mehrreihiges hochprismatisches Epithel bei der alle Zellen auf der Basalmembran verankert sind, jedoch nicht jede Zelle die Oberfläche erreicht. Unter Normalbedingungen lassen sich innerhalb des respiratorischen Flimmerepithels grundsätzlich 3 Zelltypen unterscheiden: Basal-, Becher-, und Zilienzellen, die eine undurchlässige Barriere mit Tight junctions darstellen. Beim Pferd überwiegen die hochprismatischen Flimmerepithelzellen in den größeren Bronchien und der Trachea. Da aber beim Pferd die respiratorischen Bronchiolen fehlen, kann sich dieses Epithel bis zum Ductus alveolaris erstrecken (PIRIE et al. 1990; KAUP et al. 1990), während Becherzellen in größere Anzahl in den Bronchien und Bronchiolen auftreten.

Die kleineren Bronchien weisen vorwiegend Flimmerzellen, zahlreiche zilienlose Becherzellen und die Ausführungsgänge submuköser Drüsen auf. Die größeren Bronchiolen weisen eine abnehmende Anzahl von Flimmerzellen und zahlreiche zilienlose Bronchiolarepithelzellen auf, die in den terminalen Bronchiolen vorherrschend werden. Unter dem kuboiden bronchiolaren Epithelzellen überwiegen zilienlose Zellen (Clara-Zellen), die große Mengen an glattem endoplasmatischem Retikulum enthalten. Die submukösen Drüsen in den Bronchien weisen sowohl Becherzellen als auch seröse Zellen auf (DERKSEN 1991). Das Alveolarepithel der Lunge setzt sich aus den alveolären Plattenepithelzellen vom Typ I (AT I, Pneumozyten-Typ I) und den Surfactant produzierenden Zellen vom Typ II (AT II, Pneumozyten-Typ II) zusammen (FUCHS et al. 2003). Ferner finden sich in der Lunge Alveolarmakrophagen und andere Entzündungszellen, deren Zahl bei einer Entzündung infolge chemotaktischer Reaktionen drastisch ansteigt (DERKSEN 1991).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Pferdelunge mit Tracheobronchialbaum

1 = Lobus cranialis, 2 = Lobus caudalis, 3 = Lobus accessorius (grün markiert), 4 = Incisura cardiaca, 5 = Trachea, 6 = Bronchus principalis, 7 = Bronchus lobaris des Lobus cranialis, 8 = Bronchus lobaris des Lobus caudalis, 9 = Bronchus lobaris des Lobus accessorius, 10 = abzweigende Segmentbronchien (SALOMON 2008).

### 2.1.3 Funktion des Atemwegsepithels

Das Atemwegsepithel bildet die Trennfläche zwischen externen Umwelteinflüssen und dem Organismus bzw. der unter dem Epithel liegenden glatten Muskulatur. Dieses Atemwegsepithel, das aus verschiedenen Zelltypen zusammensetzt, kann unterschiedliche Funktionen ausüben (DANIELIAN et al. 2007). Die zentrale Aufgabe des tracheobronchialen Epithels ist es trotz unterschiedlicher Zusammensetzung der Zellpopulation im physiologischen als auch im pathologischen Zustand, die Funktion des Respirationstrakts zu unterstützen. Neben der gut bekannten physikalischen Barrierefunktion des intakten Epithels der Atemwege gegen verschiedene Noxen und Erreger reguliert es die mukoziliäre Clearance, den Flüssigkeit- und Elektrolythaushalt im Atemtrakt (CRYSTAL et al. 2008). Die Tight junctions und die mukoziliäre Reinigung bilden eine wirksame mechanische Barriere gegen Keime. Zusätzlich ist das Atemwegsepithel in der Lage, antimikrobielle Substanzen und Entzündungsmediatoren zu sezernieren, die eine chemische Barriere bilden und maßgeblich zur mukosalen Immunität, zum Metabolismus und Elimination von Xenobiotika (DAVIDSON et al. 2004) und zur Erkennung von Erregern beitragen. Die Epithelzellen der Atemwege bilden auch protektiven Schleim, der teilweise Elektrolyte, Enzyme, Anti-Enzyme, Oxidantien, Antioxidantien, exogene bakterielle Nebenprodukte und endogene antibakterielle

Substanzen sowie Zell- und Plasma-spezifische Mediatoren und Proteine enthalten kann (ROGERS 2007). Das Epithel ist metabolisch sehr aktiv und hat die Fähigkeit, eine ganze Reihe entzündlicher Prozesse durch Freisetzung entzündungsfördernder Substanzen zu modulieren.

Epithelzellen der Atemwege können die Ansprechbarkeit und Reaktivität der Atemwege durch einen oder mehrere verschiedene Mechanismen regulieren, beispielsweise durch Bildung einer mechanischer Barriere, die aus mukoziliärer Schicht, Adhäsionsmolekülen und Tight junctions gebildet wird, um das darunterliegende Bronchialgewebe vor spasmogenen Einflussfaktoren zu schützen (KNIGHT u. HOLGATE 2003). Das Epithel produziert auch Enzyme, z.B. Endopeptidasen, die bronchospasmogene Mediatoren wie Kinine, Endotheline, vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Angiotensine proteolytisch abbauen können. Enzyme wie die Acetylcholinesterase und Histamin-N-Methyltransferase wurden im menschlichen wie im tierischen Atemwegsepithel nachgewiesen (KOGA et al. 1992; OHRUI et al. 1992). Diese Funktionen der Epithelzellen dienen zum Schutz der Atemwege vor spasmogen wirkenden Substanzen. Somit besitzen Epithelzellen eine indirekte Bedeutung, um die Reaktivität der glatten Muskulatur der Atemwege und somit Bronchospasmen zu begrenzen.

Des Weiteren reguliert das Atemwegsepithel den Tonus der Bronchialmuskulatur unmittelbar, indem es entweder Substanzen wie  $PGE_2$  und Stickstoffmonoxid abgibt, die zur Relaxation der glatten Muskulatur führen (DAVIDSON et al. 2004), oder aber kontraktile Faktoren freisetzen, die zur Kontraktion führen, wie Leukotriene,  $PGF_{2\alpha}$  oder Endothelin-1 (WILKENS et al. 1992; NINOMIYA et al. 1995). Die Schädigung des Atemwegsepithels kann zur gesteigerten Produktion von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden führen, so dass diese im Zusammenspiel mit dem angeborenen Immunsystem bei der Entzündung der Atemwege und bei Wundheilungsprozessen in diesen Geweben regulatorische und modulatorische Funktionen aufweisen können (BALS u. HIEMSTRA 2004).

## **2.2 Pathophysiologische Bedeutung des Atemwegsepithels bei Atemwegserkrankungen**

### **2.2.1 Recurrent Airway Obstruction des Pferdes**

Die equine Recurrent Airway Obstruction (RAO) ist eine häufig auftretende multifaktoriell bedingte Atemwegserkrankung des Pferdes, die dem Asthma bronchiale des Menschen ähnelt (DEATON 2006). Klinisch kann diese Entzündung durch Belastungsintoleranz, Dyspnoe, Husten, übermäßige Schleimakkumulation und Bronchospasmus charakterisiert werden (GERBER et al. 2008). Es werden nach ihrem saisonalen Auftreten zwei unterschiedliche Formen dieser Erkrankung unterschieden: die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), die vorwiegend im Winter bei aufgestallten Pferden auftritt, und die obstruktive Lungenerkrankung, die auftritt, während sich die Pferde auf der Sommerweide befinden (ROBINSON et al. 2003; SEAHORN u. BEADLE 1994).

Die Entzündungsreaktion bei RAO tritt hauptsächlich in den unteren Atemwegen (Bronchien) auf. In der Flüssigkeit der bronchoalveolaren Lavage (BALF) findet man hauptsächlich neutrophile Granulozyten als Entzündungszellen und im Plasma häufig unterschiedliche Entzündungsmediatoren wie Histamin, Bradykinin, Leukotriene, den Thrombozytenaktivierenden Faktor (PAF), Endothelin-1 und 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) (ROBINSON et al. 1996). Eine erhöhte Expression von Interleukin 8 (IL-8) in Bronchialbiopsien RAO-erkrankter Pferde weist darauf hin, dass IL-8 chemoattraktiv auf neutrophile Granulozyten wirkt (AINSWORTH et al. 2003). Des Weiteren konnte bei dieser Erkrankung eine Dysregulation der autonomen Rezeptoren des Respirationstrakts gezeigt werden, zum einen kommt es zu verminderter Anzahl und Funktion des  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsystems (ABRAHAM et al. 2006), und zum anderen zur unveränderten Anzahl jedoch leicht erhöhten Funktion des muskarin-cholinergen Rezeptorsystems (ABRAHAM et al. 2007). Diese Rezeptorsysteme stehen im Normalfall im Gleichgewicht, um die Funktion der Atemwegsmuskulatur hinsichtlich Relaxation und Kontraktion zu regulieren.

### **2.2.2 Das humane Asthma bronchiale und chronisch obstruktive Lungenerkrankung**

Asthma und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) sind komplexe Krankheitsbilder, die nicht genau definiert sind (JEFFERY 1999). Asthma ist eine komplexe, durch unspezifische Stimuli ausgelöste Erkrankung der Atemwege, die durch Obstruktion der Atemwege, Entzündungen und bronchiale Hyperreaktivität gekennzeichnet ist (BJÖRNSDOTTIR u. CYPGAR 1999). Die Entzündungsreaktion beim allergischen Asthma

geht mit einer erhöhten Einwanderung hauptsächlich CD<sub>4</sub>-positiver T-Lymphozyten (Th<sub>2</sub>-Zellen), eosinophiler Granulozyten und in geringem Umfang Mastzellen einher (HOLGATE 2008), die mit einer Zerstörung des Bronchialepithels, einer Verdickung der Basalmembran und einer Muskelhypertrophie bzw.-hyperplasie mit der Folge eines „Airway Remodelling“ assoziiert ist. Beim Asthma resultiert die Atemwegsobstruktion aus übermäßigem Spasmus der Bronchialmuskulatur, Entzündung und Produktion eines viskösen und gallertigen Schleims. Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung des Menschen (COPD) ist gekennzeichnet durch Emphyseme und eingeschränkte Luftzufuhr infolge einer chronischen Entzündung des Lungengewebes (FIRA-MLADINESCU et al. 2007).

Die Atemwegsepithelzellen, u.a. Bronchialepithelzellen, besitzen sonst neben ihrer primären Barrierefunktion eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Asthma und COPD, im Wesentlichen durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (RAEBURN u. WEBBER 1994) wie IL-1, IL-6, TGF- $\beta$  TNF $\alpha$ , Chemokine wie IL-8, Stickoxid, Lipidmediatoren, reaktive Sauerstoffradikale und Adhäsionsmoleküle, die die Infiltration von Entzündungszellen wie neutrophile und eosinophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Mastzellen in das Entzündungsgewebe regulieren können (HSIEH et al. 2005). Darüber hinaus besitzen diese Epithelzellen Rezeptoren, wie den TL-Rezeptoren „(Toll-like receptors)“, die als Erkennungsstellen für Antigene dienen. Diese Zellen haben die Kapazität, Wachstumsfaktoren (wie EGF, IGF, Fibroblastenwachstumsfaktor) zu bilden, die wiederum in der Lage sind, mit Fibroblasten zu interagieren, um Proliferation und Differenzierung von Epithelzellen zu initiieren, so dass sie am Atemwegsremodelling partizipieren können. Die Schädigung der epithelialen Barrierefunktion der Atemwege wurde beim Asthma nachgewiesen (HOLGATE 2008). In vitro konnte gezeigt werden, dass primäre Epithelzellen aus asmathischem Lungengewebe eine fehlende Differenzierung zeigen und gestörte Tight junctions bilden.

Ein wichtiger und konsistenter Befund bei Asthma bronchiale, COPD und RAO ist die übermäßige Produktion von Schleim, der viskös ist und schlecht ausgeworfen werden kann und somit die peripheren Atemwege blockiert - möglicherweise eine wichtige Ursache für die Morbidität solcher Erkrankungen. Dies resultiert in der Regel aus einer Veränderung der Zusammensetzung der Atemwegsepithelzellen. Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die in der Tat zeigen, dass es beim Asthma zur Metaplasie der Becherzellen durch Differenzierung der vorhandenen Zellen sowie durch Proliferation der Epithelzellen der Atemwege kommt

(TESFAIGZI 2008). Diese Zellen sind in der Peripherie der Atemwege zu finden, wo sie normalerweise nicht vorkommen. Im späten Stadium solcher Atemwegserkrankungen kommt es zur Zerstörung des Atemwegsepithels durch oxidativen Stress aufgrund vermehrter Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Ablösung des Bronchialepithels, ein Vorgang, der für die bronchiale Hyperreaktivität und den strukturellen Umbau der Atemwege weitreichende pathophysiologische Bedeutung hat (KIRKHAM u. RAHMAN 2006; RAHMAN 2003; RAHMAN 2005). Die Obstruktion und Hyperreaktivität der Atemwege resultiert nicht nur aus einer Schädigung und Desquamation des Bronchialepithels, sondern auch aus einer Hyperplasie der glatten Muskulatur und Drüsenzellen, Veränderung des submukösen Gefäßbetts, Fibrose der bronchialen Basalmembran mit subepithelialer Kollagenablagerung und Zunahme der Myofibroblasten (SIDDIQUI u. MARTIN 2008; BENTO u. HERSHENSON 1998; MUNAKATA 2006; VOYNOW 2002; PARAMESWARAN et al. 2006; GOSENS et al. 2006).

Das Ungleichgewicht des adrenergen und cholinergen Rezeptorsystems wird auch als Bestandteil der Pathophysiologie dieser Erkrankungen beschrieben. Beeinträchtigte Signaltransduktion der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren (GOLDIE et al. 1986; BAI et al. 1990) und hochregulierte Muskarinrezeptorfunktion, die die  $Ca^{2+}$ -Empfindlichkeit der glatten Atemwegsmuskulatur regulieren, wurden beschrieben (GOSENS et al. 2006).

### **2.2.3 Zystische Fibrose des Menschen**

Im Rahmen chronischer Entzündungsreaktionen wie der zystischen Fibrose können Atemwegsepithelzellen auch eine Rolle bei der Pathogenese spielen. Die Erkrankung ist auf eine Mutation in der „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)“ Gensequenz zurückzuführen, die für einen cAMP-regulierten Chloridkanal kodiert (MARCET u. BOEYNAEMS 2006; KUNZELMANN u. MALL 2003). CFTR wird in vielen Epithelzellen einschließlich der Atemwege exprimiert. Sein Defekt führt zu einer erhöhten Chloridkonzentration in Sekreten, z.B. der Bronchien (SMITH et al. 1994). CFTR funktioniert wie ein regulierter Chloridkanal, der wiederum die Aktivität anderer Chlorid- oder Natriumkanäle an der Zelloberfläche reguliert, mit dem Resultat der Bildung eines viskösen, exokrinen Sekrets (SMITH et al. 1996). Diese veränderte Qualität des Schleims verursacht obstruktive Prozesse auch in anderen Organsystemen. Die Isolierung primärer Epithelzellen der Atemwege ermöglicht die Erforschung der Mutationsvariante des CFTR-Genes.

## **2.3 Zellkulturmodelle des Atemwegsepithels**

### **2.3.1 Primärkulturen**

#### **2.3.1.1 Primäre tracheobronchiale Epithelzellen**

Es wurden Primärkulturen von Epithelzellen aus der Trachea und Bronchien verschiedener Tierspezies etabliert. Bislang konnten Epithelzellen der Atemwege von verschiedenen Spezies kultiviert werden, u.a. aus dem Tracheobronchialbaum des Menschen (GRAY et al. 1996; MARGARIT et al. 2005), Trachealepithelzellen des Kaninchens (MATHIAS et al. 1996), der Ratte (KAARTINEN et al. 1993), der Maus (DAVIDSON et al. 2004), des Hamsters (ROWE et al. 2004), des Schafs (RADI u. ACKERMANN 2004) und des Rindes (SCHUMANN et al. 1988). Bei den isolierten und kultivierten Atemwegsepithelzellen konnte darüber hinaus - unter Verwendung besondere Kulturbedingungen wie Air-Liquid-Interface - die Proliferation und Differenzierung beobachtet werden. Hierbei bilden die Zellen hochprismatische mehrreihige Flimmerzellen, wie unter in vivo-Bedingungen. Elektronenmikroskopische, immunzytochemische, elektrophysiologische und funktionelle Studien an primären Epithelzellen zeigten charakteristische Eigenschaften nativer Atemwegsepithelzellen, einschließlich der Ultrastruktur apikaler Zilien, Mikrovilli, Tight junctions und der Expression verschiedener Rezeptoren.

#### **2.3.1.2 Primäre Alveolarepithelzellen**

Weitere Zellkulturmodelle, die zu pharmakologischen und biotechnologischen Untersuchungen verwendet werden, sind Alveolarepithelzellen. Man unterscheidet Alveolarepithelzellen Typ I und -Typ II, die unterschiedliche zelluläre Eigenschaften besitzen. Bisher wurden diese Zelltypen von unterschiedlichen Spezies einschließlich des Menschen generiert - aus Lungenalveolen der Ratte (CHEN et al. 2004), des Menschen (FUCHS et al. 2003) und des Schweines (STEIMER et al. 2006). Beide Zelltypen unterscheiden sich in ihren morphologischen, biochemischen und metabolischen Eigenschaften. TypII Alveolarepithelzellen sind nach Schädigung zur Regeneration und Erneuerung in der Lage. In diesem Zusammenhang kommt es zur Entdifferenzierung der TypII-Zellen zu Typ I-Zellen, da die Typ II-Zelle selbst nicht in der Lage zur Zellteilung ist.

## **2.3.2 Permanente Zelllinien**

### **2.3.2.1 Tracheobronchiale Epithelzelllinien**

Da die zuvor beschriebenen primären Epithelzellen der Atemwege unterschiedlicher Säuger im Regelfall nur sehr begrenzt weitergezüchtet werden können, d.h. nach wenigen Passagen altern und absterben, hat man Zelllinien aus tumorösen Geweben, die durch Spontanmutationen oder Virusinfektionen so transformiert werden, entwickelt, dass sie sich fast unbegrenzt weiterzüchten lassen. Bisher gibt es solche permanenten Zelllinien, die als *in vitro* Zellmodelle zur Untersuchung der Atemwegserkrankungen dienen können, nur für Mensch und Maus, während für andere Spezies einschließlich für das Pferd keine Zelllinien zur Verfügung stehen. Derzeit sind drei humane Zelllinien des Atemwegstrakts für Forschungszwecke anwendbar: 16HBE14o- (COZENS et al. 1992), BEAS-2B (REDDEL et al. 1988) und A549-Zellen (GIARD et al. 1973), die in der Kultur über mehrere Passagen bei Erhalt der epithelialen Eigenschaften gehalten werden können. Unter diesen Zellen kann man im Wesentlichen eine Unterscheidung zwischen weniger definierten Tumorzelllinien (A549) und immortalisierten Zelllinien (16HBE14o- und BEAS-2B) treffen. Immortalisierte Zelllinien werden durch Transfektion etablierter primärer Zellen mit bekannten Onkogenen gefolgt von der Selektion der Klone mit den gewünschten epithelialen Eigenschaften generiert. Folgende Onkogene (Genkonstrukte) werden häufig verwendet: das Simian Virus 40-T-Antigen (SV40 TAg), das Adenovirus E1A/E1B und das Papillomavirus E6/E7, welche alle eine entsprechende DNA-Synthese induzieren.

### **2.3.2.2 Alveolarepithel-Zelllinien**

Gegenwärtig steht außer der humanen Lungenzelllinie A549 (GIARD et al. 1973) keine weitere Zelllinie des Alveolarepithels zur Verfügung. A549 Zellen wurden aus tumorösem Lungengewebe isoliert und kultiviert. Diese Zellen zeigen hauptsächlich Eigenschaften von Typ II-Pneumozyten. Erst kürzlich wurde eine Zelllinie von Typ I-Pneumozyten (AT-I) beschrieben, die aus primären, humanen Typ II-Pneumozyten (AT-II) nach Transfektion mit der katalytischen Untereinheit der Telomerase und des Polyoma-SV-40-T-Antigens (SV40TAg) gewonnen wurde (KEMP et al. 2008). Diese Technik der Zelltransformation und Immortalisierung fördert die Zellteilung bei Erhalt der Stoffwechselaktivität und der Epithelzeleigenschaften.

### 2.3.3 Verwendung und Grenzen zell-basierter Systeme

In vitro-Zellsysteme können zur Untersuchung der physiologischen Funktionen des Epithels (HALLDORSSON et al. 2007), der Pathomechanismen von Lungenerkrankungen, (GRUENERT et al. 1988) sowie zu pharmakologischen und toxikologischen Untersuchungen (GAO et al. 2007; SUN et al. 1995) verwendet werden. Die Verwendung primärer Epithelzellen der Atemwege kann somit wertvolle Daten zur in vivo-Situation der Atemwege liefern, da diese Zellen unter ihren Kulturbedingungen beispielweise unter gleichzeitiger Anwesenheit und Stimulation von Substanzen bzw. Pharmaka oder Mediatoren gehalten werden können (ROWE et al. 2004), wobei aber die Interaktion mit benachbarten mesenchymalzellen und Immunzellen fehlen (DIMOVA et al. 2005). Darüber hinaus sind primäre Epithelzellen der Atemwege für in vitro-Untersuchungen im Vergleich zu permanenten Zelllinien von Vorteil, da sie aus verschiedenen Zelltypen des respiratorischen Epithels bestehen, und somit nahezu die in vivo-Zellpopulation repräsentieren können (LIN, H et al. 2007).

Ein kritischer Punkt ist hier jedoch insbesondere die Überlebenszeit der Zellen, die limitiert ist, da nach anfänglicher Proliferation dieser Zellen bald eine Differenzierung mit einhergehendem Sistieren des Wachstums stattfindet, d.h. es kommt mit zunehmender Ausreifung der Zellen zum Proliferationsstop (JETTEN et al. 1989). In der Regel ist der Differenzierung-induzierte Verlust der proliferativen Aktivität solcher Zellen irreversibel. Häufig zeigen Epithelzellen gleichzeitig die Tendenz, sich von ihrer Unterlage zu lösen, was dem Verhalten der Zellen in vivo, sich nach der terminalen Differenzierung abzulösen und schließlich aus den Atemwegen abgestoßen zu werden, entsprechen würde (HECKMAN et al. 1987; CHEVILLARD et al. 1991). Die Variabilität der Zellisolate aus unterschiedlichen Tieren kann auch bei der Kultivierung und Verwendung primärer Epithelzellen der Atemwege Probleme bereiten. Ein wichtiger Schritt in diesen Zusammenhang wäre letztendlich, solche primäre Zellen zu transformieren und permanente Zelllinien zu generieren, die über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten werden können (GRUENERT et al. 1995). Jedoch können auch solche Zelllinien ihre epithelialen Eigenschaften wie Schleimproduktion und Zilienbewegung verlieren. Im Idealfall sollte ein solches Zellmodell mit wenig phänotypischen und morphologischen Veränderungen behaftet sein.

## **2.4 Isolierung und Charakterisierung primärer Epithelzellen der Atemwege**

### **2.4.1 Methoden der Zellisolation und Kultivierung**

Bei der Kultivierung von normalen, nicht-neoplastischen Zellen des Respirationstrakts unterscheidet man zwei Primärkultursysteme: die Monolayerkultur, bei der die Zellen zunächst durch diverse Isolationstechniken vom Ursprungsorgan getrennt werden, und die Organkultur (Gewebeexplante), bei der kleine Stücke intakter Mukosa direkt in Kultur gebracht werden und aus denen die Zellen auswachsen (CHEVILLARD et al. 1991; GRUENERT et al. 1995).

Zur Isolation der Epithelzellen aus Trachea und Bronchien werden verschiedene Methoden mit unterschiedlichem Erfolg angewendet. Prinzipiell kann man zwischen der mechanischen Isolierung, Chelation und dem enzymatischen Gewebeverdau unterscheiden (WU et al. 1985, FRESHNEY 1994; HACKETT u. KNIGHT 2007; DOHERTY et al. 2003). Das Auswachsen der Zellen aus den Gewebestücken in Kulturmedien mit Verdauungsenzymen führt jedoch nicht unbedingt zu hoher Zellausbeute mit einer homogenen Zellpopulation. Häufige erschweren Kontaminationen mit Mikroorganismen sowie unerwünschte Kokultivierung anderer Zellen (z.B. Fibroblasten) optimale Kulturbedingungen für Epithelzellen der Atemwege zu finden (WU et al. 1985; DAVIDSON et al. 2004). Beim enzymatischen Gewebeverdau werden durch die Behandlung mit Enzymlösungen Proteinkomponenten und Oberflächenrezeptoren der Atemwege hydrolysiert und die Epithelschicht dadurch abgelöst. Die Kultivierbarkeit von Epithelzellen war bei verschiedenen Spezies in unterschiedlichem Ausmaß vom Enzymtyp und der Technik der Isolierung abhängig. Langlebige Primärkulturen differenzierter Epithelzellen konnten durch Verwendung unterschiedlicher Enzyme wie Pronase-DNase (DAVIDSON et al. 2000; DAVIDSON et al. 2004), Elastase (HICKS et al. 1997), Trypsin (GOLDMAN u. BASEMAN 1980; MARTIN et al. 1991), Trypsin-Elastase (STEIMER et al. 2006), Protease (WYATT et al. 1998), Kollagenase-Dispase (SHANNON et al. 1999) und Dispase (SCHUMANN et al. 1988; DEBUYSSCHER et al. 1984), teilweise in Kombination, etabliert werden.

Enzymatische Vereinzelung epithelialer Zellen ist die gängigste Methode bei der Zellisolation. Hierfür müssen die Gewebestückchen zunächst manuell oder mit speziellem Gewebezerhackern zerkleinert werden, um den enzymatischen Verdau zu begünstigen. Die gewonnenen Zellen können von anderen, nicht erwünschten Kontaminanten, wie Fibroblasten, aber auch Endothelzellen, Erythrozyten sowie Entzündungszellen und anderen

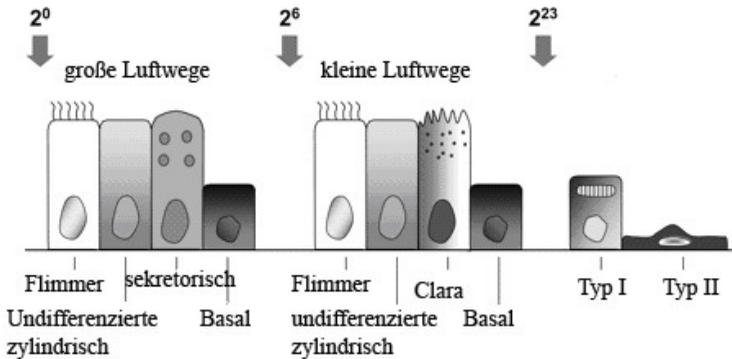
Zelltypen unter Zuhilfenahme folgender Methoden separiert werden: durch Trituration und Filtration der Zellsuspension sowie Zentrifugation (STEIMER et al. 2006), Adhäsionsmethoden (MILLION et al. 1999; RHEE et al. 2001), magnetische Zellseparation (FUCHS et al. 2003), selektive Trypsinisierung (LIN et al. 2001) und durch die Verwendung von supplementierten, serumfreien Medien (LECHNER et al. 1982; WU et al. 1997).

Ein primäres Ziel der Etablierung von Zellkultursystemen ist es, unter in vitro-Bedingungen eine optimale und effiziente Anzuchtung von Epithelzellen mit typischer Morphologie und biochemischen Eigenschaften zu erhalten, die dem in vivo-Zellsystem weitgehend gleicht (GRUENERT et al. 1995). Die isolierten Primärzellen können unter variablen Bedingungen kultiviert werden, die die Zellproliferation und -differenzierung beeinflussen, z.B. durch die Zusammensetzung des Mediums, Kulturmaterialien, Zelldichte und -zusammensetzung und Einbringungsdichte (GRUENERT et al. 1995), die Kultivierung von Epithelzellen der Atemwege unter Air-Liquid-Interface (BALS et al. 2004; DAVIDSON et al. 2000; DAVIDSON et al. 2004) sowie dreidimensionale Kulturbedingungen, die die Zelldifferenzierung und Polarisation fördern (ULRICH u. DÖRING 2004).

## **2.4.2 Charakterisierung epithelialer Zelleigenschaften**

### **2.4.2.1 Zelluläre Zusammensetzung des Atemwegsepithels**

Über 40 verschiedene Zellarten wurden in der Lunge von Säugetieren identifiziert (NIJKAMP 1993). Charakteristisch für die epitheliale Auskleidung der luftleitenden Atemwege ist ein mehrreihiges, hochprismatisches Epithel, welches ultrastrukturell, funktionell und biochemisch hauptsächlich in 4 Zelltypen (Abb. 2) eingeteilt werden kann: Zilienzellen (Flimmerzellen), sekretorische Zellen (muköse, seröse, Becherzellen oder Clara-Zellen), undifferenzierte zylindrische Zellen und Basalzellen (CRYSTAL et al. 2008).



**Abb. 2:** Zelltypen des Atemwegepithels

In den großen Atemwegen ( $2^0$  bis  $2^5$  Verzweigungen) macht der Großteil der Zellen Zilienzellen, undifferenzierte, sekretorische Zellen oder Basalzellen aus. In den kleineren Luftwegen ( $2^6$  bis  $2^{23}$  Verzweigungen) sind zwar auch die Hauptzelltypen ähnlich, jedoch mit einer steigenden Zahl von Zilienzellen und einer verringerten Anzahl von Becherzellen zugunsten von Clara-Zellen. Nach  $2^{23}$  Verzweigungen vereint sich das Epithel der luftleitenden Atemwege mit dem Alveolarepithel und den dort vorkommenden Typ I- und Typ II-Pneumozyten (CRYSTAL et al. 2008).

Zilienzellen sind etwa 20-60  $\mu\text{m}$  groß, tragen je etwa 300 Zilien und besitzen zahlreiche Mitochondrien (PATTON u. PLATZ 1993). Becherzellen sind wegen ihrer zahlreichen sekretorischen Granula reich an elektronendichten, zytoplasmatischen Einschlüssen. Ihre Funktion ist die Bildung und Aufrechterhaltung der Schleimschicht auf der luminalen Seite des Epithels. Becherzellen haben eine Schutzfunktion und sind etwa 5-10  $\mu\text{m}$  dick (PLOPPER et al. 1983; BREEZE u. WHEELDON 1977). Basalzellen sind in den luftleitenden Atemwegen ubiquitär vorhanden und sind an der Basalmembran verankert (KNIGHT u. HOLGATE 2003). Sie sind eher flach oder spindelförmig und zeigen wenig zytoplasmatische Einschlüsse (FORBES 2000).

## **2.4.2.2 Biochemische Marker zur Differenzierung von Epithelzellen**

### **2.4.2.2.1 Zytokeratine**

Keratine sind eine komplexe Gruppe filamentöser Proteine des Zytoskeletts und gehören zu den Hauptmarkern der Differenzierung epithelialer Zellen (FUCHS 1988). Es wurde vermutet, dass Zytokeratine ausschließlich intrazellulär vorkommen und dort ein komplexes Gerüst aus Intermediärfilamenten bilden, die die Zellorganellen mit dem Zellkern und der Plasmamembran verbinden (SAJJAN et al. 2000). Da die Expression von Zytokeratinen mit bestimmten Zelltypen und deren Differenzierungsgrad assoziiert werden kann, wurde das Expressionsmuster genutzt, um die molekularen Mechanismen zu erforschen, die der Zelldifferenzierung und Entwicklung zugrunde liegen (FUCHS 1988).

Die genotypische Familie der Zytokeratine (CK) beinhaltet 20 verwandte Polypeptide, welche in Vertebraten hoch konserviert sind. Diese verschiedene Typen der Zytokeratine können aufgrund von Sequenzhomologien in zwei verschiedene Untergruppen eingeteilt werden: Typ I-Keratine haben ein geringes Molekulargewicht (40-56 kDa) (CK9-CK20) und sind relativ sauer, Typ II-Keratine besitzen ein höheres Molekulargewicht (53-68 kDa) (CK1-CK8) und sind basisch (ENDRES et al. 2005). Jeder Epithelzelltyp weist eine charakteristische, differenzierungsabhängige Kombination von zwei oder mehreren Zytokeratin-Polypeptiden auf, wobei Typ I- und Typ II-Polypeptide immer in einem stöchiometrischen Verhältnis vorkommen, das ihre Spezialisierung oder pathologische Veränderung reflektiert (STOSIEK et al. 1992). Zytokeratine werden häufig benutzt, um bestimmte Zelltypen in einem spezifischen Epithel zu charakterisieren. Zytokeratine mit niedrigem Molekulargewicht wie CK-5, CK-14 und CK-17 werden von Basalzellen exprimiert (DANIELY et al. 2004), während CK-18 in Zilienzellen und Becherzellen zu finden sind. CK-13 ist ein Marker für Metaplasien von Plattenepithelzellen (JETTEN et al. 1989).

### **2.4.2.2.2 Muzin-Antigene**

Muzine sind glykosilierte Glykoproteine mit hohem Molekulargewicht, die den Hauptbestandteil des Schleims ausmachen (KESIMER et al. 2009). Die Becherzellen und submukösen Drüsenzellen bilden den zellulären Muzinspeicher (WICKSTROM 1998). In den Lungen gesunder Menschen und der meisten größeren Säugetiere stellen die Becherzellen ca. 5 bis 25% der hochprismatischen Epithelzellen im den Atemwegen (DAVIS u. ABDULLAH 1997).

Muzine sind verantwortlich für die viskoelastischen und hydrophilen Eigenschaften der komplexen Schleimschicht, die dem Atemwegsepithel Feuchtigkeit und Schutz bietet (ROSE et al. 1979). Bis heute wurden neun Muzin-Gene ermittelt und acht mRNA-Arten (MUC1, -2, -3, -4, -5AC, -5B, -7 und -8) werden in den menschlichen Atemwegen exprimiert (ROSE u. GENDLER 1997). MUC2, MUC5AC und MUC5B werden weit verbreitet in den Atemwegen exprimiert und für das Atemwegsepithel als Differenzierungsmarker genutzt (GRAY et al. 2004). Die Induktion der Expression von Muzin-Genen und die Differenzierung normaler Becherzellen wird z.B. durch Retinolsäure (KIM et al. 2007) und dem epidermalen Wachstumsfaktor reguliert (TAKEYAMA et al. 1999). Eine Überproduktion des Schleims resultiert aus pathologischen Veränderungen der Zellen z.B. durch umweltbedingte und infektiöse Einflüsse oder Entzündungsmediatoren (ROSE et al. 2000).

#### **2.4.2.2.3 Lektin-Bindungsstellen**

Lektine sind glykokonjugierte Bindungsmoleküle, die im Gewebe zahlreicher Pflanzen und Tiere vorkommen (ADAM et al. 2003). Die spezifischen Lektin-Bindungen an hochprismatischen Epithelzellen der Atemwege und an den Basalzellen unterscheiden sich. Galactose-spezifische Lektine binden an Basalzellen, aber nicht an Flimmerepithel- oder Becherzellen. Während die Bindung durch bestimmte Fruktose-spezifische Lektine charakteristisch für die hochprismatischen Epithelzellen ist, binden manche Lektine sowohl an hochprismatische Epithelzellen als auch an Basalzellen (DORSCHIED et al. 1999).

#### **2.4.2.3 Differenzierungsverhalten**

Während der embryonalen Entwicklung proliferieren und differenzieren sich die Epithelzellen zu unterschiedlichen Zelltypen (PARK et al. 2006). Wird die tracheobronchiale Schleimhaut verschiedenen aerogenen toxischen Substanzen ausgesetzt, kommt es zu einem Anstieg der Zellproliferation und zu vorübergehenden oder lang andauernden Veränderungen der Zelldifferenzierung, die mit Metaplasie einhergehen können (NETTESHEIM et al. 1990). Es ist bekannt, dass sich Basal- und Becherzellen teilen, wobei eine Teilung der Flimmerepithelzellen selten beobachtet wurde und diese gewöhnlich als enddifferenziert gelten. Verschiedene Untersuchungen belegen die Rolle der Basalzellen als Vorläuferzelltyp (NETTESHEIM et al. 1990; ENDRES et al. 2005), andererseits wird vermutet, dass auch Becherzellen zur Regeneration des mukoziliären Epithels dienen können (McDOWELL et al. 1984).

Der Differenzierungsverlauf der verschiedenen Epithelzellen der Atemwege ist unterschiedlich, zuerst differenzieren sich Flimmerepithelzellen gefolgt von Zellen ohne sekretorische Granula und danach Basalzellen sowie kleine schleimbildende Zellen (PLOPPER et al. 1992). In vitro konnte gezeigt werden, dass die mukoziliare Differenzierung der Atemwegsepithelzellen von verschiedenen Faktoren abhängt: von der Kultivierung der Epithelzellen unter Air-Liquid-Interface-Bedingungen, von der Anwendung einiger Wachstumssubstrate wie Kollagen, Wachstumsfaktoren, Kalzium, Retinole, Insulin und Steroidhormonen (WU et al. 1997). Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist wichtig für die Migration, Proliferation und Differenzierung, sowie zur Verstärkung epithelialer Reparationsphasen nach Epithelschädigung (TAKEYAMA et al. 1999; SWEENEY et al. 2001). Der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ist notwendig für die epitheliale Homöostase aufgrund seiner antiproliferativen und proapoptischen Aktivität und durch seine Fähigkeit, die Wirkung des epidermalen Wachstumsfaktors negativ zu beeinflussen (BOLAND et al. 1996).

#### **2.4.2.4 Bioelektrische Eigenschaften**

Die Barrierefunktion des Atemwegsepithels wird durch einen apikalen Verbindungskomplex reguliert, der aus Tight junctions und Desmosomen besteht (POHL et al. 2009). Tight junctions bestehen aus den Proteinen ZO 1-3, Occludin, Claudin 1-5, Adhäsionsproteinen (beta-Catenin, E-Cadherin) (HOLGATE 2008), welche eine regulierbare Barriere zwischen den Epithelzellen der Atemwege und den Alveolen für den transzellulären Transport von Wasser, Ionen und gelösten Stoffen darstellen (VAN ITALLIE u. ANDERSON 2004). Die Bildung von funktionellen Tight junctions konnte in vitro in einschichtig kultivierten Atemwegsepithelzellen unter Air-Liquid-Interface-Bedingungen elektronenmikroskopisch, immunzytochemisch sowie durch Messung des transepithelialen Widerstands dargestellt werden (DAVIDSON et al. 2000; ROWE et al. 2004). Die Funktion der Ionenkanäle und Auswirkungen chemischer und entzündlicher Mediatoren auf elektrische Eigenschaften des Atemwegsepithels können durch die Aufzeichnung von Kurzschlussströmen ( $I_{SC}$ ), Potentialdifferenzen und transepithelialen elektrischen Widerständen untersucht werden (DAVIDSON et al. 2000; CLARKE et al. 1992; TAKIZAWA 1990; STEIMER et al. 2006).

## **2.5 Pharmakologische Bedeutung des Atemwegsepithels**

### **2.5.1 Atemwegsepithelzellen als pharmakologisches Target**

Atemwegsepithelzellen werden als viel versprechende pharmakologische Targets angesehen, da viele Befunde dafür sprechen, dass die Epithelzellen in der Pathophysiologie einer Vielzahl von nicht-infektiösen und infektiösen Atemwegserkrankungen beteiligt sind (FORREST et al. 2005). Unter normalen und pathologischen Bedingungen sind viele epitheliale Reaktionen rezeptorvermittelt. Die Expression und Funktion von Rezeptoren in Atemwegsepithelzellen und ihren Zelllinien verschiedener Säugetierarten werden beschrieben, einschließlich Toll-like-Rezeptoren (HERTZ et al. 2003; LIN, FC et al. 2007; GREENE u. McELVANEY 2005), Zytokin- und Chemokin-Rezeptoren (BECK et al. 2006; JOSHI et al. 2006; CHUNG 2006; SUZUKI et al. 2008), Prostaglandin-Rezeptoren (HATTORI et al. 2008), Lipoxin-Rezeptoren (BONNANS et al. 2007),  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren (DAVIS et al. 1990; KELSEN et al. 1995; KELSEN et al. 2000; KERCSMAR et al. 1991; KELSEN et al. 1994; MARDINI et al. 1994; MICHAEL 1986; LAZARUS et al. 1984), muskarin-cholinerge Rezeptoren (GOSENS et al. 2006), Purin-Rezeptoren (WONG et al. 2009), Adenosin-Rezeptoren (BROWN et al. 2008), interzelluläre Adhäsionsmoleküle (TOSI et al. 1992) und Ionenkanal-Rezeptoren (MATTHAY u. ROBRIQUET 2005; MA et al. 2006).

Die Expression verschiedener Rezeptoren weist auf an die diversen Funktionen des Atemwegsepithels bei der Regulation der Homöostase und auf ihre mögliche Beteiligung an verschiedenen Funktionsstörungen dieser Zellen hin und zeigt, dass Epithelzellen aus dem Respirationstrakt in der Grundlagenforschung notwendig sind, um Pathomechanismen der Atemwegserkrankungen zu erkennen und Faktoren-spezifische Pharmaka (Agonisten und Antagonisten) für Mensch und Tier zu entwickeln.

### **2.5.2 Pharmakologische Beeinflussung der Funktionen der Atemwegsepithelzellen**

#### **2.5.2.1 Schleimbildung**

Die Schleimbildung scheint ein grundlegender homöostatischer Prozess der Atemwege zu sein, da nahezu alle Entzündungsmediatoren, die bislang erforscht wurden, die Schleimsekretion deutlich erhöhen (ROGERS 2007), was einen erwünschten Schutzmechanismus des Atemwegstrakts darstellt. Der Flüssigkeitsfilm der Atemwegsoberflächen besteht aus Muzin und Wasser, das von Becherzellen und submukösen Drüsenzellen sezerniert wird. Die Schleimbildung ist ein Vorgang, der durch das autonome

Nervensystem und eine Vielzahl chemischer Mediatoren und Zytokine gesteuert wird (TAMAOKI 1999), u.a. durch Purin-Nukleotide (EVANS et al. 2009),  $\beta$ -adrenerge Rezeptoragonisten (SALATHE 2002) und Interleukine (KASAIAN u. MILLER 2008). Eine Überproduktion von Schleim ist für entzündliche und allergische Lungenerkrankungen charakteristisch, führt zur Atemwegsobstruktion und begünstigt eine bakterielle Besiedelung der Atemwege (HAUBER u. ZABEL 2008).

Eine chronische Überproduktion von Schleim trägt zur Pathophysiologie und Morbidität von Atemwegserkrankungen bei, so bei Asthma bronchiale, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) und zystischer Fibrose. Neue Erkenntnisse (RYHNER et al. 2008) deuten darauf hin, dass die Überproduktion von Schleim bei Pferden mit wiederkehrender Atemwegsobstruktion (RAO) durch Vorgänge induziert wird, die unabhängig von der Expression des Calcium-aktivierten Chlorid-Kanals 1, des Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors, von Muzin 5AC, B-Zell-Lymphom-2 (Bcl-2), Interleukin-13 und Interferon-gamma ( $INF\gamma$ ) sind. Diese Ergebnisse stehen in Gegensatz zu Befunden bei Asthmatikern und COPD-Patienten (HOSHINO et al. 2002; TOHDA et al. 2002; TESFAIGZI 2008). Dies zeigt die Notwendigkeit, spezifische Pharmaka zur Beeinflussung insbesondere Hemmung der Schleimsekretion zu entwickeln.

### **2.5.2.2 Ionen- und Flüssigkeitstransport**

Die Homöostase des Flüssigkeitsfilms auf den Atemwegen hängt vom transepithelialen Ionen- und Flüssigkeitstransport ab und spielt eine entscheidende Rolle für die Abwehrmechanismen in der Lunge und bei der mukoziliären Clearance (BLOUQUIT-LAYE u. CHINET 2007). Der transepitheliale Ionen- und Flüssigkeitstransport wird durch verschiedene Mechanismen kontrolliert, einschließlich der Aktivierung des epithelialen Natriumkanals (ENaC) und des „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulators“ (MATTHAY et a. 2005). Die Resorption überschüssiger Flüssigkeit aus den distalen Atemwegen und den Alveolen erfordert den transepithelialen Transport von  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -Ionen durch die alveolaren Typ II- und eventuell auch Typ I-Pneumozyten (DAVIS u. MATALON 2007), welcher von grundlegender Bedeutung für die alveoläre Flüssigkeitsclearance ist (BERTHIAUME u. MATTHAY 2007). Transepitheliale Ionen- und Flüssigkeitstransporte sind cAMP-abhängige Prozesse, die durch  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren und purinerge Agonisten aktiviert werden können. Die Behandlung von Epithelzellen mit  $\beta$ -adrenergen Rezeptoragonisten kann Defekte der ENaC-Funktion aufheben, in dem sie z.B.

alveoläre Flüssigkeitsresorption induzieren und somit Schutz vor experimentell induzierten Lungenödemen bieten (SATORI et al. 2001). Eine Studie von LIEBLER et al. (2004) beschreibt, dass sowohl AT I- wie auch AT II-Zellen funktionelle  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren exprimieren, was dazu beitragen könnte, dass die Menge an  $\text{Na}^+$  in den Alveolen und die Wasser-Clearance ansteigt.

### **2.5.2.3 Modulation der Funktion der glatten Muskulatur der Atemwege**

Die Atemwegsepithelzellen der Säuger spielen eine wichtige Rolle bei der physiologischen und pharmakologischen Regulation des Tonus der glatten Muskulatur der Atemwege durch die Freisetzung von Kontraktions- und Relaxationsfaktoren und beeinflussen so die Reaktion der Atemwege (BERTRAND u. TSCHIRHART 1993; ITO u. TASHIRO 1994). Die Entfernung des Epithels *in vitro* erhöht die Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege durch verschiedene bronchoaktive Substanzen. Dies zeigt, dass Epithelzellen die darunter liegende Muskulatur beeinflussen können (RAEBURN 1990; AIZAWA et al. 1991). Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) und Stickoxide (NO) gehören zu den Substanzen, die die Relaxation der glatten Atemwegsmuskulatur beeinflussen (FOLKERTS u. NIJKAMP 1998; FISCHER et al. 2002).

Es ist bekannt, dass  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren über den cAMP-Signalweg zur Relaxation der glatten Muskulatur der Atemwege führen. Allerdings ist schwierig zu unterscheiden, ob der über  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren vermittelte Effekt von den Zellen der glatten Muskulatur oder von den Epithelzellen ausgeht. Tatsächlich konnte man feststellen, dass die Entfernung des Epithels von der glatten Muskulatur *in vitro* die Isoprenalin-induzierte Relaxation der glatten Muskulatur senkt, was auf die Bedeutung der Epithelzellen hinweist (STUART-SMITH 1988). Überexpression  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren in den Atemwegsepithelzellen von Mäusen reduziert die Bronchokonstriktion (McGRAW et al. 2000), was bedeutet, dass epitheliale  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren die Atemwegsempfindlichkeit gegen Spasmogene *in vivo* regulieren. Der bronchodilatatorische Effekt von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoragonisten resultiert somit aus der Aktivierung der Rezeptoren sowohl von Epithelzellen als auch von glatten Muskelzellen.

## 2.5.3 Expression und Funktion $\beta$ -adrenerger Rezeptoren in den Atemwegen

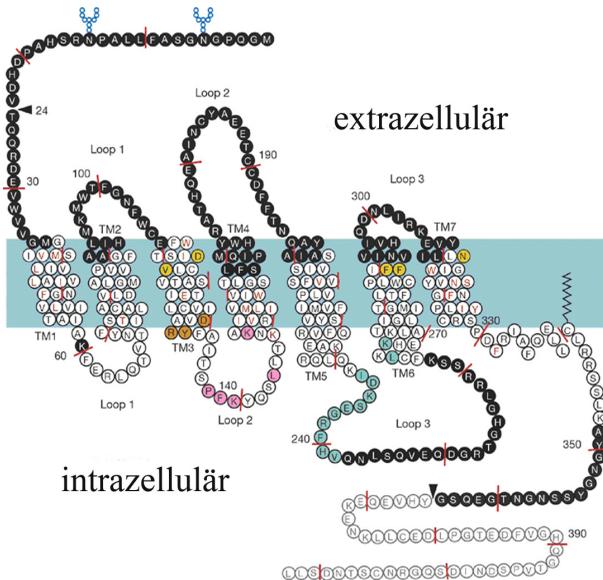
### 2.5.3.1 Struktur, Lokalisation und Regulation

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) umfassen eine Vielzahl von Klassen von Rezeptoren, die durch ein weitgefächertes Spektrum von extrazellulären, chemischen und biologischen Signalen aktiviert werden (SUN et al. 2007; DAVIES et al. 2007). Als Prototyp gelten die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ( $\beta$ -AR), die aus pharmakologischer und genetischer Sicht verschiedene Subtypen umfassen,  $\beta_1$ -AR,  $\beta_2$ -AR und  $\beta_3$ -AR, die in vielen Zell- und Gewebetypen koexprimiert werden (ZHU et al. 2005).

Die drei  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsubtypen sind in verschiedenen Geweben unterschiedlich verteilt. Der  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor wird größtenteils im Herzen exprimiert, der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor in der Gebärmutter, Skelettmuskulatur und Lunge (STROSBERG u. PIETRI-ROUXEL 1996), während der  $\beta_3$ -adrenerge Rezeptor hauptsächlich im Fettgewebe exprimiert wird (STROSBERG 1997). Sowohl der  $\beta_1$ - als auch der  $\beta_2$ -Subtyp wurden in den Atemwegen verschiedener Säugetiere gefunden (JANSSEN u. DANIEL 1991), wobei der  $\beta_2$ -Subtyp dominiert (BARNES et al. 1983; ABRAHAM et al. 2003; CARSWELL 1983; CARSTAIRS 1985). Das Vorkommen der atypischen  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ( $\beta_3$ -AR) in den Bronchien von Hunden (TAMAOKI et al. 1993) und im Trachealepithel des Kaninchens (TAKEYAMA et al. 1993) wurde beschrieben. Die pulmonalen  $\beta_2$ -AR von Säugetieren werden nicht nur auf der glatten Muskulatur der Atemwege, sondern auch auf proinflammatorischen Immunzellen exprimiert. Dazu gehören Mastzellen, Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten, Lymphozyten, epitheliale und endotheliale Zellen und sowohl Typ I- als auch Typ II-Alveolarzellen (GIEMBYCZ u. NEWTON 2006; MCGRAW u. LIGGETT 2005).

Die humanen  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR zeigen eine 54%ige Homologie der Aminosäuresequenz.  $\beta_3$ -AR zeigen eine 50%ige Homologie der Aminosäuresequenz gegenüber  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR (CHEN et al. 1994). Der  $\beta_2$ -AR wurde in Geweben verschiedener Säugetiere kloniert, darunter Mensch, Maus, Rhesusaffe und Rind (AMEND u. GUAN 1995; OOSTENDORP et al. 2002). Das menschliche  $\beta_2$ -AR-Gen, bestehend aus 1200 Basenpaaren, translatiert in ein 413-Aminosäuren-Protein mit einer Molekularmasse von 46,5 kDa. Wie andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren hat der  $\beta_2$ -AR (Abb. 3) sieben Transmembrandomänen, einen extrazellulären Amino-Terminus, einen intrazellulären Carboxyl-Terminus, drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen (DZIMIRI 1999). Die extrazellulären Regionen sind beteiligt

an der Ligandenbindung, während die intrazellulären Regionen hauptsächlich an der Signaltransduktion beteiligt sind (RIOS et al. 2001).

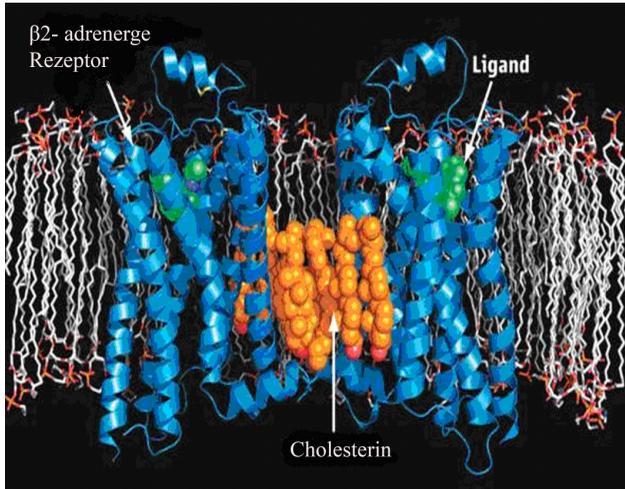


**Abb. 3:** Struktur des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors

Schwarze Kreise mit weißen Buchstaben bezeichnen Aminosäuren, die das Modell nicht beinhaltet. Graue Buchstaben und Kreise bezeichnen Aminosäuren, die nicht im B2AR365 Konstrukt, welches für die Kristallographie verwendet wurde, enthalten sind. Rot beschriftet sind Aminosäuren, für die die Elektronendichte der Seitenkette nicht modelliert wurde. Gelbe Residuen kennzeichnen Aminosäuren, die an der Ligandenbindung beteiligt sind, wie Mutagenesestudien zeigen. Orangefarbige Aminosäuren bezeichnen die konservierte DRY Sequenz. Grüne Aminosäuren bilden das Fab5-Epitop und rosafarbene Aminosäuren sind gegen den Fab-konstanten Bereich im Verband abgegrenzt. Kleine blaue Kreise deuten auf Glykolisierungsorte hin. Rote Linien verdeutlichen den Abstand von zehn Aminosäuren (RASMUSSEN et al. 2007).

Die dreidimensionale kristallographische Struktur (Abb. 3 und 4) der menschlichen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren wurde erst kürzlich bestimmt (RASMUSSEN et al. 2007; CHEREZOV et al. 2007), was einen wesentlichen Fortschritt auf dem Gebiet der GPCR-Biologie bedeutet. Radioligandenbindungsstudien (SPINA et al. 1989; ABRAHAM et al.

2003) und die computertomographische Untersuchung (HOFFMAN 1997) haben gezeigt, dass die  $\beta_2$ -AR Dichte mit steigender Verzweigung der Bronchien zunimmt und ihre maximale Anzahl in der alveolaren Region hat.



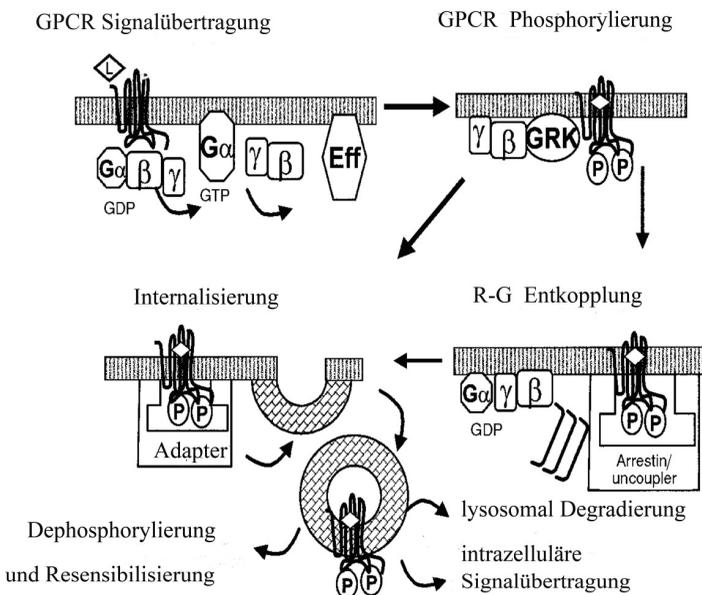
**Abb. 4:** Struktur des menschlichen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors (blau).

Der  $\beta_2$ -AR befindet sich eingeschlossen in eine Lipidmembran und an einen diffusionsfähigen Liganden (grün) gebunden, mit Cholesterin und Palmitinsäure (orange) zwischen zwei Rezeptormolekülen (CHEREZOV et al. 2007).

Die Epithelzellen kontrollieren die Reaktion auf extrazelluläre GPCR-Liganden durch die Expression und Regulation jeder einzelnen Komponente des GPCR-G-Protein-Effektorsignalwegs (SAFFITZ u. LIGGETT 1992). Fast alle GPCR werden durch Phosphorylierung reguliert (TOBIN 2008; TOBIN et al. 2008). Die Desensibilisierung von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren resultiert aus deren Down-Regulation und Entkoppelung des Rezeptors von den G-Proteinen (DZIMIRI 1999). Agonisten-induzierte Phosphorylierung von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ist Hauptmechanismus für Rezeptordesensibilisierung (HAUSDORFF et al. 1990).

Homologe Desensibilisierung bedeutet Verlust der Reaktion auf Liganden, indem ein Rezeptor wiederholt durch ein und denselben spezifischen Agonisten stimuliert wird, während heterologe Desensibilisierung durch die wiederholte Stimulation eines Rezeptors mit

unterschiedliche Agonisten auftritt (SCHEER et al. 1999).  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren können durch Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) (BOTERMAN et al. 2006) und G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinase (GRK) phosphoryliert werden (MCGRAW et al. 1998) (Abb. 5). Die Bindung des  $\beta$ -Arrestins an den phosphorylierten und Agonist-gebundenen Rezeptor führt zu verstärkter Hemmung der intrazellulären Signalübertragung über G-Protein und Effektorsubstanzen. Dies kann schließlich zu Internalisation und Down-Regulation dieser Rezeptoren führen (TRAN et al. 2004; LUTTRELL u. LEFKOWITZ 2002). Der internalisierte Rezeptor wird entweder lysosomal abgebaut oder zur Wiederverwendung zur Membran zurück transportiert (KELLY 2006).



**Abb. 5:** Schema der GRK-abhängigen Modulation von GPCR-vermittelter Signaltransduktion

Nach der Aktivierung der GPCR durch einen Liganden (L) aktivieren die Rezeptoren heterotrimere G-Proteine. Im Fall von GRK2/3 können die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine GRK rekrutieren, um die Phosphorylierung (P) aktivierter GPCR zu initiieren. Die Phosphorylierung durch GRK erlaubt den GPCR mit Proteinen wie Arrestinen zu interagieren, was die Entkopplung der G-Proteine von den GPCR bewirkt. Zusätzlich zur Entkopplung werden viele GPCR internalisiert. Dies geschieht durch ein Adapter-Protein, das

den phosphorylierten Rezeptor bindet und die Endozytose einleitet. Die Internalisierung des  $\beta_2$ -AR verläuft nach dem Rezeptor-G-Protein-Entkopplungsschritt; der Adapter ist ein Arrestin, das den  $\beta_2$ -AR in sogenannte „clathrin-coated pits“ leitet (BÜNEMANN u. HOSEY 1999).

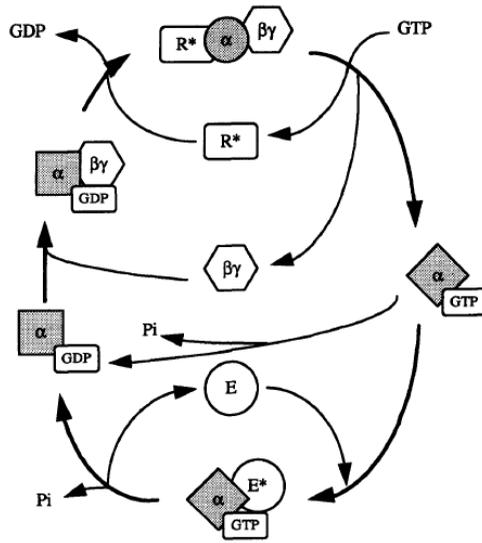
### 2.5.3.2 Signaltransduktionswege

Die Bedeutung der GPCR als pharmakologisches Target liegt in ihrer physiologischen Rolle als Zelloberflächenrezeptoren, die für die Umwandlung exogener Signale in zelluläre Reaktionen verantwortlich sind (FANG et al. 2003). Die  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren übertragen Katecholaminsignale durch Koppelung an große heterotrimere G-Proteine (Guaninnukleotid-Bindungsprotein), welche aus  $\alpha\beta\gamma$ - Untereinheiten bestehen. Ein Agonist-gebundener GPCR durchläuft eine Konformationsänderung, die seine Verbindung mit dem heterotrimeren G-Protein (Gs) induziert. Aktivierung von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren in der Membran der glatten Atemwegsmuskulatur und anderer Zellen resultiert in der Freisetzung von stimulierenden G-Protein- $\alpha$ -Untereinheiten aus dem heterotrimeren  $\alpha\beta\gamma$  G-Protein. Die freie  $\alpha$ -Untereinheit verstärkt dann die Aktivität der Adenylatzyklase (AC) und steigert so die Biosynthese von cAMP aus Adenosintriphosphat (DZIMIRI 1999). Die intrinsische GTPase-Aktivität von  $G\alpha$ , die durch Regulatoren G-Protein signalisierender (RGS) Proteine moduliert werden kann, verursacht dann die Hydrolyse von GTP zu GDP, um die Effektoraktivierung zu beenden und die Wiederherstellung des membrangebundenen  $\alpha\beta\gamma$ -Trimers zu fördern.

Das cAMP bindet an die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA), die wiederum entscheidende regulative Proteine phosphoryliert, die bei der Kontrolle des Muskeltonus involviert sind. PKA spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Kontraktionszustands der glatten Atemwegsmuskulatur (PENN u. BENOVIC 2008). Dies geschieht über Mechanismen, die die Höhe des über den Gq-gekoppelten Rezeptor-vermittelten  $Ca^{2+}$ -Anstiegs reduzieren. Die PKA phosphoryliert sowohl Gq-gekoppelte Rezeptoren als auch Phospholipase C (PLC), welche die GPCR-PLC-vermittelte Phosphoinositid (PI)-Bildung und folglich auch den  $Ca^{2+}$ -Einstrom hemmen kann. Die Phosphorylierung der Leichte-Ketten-Myosin-Kinase (MLCK) durch PKA verringert die MLCK-Affinität zu  $Ca^{2+}$ -Calmodulin, folglich reduzieren sich auch die Aktivität und die Leichte-Myosin-Ketten (MLC) Phosphorylierung.

Die Untersuchungen vom BAI u. SANDERSON (2006) zeigten, dass der Relaxationseffekt von cAMP-erhöhenden Substanzen auf die Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur erreicht wird, indem die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationsfrequenz reduziert wird. Das geschieht durch die Verringerung der zytoplasmischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe durch  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren. Zusätzlich zur Relaxation der glatten Atemwegsmuskulatur, wird angenommen, dass cAMP den Transport von Ionen, Wasser und mukösen Glykoproteinen in Atemwegen moduliert (LAZARUS et al. 1984). Die cAMP-abhängige Signalübertragung kann die durch Fibroblasten-Wachstumsfaktor induzierte Transdifferenzierung von frühen trachealen Epithelzellen zu respiratorischen Epithelzellen verstärken (XU et al. 2006).

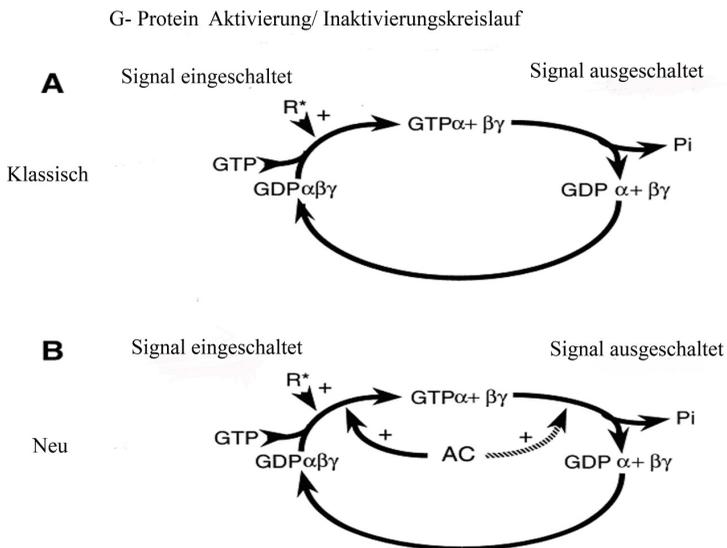
Die heterotrimeren G-Proteine sind eine Proteinfamilie, bestehend aus  $\text{G}\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 45 bis 52, 35 bis 37 bzw. 8 bis 10 kDa, die als Überträger von Signalen von GPCR in verschiedenen Zellen eine regulatorische Schlüsselrolle spielen (GILMAN 1987). Die  $\alpha$ -Untereinheit ist das GTP-Bindeprotein, wohingegen die fest zusammengehörigen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten in der Plasmamembran verankert sind (Abb. 6) und die GDP-gebundene  $\alpha$ -Untereinheit binden, um mit einer großen Affinität das  $\alpha\beta\gamma$ -Heterotrimer zu bilden (PENN u. BENOVIĆ 2008). Entsprechend den strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten der  $\alpha$ -Untereinheiten wurden G-Proteine in vier Familien klassifiziert, und zwar  $\text{G}_s$ ,  $\text{G}_{i/o}$ ,  $\text{G}_{q/11}$  und  $\text{G}_{12/13}$  (CARBRERA-VERA et al. 2003). G-Proteine wandeln Signale von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren um und übertragen sie auf ein Effektorprotein, wobei es sich meist um Enzyme oder Ionenkanäle handelt (ROSENTHAL u. SCHULTZ 1988; RENS-DOMIANO u. HAMM 1995). Die  $\text{G}_{\alpha_s}$ -Untereinheit aktiviert hauptsächlich die Adenylatzyklase (WETTSCHURECK u. OFFERMANN 2005), während die  $\text{G}_{\alpha_i}$ -Untereinheit die Hemmung dieses Enzyms verursacht (SUNAHARA et al. 1996). Die  $\text{G}_{\alpha_q}$ -Untereinheit stimuliert die Phospholipase C, was in der Synthese der second messenger Diacylglycerin (DAG) und Inositol-(1, 4, 5)-Triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) resultiert (RHEE 2001).



**Abb. 6:** Der G-Protein-Zyklus

Die  $\alpha$ -Untereinheit wird an GDP und die  $\beta\gamma$ -Untereinheit gebunden; im inaktiven Zustand des G-Proteins sind der Rezeptor und Effektor entkoppelt. Die Ligandenbindung induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors. Dieser Komplex hält die  $\alpha$ -Untereinheit in einer Form mit einer offenen Guaninnukleotid-Bindungsstelle. Da GTP in einer viel höheren Konzentration in der Zelle vorkommt als GDP, wird es vorzugsweise durch die  $\alpha$ -Untereinheit gebunden. Die Bindung von GTP führt zur Dissoziation des Rezeptors und der Trennung des G-Proteins in seine funktionellen Dimere. Die  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten sind in der Lage, mit Effektormolekülen zu interagieren, solange bis die Hydrolyse von GTP durch die GTPase die  $\alpha$ -Untereinheit von ihrem Rezeptor absplattet. Die Reassoziierung mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit bringt das System in den Grundzustand zurück. Abkürzungen sind: R\*, Ligand-aktivierter Rezeptor, E\* und E, aktive bzw. inaktive Rezeptormoleküle (NASH u. OSBORNE 1996).

Die Adenylatzyklase (AC) ist ein Enzym, welches die Generierung von cAMP aus intrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert. Bis heute wurden neun membrangebundene Isoformen (AC1-AC9) und eine lösliche Form der Säugetier-AC (sAC) aus verschiedenen Tierspezies kloniert und beschrieben (FENG et al. 2006). Es gibt eine große Vielfalt von G-Protein-regulierten transmembranären Adenylatzyklasen in Säugetiergeweben (PREMONT et al. 1996). Ein interessanter neuer Aspekt der Funktionen der AC (Abb. 7) in Hinblick auf  $G_{\alpha s}$  und  $G_s$  ist, dass die Enzyme sowohl  $G_{\alpha s}$  inaktivieren (GAP Aktivität der AC) als auch die Aktivierung des  $G_s$ -Proteins erleichtern. Diesen offensichtlich paradoxen Effekt gibt es auch bei anderen Proteinen wie Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion (RGS) und GAP-Aktivität gegen  $G_{\alpha}$ -Untereinheiten (PATEL et al. 2001).



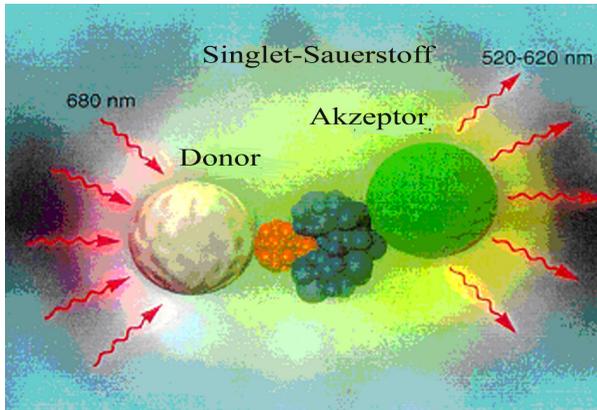
**Abb. 7:** G-Protein-abhängige Aktivierung der Adenylatzyklase

Bild A stellt den klassischen Aktivierungs- und Inaktivierungskreislauf der G-Proteine durch ihre Rezeptoren dar. Bild B wurde überarbeitet, um die beiden neuen Funktionen der AC zu beschreiben. Der schraffierte Pfeil kennzeichnet die GAP-Aktivität der Adenylatzyklase (AC) nur gegen  $G_{\alpha s}$ . AC agiert als ein GAP nicht gegen  $G_{\alpha i}$ . Jedoch verstärkt AC die Signaltransduktion über  $G_s$ -Protein und G-Protein gekoppelte Rezeptoren, weshalb dieser Pfeil sowohl für Typen von Rezeptoren und heterotrimeren G-Proteinen steht (PATEL et al. 2001).

Das 3',5'-zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein entscheidender Second-messenger, der komplexe biologische Prozesse reguliert. Dies geschieht durch die Aktivierung von cAMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA) und Guaninnukleotid-Austausch-Proteinen, die direkt durch cAMP aktiviert werden (Epac 1/2) (NIKOLAEV u. LOHSE 2006). Die Synthese von cAMP tritt ausschließlich in der Plasmamembran auf und wird durch Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), ATP-Konzentrationen, AC-Phosphorylierung durch GPCR-gebundene Serinkinasen einschließlich PKC und PKA und Calmodulin-Kinasen reguliert (FELDMAN u. GROS 2007). Zyklische Nukleotidphosphodiesterasen (PDE) umfassen eine Familie von Enzymen, die am Abbau intrazellulärer second-messenger wie cAMP und cGMP beteiligt sind, um das inaktive 5'-Monophosphat-Produkt zu bilden (FAISY et al. 2006).

Die klassische biochemische Methode cAMP zu messen, basiert auf dem Radioimmunassay (NIKOLAEV u. LOHSE 2006). Diese Methode erfordert Zellerstörung, um eine kleine Menge von Zytosol zu gewinnen, in der die cAMP-Konzentration mit cAMP-Antikörpern und  $^{125}\text{I}$ -markierten cAMP bestimmt werden kann.

Eine neue nicht-radioaktive Partikel (Bead)-basierte Methode für die Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration ist das ALPHA-Screening-Assay (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay). Das Prinzip des AlphaScreen-Assay funktioniert folgendermaßen (Abb. 8): Wenn anti-cAMP-Biotin Akzeptor-Beads und Streptavidin-Donor-Beads durch biologische Interaktionen in unmittelbare Nähe gebracht werden ( $< 200$  nm), dann wird bei einer Laseranregung von 680 nm der umgebende Sauerstoff auf den Akzeptor-Beads durch einen Photosensibilisierer in den Donor-Beads in einen Singlet-Zustand umgewandelt. Der Singlet-Sauerstoff reagiert mit einem Chemoluminescer in der Nähe der Acceptor-Beads, um Energie zu generieren. Die Energie kann dann in den gleichen Beads auf Fluorophoren übertragen werden, um Licht von einer Wellenlänge von 520-620 nm abzugeben (Fluoreszenzsignal). Bei der Anwesenheit von cAMP in den Proben konkurriert es mit der Akzeptor-Donor-Interaktion und verringert folglich die Lichtintensität (AlphaScreen-Signal), die von den Donor-Beads abgegeben wird. Das ermöglicht es, die Menge von cAMP zu berechnen (ZHANG et al. 2005).



**Abb. 8:** Schematische Darstellung des AlphaScreen-Signals

Wenn biologische Interaktionen die Akzeptor- und Donor-Beads in unmittelbare Nähe bringen, wird ein verstärktes Lichtsignal mit einer Wellenlänge von 520-620 nm erzeugt.

### 2.5.3.3 Rolle der $\beta$ -adrenergen Rezeptoren bei entzündlichen Atemwegserkrankungen

GPCR sind an grundlegenden physiologischen Prozessen der Säugetiere beteiligt und GPCR-Störungen können wesentlich zur Pathophysiologie verschiedener Krankheiten beitragen (WAHLEN et al. 2007). Die  $\beta$ -adrenerge Rezeptor-Fehlfunktionen sind in die Pathophysiologie von chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen wie Asthma und COPD involviert (GOLDIE et al. 1986; BAI et al. 1990). An transgenen Mäusen wurden Typen von Asthma beschrieben, welche die Expression von  $G_{\alpha i}$  in der glatten Muskulatur erhöhen und somit verantwortlich sind für die verstärkte Bronchokonstriktion, die durch  $M_3$ -muskarin-cholinerge Rezeptoren vermittelt wird und die Relaxation durch  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren vermindert (McGRAW et al. 2000).  $\beta_2$ -AR-Agonisten haben zentrale Bedeutung bei der Behandlung von Symptomen der bronchialen Hyperreaktivität bei Asthma. Paradoxerweise kommt es durch regelmäßige Verabreichung dieser Medikamente zu einem Rebound-Effekt mit Anstieg der Hyperreaktivität und einer zunehmenden Morbidität und Mortalität bei Asthma (PAGE u. SPINA 2006). Am Beispiel Recurrent Airway Obstruction (RAO) des Pferdes wurde gezeigt, dass die Fehlfunktion von pulmonalen  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren auch die Herunterregulation des Rezeptors und Fehler in allen downstream gekoppelten Signalen einschließt (ABRAHAM et al. 2006). Die Expression und Funktion der  $M_3$ -muskarin-cholinergen Rezeptoren war hingegen bei Pferden mit RAO nicht auffällig verändert

(ABRAHAM et al. 2007). Dagegen scheinen für Asthmatypen bei Menschen und anderen Tierarten die Herabregulierung von neuronalen M<sub>2</sub>-muskarin-cholinergen Rezeptoren (COULSON u. FRYER 2003) und die Hochregulierung der M<sub>3</sub>-muskarin-cholinergen Rezeptoren (TOHDA et al. 2002; PROFITA et al. 2005) für die Bronchialhyperreaktivität verantwortlich zu sein. Das nicht-neuronale cholinerge System der inflammatorischen Zellen in den Atemwegen, einschließlich der Neutrophilen und anderer residenter Zellen, die Muskarinrezeptoren exprimieren, kann ebenfalls zur Pathophysiologie von entzündlichen Atemwegserkrankungen beitragen (GWILT et al. 2007).

Der Genpolymorphismus kann die interindividuelle Variabilität der Reaktion bei COPD- und Asthmatherapie erklären. Genetische Polymorphismen, die Veränderungen in der  $\beta_2$ -AR-Expression, der zellulären Verteilung und Signalübertragung bedingen, wurden sowohl in der Promoter als auch in der codierenden Region des  $\beta_2$ -AR-Gens bei Asthma identifiziert (TAYLOR et al. 2000). Patienten mit dem Haplotyp Arg<sup>16</sup>Gln<sup>27</sup> im  $\beta_2$ -AR-Gen leiden unter einem schnellen Verlust der Therapiewirksamkeit bei chronischer Behandlung mit Agonisten, auch verursacht durch homologe Desensibilisierung. Patienten, die beim Arg<sup>16</sup>  $\beta_2$ -AR-Gen homozygot sind, sind anfälliger für Häufungen der Asthmaanfälle als Patienten, die bei Gly<sup>16</sup>  $\beta_2$ -AR-Gen homozygot sind (BRODDE 2008).

Die Stimulation von  $\beta_2$ -AR durch Katecholamine führt nicht nur zur Relaxation des glatten Atemwegsmuskulatur, sondern moduliert auch die entzündliche Reaktion, da  $\beta_2$ -AR auch in residenten und infiltrierenden Zellen anzufinden sind (LAAN et al. 2006). Diese Fähigkeit, die inflammatorische Reaktion zu modulieren, führt in Verbindung mit der Hemmung der Phosphorylierung und anschließender verzögerter Freisetzung des Hemmstoffs  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) aus dem Transkriptionsfaktor Nuklearfaktor (NF)  $\kappa$ B dazu, dass die Synthese von Zytokinen reduziert oder verzögert ist (LAAN et al. 2006).

## 2.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Nach dem Kenntnisstand zu Beginn der experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gibt es keine ausreichend etablierte und optimierte Methode zur Isolierung und Charakterisierung von equinen Atemwegsepithelzellen, und darüber, ob isolierte primäre Epithelzellen der equinen Atemwege funktionelle  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren exprimieren. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen und Ziele geklärt werden:

- Etablierung von Methoden zur Isolierung von primären Trachealepithelzellen des Pferdes.
- Etablierung der Kulturbedingungen und die Charakterisierung der Epithelzellen in Primärkulturen.
- Etablierung von Methoden für serielle Kulturpassagen und Steigerung der in vitro-Lebensdauer von primären Trachealepithelzellen des Pferdes.
- Identifizierung von  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsubtypen in intakten Trachealepithelzellen und die Bestimmung von Bindungseigenschaften.
- Bestimmung der Funktion der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren, die in den Trachealepithelzellen des Pferdes exprimiert werden.

### **3 MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Tiere**

Zur Isolierung der Trachealepithelzellen standen insgesamt 37 gesunde Pferde unterschiedlichen Geschlechts der Rassen Warmblut, Deutsches Reitpony und Haflinger in einem mittleren Alter von 15 Jahren zur Verfügung. Das Trachealgewebe wurde von gesunden Schlachtpferden ohne klinische Anzeichen einer Herz- oder Lungenerkrankung unmittelbar nach der Schlachtung in verschiedenen Roßschlachtereien (Grimma, Jena, Albertsdorf) entnommen.

#### **3.2 Material**

##### **3.2.1 Einmalartikel**

- Cell-Strainer (BD Falcon™), 40µm ( BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
- Eppendorfgefäße 1,5 ml und 2 ml ( Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Falconröhrchen 50 ml und 15 ml (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Kulturflaschen, 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Kulturschalen, 94 x 16 mm (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Mullkompressen (Wilh. Weisweiler GmbH, Münster, Deutschland)
- Nitrocellulose Transfermembran ( Whatman GmbH, Dassel, Deutschland)
- Pipettenspitzen (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Whatman GF/C Glasfaserfilter (Whatman International Ltd, Maidstone, England)
- Zellkulturplatten, 24-, 12-, 6-Well-Platten (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland)

##### **3.2.2 Verbrauchsmaterial für Zellkultur**

- Rattenschwanz-Kollagen Typ I (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Matrigel-Basement-Membrane-Matrix (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
- ThinCert™, Transwell-Inserts, 0,4 µm Porengröße, 8,36 mm Durchmesser (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland)

##### **3.2.3 Zellkulturmedien, Pufferlösungen und Enzyme**

###### **Zellkulturmedien**

- Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (PAA Laboratories, Pasching, Österreich).

- Airway-Epithelial-Cell-Growth-Medium / supplement Mix (PromoCell, Heidelberg, Deutschland)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- Fetales Kälberserum (Invitrogen Life Technologies, Scotland, UK)
- Nicht-essentielle Aminosäuren (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- L-Glutamin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)

#### **Puffer und Enzyme für die Zellkultur**

- Hanks'-Balanced-Salt-Solution (HBSS), Calcium- und Magnesium-frei (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- PBS Puffer: Für 1 Liter PBS wurden 8,5 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in destilliertem Wasser gelöst und bei 121 °C für 20 min autoklaviert
- 0,25% Trypsin -EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dispase II-Lösung (Roche, Penzberg, Deutschland)

#### **Puffer für Rezeptorbindung**

- Inkubations-Puffer: 10 mM Tris-Base, 154 mM NaCl, 0,55 mM Ascorbinsäure, pH 7,4
- Wasch-Puffer: 10 mM Tris-Base, 154 mM NaCl, pH 7,4

#### **Puffer für cAMP -Assay**

- Lyse-Puffer: 5 mM HEPES, 0,1% BSA, 0,3% Tween-20, pH 7,4
- Assay-Puffer: 5 mM HEPES, 1 x HBSS, 0,1% BSA, pH 7,4

#### **Puffer für Elektrophorese**

- Transfer-Puffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20% Methanol
- Trenn-Puffer: 1,5 M Tris-Base, 0,4% SDS, pH 7,4
- Sammel-Puffer: 2 M Tris-Hydrochlorid, 10% SDS, pH 6,8
- Lauf-Puffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3
- Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS): 20 mM Tris-Hydrochlorid, 150 mM NaCl, pH 7,5
- TBST: TBS mit Zusatz von 0,05% Tween-20
- Tris-EDTA-Puffer: 25 µM Tris-Hydrochlorid, 5 µM EDTA-Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, 5 µM EGTA, pH 7,5

- Lade-Puffer: 60 mM Tris-Hydrochlorid, 25% Glycerol, 2% SDS, 14,4 mM Mercaptoethanol, 0,1% Bromphenolblau

### 3.2.4 Chemikalien

- Ammoniumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ammoniumperoxidsulfat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Amphotericin B (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- Bovines Serum-Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- CGP12177[(±)-4-(3-Tertiärbutylamino-2-hydroxypropoxy)-Benzimidazol-2-ol] (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- CGP 20712A 1-[2-((3-Carbamoyl-4-hydroxy)phenoxy)ethylamino]-3-[4-(1-methyl-4-trifluoromethyl-imidazolyl)-phenoxy]-2-Propanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (Fluka Feinchemikalien, Neu Ulm, Deutschland)
- EDTA-Na<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O, Ethylendiamintetraacetat (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- EGTA, Ethylen-Glycol-Bis (2-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetra-essigsäure (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- (-)-Epinephrin (+) -Bitartrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Fluorsave Anti-Fade-Reagent (Calbiochem, San Diego, USA)
- Glutaraldehyd (Plano, Wetzlar, Deutschland)
- Glycin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- ICI118.551(Erythro-(+/-)-1-(7-Methylindan-4-yloxy)-3-Isopropylaminobutan-2-ol) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- (-)-[<sup>125</sup>I]-Iodocyanopindolol, ICYP (Spezifische Aktivität: 2200 Ci/mmol) (PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA)
- Isopropanol 99,5% (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- (-)-Isoproterenol (+) Bitartrat (Sigma, St. Louis, USA)
- 3-Isobutyl-1-Methylxanthin, IBMX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kaliumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- L-(+)-Ascorbinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Methanol 99% (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

- Natriumdodecylsulfat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- (-)-Norepinephrin-Bitartrat-Hydrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Papanicolaou-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Penicillin / Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- peqGold Protein Marker IV (peqLab biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland)
- Rotiphorese®Gel-30 (37,5:1) 30% Acrylamid/Bisacrylamid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- TEMED (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Tris-Hydrochlorid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Tris-Base (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Tween-20 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Western blue®: Substrat für alkalische Phosphatase, enthält ein Gemisch aus 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazolium (NBT) (Promega Corporation, Madison, USA)

### 3.2.5 Antikörper

- Monoklonaler Maus-Anti-Human-Zytokeratin 5/6/18, Klon LP34 (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland)
- Monoklonaler Maus-Anti-Human-Zytokeratin, Klon AE1/AE3 (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland)
- Monoklonaler Maus-Anti-Panzytokeratin, Klon Lu5 (Chemicon International, CA, USA)
- Monoklonaler Maus-Anti-Human-Zytokeratin 19, Klon b170 (Novocastra Laboratories, Newcastle, UK)
- Monoklonale Maus-Anti-Vimentin, Klon vim3B4 (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland)
- Monoklonaler Maus-Peroxidase-Anti-Peroxidase (Jackson Immuno-Research Laboratories, USA)
- Polyklonaler Kaninchen-Anti-Human- $\beta_2$ -AR (H-73) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)
- Polyklonaler Ziege-Anti-Maus-IgG- FITC (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland)
- AffinPure-Ratte-Anti-Maus-IgG (H +L) (Jackson Immuno-Research Laboratories, USA)

- Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (H+L)-alkalische Phosphatase (Vector Laboratories, CA, USA)

### 3.2.6 Kits

- AlphaScreen® cAMP-Assay-Kit (PerkinElmer LAS, Montreal, Canada)
- MACS-Anti-Human-Fibroblast-MicroBeads Isotyp: Maus IgG<sub>a</sub> (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland)

### 3.2.7 Zelllinien

Die humane Bronchialepithelzelllinie 16HBE14o- und Cos-1 Nierenzellen des Afrikanischen Grünen Affen wurden freundlicherweise von Dr. C. Ehrhardt, Saarbrücken, bereitgestellt.

### 3.2.8 Geräte

- Automated McIlwain TC752 Tissue Chopper (Mickle Laboratory, Surrey, UK)
- Canon Digitalkamera (Canon, Woodhatch, Surrey, UK)
- Elektrophorese Power supply-EP5 600 und Blotting-Kammer (Amersham Pharmacia Biotech Wien, Österreich)
- Eppendorf Zentrifuge S403 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Fusion alpha-multiplate Reader (PerkinElmer LAS, Montreal, Canada)
- Gamma-Counter-Wallac WIZARD1470 (PerkinElmer Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland)
- Gelelektrophorese-Kammer und PowerPac Basic power supply (Bio-Rad Laboratories, GmbH, München, Deutschland)
- Hettich Universal 320 Zentrifuge (GMI, Minnesota, USA)
- Leica DM IBR Inverses Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland)
- Neubauer Zählkammer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Olympus BX50 Fluoreszenzmikroskop (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan)
- Olympus CKX41/CKX31 Inverses Mikroskop (Olympus Corporation, Tokyo, Japan)
- Olympus Digitalkamera, CC-12 (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan)
- Rasterelektronenmikroskop, LEO 1430 vp (LEO Electron microscope, Cambridge, UK)
- Vakuumfiltrationsanlage, Cell-harvester (Brandel Biomedical Research and Development, Gaithersburg, USA)
- 1225 Sampling Manifold (Filtertopf) (Millipore, Billerica, USA)

### **3.3 Methoden**

#### **3.3.1 Gewebeentnahme und Aufbereitung**

Das Trachealgewebe wurde von gesunden Pferden ohne klinische Anzeichen einer Herz-oder Lungenerkrankung unmittelbar nach der Schlachtung in der Roßschlachtereier entnommen. Die Organproben wurden eiskühlt innerhalb von 1-2 h nach der Schlachtung ins Institut transportiert. Die Trachea wurde zunächst mit sterilen Scheren und Skalpell der Länge nach eröffnet und in ca. 8 cm breite Stücke geteilt. Diese Trachealstücke wurden mit steriler, eiskalter  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -freier Hank's-Balanced-Salt-Solution (HBSS) mehrmals gewaschen, um Schleim, Blut und oberflächliche Kontaminationen zu entfernen. Unter einer sterilen Arbeitsbank wurden aus dem Trachealgewebestücken Epithelschnitte von der darunter liegenden glatten Muskulatur mit Hilfe von Pinzette und Skalpell entfernt und im Becherglas mit eiskaltem HBSS gewaschen. Danach wurden diese Gewebestücke entweder mit Scheren oder dem automatischen Gewebeerhacker (Tissue chopper Mellwain TC752) auf eine Größe von etwa 1-2 mm zerkleinert, um die Angriffsfläche für das Verdauungsenzym zu vergrößern. Die Zerkleinerung der Gewebe mit Schere oder automatischen Gewebeerhacker ergab keinen nennenswerten Unterschied bei der Isolierung der Epithelzellen der Trachea, so dass weiterhin routinemäßig manuelle Zerkleinerung angewendet wurde, da diese Methode für das Trachealepithelgewebe etwas schonender ist als die maschinelle Zerkleinerung.

#### **3.3.2 Isolierung und Kultivierung der equinen Trachealepithelzellen**

##### **3.3.2.1 Enzymverdau**

Um aus dem equinen Trachealgewebe einzelne Epithelzellen herauszulösen, wurde die enzymatische Methode der Gewebedissoziation durchgeführt, wie diese bereits bei anderen Tierarten zur Isolation von Lungenepithelzellen beschrieben wurde (DAVIDSON et al. 2000; SCHUMANN et al. 1988; WIDDICOMB et al. 1987; SHANNON et al. 1999; KAARTINEN et al. 1993; BAEZA-SQUIBAN et al. 1994). Allerdings wurde die enzymatische Methode so modifiziert, dass in möglichst kurzer Zeit große Mengen lebensfähige und ausschließlich epitheliale Zellen gewonnen werden konnten. Etwa 500 mg des manuell bzw. maschinell zerkleinerten Gewebes wurden in Erlenmeyer-Kolben überführt und jeweils 10 ml 0,25% Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben. Nach Optimierung wurde das mit 10ml Trypsin-EDTA (0,25%) versetzte Gewebe im Brutschrank mit 5%  $\text{CO}_2$  und ~95% Feuchtigkeit bei 37°C für 2 h inkubiert. Zur Verbesserung des Enzymverdaus wurden die Kolben langsam geschüttelt und durch Auf-und-Ab-Pipettieren der Gewebesuspension wurde das Ablösen der Epithelzellen

aus dem Zellverband begünstigt. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml 20% (v/v) fetalem Kälberserum in HBSS gestoppt.

### **3.3.2.2 Zellseparierung**

#### **3.3.2.2.1 Filtration und Zentrifugation**

Nach Beendigung des Enzymverdaus erfolgte zur Abtrennung von größeren Gewebeteilen die Filtration der Gewebesuspension durch zweilagigen sterilen Mull. Die zellhaltige Suspension wurde in 50 ml Falcon Röhrchen aufgefangen und zwei Waschschritten mit 10 ml HBSS unterzogen. Danach wurde die Suspension durch Zellsiebe mit Porengröße von 40 µm filtriert und die Zellsiebe mit jeweils 5 ml HBSS gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 200 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. Hierauf folgten die Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.

#### **3.3.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und -vitalität**

Mittels Neubauer-Zählkammer wurden die isolierten Zellen gezählt. Zur Untersuchung der Zellvitalität wurde eine Färbung mit 0,1% Trypanblau durchgeführt. Intakte Zellen werden vom Farbstoff nicht durchdrungen und erscheinen in der Phasenkontrastmikroskopie transparent, wohingegen sich abgestorbene Zellen blau anfärben. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel ermittelt:

Zellzahl/ml = Mittlere Zellzahl in 4 großen Quadraten x  $10^4$

wobei  $10^4$  als Korrekturfaktor für die Neubauer-Zählkammer von der Firma empfohlen wird.

### **3.3.3 Anreicherung der Epithelzellfraktion**

#### **3.3.3.1 Kollagenbeschichtung der Kulturgefäße**

Zellkulturschalen, Flaschen und Membranfilter waren zur Steigerung der Proliferation und Adhäsion der Zellen mit Kollagen und Matrigel beschichtet. Zur Beschichtung wurde eine 0,05% Lösung in 0,2% Eisessig aus Rattenschwanz-Kollagen Typ I mit steril filtriertem und destilliertem Wasser hergestellt. Pro 58 cm<sup>2</sup> Kulturfläche der Kulturschale wurden 600 µl (~5 µg/cm<sup>2</sup>) der Kollagenlösung gegeben. Die 0,336 cm<sup>2</sup> Transwell-Insert (Thincert™ Tissue culture inserts) wurden mit 100 µl (~1,4 µg/cm<sup>2</sup>) der Kollagenlösung beschichtet. Beide Kulturgefäße wurden danach 1-2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen.

### **3.3.3.2 Matrigelbeschichtung der Kulturgefäße**

Die Kulturschalen und Transwell-Inserts wurden zusätzlich mit Matrigel (Basement membrane matrix) beschichtet. Matrigel besteht aus Proteinen der extrazellulären Matrix, hauptsächlich aus Laminin und Kollagen-IV und wurde vor Benutzung über Nacht bei 4°C auf Eis aufgetaut. Das Auftragen erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Matrigel wurde mit Kulturmedium im Verhältnis 1:5 verdünnt und eine dünne Schicht auf die Oberfläche der Kulturgefäße gegossen, bis die Oberfläche vollständig bedeckt war. Die Transwell-Inserts wurden mit 100 µl (5,5 µg/cm<sup>2</sup>) dieser Lösung beschichtet. Zur Polymerisation des Gels wurden die Kulturgefäße bei 37°C für 1-2 h inkubiert. Vor der anschließenden Ausplattierung der Epithelzellen wurde überschüssiges Gel entfernt.

### **3.3.3.3 Adhäsionsverhalten**

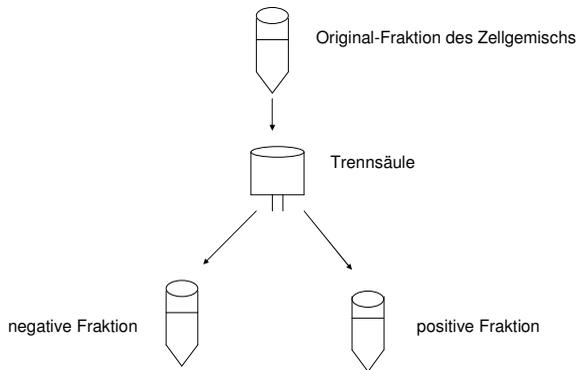
Für Folgeversuche wurden die Zellpellets entweder in MEM mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin und 1% nicht-essentiellen Aminosäuren oder in serumfreiem Airway Epithelial Cell Growth Medium (AECGM)/supplement Mix resuspendiert. Der Supplement Mix enthält 0,4% Bovine-Pituitary-Extract, 10 ng/ml epidermalen Wachstumsfaktor, 5 µg/ml Insulin, 0,5 µg/ml Hydrocortison, 0,5 µg/ml Epinephrin, 6,7 ng/ml Trijodthyronin, 10 µg/ml Transferrin und 0,1 ng/ml Retinsäure. Dazu enthalten beide Medien 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,5 µg/ml Amphotericin B, um Infektionen zu verhindern. Danach wurden 6 ml der Zellsuspension (5,7 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml) 30 min lang auf unbeschichteten 94-mm Kulturschalen bei 37°C inkubiert, um durch differentielle Adhäsion nicht-epitheliale von epithelialen Zellen zu trennen. Für diesen Vorgang ist nach eigenen Untersuchungen eine Inkubationszeit von 30 min am besten geeignet. Nach diesen 30 min wurde das Medium mit den enthaltenen nicht-adhärenen Epithelzellen vorsichtig abgenommen, wobei besonders darauf geachtet wurde, dass keine adhärenen kontaminierenden Zellen, z.B. Fibroblasten vom Boden der Schale gelöst wurden, und auf neue Kulturschalen verlagert.

### **3.3.3.4 Verfahren der magnetischen Zellseparation (MACS)**

Für eine erfolgreiche Zellseparation gelten zwei Voraussetzungen. Erstens müssen die Zellen als Einzelsuspension vorliegen, was bei flüssigen Geweben wie dem Blut unmittelbar gewährleistet ist. Hingegen erfolgt bei soliden Geweben, wie dem respiratorischen Epithel, zuvor eine Isolierung der Zellen aus dem Gewebsverband mittels enzymatischem Verdaus.

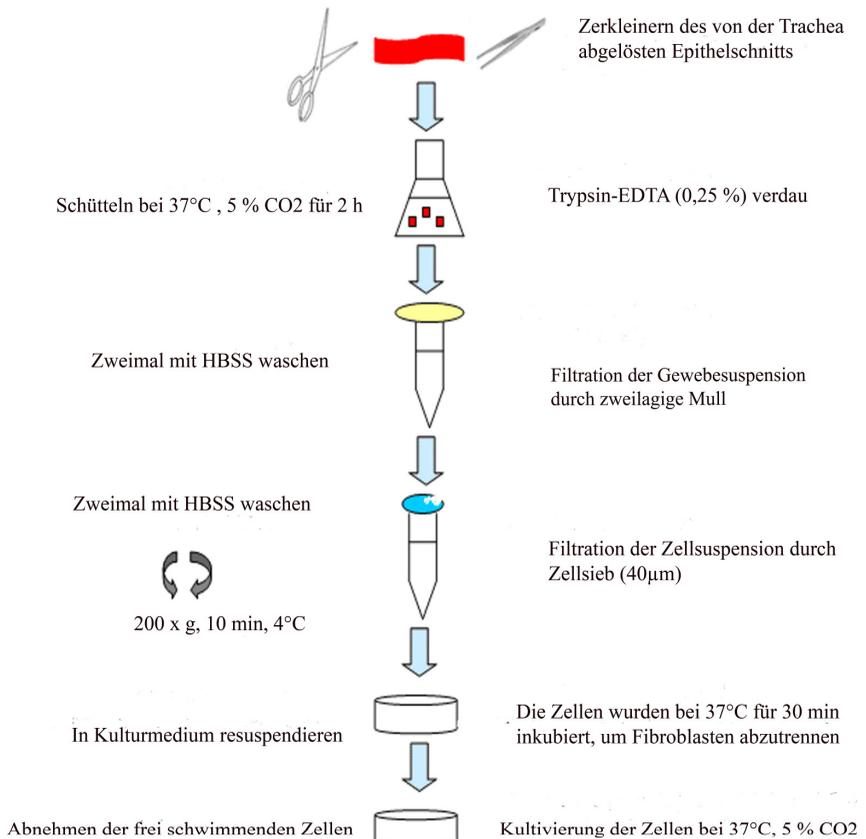
Zweitens müssen die einzelnen Zelltypen aus dem Zellgemisch charakteristische Merkmale aufweisen, die eine eindeutige Unterscheidung voneinander ermöglichen. Die Merkmale können physikalischer oder immunologischer Natur sein. Physikalische Merkmale sind z.B. Größe und Masse einer Zelle, während Oberflächen-Antigene eine immunologische Unterscheidung anhand von monoklonalen Antikörpern ermöglichen.

Bei magnetischer Zellseparation werden viele Zellen gleichzeitig aufgrund einer einzigen Eigenschaft sortiert. Bei dieser Methode werden die Zellen durch Konjugate aus monoklonalen Antikörpern und einiger superparamagnetischer Partikel (Microbeads) markiert. Laut Angaben des Herstellers Milteni Biotec bestehen die Microbeads aus Dextranpolymeren, mit Eisenoxid beschichtet, und besitzen eine durchschnittliche Partikelgröße von 50 nm. Die magnetische Zellseparation kann aufgrund der geringen Größe der Apparatur unter einer sterilen Sicherheitswerkbank erfolgen und ermöglicht eine spätere Kultivierung der separierten Zellpopulationen. Die magnetische Separation kann dazu dienen, Fibroblasten aus dem respiratorischen Epithelzellgemisch zu gewinnen, um eine Aussage über den Kontaminationsgrad der Epithelzellen der Trachea mit Fibroblasten zu treffen. Eine Anreicherung der Fibroblasten mittels MACS ist bislang nur für Fibroblasten des Menschen beschrieben, jedoch nicht für Fibroblasten des Pferdes. Das Prinzip der magnetischen Zellseparation ist es, innerhalb des Zellgemisches die Zielzellen magnetisch zu markieren. Hierbei wird die Zellsuspension über eine spezielle Trennsäule gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Die unmarkierten Zellen passieren die Säule ungehindert, während die markierten Zellen zunächst festgehalten und erst später aus dem Magnetfeld eluiert werden, wie in Abb. 9 schematisch gezeigt wird.



**Abb. 9:** Ablauf der magnetischen Separation von Fibroblasten

Für die magnetische Separation (MACS) von Fibroblasten wurde aus dem Gemisch equiner respiratorischer Zellen eine Einzelzell-Suspension von 1 Million Zellen in MACS-Puffer (PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA) mittels Trypsinverdau der Trachea und durch Trypsinieren von Fibroblasten aus den Primärkulturen hergestellt. Equine tracheale Fibroblasten (ETF) wurden isoliert, nach konfluentem Wachstum trypsinisiert, bei Raumtemperatur und  $200 \times g$  für 10 min pelletiert und gezählt. Danach wurden  $10^6$  ETF in  $80 \mu\text{l}$  MACS-Puffer resuspendiert.  $20 \mu\text{l}$  der Anti-Fibroblasten Mikropartikel wurden hinzugefügt und der Ansatz 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 ml Puffer/ $10^6$  Zellen gewaschen und erneut bei  $200 \times g$  für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Puffer resuspendiert. Nachdem die MACS-Säule mit  $500 \mu\text{l}$  Puffer gespült wurde, wurde die Zellsuspension in die Säule gegeben, danach dreimal mit jeweils 500 ml Puffer gewaschen und das Eluat mit den partikelfreien Zellen aufgefangen. Die Säule wurde entnommen und 1 ml Puffer zugegeben, um die Zellen auszuspülen. Die magnetisch markierten Zellen wurden gezählt. Als Negativkontrolle dienten ETF ohne Anti-Fibroblasten-Mikrokügelchen und als Positivkontrolle Cos-1-Zellen.



**Abb. 10:** Schematischer Ablauf zur Isolierung equiner Trachealepithelzellen

### 3.3.4 Kultivierung, Passagierung und Konservierung der primären equinen Trachealepithelzellen

#### 3.3.4.1 Zellkultivierung auf Kulturschalen

Als Kulturmedien dienen serumfreies, Hormon-supplementiertes AECGM und MEM mit 10 % fetalem Kälberserum und 1% nicht-essentiellen Aminosäuren. Beide Kulturmedien enthalten auch Antibiotika und Antimykotika (s. 3.3.3.3). Die Trachealepithelzellen wurden in einer hohen Zelldichte von  $6,9 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in 6 ml Medium sowohl auf unbehandelten als auch entweder auf Kollagen- oder Matrigel-beschichteten Kulturschalen ausplattiert. Die Kultivierung der Zellen fand im Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% statt. Zur optimalen Nährstoffversorgung der Zellen war ein

Mediumwechsel zunächst nach 24 h Kultivierung und anschließend von 48 h notwendig. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf ihre Zellmorphologie hin untersucht. Dazu wurde Licht- und Phasenkontrastmikroskopie angewandt und entsprechende Aufnahmen angefertigt. Nach der Isolation wurden Trachealepithelzellen des Pferdes als ETEZ-n (primäre equine Trachealepithelzellen) benannt, wobei n für die fortlaufende Zahl der Isolation steht. Insgesamt wurden 37 Epithelzell-Isolationen durchgeführt, um die optimalen Vorgehensweisen und Bedingungen für Isolation und Kultivierung dieser Zellen herauszufinden und zu etablieren sowie um epitheliale  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren zu untersuchen.

### **3.3.4.2 Differenzierung in Air-Liquid-Interface (ALI)**

Um mukoziliare Differenzierung und Polarisation der Epithelzellen zu erhalten, wurde die Methode des Air-Liquid-Interfaces angewandt. Hierzu wurden die Zellen in Transwell-Inserts (0,4  $\mu$ m Porengröße, 8,36 mm Durchmesser), die entweder mit Kollagen- oder Matrigel beschichtet waren, in einer Dichte von  $4,5 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Die apikale Seite der Transwell-Inserts wurde dabei mit 300  $\mu$ l, die basolaterale Seite mit 1 ml AECGM gefüllt und die Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Bis zum Erreichen der Konfluenz am ca. 4.-5. Tag wurde das Medium beider Seiten täglich gewechselt. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Medium der apikalen Seite abgenommen, um dort eine Gasphase zu simulieren. Das Medium der basolateralen Seite wurde weiterhin alle zwei Tage gewechselt.

### **3.3.4.3 Populationsverdopplungszeit**

Zur Ermittlung der Populationsverdopplungszeit einer Zellkultur musste der Wachstumsverlauf festgehalten werden. Zu diesem Zweck wurden 6-well Platten mit  $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> der primär isolierten ETEZ in 2 ml serumfreiem AECGM besiedelt. Die Auszählung der Zellzahl erfolgte zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h, 72 h, und 96 h in Dreifachbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer. Zunächst wurde jede Vertiefung der Platte zweimal mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die Populationsverdopplungszeit wurde graphisch ermittelt, als Anhaltspunkte galten dabei die Zeitpunkte des zweifachen Anstiegs der Zellzahl in der exponentiellen Wachstumsphase.

### **3.3.4.4 Passagierung der primären equinen Trachealepithelzellen**

#### **3.3.4.4.1 Trypsinisierung**

Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 75% wurde das Medium der Primärkulturen abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Hinzufügen von 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung wurde der Ansatz bei 37°C für 10 min in den Brutschrank gestellt. Die Enzymreaktion wurde mit 5 ml MEM, das mit 10% fetalem Kälberserum versetzt wurde, gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation (200 x g für 10 min) pelletiert. Das Pellet wurde in dem gleichen MEM resuspendiert, in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die subkultivierten Zellen zeigten jedoch weder Adhäsion noch Proliferation. Die Adhäsion konnte auch durch Beschichtung mit Kollagen Typ I und Zugabe von Serumangereichertem MEM nicht erreicht werden. Eine Subkultivierung war nach Trypsinisierung nicht möglich und die folgenden Passagen waren meist stark mit Fibroblasten überwachsen.

#### **3.3.4.4.2 Dispase II-vermittelte Ablösung der Trachealepithelzellen**

Alternativ zur Trypsinisierung wurde untersucht, ob eine Behandlung der Zellen mit einem weniger aktivem Enzym (Dispase II, 2,4 U/ml) die Adhäsion und die Proliferation nach Passagierung verbessern könnte. Die Ablösung der Zellen war nach 15 min Inkubation mit Dispase II bei 37°C erreicht. Die Enzymlösung wurde jedoch nach 5 min Inkubation vorsichtig wieder gesaugt, um Zellschäden zu minimieren und die Zellen wurden wieder in den Brutschrank verbracht. Die durch Dispase II abgelösten Zellen wurden dann in serumfreien AECGM resuspendiert, bei 200 x g 10 min bei 4°C gewaschen und erfolgreich in unbeschichteten Kulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde erstmals nach einem Tag, dann alle zwei Tage gewechselt. Nach Konfluenz wurden die Zellen mit Dispase II abgelöst und weiter subkultiviert.

#### **3.3.4.5 Kryokonservierung**

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die primären equinen Trachealepithelzellen nach Proliferation und Konfluenz trypsinisiert. Danach wurden 2-3 x 10<sup>6</sup> Zellen in Einfriermedium, das 0,7 ml MEM mit 0,2 ml fetales Kälberserum und 0,1 ml DMSO enthielt, in Kryoröhrchen eingewogen. Zunächst wurden Kryoröhrchen über Nacht bei -80°C gefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dabei wurde auch die Überlebensrate der Zellen überprüft und ob die Kryokonservierung eine weitere Kultivierung erlaubt. Für ein Monat gefrorene Zellen wurden zügig bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 10 ml vorgewärmtem

Kulturmedium in 15 ml Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 200 x g bei 4 C für 10 min und Zellzählung wurden die Zellen in 5 ml serumfreiem AECGM in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen gegeben und bei 37 C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### **3.3.5 Kultivierung permanenter Zelllinien und Fibroblasten**

#### **3.3.5.1 Kultivierung der 16HBE14o- und Cos-1 Zellen**

Die humane Bronchialepithel-Zelllinie 16HBE14o- wurde gemäß eines etablierten Protokolls kultiviert (GRUENERT 1988; COZENS et al. 1994) und diente als Positivkontrolle während der Charakterisierung primärer ETEZ. Gefrorene Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und in ein 15 ml Röhrchen überführt, das 10 ml vorgewärmtes MEM mit 10% fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,5  g/ml Amphotericin B enthielt. Durch Zentrifugation bei 200 x g bei 4 C für 10 min wurden die Zellen pelletiert, und anschließend mit 14 ml MEM resuspendiert, in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt bei 37 C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach der Konfluenz wurden die Zellen mittels Trypsinisierung auf 24-well Platten mit einer Zelldichte von 5 x 10<sup>4</sup> Zellen/Well subkultiviert. Dafür wurden Zellen oberhalb der Passage 87 verwendet. Mit den African-Green-Monkey-Kidney-Cells (Cos-1) wurde gleichermaßen verfahren, diese wurden aber in DMEM mit L-Glutamin kultiviert und dienten als Positivkontrolle zur Isolierung equiner Trachealfibroblasten. Cos-1 Zellen haben die Eigenschaften von Fibroblasten und dienen als positive Kontrolle für Vimentin-Färbung während der ETEZ- und ETF-Isolation.

#### **3.3.5.2 Isolierung und Kultivierung der equinen Trachealfibroblasten**

Equine Trachealfibroblasten (ETF) wurden als Negativkontrolle für die immunzytochemischen Färbungen herangezogen und Dafür isoliert und kultiviert. Die ETF wurden durch Behandlung der equinen Trachealepithelzellen in Kultur mit MEM, das 10% fetales Kälberserum enthielt, gewonnen. Dabei überwucherten die Fibroblasten mit ihrer spindelförmigen Morphologie ins serumhaltige Medium sehr schnell. Detektiert wurden die Fibroblasten durch immunzytochemische Färbung mit Anti-Vimentin-Antikörper.

### **3.3.6 Charakterisierung von primären equinen Trachealepithelzellen und Trachealgewebe**

#### **3.3.6.1 Morphologische Untersuchung primärer Gewebe und Zellen**

##### **3.3.6.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Trachealgewebe**

Für histologische Untersuchungen wurden die Schnitte des Trachealepithels nach Standardverfahren eingebettet. Die mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms angefertigten Schnitte von 4-5 µm Größe wurden anschließend auf Objektträger aufgebracht und nach einer routinemäßigen Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung unterzogen.

##### **3.3.6.1.2 Hämatoxylin-Eosin -Färbung der primären Trachealepithelzellen**

Membraneinsätze von frisch isolierten und kultivierten Epithelzellen wurden auch mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Zu diesem Zweck wurden frisch isolierte Zellen auf Objektträger zentrifugiert und mit 2% PFA fixiert. Die isolierten Zellen wurden zudem auf unbeschichtete Deckgläschen in 24-Well-Platten ausgesät (200.000 Zellen/Well) und bis zu einer Konfluenz von 75% kultiviert und mit PFA fixiert. Danach wurden die Membraneinsätze - wie oben (3.3.6.1.1) beschrieben - gefärbt.

##### **3.3.6.1.3 Lichtmikroskopie**

Das Wachstumsverhalten primärer sowie kultivierter Epithelzellen wurde fortlaufend lichtmikroskopisch beobachtet. Zum Einsatz kamen hierzu inverse Phasenkontrastmikroskopie und differentielle Interferenzkontrastmikroskopie. Aussagefähige und repräsentative Bildaufnahmen wurden durch Digitalkameras (Canon, Surrey, UK) realisiert.

##### **3.3.6.1.4 Rasterelektronenmikroskopie**

Die Trachealepithelzellen wurden auch rasterelektronenmikroskopisch untersucht und dazu in Transwell-Inserts (s. 3.3.4.2.) kultiviert. Hierzu wurden die Membraneinsätze zweimal HBSS gewaschen und die Zellen bei Raumtemperatur eine Stunde lang mit 3% Glutaraldehyd in Acodylat-Puffer (0,1 M Natriumacodylat, 0,1 M Saccharose, pH 7,4) fixiert. Nachdem der Ansatz 3 x 5 min mit demselben Puffer gewaschen wurde, folgte eine weitere Fixierung bei 4°C für 1 h mit 1% Osmiumtetroxid in Acodylat-Puffer. Die Transwell-Inserts wurden 3 x 5 min mit Acodylat-Puffer gewaschen und die Zellen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (25-

100%) jeweils 10 min pro Stufe dehydriert. Die Inserts wurden mit absolutem Alkohol getrocknet und mit dem Rasterelektronenmikroskop Modell LEO1430 vp visualisiert.

### **3.3.6.2 Immunzytochemie**

#### **3.3.6.2.1 Immunfluoreszenz**

Um die Identität und Reinheit der isolierten equinen Trachealepithelzellen zu prüfen, erfolgte die Charakterisierung durch Färbungen mit zellspezifischen Markern: den Antikörpern Anti-Zytokeratin und Anti-Vimentin. Dafür wurden neben frisch isolierten Zellen auch Primärkulturen und deren Passagen angefärbt. Um aus der Zellsuspension eine Zelllage für die Färbung zu bilden, wurden die isolierten Zellen direkt nach der Isolation mittels Zentrifugation durch Zytospin (Hettich Universal Zentrifuge) auf Objektträger verbracht. Die isolierten Zellen wurden zudem auf unbeschichtete Deckgläschen in 24-Well-Platten ausgesät (200.000 Zellen/Well) und bis zu einer Konfluenz von 75% kultiviert. Für diesen Zweck wurden die monoklonalen Maus-Primärantikörper Anti-Human-Zytokeratin 5/6/18 Klon LP34 (1:100 Verdünnung) und Anti-Bovine-Vimentin Klon vim 3B4 (1:100 Verdünnung) verwendet. Als Sekundärantikörper diente der mit FITC konjugierte polyklonale Antikörper Ziege-Anti-Maus-IgG (1:200 Verdünnung). Die verwendeten Antikörper wurden mit 3% BSA in PBS verdünnt. Als Positivkontrollen dienten die humanen Bronchialepithelzellen 16HBE14o- für Zytokeratin und primäre equine Trachealfibroblasten für Vimentin. Bei den Negativkontrollen wurde der Primärantikörper weggelassen.

Die Zellen auf den Objektträgern und 24-Well-Platten wurden für die immunzytochemische Untersuchung mit vorgekühltem 100% Aceton (-20°C) für 5 min fixiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Ansätze mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS für 10 min bei Raumtemperatur (RT) neutralisiert. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde 3% BSA in PBS hinzugefügt und die Zellen 30 min bei RT im Brutschrank inkubiert. Die Primärantikörper (Anti-Zytokeratin und Anti-Vimentin, 200 µl/Ansatz) wurden aufgetragen und der Ansatz wurde für 1 h bei RT inkubiert und anschließend 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurde der Sekundärantikörper (FITC-konjugiertes Ziege-Anti-Maus-IgG, 200 µl/Ansatz) aufgetragen und der Ansatz 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Zur Färbung der Zellkerne wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, 1:2000 Verdünnung) verwendet. Die Färbungen wurden dreimal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gespült, mit Deckgläschen eingedeckt und mit Floursave-Antifade-Reagent fixiert. Danach folgte eine Trocknung für 1 h bei RT. Morphologische Untersuchung der immunzytochemische Färbungen wurden mit dem

Olympus BX50 Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, an dem eine CC12 Digitalkamera angeschlossen ist. Alle immunzytochemischen Färbungen wurden quantitativ ausgewertet. Die Anzahl zytokeratin- bzw. vimentinpositiver Zellen pro 100 Zellen wurde aus drei zufällig gewählten Sichtfeldern pro Färbung bestimmt.

### **3.3.6.2.2 Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Färbung**

#### **3.3.6.2.2.1 Trachealgewebe**

PAP Färbungen wurden angewandt, um Zytokeratine in equinen Schnitten des Trachealepithels zu lokalisieren. Alle Färbungen wurden zunächst mit 2 % PFA in PBS fixiert. Die Antikörper wurden mit 1% BSA in TBS verdünnt. Nach Inaktivierung endogener Peroxidasen mit 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden die Primärantikörper (100 µl/Ansatz) - Maus-Anti-Zytokeratin-AE1/AE3 (1:50 Verdünnung), Maus-Anti-Zytokeratin-19 Klon b170 (1:100 Verdünnung) und Maus-Anti-Panzytokeratin Klon Lu5 (1:20 Verdünnung) - aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden am folgenden Tag 3 x 5 min mit TBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl des Sekundärantikörpers Ratte-Anti-Maus-IgG (1:100 Verdünnung) wurden die Färbungen für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschungen und nach Auftragen von 100 µl (1:500 Verdünnung) Maus-Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP-Komplex) wurde erneut für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend folgten 3 Waschschritte für 5 min mit TBS und nach Zugabe von 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) wurde der Ansatz 10 min bei RT geschüttelt. Nach dreimaligem Spülen mit TBS und einmaligem Spülen mit destilliertem Wasser folgte die Gegenfärbung mit Papanicolaou-Lösung (1:20 Verdünnung) für 10 Sekunden. Danach wurden die Ansätze unter fließendem Wasser gespült, schließlich in einer aufsteigenden Ethanolreihe (25-100%) entwässert, eingedeckt und mikroskopiert.

#### **3.3.6.2.2.2 Trachealepithelzellen**

Die frisch isolierten ETEZ und Primärkulturen wurden auch mit PAP gefärbt. Zu diesem Zweck wurden die Membraneinsätze im gleichem Verfahren (s. 3.3.6.1.2) vorbereitet und analog zu dem oben beschriebenen Verfahren für Proben der Trachealgewebe (s. 3.3.6.2.2.1) mit PAP gefärbt.

### **3.3.7 Charakterisierung $\beta$ -adrenerger Rezeptoren in primären equinen Trachealepithelzellen**

#### **3.3.7.1 Radioligandenbindungsstudien**

##### **3.3.7.1.1 Sättigungsexperimente**

Zur Ermittlung der maximalen  $\beta$ -adrenergen Rezeptordichte ( $B_{\max}$ ) und der Bindungskonstante ( $K_D$ ) der ETEZ wurden Sättigungsbindungsstudien durchgeführt. Die Zellen wurden - wie unter 3.3.2.1 und 3.3.4.1 beschrieben – isoliert und kultiviert und der epitheliale Ursprung der Zellen mittels Zytokeratin-Färbung bestimmt. Frisch isolierte Zellen und Primärkulturen wurden in der gewünschten Konzentration in Inkubationspuffer resuspendiert. Die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren wurden mit dem Radioliganden [ $^{125}$ I](-) Iodocyanopindolol (ICYP) nach ABRAHAM et al. (2004b) identifiziert. Die Zellsuspension (150.000 Zellen/Assay) wurde in Doppelbestimmung in einem Gesamtvolumen von 250  $\mu$ l mit Inkubationspuffer (10 mM Tris-Base, 154 mM NaCl und 0,55 mM Ascorbinsäure, pH 7,4) und 6 aufsteigenden Konzentrationen (5 bis 160 pM) von ICYP für 90 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert.

Ansätze:

150  $\mu$ l Zellsuspension ( $1,5 \times 10^5$  Zellen)

50  $\mu$ l steigende Konzentration des ICYP

50  $\mu$ l Inkubationspuffer

Unspezifische Bindungen wurden als diejenigen ICYP-Bindungen in verschiedenen Konzentrationen ermittelt, die durch eine hohe Konzentration (1  $\mu$ M) des nicht-selektiven hydrophilen  $\beta$ -adrenergen Rezeptorantagonisten ( $\pm$ )-CGP 12177 nicht verdrängt werden konnten. Die spezifische Bindung wurde dabei definiert als Differenz der Gesamt-ICYP-Bindung zur Bindung in Abwesenheit und die unspezifische Bindung zur Bindung in Anwesenheit von ( $\pm$ )-CGP 12177. Die Inkubation wurde durch Verdünnung des Reaktionsgemisches mit 8 ml eiskaltem Wasch-Puffer (10 mM Tris-Base, und 154 mM NaCl, pH 7,4) beendet und anschließend über Whatman GF/C Glasfaserfilter vakuumfiltriert. Jeder Filter wurde mit weiteren 8 ml des Wasch-Puffers gewaschen. An Filter gebundene Radioaktivität der ICYP wurde mit einem Gamma-Counter (Effizienz > 80 %) detektiert.

### 3.3.7.1.2 Verdrängungsexperimente

Um das Verhältnis der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren auf den Trachealepithelzellen zu ermitteln, wurden Verdrängungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden frisch isolierte ETEZ und Primärzellkulturen (150.000 Zellen/Assay) in einem Gesamtvolumen von 250  $\mu$ l mit Inkubationspuffer (s.3.3.7.1.1) und mit einer fixen ICYP-Konzentration und steigenden Konzentrationen des hochselektiven  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptorantagonisten ICI 118.551 und dem hochselektiven  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptorantagonisten CGP 20712A für 90 min bei 37°C inkubiert. Das weitere Vorgehen dieser Bindungsstudie entspricht dem oben beschriebenen Verfahren (s. 3.3.7.1.1).

Ansätze:

150  $\mu$ l Zellsuspension ( $1,5 \times 10^5$  Zellen)

50  $\mu$ l ICYP (konstante Konzentration: 40-45 pM)

50  $\mu$ l steigende Konzentration ( $10^{-10}$ - $10^{-4}$  M) des unmarkierten Liganden

### 3.3.7.2 Gelelektrophorese und Westernblot

Die Proteinexpression der  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren in den equinen Trachealepithelzellen wurde durch Westernblot-Analyse untersucht. Hierzu wurden die Zellen in Lyse-Puffer (1 mM  $\text{KHCO}_3$ ) homogenisiert. Die Gesamtmenge der Membranproteine wurde nach Lowry et al. (1951) mit BSA als Standard bestimmt. Die Zelllysate wurden in gleicher Menge Lade-Puffer (60 mM Tris-HCl, 25% Glycerol, 2% SDS, 14,4 mM Mercaptoethanol, 0,1% Bromphenolblau) gelöst und 5 min gekocht. Die Proteinproben (20  $\mu$ g/Tasche) wurden auf ein Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gel (SDS-PAGE) aufgetragen. Die SDS-PAGE bestand aus 12% Trenngel und 3% Sammelgel. Der Laufpuffer bestand aus 2,5 mM Tris-Base, 19,2 mM Glycin und 0,1% SDS bei pH 8,3. Das proteinhaltige Gel wurde zunächst bei 90 V für 15 min, dann 150 V für 90 min laufen gelassen. Dabei diente pEqGold Proteinmarker-IV als Größenstandard. Gewebelysate aus Mäusegehirnen fungierte als Positivkontrolle für  $\beta_2$ -Rezeptoren. Bei den Negativkontrollen wurde Lade-Puffer anstatt Primärantikörper verwendet. Die Proteine wurden durch Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20% Methanol in destilliertem Wasser) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde das Wet-Transfer-System für 90 min, 100 mA, 30 V und RT angewandt. Gleichmäßige Proteinverteilung und Transfer wurden dabei durch eine Färbung der Gele mit monoklonalen Mausantikörpern gegen  $\beta$ -Actin bestätigt. Danach wurde der Ansatz für 1 h bei RT mit 3% BSA auf TBST (Blockpuffer) im Schüttler geblockt. Die

verwendeten Antikörper wurden ebenfalls mit Blockpuffer verdünnt. Zuerst wurde die Membran mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern - Anti- $\beta_2$ -adrenergen-Rezeptor (Klon H-73, 1:200 Verdünnung), und Anti- $\beta$ -Actin (1:10000 Verdünnung) als Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde dann 3 x 10 min mit TBST gewaschen, mit alkalischer Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörpern überschichtet und 1 h bei RT inkubiert. Dazu dienten Anti-Kaninchen-IgG (1:1000) für  $\beta_2$ -AR und Anti-Maus-IgG (1:5000) für  $\beta$ -Actin. Schließlich wurde die Membran 3 x 10 min mit TBST gewaschen und zweimal unter fließendem Wasser gespült. Für die Entwicklung der Membran und Visualisierung der Proteinexpression wurde im Dunkeln das Substrat für die alkalische Phosphatase (western blue®) aufgebracht, welches ein Gemisch aus 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP) und Nitroblautetrazolium (NBT) enthält.

### **3.3.7.3 Immunzytochemische Färbung der Trachealepithelzellen für $\beta$ -adrenerge Rezeptoren**

Zur Prüfung der Lokalisation der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren auf primären ETEZ wurden die Zellen immunzytochemisch gegen  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptorantikörper gefärbt. Für die Färbungen wurden frisch isolierte Epithelzellen auf Objektträger übertragen und Zellen aus Primärkulturen in serumfreiem Medium in 24-Well-Platten (200.000 Zellen/Well) auf Deckgläschen bis zu einer Konfluenz von 75% kultiviert. Nach 5-minütiger Fixierung der Zellen mit bei -20°C vorgekühltem Aceton wurden die Proben einmal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden durch Zugabe von 3% BSA für 30 min geblockt. Die vorbereiteten Färbungen wurden dann mit polyklonalem Anti-Human  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptorantikörper des Kaninchens (Klon H-73, 1:100 Verdünnung) bedeckt und 1 h bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschungen je 5 min mit PBS, danach erfolgte die Überschichtung mit Ziege-Anti-Kaninchen-FITC-konjugierten-IgG (1:200 Verdünnung) und Inkubation für 1 h bei RT im Dunkeln. Zellen, die lediglich mit Blockpuffer behandelt wurden, dienten als Negativkontrolle. Nach erneutem Waschen wurden die Färbungen in Floursave Antifade - Reagent eingelegt und mit dem Olympus-BX50-Mikroskop, an dem eine CC12-Digitalkamera angeschlossen ist, Bilder angefertigt.

### **3.3.7.4 Funktionelle Charakterisierung $\beta$ -adrenerger Rezeptoren an equinen Trachealepithelzellen**

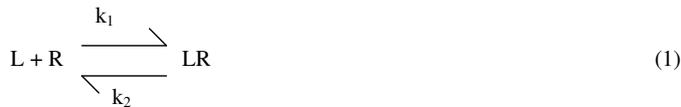
#### **3.3.7.4.1 cAMP -Assay**

Die ETEZ wurden – wie unter 3.3.2.1 und 3.3.4.1 beschrieben – isoliert und kultiviert. Die isolierten Zellen wurden nach dem letzten Zentrifugationsvorgang in PBS-Puffer, der 100  $\mu$ M 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (Phosphodiesterasehemmer) enthielt, aufgenommen. Der Versuchsansatz basiert auf der Methode von Abraham et al. (2004). Aliquots von 300  $\mu$ l Zellsuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen) wurden bei 37°C für 15 min mit 30  $\mu$ l PBS/IBMX (basaler cAMP Gehalt) oder (-)-Isoproterenol, (-)-Epinephrin und (-)-Norepinephrin (5-Konzentrationen zwischen  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) in einem Gesamtvolumen von 330  $\mu$ l inkubiert. Desweiteren wurde die Isoproterenol-induzierte cAMP-Bildung in An- und Abwesenheit des hochselektiven  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptorantagonisten ICI 118.551 (100 nM) bzw. des hochselektiven  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptorantagonisten CGP 20712A (300 nM) untersucht. Die Reaktion wurde durch 5-minütiges Erhitzen der Proben auf 95°C gestoppt. Anschließend wurden die Proben bei 4°C gekühlt und bei 2040 x g für 10 min zentrifugiert. Es wurden dann von jedem Überstand 2 x 100  $\mu$ l Aliquot entnommen und sofort bei -20°C bis zur cAMP-Bestimmung eingefroren. Der Gehalt des intrazellulären cAMP wurde in den aufgetauten Proben mittels AlphaScreen® -cAMP-Assay-Kit nach Anweisung des Herstellers gemessen: Durchgeführt wurde der Assay in einer Dreifachbestimmung mit einem Volumen von 25  $\mu$ l in 384-Well-Mikrotiterplatten bei RT. Eine Standard-cAMP-Reihe mit Konzentrationen von 5  $\mu$ M bis 50 pM wurde durch Verdünnung von 15  $\mu$ l einer 50  $\mu$ M cAMP-Standardlösung in PBS in Gegenwart von 100  $\mu$ M IBMX hergestellt. 5  $\mu$ l Probe bzw. 5  $\mu$ l Standard-cAMP wurden jeweils zusammen mit 0,1  $\mu$ l Anti-cAMP-Acceptor-Beads in 10  $\mu$ l Assay-Puffer (5 mM HEPES, 1x HBSS, 0,1% BSA, pH 7,4) pro Well pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend bei 40 x g für 1 min zentrifugiert und bei RT im Dunkeln 30 min inkubiert. Eine Mischung, die 0,1  $\mu$ l Streptavidin-Donor-Beads (10 U/ $\mu$ l) und 0,0075  $\mu$ l biotinhaltige cAMP (133 u/ $\mu$ l) in 10  $\mu$ l Lyse-Puffer (5 mM HEPES, 0,1% BSA, 0,3% Tween-20, pH 7,4) enthielt, wurde zugegeben, der Ansatz mit 40 x g für 1 min zentrifugiert und für 1 h inkubiert, wobei die Inkubationen mit AlphaScreen Beads unter grün-gefiltertem Licht stattfanden. Die Signale des AlphaScreen (cps-counts per second) wurden mit dem Fusion-Alpha® multilabel Reader gemessen.

### 3.4 Datenanalyse und statistische Auswertung

#### 3.4.1 Kinetik der Rezeptorbindung

Die Bindungskinetik bestimmt die Affinität eines Liganden zum Bindungspartner, beeinflusst damit die Bindungstendenz und den Gleichgewichtszustand (SWINNEY 2008). Die Bindung eines Liganden an einer homogenen Rezeptorbindungsstelle zu einem Rezeptor-Liganden-Komplex ist eine reversible Reaktion, die dem Massenwirkungsgesetz folgt und über Gleichung (1) beschrieben wird (LIMBIRD 1997):



wobei

L = Ligand

R = Rezeptor

LR= Ligand-Rezeptor-Komplex (LR-Komplex)

$k_1$  = Assoziationskonstante

$k_2$  = Dissoziationskonstante

Für die Bindungsreaktion wurde der Ansatz aus Rezeptoren und Radioliganden inkubiert, um  $\beta$ -Rezeptoren zu identifizieren. Die Konzentration und die Dauer der Inkubation, die für eine nachweisbare Bindung nötig sind, werden durch das Massenwirkungsgesetz subsequent beeinflusst:

$$\text{Initiale Assoziationsrate} = k_1[\text{L}][\text{R}] \quad (2)$$

$$\text{Initiale Dissoziationsrate} = k_2[\text{LR}] \quad (3)$$

Wobei

[L] = Konzentration des freien Radioliganden

[R] = Konzentration des freien Rezeptors, und

[LR] = Konzentration des Ligand-Rezeptor-Komplexes, ( $[\text{R}]_{\text{Tot}} = [\text{LR}] + [\text{R}]$ )

Im Gleichgewichtszustand entspricht die Dissoziationsrate der Assoziationsrate

$$k_1[\text{L}][\text{R}] = k_2[\text{LR}] \quad (4)$$

Das Verhältnis der Reaktanden, um einen LR-Komplex zu bilden, ist:

$$[\text{L}][\text{R}] / [\text{LR}] = k_2/k_1 = K_D, \text{ in Mol} \quad (5)$$

$K_D$  = Gleichgewichts-Dissoziationskonstante

$$[\text{LR}] / [\text{L}][\text{R}] = k_1/k_2 = K_A = \text{mol}^{-1} \quad (6)$$

$K_A$  ist die (Gleichgewichts) Assoziationskonstante.

$K_D$  wird am häufigsten herangezogen, um die Affinität des Rezeptors zum Liganden zu beschreiben, weil die Einheit mol resultiert und nicht wie bei der (Gleichgewichts) Assoziationskonstante  $\text{mol}^{-1}$ . Ein Anstieg der  $K_D$  geht einher mit der Abnahme der Rezeptoraffinität zum (Radio)liganden.

$[\text{LR}]$  = Konzentration des Ligand-Rezeptor-Komplexes, definitionsgemäß die Konzentration des an den Rezeptor gebundenen Liganden  $[\text{LR}]$  wird später als B bezeichnet

$[\text{R}]_{\text{Tot}}$  = Gesamtkonzentration der Rezeptorbindungsstellen =  $B_{\text{max}} = [\text{R}] + [\text{LR}]$

$y$  = Anteil der Sättigung von R mit L

$$y = [\text{LR}] / [\text{R}]_{\text{Tot}} = B / B_{\text{max}} \quad (7)$$

$$B = [\text{LR}] = y [\text{R}]_{\text{Tot}}$$

$$1-y = \text{Anteil des unbesetzten Rezeptors} \quad (8)$$

$$[\text{R}] = (1-y) [\text{R}]_{\text{Tot}}$$

Die Ergebnisse der Radioligandenbindungsstudien werden ausgedrückt als Bruchteil der Besetzung des Rezeptors ( $y$ ).

Für die Beziehung zwischen  $y$ ,  $[\text{L}]$  und  $K_D$  im Gleichgewichtszustand gilt:

$$\text{Assoziationsrate} = k_1[\text{L}][\text{R}] = k_1(1-y)[\text{R}]_{\text{Tot}} \quad (9)$$

$$\text{Dissoziationsrate} = k_2[\text{LR}] = k_2(y)[\text{R}]_{\text{Tot}} \quad (10)$$

Im Gleichgewichtszustand entspricht die Dissoziationsrate der Assoziationsrate und :

$$k_1(1-y)[\text{R}]_{\text{Tot}} = k_2(y)[\text{R}]_{\text{Tot}}$$

geteilt durch  $[\text{R}]_{\text{Tot}}$

$$k_1[1-y] - k_1[L]y = k_2y, \text{ umstellen nach } y,$$

$$y = k_1[1-y] = y(k_2 + k_1[L])$$

$$y = (k_1[1-y]) / (k_2 + k_1[L])$$

rechte Seite der Gleichung geteilt durch  $k_1$ :

$$y = [1-y] / (k_2/k_1 + [L])$$

einsetzen von  $K_D$  für  $k_2/k_1$ ,

$$y = [L] / (K_D + [L]) \quad (11)$$

Sollte die Rezeptorbindungsstelle physiologisch relevant sein, so sollte diese sättigbar sein, weil eine endliche Dichte der Rezeptoren vorausgesagt wird. Um die Sättigung zu untersuchen, wird die Bindungstendenz als Funktion ansteigender Konzentrationen des Radioliganden gesehen. Wenn die gebundene Radioaktivität die Bindung eines einzelnen Radioliganden zu einem sättigbaren Rezeptor einer bestimmten Affinität  $K_D$  zum Liganden  $^*L$  repräsentiert, dann resultiert das Diagramm,  $[\text{LR}]$  gegen  $[\text{L}]$  aufgetragen, in einer rechtwinkligen Hyperbel, weil

$$y = [\text{LR}]/[\text{R}]_{\text{Tot}} = [\text{L}]/(\text{K}_D + [\text{L}]) \quad (12)$$

gilt

$$[\text{LR}] = ([\text{L}][\text{R}]_{\text{Tot}})/(\text{K}_D + [\text{L}]),$$

Und für eine rechtwinklige Hyperbel gilt:

$$y = (ax)/(b+x)$$

$\text{K}_D$  ist das Maß der Affinität des Rezeptors zum Liganden, also die Konzentration des Liganden, die den Rezeptor halb-maximal besetzt:

$$[\text{LR}] = [\text{R}]_{\text{Tot}}/2$$

Aus Gleichung (12) folgt:

$$[\text{R}]_{\text{Tot}} = (2[\text{L}][\text{R}]_{\text{Tot}})/(\text{K}_D + [\text{L}])$$

Geteilt durch  $[\text{R}]_{\text{Tot}}$ :

$$1 = 2[\text{L}]/(\text{K}_D + [\text{L}])$$

Daraus folgt:

$$\text{K}_D + [\text{L}] = 2[\text{L}] \text{ und } \text{K}_D = [\text{L}]$$

$$\text{K}_D = [\text{L}], \text{ führt zu der Beziehung: } [\text{LR}] = [\text{R}]_{\text{Tot}}/2 = B_{\text{max}}/2$$

Die Konsequenz der isothermen Sättigung, im Diagramm als  $[\text{*LR}]$  gegen  $[\text{*L}]$  aufgetragen, ist eine rechtwinklige Hyperbel, wobei die x-Achse  $[\text{R}]_{\text{Tot}}$  oder  $B_{\text{max}}$  darstellt, wie im Folgenden gezeigt:

Weil

$$[\text{LR}] = ([\text{L}][\text{R}]_{\text{Tot}})/(\text{K}_D + [\text{L}])$$

$$[\text{LR}](\text{K}_D + [\text{L}]) = [\text{L}][\text{R}]_{\text{Tot}}$$

$$[\text{LR}]\text{K}_D + [\text{L}][\text{LR}] = [\text{L}][\text{R}]_{\text{Tot}}$$

$$[\text{L}]( [\text{R}]_{\text{Tot}} - [\text{LR}] ) = [\text{LR}]\text{K}_D$$

$$[\text{L}] = ([\text{LR}]\text{K}_D)/([\text{R}]_{\text{Tot}} - [\text{LR}])$$

Es folgt  $[\text{LR}] \rightarrow [\text{R}]_{\text{Tot}}$ ,  $[\text{L}] \rightarrow \infty$  weil  $[\text{R}]_{\text{Tot}} - [\text{LR}] \rightarrow 0$ . 0 durch etwas Unendliches ergibt etwas Unendliches. Das bedeutet,  $B_{\text{max}}$  wird nur durch unendliche Konzentrationen von  $[\text{*L}]$  erreicht. Demnach kann  $B_{\text{max}}$  niemals experimentell beobachtet werden.  $B_{\text{max}}$  kann näherungsweise bestimmt, aber nie genau erreicht werden.

### 3.4.2 Analyse der Bindungsdaten und Statistik

Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) und die maximale Rezeptordichte ( $B_{max}$ ) wurden für ICYP nach der Methode von Scatchard (1949) mit nicht linearer Regressionsanalyse bestimmt. Die Daten aus den Bindungsstudien wurden herangezogen, darüber eine hyperbole Kurve angelegt und mittels iterativer nicht linearer Regression die Affinität ( $K_D$ ) und Rezeptordichte ( $B_{max}$ ) ermittelt. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der Bindungsstudien auch mittels linearer Regression ausgewertet. Die Anzahl der Rezeptoren pro Zelle wurde errechnet, indem die ICYP-Bindung von cpm in  $\text{fmol}/10^6$  Zellen umgerechnet und mit der Avogadro-Konstante multipliziert wurde (Abraham 2001). Die Daten der Verdrängungsexperimente wurden dagegen unter Zuhilfenahme einer sigmoidalen Kurve ausgewertet. Die resultierenden  $IC_{50}$ -Werte wurden mittels Cheng-Prusoff-Gleichung (Cheng u. Prusoff 1973) in  $K_i$ -Werte umgerechnet:

$$K_i = IC_{50}/([L]/K_D)+1$$

wobei  $IC_{50}$  als die Konzentration definiert wurde, die nötig war, um 50% der spezifischen ICYP-Bindung zu inhibieren und  $[L]$  für die Konzentration an ICYP im Assay stand.  $K_D$ -Werte für ICYP wurden aus der Sättigungsbindung ermittelt. Zur statistischen Analyse wurde der F-Ratio Test durchgeführt, um festzustellen, ob die der Inhibition-Konzentrations-Kurven für ein oder zwei Bindungsstellen von ICYP sprechen.

Die Konzentrationsbestimmung des cAMP im AlphaScreen-Assay erfolgte durch Interpolation aus Eichkurven, die aus einer sigmoidalen Kurve mit variabler Steigung (Hill-Slope) mittels folgender Gleichung abgeleitet wurden:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top}-\text{Bottom})/(1+10^{((\log EC_{50}-x) \cdot \text{Hill slope})})$$

$$X = \text{cAMP [nM]} = 10^{\frac{\log_{10} EC_{50} - (\log_{10} ((\text{Top}-\text{Bottom})/ Y[\text{cps}] - \text{Bottom}) - 1) / \text{Hill slope}}{}}$$

wobei  $x$  die Konzentration des cAMP in nM darstellt und  $y$  das AlphaScreen-Signal aus counts per second (cps).

Die Konzentration des Agonisten, der eine halb-maximale cAMP-Bildung induzierte ( $EC_{50}$ ), wurde ermittelt, indem die Daten in folgende Gleichung eingesetzt wurden:

$$E = E_{max} \times C^h / (EC_{50}^h + C^h),$$

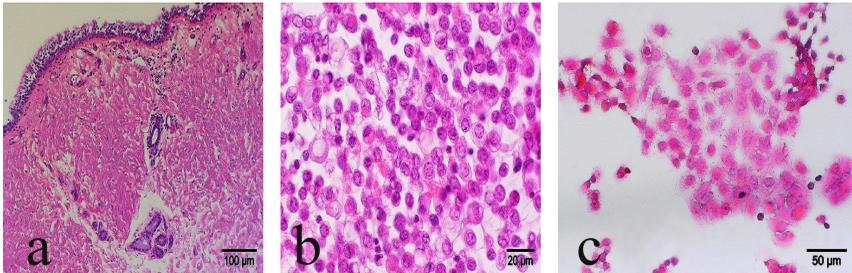
wobei  $E$  die relative Menge des produzierten cAMP,  $E_{max}$  das relative Maximum der cAMP-Bildung,  $C$  die Konzentration des Agonisten und  $h$  die Hill darstellen.

Die aufgeführten, experimentell gewonnenen Ergebnisse sind Mittelwert  $\pm$  SEM aus  $n$  Untersuchungen dargestellt. Die Auswertungen und Berechnungen der Ergebnisse aus den Bindungsstudien und dem cAMP-Assay wurden mit Prism programme (version 4.01, Graphpad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede

zwischen den verschiedenen Ansätzen wurden über den Non-paired two-tailed student's T-test abgeleitet. In allen Untersuchungen galt für eine statistische Signifikanz  $p < 0,05$ .

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Morphologische Befunde der Trachealgewebe und Trachealepithelzellen



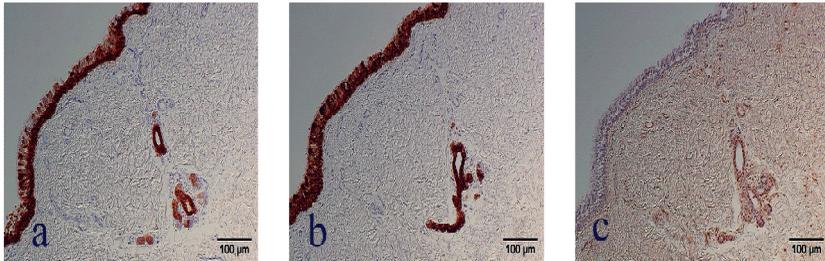
**Abb. 11:** Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Trachealgewebe und isolierten und kultivierten Epithelzellen

Trachealgewebe mit hochprismatischen, mehrreihigen Flimmerepithelzellen mit darunter liegendem Bindegewebe (a), primäre Trachealepithelzellen nach Isolation und 6 Tagen nach Kultivierung und Zytospinaufbereitung (b) und Wachstum auf Deckgläschen in 24-Well-Platten (c).

Durch die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung (Abb. 11 a) an Formalinfixierten Paraffinschnitten von nativem Trachealgewebe sind die hochprismatischen mehrreihigen Flimmerepithelzellen gut zu sehen. Auf der Oberfläche des Epithels sind Kinozilien der Zilienzellen und Zellkerne relativ dunkelblau gefärbt zu sehen. Die Basalmembran, die frei von Zellkernen ist, lässt sich als Aussparung erkennen. Die Basalzellen befinden sich unmittelbar unter der Basalmembran und lassen sich aufgrund der Lage identifizieren. Innerhalb der Basalmembran befindet sich eine Bindegewebsschicht, die als Lamina propria mucosae bezeichnet wird. In Rahmen der Präparation wurde das Trachealepithel vollständig von der Lamina propria abgelöst. Die Basalmembran bleibt dabei, trotz Trypsin-Einwirkung und Präparation mit dem Skalpell, als Barriere zum Bindegewebe weitgehend erhalten. Die isolierten und kultivierten primären Trachealepithelzellen (ETEZ) wurden auch HE-gefärbt, man sieht typische, große und runde Epithelzellen nach 6-tägiger Kultivierung (Abb. 11 b und c).

Darüber hinaus wurde auch an Paraffinschnitten der nativen Trachealgewebe eine Reihe von Zytokeratin-Antikörpern auf deren Reaktivität getestet (Abb. 12). Die Immunreaktivität des Trachealepithels war stärker für Anti-Zytokeratin 19 (Abb. 12 a) und Anti-Zytokeratin

AE1/AE3 (Abb. 12 b), jedoch schwächer ausgeprägt für Anti-Panzytokeratin (Abb. 12 c). Diese Befunde liefern die Voraussetzung für einen geeigneten Epithelzellmarker der ETEZ. In allen Abbildungen der immunhistochemischen Färbung kann ebenfalls die Epithelmorphologie gut erkannt werden, d.h. mehrreihige, hochprismatische Trachealepithelzellen auf der Basalmembran.



**Abb. 12:** Immunperoxidase-Färbung von Paraffinschnitten aus nativen Trachealgeweben

Die Färbung mit Anti-CK19 (a), Anti-CK-AE1/AE3 (b) und Anti-Pan-CK(c) ist hier gezeigt. Die Schnitte wurden in 10% Formalin fixiert und über Nacht bei 4°C mit den Primärantikörper, Maus-Anti-CK19 (1:100 Verdünnung), Maus-Anti-CK-AE1/AE3 (1:50 Verdünnung) und Maus-Anti-Pan-CK (1:20 Verdünnung) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden 100 µl einer 1:100 Verdünnung des Sekundärantikörpers Ratte-Anti-Maus-IgG aufgetragen und der Ansatz bei RT für 30 min inkubiert. Die Ansätze wurden erneut dreimal gewaschen, danach wurden 100 µl einer 1:500 Verdünnung Maus-Peroxidase-Anti-Peroxidase aufpipettiert und die Ansätze erneut 30 min bei RT inkubiert. Vor dem Aufbringen einer DAB-Lösung und Inkubation für 10 min bei RT wurden die Ansätze 3 x 5 min mit TBS gewaschen. Es folgte Spülen mit TBS und destilliertem Wasser und die abschließende Gegenfärbung mit Papanicolaou-Lösung (1:20 Verdünnung) für 10 sek. Die Präparate wurden unter fließendem Wasser gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (25-100%) entwässert, mit Medium bedeckt und mikroskopische Aufnahmen angefertigt.

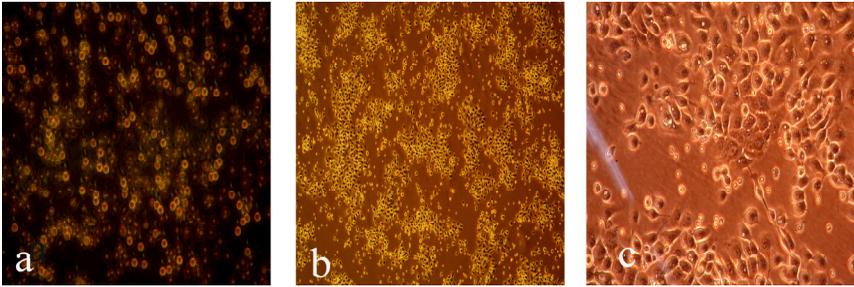
## **4.2 Isolation und Kultivierung der equinen Trachealepithelzellen**

### **4.2.1 Zellausbeute nach Trypsinverdau**

Nach enzymatischem Verdau des mechanisch zerkleinerten Trachealgewebes mit 0,25 % Trypsin-EDTA in HBSS für 2 h bei 37°C, Filtration und Zentrifugation wurde die Zellausbeute ermittelt. Die Separation der Fibroblasten durch zeitabhängige Adhäsionsversuche machte eine hohe Ausbeute vitaler Epithelzellen möglich. Bei der Aufarbeitung von ca. 500 mg Trachealgewebe ergab sich im Mittelwert eine Zellzahl von  $6,1 \pm 0,63 \times 10^6$  Zellen ( $n = 11$ ). Das Auszählungsverfahren mit Trypanblau ergab dabei  $94,7 \pm 1,17\%$  ( $n = 11$ ) der Zellen als vital. Der Trypsinverdau maschinell zerkleinerten Trachealgewebes (200-500  $\mu\text{m}$ ) ergab ein ähnliches Resultat mit der Zellzahl von  $4,42 \pm 1,1 \times 10^6$  Zellen/500 mg Gewebe, die Zellvitalität lag bei diesem Isolationsverfahren um  $93,66 \pm 1,13\%$  ( $n = 3$ ).

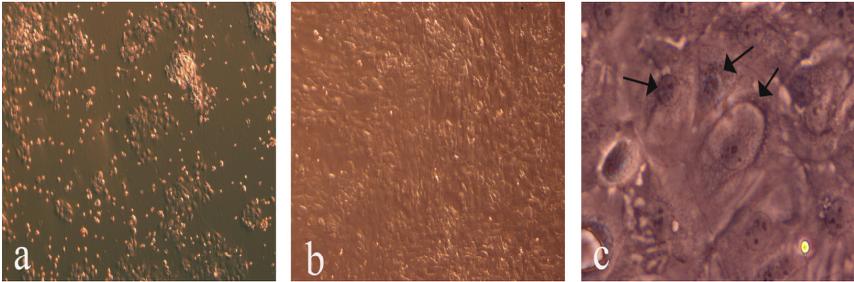
### **4.2.2 Morphologie und Kulturverhalten der equinen Trachealepithelzellen**

Phasenkontrastmikroskopie der frisch aus dem Zellverband gelösten Zellen zeigte eine gemischte Zellpopulation aus einer größeren Anzahl Epithelzellen mit und ohne Zilien aber auch Kontaminanten nicht-epithelialen Ursprungs (Abb. 13 a). Diese nicht-epithelialen Zellen konnten dennoch durch das stufenweise Ausplattieren, anschließende Kultivierung und sukzessiven Mediumwechsel eliminiert werden, was letztlich zu einer einheitlichen Zellpopulation führte, wie auch durch die immunzytochemische Färbung (Abb. 19) belegt werden konnte. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung frisch isolierter Trachealepithelzellen fiel auf, dass Zellgruppen von 2-5 der Epithelzellen aktive kreisförmige Bewegung zeigten, die auf einen Zilienschlag hindeuteten. Eine Unterscheidung zwischen Basalzellen und Becherzellen war nicht sicher möglich. Die isolierten Zellaggregate wuchsen bei der ersten Ausplattierung nicht am Grund der Kulturschale an.



**Abb. 13:** Wachstumsverhalten equiner Trachealepithelzellen in den Transwell-Inserts Direkt nach der Isolation (a) und nach 4-tägiger Kultivierung ( $1,5 \times 10^5$  Zellen/Well) in serumfreiem AECGM auf Kollagen-beschichteten Transwell-Inserts (b, c). Vergrößerung: 200 x (a), 100 x (b), 400 x (c).

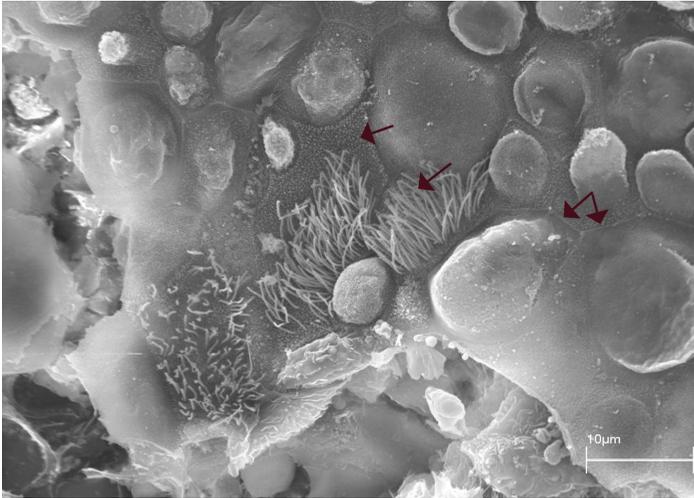
Die Zellen adhärten innerhalb eines Tags nach Aussaat und wuchsen zu Monolayern in ca. 6 Tagen. Die Zellen der Primärkultur  $P_0$  (Abb. 14) neigten dazu, „Inseln“ zu bilden, d.h. sie adhärten und proliferierten bevorzugt als größere Zellaggregate (Abb. 14 a). In unserem Versuchsaufbau erreichten die ETEZ-Kulturen innerhalb einer Woche eine Konfluenz von > 80 % (Abb. 14 b) und bildeten eine einzelne, kubische Zellschicht mit kopfsteinpflasterartiger Morphologie und sichtbaren Zell-Zell-Kontakten. Im Laufe der Kultivierung entwickelten sich daraus morphologisch hochprismatische, mehrreihige Epithelzellen (Abb. 13 c) mit Zellen, die phasenkontrastmikroskopisch sichtbare Zilien zeigten (Abb. 14 c, Pfeile).



**Abb. 14:** Wachstumsverhalten equiner Trachealepithelzellen auf Kulturschalen

Differenzielle Interferenz-Kontrastmikroskopie der ETEZ, kultiviert in serumfreiem AECGM auf unbeschichteten Kulturschalen am Tag 2 (a), bei 100% Konfluenz am 6. Tag (b) und Phasenkontrastmikroskopie am 6. Tag (c). Pfeile zeigen den während der Mikroskopie sichtbaren Zilienschlag (c). Vergrößerung: 100 x (a), 400 x (b), 630 x (c).

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Primärkulturen gaben Aufschluss darüber, dass sich das Epithel polarisierte. Die proliferierten Zellen zeigten nach wie vor die charakteristische Morphologie des in situ-Epithels durch nachweisbare Ausbildung von Zilien, apikalen Mikrovilli und Zell-Zell-Kontakten (Abb. 15). Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Primärkulturen des equinen Trachealepithels sind zilientragende und zilienlose Zellen zu sehen.

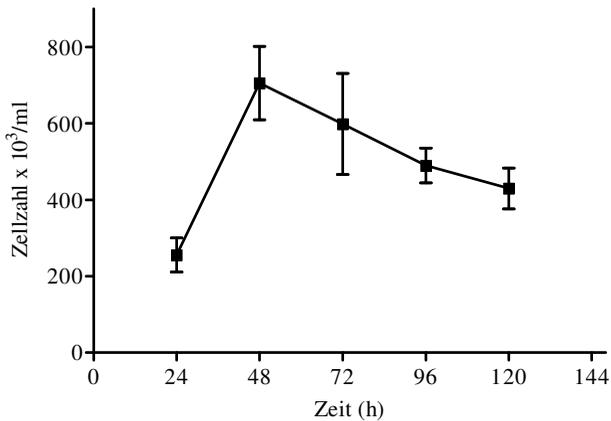


**Abb. 15:** Ultrastrukturelle Darstellung des Verbandes der in Transwell-Inserts kultivierten Trachealepithelzellen

ETEZ wurden in einer Dichte von  $4,5 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf serumfreiem AECGM auf Kollagen beschichtete Transwell-Inserts (0,4 μm Porengröße) ausgesät. Die apikale Seite der Transwell-Insert wurde dabei mit 300 μl, die basolaterale Seite mit 1 ml AECGM gefüllt und die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am 4. Tag wurde das Medium der apikalen Seite abgenommen, um dort eine Gasphase zu simulieren. Die Membraneinsätze von kultivierten Zellen wurde am 8. Tag für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet. Die Pfeile zeigen von links nach rechts epitheliale Ultrastrukturen: Microvilli, Zilien und Zell-Zell-Kontakte. Skalierung ist 10 μm.

#### 4.2.3 Populationsverdopplungszeit

Die Populationverdopplungszeit wurde mit ETEZ aus Primärkulturen bestimmt, die in einer hohen Dichte von  $10^6$  Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät wurden. Manuelles Auszählen mit geringeren Zelldichten war praktisch kaum möglich, daher wurden hohe Zelldichten dazu herangezogen, um die Populationsverdopplungszeit festzulegen. Wie aus Abb. 16 ersichtlich, konnte die Populationsverdopplungszeit anhand der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen auf ~19 h geschätzt werden.



**Abb. 16:** Wachstumskurve der primären equinen Trachealepithelzellen

Die Zellen wurden in serumfreiem AECGM auf unbeschichteten 6-Well-Platten in einer Dichte von  $10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> kultiviert. Die Populationsverdopplungszeit wurde aus der exponentiellen Phase der Wachstumskurve abgelesen. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M aus drei Experimenten, die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

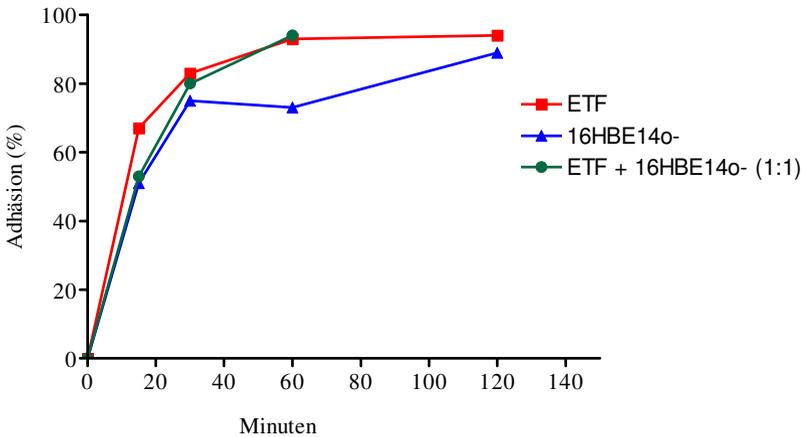
#### 4.2.4 Magnetische Separierung der equinen Trachealepithelzellen

Da bei Isolation und Kultivierung primärer Epithelzellen die Reinheit durch mesenchymale Zellen wie Fibroblasten beeinflusst werden kann, sollte im nächsten Schritt durch magnetische Separierung das Vorhandensein solcher Epithelzellkontaminanten geprüft werden. Die Separation von Zellen, z.B. equinen Fibroblasten, die reine equine Primärepithelzellkultur kontaminieren können und die positiv für das Epitop der equinen Fibroblasten (Maus-Anti-Human-Fibroblast-MicroBeads) sind, ergab eine Fraktion von  $6,4 \pm 3,80\%$  (Tabelle 1), während  $2,70 \pm 0,65\%$  positive humane Fibroblasten (Cos-1) für humane Antikörper festgestellt wurden. Hingegen führten Kontrollen ohne Primärantikörper nur zu einer Fraktion von ca.  $4,70 \pm 0,30\%$ . Der monoklonale Anti-Fibroblast-Antikörper gegen das Epitop der Pferde-Trachealfibroblasten markierte diese Zellen schlecht, dies deutet darauf hin, dass der Antikörper eine eingeschränkte Kreuzreaktivität mit dieser Tierspezies besitzt und MACS mit dem humanen Antikörper stellt sich für die Detektion der Pferdefibroblasten als ungeeignet dar.

ETF	Cos-1	Negativ-Kontrolle
6,4 ± 3,8	2,70 ± 0,65	4,70 ± 0,30

Tabelle 1: Anzahl der MACS-separierten equinen Trachealfibroblasten (ETF).

Daten sind Mittelwerte ± S.E.M (n = 3), die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.



**Abb. 17:** Differenziertes Adhäsionsverhalten der equinen Trachealfibroblasten (ETF) und der humanen bronchialen Epithelzelllinien (16HBE14o-)

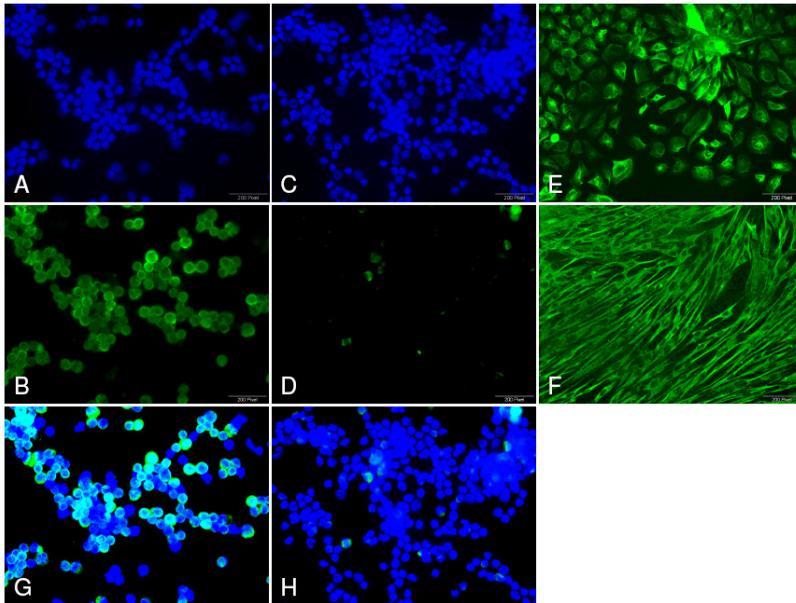
ETF, 16HBE14o- und ein 1:1-Gemisch beider Zellarten mit einer Zelldichte von  $2-3 \times 10^6$  Zellen/ml wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in 5 ml serumfreiem AECGM auf unbeschichteten Kulturschalen inkubiert und adhärenente Zellen wurden nach unterschiedlichen Intervallen ausgezählt.

Wie in Abb. 17 gezeigt, adhären die meisten Fibroblasten über differentielle Adhäsion innerhalb von 30 min rasch auf dem Grund der Kulturschale. Dadurch war es möglich, größere Mengen der freischwimmenden Epithelzellen vorsichtig im abgenommenen Medium auf neuen Kulturschalen auszusäen. Durch dieses Vorgehen war eine Trennung der ETEZ von Fibroblasten möglich. Proliferation der noch vorhandenen Fibroblasten in der so gewonnenen

Epithzellfraktion wurde durch Kultivierung in serumfreiem AECGM und durch Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren unterdrückt.

#### **4.2.5 Expression von Epithelzellmarkern**

Um die Zusammensetzung der Zellpopulation frisch isolierter sowie kultivierter equiner Trachealepithelzellen (ETEZ) zu charakterisieren, wurden immunzytochemische Analysen durchgeführt. Dabei wurden Zytokeratine und Vimentin gefärbt, da sie als Marker für die Differenzierung von Epithel- und Mesenchymzellen dienen. Die Fluoreszenzfärbung frisch isolierter Zellen mit dem Anti-Human-Zytokeratin 5/6/18 Antikörper ergab, dass  $93,57 \pm 1,67$  % ( $n = 11$ ) der Zellen positiv gegen Zytokeratine waren. Die Fluoreszenzfärbung mit dem Anti-Vimentin-Antikörper resultiert nur in  $9,83 \pm 0,94$  % ( $n = 11$ ) immunpositiven Zellen. Dieses Ergebnis konnte allerdings durch ein Artefakt während der Färbung zu erklären sein, da Vimentin-positive Zellen ein unregelmäßiges Färbungsmuster aufwiesen (Abb. 18 g und h). Als Negativkontrollen dienten frisch isolierte und kultivierte Epithelzellen und Fibroblasten, die statt mit primären Antikörpern mit PBS versetzt wurden.

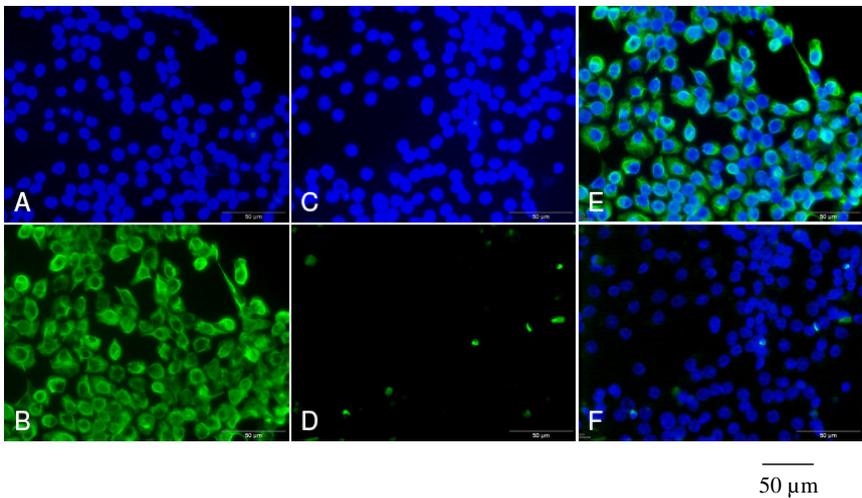


32  $\mu$ m

**Abb. 18:** Immunfluoreszenzfärbung frisch isolierter equiner Trachealepithelzellen

Die isolierten Zellen wurden durch Cytospin auf Objektträger aufzentrifugiert und mit kaltem Aceton fixiert. Die Zellen wurden daraufhin mit dem Anti-CK 5/6/18 (1:100) (A, B, E) sowie mit dem Anti-Vimentin (1:100) (C, D, F) für 1 h bei RT inkubiert. Die Proben wurden 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit dem Sekundäntikörper (Ziege-Anti-Maus- IgG-FITC, 1:200 Verdünnung) sowie dem Zellkernfarbstoff (DAPI) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Proben mit Fluorsave- Antifade-Reagent eingebettet und mit dem Olympus-BX50-Floureszenzmikroskop über die CC12-Digitalkamera Bilder aufgenommen. Die Abbildungen A und C zeigen DAPI-Färbungen, B mit Anti-Zytokeratin und D mit Anti-Vimentin. Die 16HBE14o- sowie equine Trachealfibroblasten dienten als Positivkontrolle für Anti-Zytokeratin (E) bzw. Anti-Vimentin (F). Wie die Overlays zeigen, wurden Zytokeratine (G), im Gegensatz zu Vimentin (H) von einem großen Teil der isolierten Zellen exprimiert. Skalierung entspricht 32  $\mu$ m. Vergrößerung 200 x

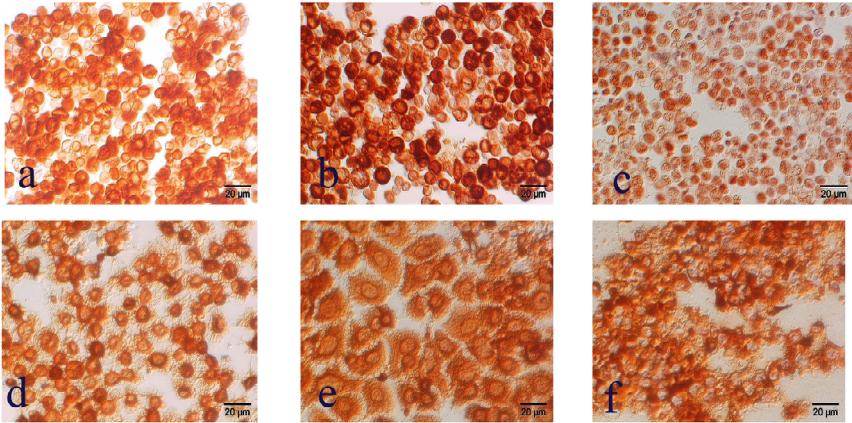
Die immunzytochemischen Färbungen der primären kultivierten ETEZ mit dem Anti-Zytokeratin 5/6/18-Antikörper zeigten nahezu 100 %ige Reaktion (n = 5) gegen Zytokeratin (Abb. 19 E und F). Zellen, die Vimentin exprimieren, konnten nicht detektiert werden, was darauf hinweist, dass die isolierten primären Trachealepithelzellen aus einer homogenen Zellpopulation bestehen, die lediglich Zytokeratine exprimieren. In den Negativkontrollen, bei denen der Antikörper nicht verwendet wurde, konnten bei allen Proben keine positiven Signale auf die Färbungen mit den jeweiligen Antikörpern detektiert werden.



**Abb. 19:** Immunfluoreszenzfärbung equiner Trachealepithelzellen in der Primärkultur

Die primären equinen Trachealepithelzellen wurden auf Deckgläschen in 24-Well-Platten (200.000 Zellen/Well) für sechs Tage ausgesät. Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff DAPI (A, C) und mit den bereits erwähnten Antikörpern Anti-Zytokeratin 5/6/18 (B) sowie Anti-Vimentin (D) gefärbt. Die Abbildungen A und C korrespondieren mit denen von B und D. Overlays der Färbungen von DAPI mit Zytokeratin bzw. Vimentin werden in Abbildungen E und F gezeigt. Positive FITC-Signale sind in der Farbe Grün dargestellt. Skalierung entspricht 50 µm. Vergrößerung 200 x

Die Färbung mit Hilfe der Peroxidase-Anti-Peroxidase frisch isolierter sowie kultivierter ETEZ gegen die Zytokeratine 19, AE1/AE3 und Panzytokeratin zeigten eine starke Expression dieser Proteine in den untersuchten Zellen (Abb. 20).

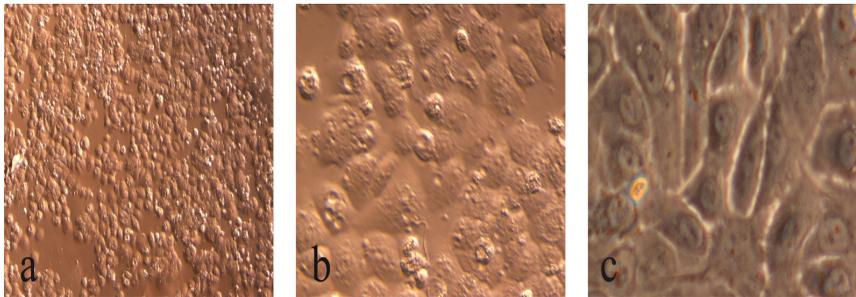


**Abb. 20:** Nachweis des Epithelzellmarker-Zytokeratin in equinen Trachealepithelzellen mit Hilfe der Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Färbung

Die frisch isolierten Zellen (a, b, c) sowie die Primärkulturen (d, e, f) wurden in 2%igem PFA fixiert. Die monoklonalen Antikörper Anti-CK 19 (1:100) (a, d), Anti-CK-AE1/AE3 (1:50) (b, e) und Anti-Panzytokeratin (1:20) (c, f) wurden auf den Deckgläschen über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden 3 x 5 min mit TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der zweite Antikörper (Ratte-Anti-Maus-IgG, 1:100) auf die Zellen gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen wurde Peroxidase-Anti-Peroxidase (1:500) dazugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Nach Waschen mit TBS-Puffer wurden die Ansätze 10 min bei RT mit DAB Lösung inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit TBS und destilliertem Wasser gespült, in einer Alkoholreihe entwässert, eingebettet und visualisiert. Die Skalierung ist 20 µm.

#### 4.2.6 Kulturbedingungen und Passagierung der equinen Trachealepithelzellen

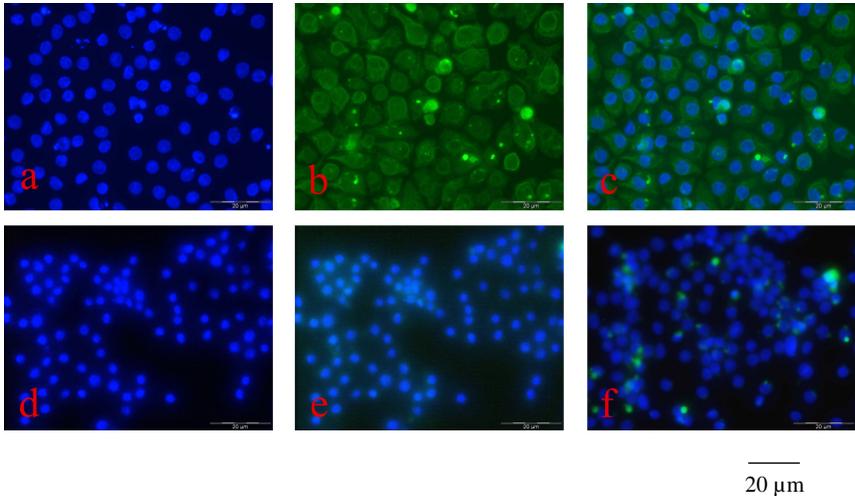
Es wurden Versuche durchgeführt, um ein Protokoll für die Subkultivierung von ETEZ und Primärkulturen ( $P_0$ ) zu etablieren. Primärkulturen wurden mit Trypsin-EDTA trypsinisiert und in MEM mit 10% fetalem Kälberserum subkultiviert. Die trypsinisierten Zellen waren allerdings nicht in der Lage, sich an den Boden der Zellkulturflaschen anzuheften und wurden daraufhin von Fibroblasten überwachsen. Auch eine Beschichtung mit Kollagen aus Rattenschwanz trug nicht zu einer Verbesserung bei.



**Abb. 21:** Wachstumsverhalten passagierter equiner Trachealepithelzellen ( $P_1$ )

Die ETEZ wurde 12 Tage auf Deckgläschen in 24-Well-Platten mit serumfreiem AECGM kultiviert. (a,b) Differentielle Interferenzkontrastmikroskopie, (c) Phasenkontrastmikroskopie. Vergrößerung 100x (a), 400x (b), 630x (c).

Dispase II (2,4 U/ml) wurde als Alternative zum Trypsinisieren und Passagieren der ETEZ verwendet. Primäre ETEZ-Kulturen dissoziierten unter Dispase II-Behandlung und hefteten sich an unbeschichtete Kulturschalen in AECGM an. Die Zellen teilten sich unter diesen Kulturbedingungen und erreichten nach etwa einer Woche 100%ige Konfluenz unter Erhalt ihres morphologischen epithelialen Zellcharakters, wie man an Hand der Phasenkontrastaufnahmen deutlich erkennen kann (Abb. 21) und durch Färbungen mit Epithelzellmarkern eruiert wurde (Abb. 22). Allerdings exprimierten zu Beginn der Kultivierung nur sehr wenige ETEZ Zytokeratin als Marker (Abb. 22 f). Nach ungefähr 12 Tagen in Kultur differenzierten sich jedoch 100% der Zellen in Zytokeratin exprimierende Zellen (Abb. 22 c). Nach der ersten Passage der Zellen ( $P_1$ ) wurden sie unter den gleichen, bereits erwähnten Bedingungen kultiviert und konnten bis zu 30 Tage als zweite Passage ( $P_2$ ) gehalten werden.



**Abb. 22:** Repräsentative immunzytochemische Färbung passagierter equiner Trachealepithelzellen (P<sub>1</sub>)

Primäre ETEZ-Kulturen wurden mit Hilfe des Enzyms Dispase II dissoziiert und auf Deckgläschen in 24-Well-Platten für 12 Tage ausgesät. DAPI gefärbte Zellkerne (a, d); Zytokeratin 5/6/18 gefärbte Zellen (b); Overlay der DAPI und Zytokeratin-Färbung (c); Overlay der DAPI und Vimentin Färbung (e); Overlay der DAPI und Cytokeratin-Färbung einer 4 Tage alten Kultur (f). Skalierung ist 20 µm. Vergrößerung 400x (a, b, c, f); 200 x (d, e).

#### 4.2.7 Vitalität nach Kryokonservierung

Equine Trachealepithelzellen, die aus einer Primärkultur in Einfriermedium kryokonserviert wurden, wurden nach einem Monat aufgetaut und subkultiviert. Die Vitalität der Zellen war ca. 68% (n = 1 in Dreifachbestimmung). Diese Zellen wurden in serumfreien Medium kultiviert und wuchsen konfluent.

### 4.3 Identifizierung und Charakterisierung $\beta$ -adrenerger Rezeptoren in equinen Trachealepithelzellen

#### 4.3.1 Radioligandenbindungsstudien

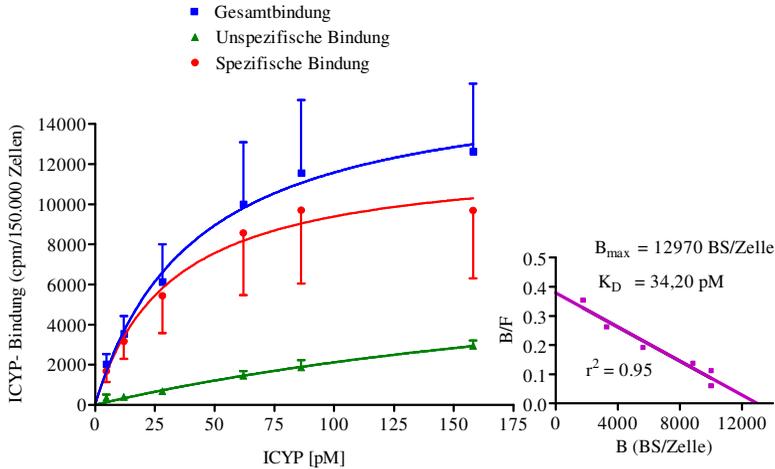
##### 4.3.1.1 Rezeptordichte und Ligandenaffinität

Die Bindung des nicht-selektiven  $\beta$ -adrenergen Rezeptorantagonisten ICYP an primären equinen Trachealepithelzellen (ETEZ) war konzentrationsabhängig sättigbar und hoch affin. Die Sättigung der spezifischen Bindung wurde bei ICYP > 60 bis 150 pM erreicht, wobei die Gesamtbindung und unspezifische Bindung von ICYP nicht sättigbar waren (Abb. 23 und 24). Die Fähigkeit zur spezifischen Bindung von ICYP an frisch isolierten ETEZ und kultivierten Epithelzellen der Trachea war vorhanden, allerdings mit unterschiedlichen Parametern der Bindungskurven. Die maximale Rezeptordichte ( $B_{\max}$ ) in frisch isolierten ETEZ betrug  $12727 \pm 883,60$  Bindungsstellen/Zelle ( $n = 7$ ), während in kultivierten Epithelzellen der Trachea eine deutlich geringere Rezeptordichte ( $3730 \pm 212$  Bindungsstellen/Zelle,  $n = 6$ ) ermittelt wurde (Tabelle 2). Die durch nicht-lineare Regressionsanalyse der spezifischen Bindungskurven ermittelten Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) waren für frisch isolierte ETEZ  $31,78 \pm 6,57$  pM ( $n = 7$ ) und für kultivierte ETEZ  $15,26 \pm 3,37$  pM ( $n = 6$ ) und zeigen, dass die  $K_D$  der ICYP-Bindung bei frisch isolierten ETEZ zweifach höher liegt als bei kultivierten ETEZ.

Bindungsparameter	Frisch isolierte Zellen	Primärkultur
$B_{\max}$ (BS/Zelle)	$12727 \pm 883,60$	$3730 \pm 212$
$K_D$ (pM)	$31,78 \pm 6,57$	$15,26 \pm 3,37$

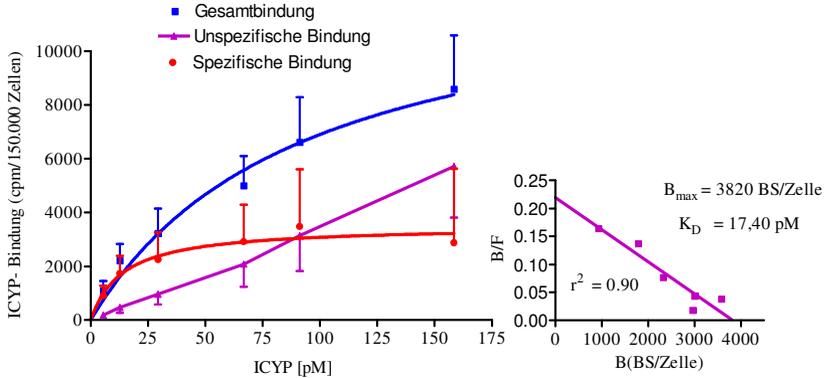
Tabelle 2. Maximale Rezeptordichte und Dissoziationskonstante der ICYP-Bindung an frisch isolierten und kultivierten equinen Trachealepithelzellen.

Die Daten wurden durch nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelt und sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M aus 6-7 Experimenten, jeweils in Doppelbestimmung. BS = Bindungsstellen, pM = picomol/l



**Abb. 23:** Bindung von ICYP an frisch isolierte equine Trachealepithelzellen.

Für den Assay wurden 150.000 ETEZ bei 37°C für 90 min mit ansteigenden ICYP-Konzentrationen inkubiert (Gesamtvolumen: 250  $\mu$ l). Die Gesamtbindung von ICYP wurde in Abwesenheit und die unspezifische Bindung in Anwesenheit von 1  $\mu$ M ( $\pm$ )-CGP 12177 bestimmt. Dabei wurde die unspezifische Bindung als ICYP-Bindung definiert, die nicht durch 1  $\mu$ M ( $\pm$ )-CGP 12177 verdrängt wurde. Die spezifische Bindung wurde aus der Differenz zwischen Gesamtbindung und unspezifischer Bindung errechnet. Das Inset zeigt die Transformation der spezifischen Bindung nach Scatchard. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M (n = 7), jeweils in Doppelbestimmung. BS = Bindungsstellen, B = gebundene, F = frei



**Abb. 24:** Bindung von ICYP an kultivierte equine Trachealepithelzellen.

Für den Assay wurden 150.000 ETEZ bei 37°C für 90 min mit ansteigenden ICYP Konzentrationen inkubiert (Gesamtvolumen: 250  $\mu$ l). Die Gesamtligandenbindung wurde in Abwesenheit und die unspezifischen Bindungen in Anwesenheit von 1  $\mu$ M ( $\pm$ )-CGP 12177 bestimmt. Die spezifische Bindung wurde aus der Differenz zwischen Gesamtbindung und unspezifischer Bindung errechnet. Das Inset zeigt die Transformation der spezifischen Bindung nach Scatchard. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M (n = 6), jeweils in Doppelbestimmung.

Wie man an Hand Tabelle 2 erkennen kann, zeigen frisch isolierte Zellen durchschnittlich eine größere Anzahl maximal spezifischer Bindungsstellen ( $B_{\max}$ ) als die primären Kulturen. Die unspezifischen Bindungsstellen waren im untersuchten Konzentrationsbereich nicht sättigbar und stiegen linear mit ansteigenden Konzentrationen des Radioliganden an (Abb. 23 und 24). Unter den Bedingungen für die Sättigung der Bindung betrug die durchschnittliche unspezifische Bindung 13,86% der Gesamtbindung für frisch isolierte Zellen und 39,48% für Primärkulturen.

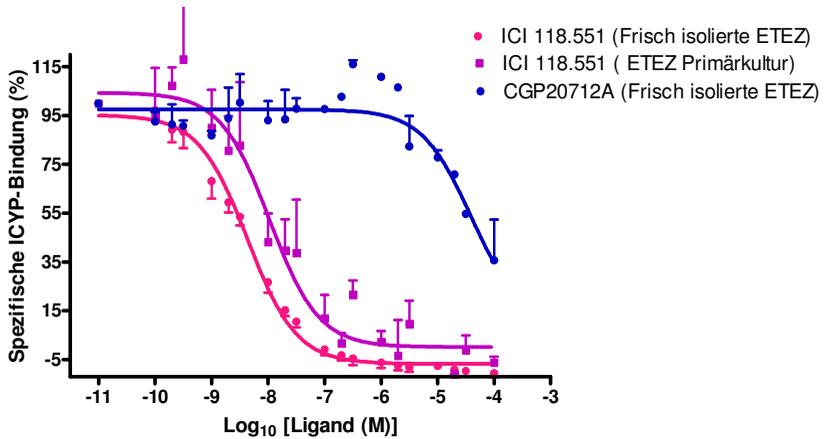
Die Transformation der ICYP-Bindungskurve nach Scatchard zeigte einen linearen Kurvenverlauf, der darauf hinweist, dass ETEZ eine homogene Population  $\beta$ -adrenerger Rezeptor exprimieren (Abb. 23 und 24, Inset). Bindungsparameter ( $B_{\max}$  und  $K_D$ ) auf die durch nach einer Scatchard-Transformation (Abb. 23 und 24) oder durch nicht-lineare Regressionsanalyse (Tabelle 2) ermittelten Bindungsparameter  $B_{\max}$  und  $K_D$  waren praktisch identisch. Für frisch isolierte Zellen (Abb. 23) lagen nach Scatchardanalyse der Wert der

maximalen  $\beta$ -adrenergen Rezeptordichte ( $B_{\max}$ ) bei 12970 Bindungsstellen/Zelle und die Dissoziationskonstante  $K_D$  bei 34,20 pM. In den Primärkulturen betragen die Werte von  $B_{\max}$  und  $K_D$ , die mit Hilfe der Scatchard-Transformation ermittelt wurden, 3820 Bindungsstellen/Zelle und 17,40 pM (Abb. 24).

#### 4.3.1.2 Subtypisierung $\beta$ -adrenerger Rezeptoren

Für die Bestimmung der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptortypen wurden Verdrängungsexperimente an intakten frisch isolierten Trachealepithelzellen und primären kultivierten ETEZ mit selektiven  $\beta$ -adrenergen Rezeptorantagonisten - dem  $\beta_1$ -selektiven Antagonisten CGP 20712A und dem  $\beta_2$ -selektiven Antagonisten ICI 118.551-durchgeführt. ICYP wurde dabei konzentrationsabhängig durch diese nicht markierten selektiven Antagonisten verdrängt. Die Verdrängungskurven sind in Abbildung 25 dargestellt. ICI 118.551 hemmt die ICYP-Bindung in beiden Zellpräparationen (frisch isolierte bzw. kultivierte ETEZ) mit einem monophasischen, steilen Kurvenverlauf (F-Test:  $p < 0,05$ ). Wie in der Abb. 25 gezeigt, verdrängt ICI 118.551 den Radioliganden ICYP mit wesentlich höherer Affinität als CGP 20712A. Für ICI 118.551 ergaben sich nahezu 100% hochaffine Bindungsstellen mit einer Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von  $1,19 \pm 0,41$  nM in frisch isolierten bzw.  $1,74 \pm 0,15$  nM in kultivierten ETEZ.

Die durch Computer-gestützte Anpassung der Konzentration-Inhibitionskurven ermittelte Funktion unterschied sich nicht signifikant von dem Modell einer einzigen homogenen Bindungsstelle. Dies konnte sowohl in frisch isolierten als auch in kultivierten Trachealepithelzellen festgestellt werden. Verdrängungsexperimente mit CGP 20712A, die nur an frisch isolierten ETEZ durchgeführt wurden, ergaben ebenfalls einen monophasischen, jedoch flachen Kurvenverlauf, der auch auf eine einzige Bindungsstelle mit  $> 95\%$  Rezeptorbesetzung hinweist, wobei jedoch die Affinität wesentlich niedriger ist, wie die Inhibitionskonstante der Verdrängungskurve zeigt ( $K_i = 17 \pm 7,90$   $\mu$ M). Somit konnte für die spezifische Bindung von ICI 118.551 eine ca. 10.000-fach höhere Affinität errechnet und die Präsenz einer homogenen Population  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren vom  $\beta_2$  Subtyp gezeigt werden.

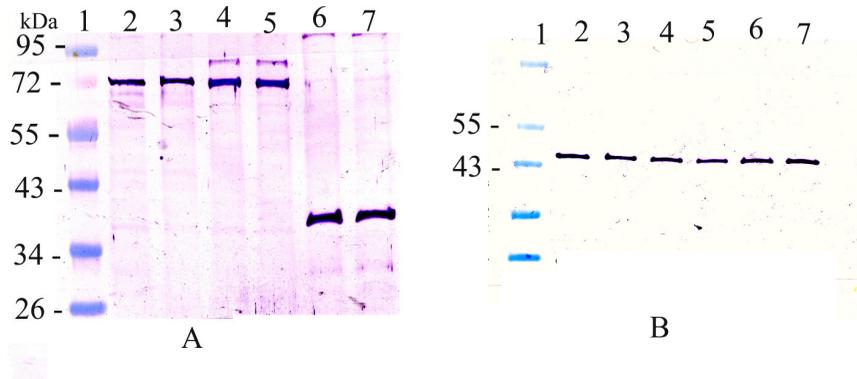


**Abb. 25:** Konzentrationsabhängige Hemmung der ICYP-Bindung durch  $\beta$ -adrenerge Rezeptorantagonisten an primären equinen Trachealepithelzellen

Für den Assay wurden 150.000 ETEZ bei 37°C für 90 min mit einer ICYP-Konzentration (40-45 pM) und ansteigenden Konzentration ( $10^{-10}$ - $10^{-4}$ M) des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptorantagonisten ICI 118.551 oder des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptorantagonisten CGP 20712A inkubiert (Gesamtvolumen: 250  $\mu$ l). 1  $\mu$ M ( $\pm$ )-CGP 12177 wurde benutzt, um die unspezifische Bindung zu definieren. Eine 100%ige Bindung entspricht der spezifischen ICYP-Bindung, die bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M ( $\pm$ )-CGP 12177 in der Abwesenheit konkurrierender Liganden detektiert wurde. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M aus n = 5-7, jeweils in Doppelbestimmung.

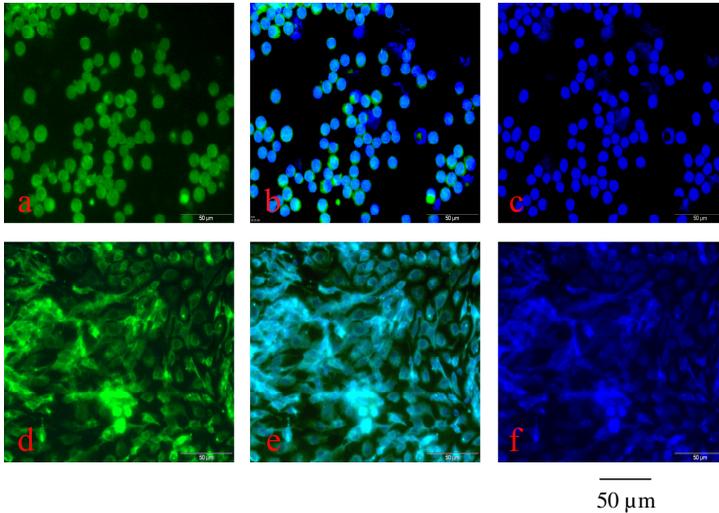
### 4.3.2 Expression $\beta$ -adrenerger Rezeptoren in equinen Trachealepithelzellen

Westernblot und Immunfluoreszenzanalysen wurden mit dem Antikörper Anti-Human- $\beta_2$ -adrenerger-Rezeptor durchgeführt, um die Proteinexpression des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in der Zellmembran equiner Trachealepithelzellen zu untersuchen. An Hand der Westernblot-Analyse konnte eine Proteinbande im Bereich 72 kDa (Abb. 26) identifiziert werden. Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigen eine starke Immunreaktivität, was einen direkten Hinweis auf die Lokalisation des Rezeptors an der Zelloberfläche der Trachealepithelzellen darstellt (Abb. 27).



**Abb. 26:** Westernblot-Analyse des  $\beta$ -AR-Proteinlevels in Trachealepithelzellen.

(A) Färbung mit Kaninchen-polyklonaler  $\beta_2$ -AR humanen Ursprungs.  $\beta$ -Actin wurde als Kontrolle verwendet (B). Reihe 1: Proteinmarker, 2 und 3 Lysat kultivierter ETEZ, 4 und 5 Lysat frisch isolierter ETEZ, 6 und 7 Lysat des Gehirngewebes der Maus (Positivkontrolle). Die Daten sind repräsentativ für drei Experimente.

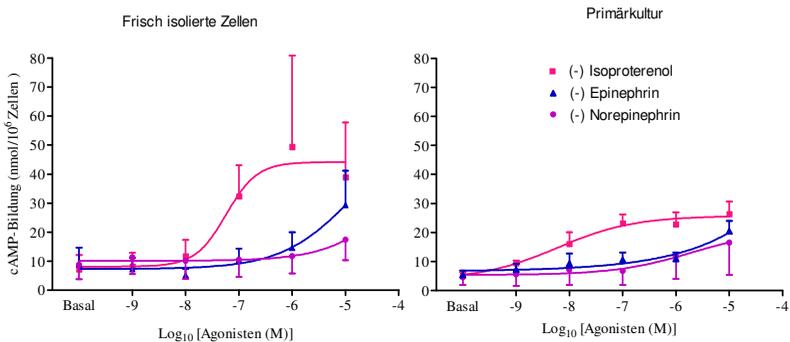


**Abb. 27:** Immunfluoreszenzfärbung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in equinen Trachealepithelzellen.

Frisch isolierte ETEZ (a, b, c) und 7-tägige Primärkulturen (d, e, f) wurden mit eiskaltem Aceton fixiert, mit 50 mM Ammoniumchlorid neutralisiert und durch 3% BSA auf PBS geblockt. Die Inkubation mit dem Primäantikörper (Anti-Human- $\beta_2$ -adrenerger Rezeptor; 1:100) erfolgte für 1 h bei RT. Die Ansätze wurden 3 x 5 min mit PBS gewaschen und 1 h bei RT mit dem Sekundäantikörper (FITC-markierte IgG; 1:200) sowie dem Zellkernfarbstoff DAPI 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Fluorsave Antifade-Reagent eingebettet und mit Hilfe des Olympus-BX50-Fluoreszenzmikroskops analysiert. Die Abbildungen c und f zeigen die DAPI-Signale korrespondierend zu den Abbildungen a und d. Die Abbildungen b und e zeigen ein Overlay der DAPI gefärbten Zellkerne und der mit FITC markierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren. Als Negativkontrolle diente ETEZ, die an Stelle des Primäantikörpers mit 3% BSA auf PBS inkubiert wurden. Positive FITC-Signale sind grün und DAPI Färbungen blau. Skalierung ist 50  $\mu\text{m}$ . Vergrößerung 200 x

### 4.3.3 cAMP-Bildung in equinen Trachealepithelzellen

Um die funktionelle Kopplung des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors mit der Adenylatzyklase zu untersuchen, wurde die intrazelluläre Bildung von cAMP als Wirkung auf die konzentrationsabhängige Stimulation der Aktivität der Adenylatzyklase durch Isoproterenol, Epinephrin und Norepinephrin gemessen.



**Abb. 28:** Konzentrationsabhängige Stimulation der cAMP-Bildung in equinen Trachealepithelzellen durch  $\beta$ -adrenerge Rezeptoragonisten.

In Anwesenheit einer 100  $\mu$ M IBMX-Lösung wurden 10<sup>6</sup> Zellen/Assay mit steigenden Konzentrationen (10<sup>-9</sup>-10<sup>-5</sup> M) von Isoproterenol, Epinephrin und Norepinephrin für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Konzentration des zytosolischen cAMP im Überstand des Zellysats mit Hilfe des AlphaScreen cAMP-Assay-Kit bestimmt. Die basale cAMP-Konzentration wurde nur in Gegenwart von PBS und IMBX gemessen. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M aus 6 Experimenten, jeweils in Dreifachbestimmung.

Abbildung 28 gibt die Konzentration-Wirkungskurve für die Bildung von cAMP in frisch isolierten und kultivierten ETEZ nach der Stimulation mit den oben genannten Agonisten wieder.

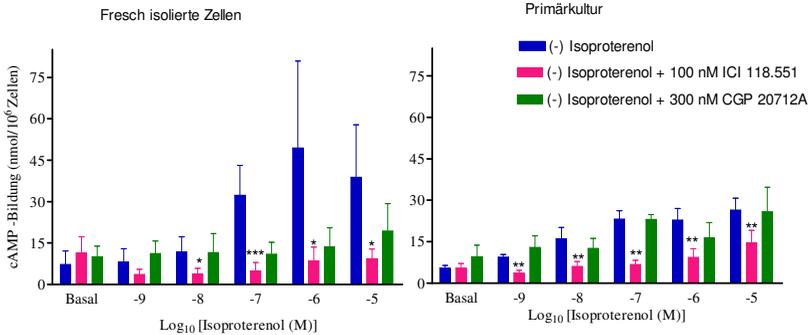
Die durch nicht-lineare Regressionsanalyse ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte der Konzentrations-Wirkungskurven von Isoproterenol, Epinephrin, und Norepinephrin betragen in frisch isolierten ETEZ 58 nM (n = 6), 13,60  $\mu$ M (n = 6), bzw. 0,43 mM (n = 6). Die maximale cAMP-Bildung dieser adrenergen Rezeptoragonisten lag bei 50 nmol/10<sup>6</sup> Zellen, 30 nmol/10<sup>6</sup> Zellen und 18 nmol/10<sup>6</sup> Zellen für Isoproterenol, Epinephrin bzw. Norepinephrin. Verglichen

mit den basalen cAMP-Werten resultierte die Stimulation der ETEZ mit Isoproterenol, Epinephrin und Norepinephrin in einem 600%igen, 220%igen bzw. 100%igen Anstieg der cAMP-Konzentration, wobei sich nur die Isoproterenol-induzierte Wirkung signifikant ( $p < 0,05$ ) vom Basalwert unterschied.

Wie aus der Konzentrations-Wirkungskurve (KWK) ersichtlich (Abb. 28), verursacht Isoproterenol eine 1000-fache Verschiebung der KWK nach links verglichen mit Epinephrin und eine 6000-fache Verschiebung verglichen mit Norepinephrin. Die Reihenfolge der Potenz dieser Agonisten bezüglich ihrer Eigenschaft, die cAMP-Bildung in frischen ETEZ auszulösen, und basierend auf den  $EC_{50}$ -Werten stellt sich somit wie folgt dar: Isoproterenol > Epinephrin > Norepinephrin. Diese Reihenfolge ist ein charakteristisches Merkmal, dass auf die Existenz von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptorsubtypen in diesen Zellen hinweist.

In den Primärkulturen der ETEZ (Abb. 28) induzierten Isoproterenol, Epinephrin und Norepinephrin eine maximale cAMP-Bildung wie folgt: 27 nmol/ $10^6$  Zellen ( $n = 6$ ), 20 nmol/ $10^6$  Zellen ( $n = 6$ ) bzw. 17 nmol/ $10^6$  Zellen ( $n = 6$ ).

Um zu prüfen, durch welchen  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsubtypen die Isoproterenol-induzierte Bildung von cAMP in ETEZ verursacht wird, wurde die cAMP-Bildung in An- oder Abwesenheit des  $\beta_1$ -selektiven Antagonisten CGP 20712A oder des  $\beta_2$ -selektiven Antagonisten ICI 118.551 bestimmt. Beide Antagonisten, ICI 118.551 (100 nM) und CGP 20712A (300 nM), wurden zu den isolierten ETEZ zugegeben, bevor es zu einer Stimulation der Zellen mit verschiedenen Isoproterenol-Konzentrationen kam. In frisch isolierten ETEZ (Abb. 29) inhibierte der  $\beta_2$ -Antagonist ICI 118.551 signifikant die Isoproterenol-stimulierte cAMP-Produktion. Ein maximaler Effekt trat dabei bei einer Konzentration von  $10^{-7}$  M Isoproterenol auf, welcher mit einer 85%igen Inhibition der Isoproterenol stimulierten cAMP-Produktion korrespondiert. ICI 118.551 verringerte bei allen Konzentrationen von Isoproterenol die cAMP-Bildung effektiv unter den Bereich des Basalwertes. Der  $\beta_1$ -Antagonist CGP 20712A konnte im Gegensatz dazu nicht die durch Isoproterenol-stimulierte cAMP-Produktion, unabhängig von der gewählten Isoproterenol-Konzentration, hemmen.



**Abb. 29:** Hemmung der Isoproterenol-induzierten cAMP-Bildung in primären equinen Trachealepithelzellen durch  $\beta$ -adrenerge Rezeptorantagonisten

In Anwesenheit von 100 nM ICI 118.551 ( $\beta_2$ ) oder 300 nM CGP 20712A ( $\beta_1$ ) wurde die Isoproterenol-induzierte cAMP-Bildung bestimmt. Die basalen cAMP-Werte wurden nur in Anwesenheit von PBS und IBMX gemessen. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M aus 5 Experimenten, jeweils in Dreifachbestimmung. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur Inkubation nur mit Isoproterenol.

Die Ergebnisse in der Abb. 29 zeigen, dass in Primärkulturen der  $\beta_2$ -selektive Antagonist ICI 118.551 signifikant die Isoproterenol-induzierte cAMP-Bildung blockiert. Dabei zeigte der Antagonist den stärksten Effekt bei einer Konzentration  $10^{-7}$  M Isoproterenol. Im Unterschied dazu konnte der  $\beta_1$ -selektive Antagonist CGP 20712A die Isoproterenol-induzierte cAMP-Bildung nicht signifikant blockieren.

## 5 DISKUSSION

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Methode entwickelt und optimiert, um Primärkulturen von Trachealepithelzellen des Pferdes zu etablieren. Im Folgenden werden die hierfür eingesetzten Methoden der Isolierung, Kultivierung und Anreicherung von Epithelzellen kritisch diskutiert und mit Befunden anderer Untersucher bei anderen Spezies verglichen. Anschließend werden aufgrund der durchgeführten Zellcharakterisierung Rückschlüsse gezogen, ob während der Langzeitkultivierung und Passagierung der Epithelzellen phänotypische Veränderungen stattgefunden haben. Abschließend wird die etablierte Primärkultur auch im Hinblick auf ihren Nutzen für weiterführende Untersuchungen, z.B. anhand der  $\beta$ -adrenergen Rezeptorexpression und Funktion, bewertet.

### 5.1 Isolation und Kultivierung primärer equiner Trachealepithelzellen

Zur Isolierung der Trachealepithelzellen wurde der enzymatische Verdau mit Trypsin-EDTA (0,25%) eingesetzt, da bei Atemwegsepithelzellen des Pferdes mit Trypsin eine gute Ausbeute und gutes in-vitro Wachstum beobachtet wurde. Durch die Trypsinbehandlung der Trachealschleimhaut-Epithelschicht mit der darunter liegenden glatten Muskulatur ließen sich neben Trachealepithelzellen auch Mesenchymalzellen isolieren. Unabhängig von der Konzentration der eingesetzten Trypsinlösung war ein großer Teil der Zellen vital. Daher wurden keine weiteren Enzyme getestet. Im Unterschied zu der für Atemwege zahlreicher Säugetierspezies beschriebenen selektiven Gewinnung von Epithelzellen mit anderen Verdauungsenzymen liefert der Trypsinverdau des Trachealgewebes des Pferdes relativ homogene Epithelzellen mit geringer Kontamination der Kultur mit Fibroblasten. Daher eignete sich der Trypsinverdau, um Trachealepithelzellen mit erhaltener Proliferationskapazität zu gewinnen. Trypsin spaltet die Peptidbindung des Lysin-Arginin – Aminosäurerests auf der Seite des C-Terminus, die an der Zell-Zell-Anhaftung beteiligt ist. Nicht-aufgereinigtes Trypsin, das routinemäßig in der Gewebekultur benutzt wird, besitzt eine höhere proteolytische Aktivität (PHILIPS 1972; OMAR u. KREBS 1975).

Der Trypsinverdau wurde auch zur Gewinnung von Epithelzellen aus Atemwegen anderer Spezies einschließlich Ratte (JASSAL et al.1991), Kaninchen (FINKELSTEIN et al.1983), Mensch (LECHNER et al.1982), Schwein (STEIMER et al. 2006) eingesetzt. Bei der Beurteilung des Kulturerfolges der isolierten Zellen ist allerdings auch die Herkunft der Zellen zu berücksichtigen. Eine besonders wichtige Rolle spielt das Alter der verwendeten Tiere und der Grad der autolytischen Gewebeerstörung. Obwohl das Wachstumspotenzial

der Epithelzellen der Trachea bei Feten wesentlich höher ist als bei adulten und älteren Tieren, war in der vorliegenden Arbeit die Verwendung fetaler Trachea nicht möglich. Wir konnten jedoch auch feststellen, dass bei jungen Pferden, die < 6 Jahre alt waren, die isolierten Trachealepithelzellen ein ausgeprägtes Proliferationsverhalten zeigten, im Unterschied zu Trachealepithelzellen, die von älteren (u.a. > 20 Jahre) Pferden gewonnen wurden. Der Grad der Autolyse variiert abhängig von der unterschiedlichen Zeitdauer, die vom Schlachtzeitpunkt der Pferde durch den Transport ins Institut und bis zum Verarbeiten der Trachea verging. Da die Vitalität der einem Verdau unterworfenen Zellen durch Autolysevorgänge reduziert worden sein kann, wurde eine histologische Untersuchung der verwendeten Tracheen von Zeit zu Zeit durchgeführt. Die zwei über längere Zeit passagierbaren Trachealepithel-Zellkulturen stammten von jungen Pferden.

Da der Gewebeverdau mit Trypsin möglich war, wurden in der vorliegenden Untersuchung versucht, die Kulturbedingungen zu optimieren. Die Primärkulturen ( $P_0$ ) adhärten auf unbeschichteten Zellkulturgefäßen und zeigten unter den gegebenen Bedingungen ein rasches Wachstum. Hingegen war es nicht möglich, auch bei verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten, den zusammenhängenden Zellrasen von  $P_0$  ETEZ wieder mit Trypsin abzulösen. Auch gelang die serielle Passage weder in serumfreiem noch serumhaltigem Medium. Die Beschichtung der Kulturgefäße mit Kollagen in verschiedenen Konzentrationen vermochte die Adhäsion der Zellen in passagierter Kultur in Schalen oder Flaschen nicht zu verbessern, somit war Typ I-Kollagen für diesen Zweck nicht erforderlich. Möglicherweise könnte Trypsin einen proteolytischen Verdau epithelialer Zellmembranen verursacht und damit die Adhäsion der Zellkulturen in folgenden Passagen beeinflusst haben. Durch proteolytische Enzyme wie Trypsin werden ferner auch verschiedene Oberflächenmoleküle in unterschiedlichem Ausmaß von der Zelloberfläche entfernt (SCHOR 1979).

Die Dissoziation der Zellen mit Dispase II und deren Passagierung in serumfreiem AECGM, supplementiert mit verschiedenen Hormonen und Wachstumsfaktoren, führte hingegen zu einer verbesserten Zelladhäsion auf den Kulturschalen. Es muss jedoch beachtet werden, dass sich epitheliale Zellen mit Dispase II im Verband zusammenhängend vom Untergrund lösen ohne sich vollständig zu vereinzeln. Dennoch waren so behandelte Zellen nach der Passagierung zur Readhäsion befähigt und überlebten bis zu 30 Tage in der zweiten Passage ( $P_2$ ).

Primäre Passagen tendierten dazu, innerhalb einer Woche zu einem zusammenhängendem Zellrasen auszuwachsen und den epithelialen Phänotyp beizubehalten, wie mikroskopisch und durch eine nahezu 100%ig positive immunzytochemische Zytokeratin-spezifische Färbung nachgewiesen wurde (Abb. 21). Bei Dispase II handelt es sich um eine Metallo-Endopeptidase, die Peptidbindungen aus N-Terminus unpolarer Aminosäuren wie Leucin und Phenylalanin hydrolysiert. Ihre relativ milde proteolytische Aktivität macht dieses Enzym besonders geeignet, um Zellrasen zu disaggregieren und Zellen zu passagieren, da die Integrität der Zellmembran geschont wird (CRAVISO 2004). Da Dispase II den Zellrasen aber als Ganzes ablöst, ist dieses Enzym ungeeignet für nachfolgende Einzelzell-Suspensionen.

Das Wachstum der isolierten Trachealepithelzellen ließ sich durch die Auswahl des Kulturmediums beeinflussen. Bei Verwendung von MEM als Wachstumsmedium wiesen sowohl Epithelzellen als auch Mesenchymalzellen eine rapide Proliferation auf, jedoch ließen sich besonders die Epithelzellen nicht subkultivieren, unabhängig davon, welches Enzym (Trypsin oder Dispase II) verwendet wurde. Die Trachealepithelzellen wuchsen auf Kulturgefäßen schnell, aber es konnte kein homogener epithelialer Zellrasen erkannt werden, stattdessen bildeten sie eine Art „kopfsteinpflasterartigen“ Belag. Da dieses Medium Serum enthielt, war anzunehmen, dass fetales Kälberserum die Proliferation der equinen Trachealepithelzellen unterschiedlich beeinflusst hat. Fibroblasten konnte dagegen mit MEM weiter subkultiviert werden. Da die Passage der Epithelzellen der Trachea in diesem Medium nicht erlangt werden konnte, war eine Optimierung eines geeigneten Kulturmediums erforderlich. Die Zugabe von nicht-essentiellen Aminosäuren (Alanin, Asparagin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Prolin, Serin) zu MEM und zusätzlich 10% fetales Kälberserum konnte die Proliferation der passagierten Zellen nicht beeinflusst oder verbessert werden. Alle so modifizierten MEM-Medien konnten jedoch auch das Wachstum der unerwünschten Fibroblasten nicht unterdrücken.

Aus diesen Gründen kam in Anlehnung an die Isolierungsverfahren von BEISSWENGER et al. (2006), WISZNIEWSKI et al. (2006) und ENDRES et al. (2005) für Atemwegsepithelzellen vieler Spezies einschließlich des Menschen serumfreies Medium zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit wurde AECGM als serumfreies Medium verwendet. Dieses serumfreie Medium ist zwar für humane Atemwegsepithelzellen entwickelt worden, jedoch ließ sich das Problem der ungenügenden Proliferation auch bei den equinen

Zellkulturen verbessern. Dieses Medium enthält Zusätze von 0,4% Bovine-Pituitary-Extract, 10 ng/ml epidermalen Wachstumsfaktor, 5 µg/ml Insulin, 0,5 µg/ml Hydrocortison, 0,5 µg/ml Epinephrin, 6,7 ng/ml Trijodthyronin, 10 µg/ml Transferrin und 0,1 ng/ml Retinsäure. Unter Verwendung eines serumfreien Kulturmediums konnte in der vorliegenden Arbeit ein reines Epithelzellwachstum ohne Kontamination durch Mesenchymalzellen (Fibroblasten) erreicht werden. Es zeigte sich auch, dass die equinen Trachealepithelzellen bei Verwendung dieses AECGM in der Lage waren, auf den Zellkulturgefäßen anzuheften und untereinander Zellkontakte aufzubauen. Dies bestätigt die Annahme, dass ein großer Teil der kultivierten Zellen epithelialen Ursprung ist. Nach dem Erreichen der Konfluenz nahmen die ETEZ eine polygonale Form an und erzeugten dadurch kopfsteinpflasterartige Muster. Dies zeigt, wie sehr Zell-Zell-Kontakte einen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie ausüben. Bei Epithelzellen in primärer Zellkultur wurde ein schnelles Wachstum beobachtet, wobei gewöhnlich innerhalb einer Woche eine Konfluenz von bis zu 80% erreicht wurde, wie es auch schon für Zellen anderer Säugerspezies beschrieben ist (DAVIDSON et al. 2000; ROWE et al. 2004; STEIMER et al. 2006). Die Verfügbarkeit einer extrazellulären Matrix in Form von Kollagen oder Matrigel führte in der vorliegenden Arbeit zu keiner ausgeprägten Gruppierung der Trachealepithelzellen in Form von Kolonien. Diese Matrices hatten keinen deutlich positiven Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Allerdings bewährte sich eine Kollagenbeschichtung für die Adhäsion und Proliferation von ETEZ auf Transwell-Inserts unter ALI-Kulturbedingungen.

Allgemein gilt für die Zellbiologie die Prämisse, dass Zellen zwei Funktionszustände annehmen können: sie können entweder proliferieren oder sich differenzieren, aber nicht beides gleichzeitig (MATUSHANSKY et al. 2003). Zur vollständigen Funktionalität des Atemwegsepithels gehört die mukoziliäre Clearance. Ein wesentlicher Bestandteil dabei ist der koordinierte Zilienschlag der Kinozilien tragenden Zellen in Richtung des Pharynx. Bei der konventionellen Kultivierung der ETEZ kommt es zu einer Differenzierung. Typische Merkmale wie Zilienbesatz und Sekretion von Muzinen sind bereits nach einer Passage oder Langzeitkultur regredient. Um das Milieu der Trachea in vitro zu simulieren, ist eine Kultivierung basierend auf dem Prinzip des Air-Liquid-Interface (ALI) geeignet (STEIMER et al. 2006). Die Zellen befinden sich dabei auf kollagenbeschichteten Membraneinsätzen (Transwell-Inserts) und polarisieren, indem sie von der basalen Seite mit Medium unterspült und auf der apikalen Seite der gasförmigen Phase exponiert werden (LIN, H et al. 2007). Tatsächlich wurde auch berichtet, dass humanes, plazentares Kollagen die Adhäsion und das

Wachstum primärer, epithelialer Zellen auch von anderen Spezies fördert (KONDO et al. 1993; DAVIDSON et al. 2000; RADI u. ACKERMANN 2004). Dies birgt allerdings die Gefahr, dass mit Fortschreiten der Zellproliferation in mehreren Lagen die Diffusionsstrecke für das Nährmedium zu groß wird, so dass die oben liegenden Zellen dehydratisieren. Die Methode des ALI stabilisiert die Zilienexprimierung und soll die Differenzierung von ETEZ zu zilienbildenden Zellen (Flimmerepithelzellen) fördern (YEH et al. 2007).

Epithelzellen werden durch kontaminierende Fibroblasten rasch überwachsen, Assays mit solchen Kulturen werden dadurch unauswertbar (RADI u. ACKERMANN 2004). Wir testeten das Adhäsionsverhalten der isolierten Zellen auf Kulturgefäßen in Abhängigkeit der Inkubationszeit, wobei sich 30 min als optimal herausstellten, um Fibroblasten von den Epithelzellen trennen zu können. Mit dieser wesentlich kürzeren Inkubationszeit als den von RADI u. ACKERMANN (2004) und DAVIDSON et al. (2000) berichteten 1-3 Stunden für ovine und murine Epithelzellen, erzielt dies den besten Kompromiss zwischen Reinheit und Ausbeute beim Aufreinigen equiner Trachealepithelzellen. Diese Variation der Adhäsionszeiten könnte durch unterschiedliche Eigenschaften der Zellen verschiedener Spezies erklärt werden. Aufgrund des unterschiedlichen Adhäsionsverhaltens war die Inkubation frisch gewonnener ETEZ für 30 min bei 37°C in serumfreiem AECGM die effektivste Methode, um kontaminierende Fibroblasten möglichst vollständig an Kulturgefäße zu binden und eine maximale Menge ungebundener Epithelzellen abschöpfen zu können. Für eine magnetische Zellseparation (MACS), die mit MicroBeads gekoppelten humanen Anti-Fibroblasten-Antikörpern getestet wurden, konnten equine Trachealfibroblasten nur zu 6,4%, und damit in nicht ausreichendem Maße magnetisch markiert werden. Möglicherweise gibt es für diese Antikörper zwischen diesen beiden Spezies eine ungenügende Kreuzreaktivität.

Primäre Epithelzellkulturen wurden unter Zuhilfenahme monoklonaler Antikörper gegen verschiedene Zytokeratine (epithelspezifische Markerproteine) und das fibroblastenspezifische Vimentin angefärbt. Die Zellen ließen sich spezifisch für Zytokeratine färben und nur die Kontrollkulturen mit equinen Trachealfibroblasten zeigten eine Vimentin-spezifische Färbung. Dies zeigt klar, dass die in Kultur gewachsenen Zellen dem Phänotyp von Epithelzellen entsprechen. Wie die nahezu 100%ig positive Färbung für den Epithelzellmarker Zytokeratin und die elektronenmikroskopisch sichtbaren Zilien und Mikrovilli (Abb. 15) zeigen, können sich gut ausdifferenzierte, epitheliale und Zytokeratin exprimierende

Zellen sowohl in Primärkulturen als auch in Passagierungen in der Regel innerhalb einer Woche bilden (Abb. 19 und 22), wenn sie unter ALI-Bedingungen wachsen. Zytokeratine sind eine komplexe Proteinfamilie fibröser Intermediärfilamente, welche zu den wichtigsten Differenzierungsmerkmalen für Epithelzellen gehören und biochemisch für deren Charakterisierung genutzt werden (FUCHS 1988). Das Expressionsmuster der Zytokeratine ist variabel und abhängig vom Subtyp der Epithelzellen, dem Grad ihrer Differenzierung und den Wachstumsbedingungen (DAVIDSON et al. 2000).

In frisch isolierten ETEZ wurden weniger als 10% Vimentin-positiver Zellen festgestellt. In Primärkulturen und deren Passagen wurde Vimentin nicht nachgewiesen, was darauf hinweist, dass sich ETEZ mit hoher Reinheit ohne Kontamination mit Fibroblasten kultivieren lassen. Obwohl Trachealepithelzellen zahlreicher Säugerspezies immunzytochemisch charakterisiert sind, stehen in der Literatur bisher noch keine quantitativen Daten zur Reinheit und Vitalität isolierter Zellen und Primärkulturen auf dem Respirationstrakt des Pferdes zur Verfügung, obwohl diese essentiell für weiterführende funktionelle Studien sind.

Es wurden Methoden entwickelt, um aus verschiedenen Regionen der Atemwege unterschiedlicher Spezies Epithelzellen zu isolieren und zu kultivieren, was in den meisten Fällen in serumfreiem, mit Hormonen und Wachstumsfaktoren angereichertem Medium gelang (WU et al. 1997). Auch in dieser Arbeit erwies sich serumfreies Medium als förderlich für die Adhäsion und das Wachstum equiner Trachealepithelzellen in Subkultur. Es wurde weiterhin beobachtet, dass sich die Anwesenheit von Serum inhibierend auf Adhäsion und Wachstum von Epithelzellkulturen auswirkt (VERGER u. IMBENOTTE 1988; LECHNER et al. 1982).

Epithelzellkulturen wurden herangezogen, um deren Differenzierung und Proliferation zu untersuchen, oder als Modell für pharmakologische und toxikologische Untersuchung inhalierter Moleküle in situ zu dienen (BAEZA-SQUIBAN et al. 1991). Darüber hinaus können equine Atemwegsepithelzellen in vitro dazu genutzt werden, mehr über die Rolle der autonomen Atemwegszeptoren und Rezeptoren für verschiedenen Entzündungsmediatoren in der Pathogenese obstruktiver respiratorischer Erkrankungen (RAO) zu erfahren. Im Unterschied zu immortalisierten Zelllinien bestehen Kulturen primärer

Atemwegsepithelzellen aus verschiedenen Zelltypen wie Becherzellen, Basalzellen, Flimmerepithelzellen und zilienlosen Epithelzellen (LIN, H et al. 2007).

Schon einige Forschergruppen haben auf primären Atemwegsepithelzellen basierte Zellkulturmodelle entwickelt und zwar aus murinen (DAVIDSON et al. 2000; DAVIDSON et al. 2004; BROCKMAN-SCHNEIDER et al. 2008; ROWE et al. 2004), ovinen (RADI u. ACKERMANN 2004), humanen (BALS et al. 2004), porcinen (STEIMER et al. 2006; CHEN et al. 2005), bovinen (KONDO et al. 1993) und caninen Atemwegen (AIZAWA et al. 1991). Allerdings wurde ein *in vitro* System für epitheliale Zellen von Equiden noch nicht vollständig etabliert. Frühere Berichte über die Verfahren für Isolierung und Kultur equiner Trachealepithelzellen (SIME et al. 1997; LIN et al. 2001) bedürfen einer signifikanten methodischen Verbesserung. Zwar beschrieben sie einige Techniken für die Zellisolation mittels Pronase, jedoch benötigt diese sehr lange Inkubationszeiten von über 24 h, die die Vitalität der Zellen stark beeinflussen kann. Zudem wurde für die Adhäsion eine Kollagenmatrix benötigt. Es wurden weder Zellausbeute noch Reinheit der isolierten Zellen untersucht, auch wurde kein Protokoll für die Passagierung von seriellen Kulturen etabliert. Überdies wurden keinerlei Hinweise auf den Grad der Differenzierung der Primärkulturen gegeben. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelte Methode ist demgegenüber effizient und erlaubt eine hohe Ausbeute lebensfähiger Zellen bei gleichzeitig genügend hoher Reinheit, um damit zellbasierte Assays durchführen zu können. Darüber hinaus können differenzierte ETEZ gebildet und kultiviert werden und das Verfahren ermöglicht eine verlängerte Überlebensdauer der primären Zellkultur durch subsequente Passagierung.

Der Morphologie und den Zytokeratin-spezifischen Färbungen nach zu urteilen, behielten seriell passagierte Epithelzellen den Phänotyp der primären Zellen. Obwohl verlässliche Methoden zur Erzeugung hochqualitativer und differenzierter Kulturen unter ALI-Bedingungen für verschiedene Spezies zur Verfügung stehen (DAVIDSON et al. 2000; YOU et al. 2002), gibt es nur für wenige Spezies etablierte Subkultivierungsprotokolle primärer Zellen, wie z.B. für murine Atemwegsepithelzellen bis zu 4 Passagen (BROCKMAN-SCHNEIDER et al. 2008) und für humane Epithelzellen zwischen 2 und 8 Passagen (KELSEN et al. 1992; De JONG et al. 1993; KELSEN et al. 2000).

Die Verfügbarkeit von Techniken zur Isolation und Kultur von ETEZ ist Voraussetzung für die Anwendung moderner molekularer Methoden und genetischer Manipulation und bietet neue Möglichkeiten zur Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie von Atemwegserkrankungen, der Regulation des Wachstums und Differenzierung der Epithelzellen, deren Rezeptoren und Signaltransduktionswege, ihrer toxikologischen Untersuchung und der Interaktion von ETEZ mit Pathogenen. Anschließend könnten daraus Strategien zur Therapie respiratorischer Erkrankungen des Pferdes (z.B. RAO) abgeleitet werden. Wichtiger ist auch, dass diese Techniken einen ersten Schritt für eine mögliche Immortalisierung darstellen, um damit permanente Zelllinien aus dem equinen Respirationstrakt zu generieren. Dies würde die Einschränkung der Nutzung primärer Zellen beseitigen.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit verbesserte Methoden zur Isolation und seriellen Kultivierung von primären equinen Trachealepithelzellen etabliert. Unter geeigneten Kulturbedingungen, wie z.B. der ALI-Kultur, proliferieren ETEZ rasch und produzieren einen epithel-ähnlichen, dicht geschlossenen Zellrasen aus differenzierten Zellen, die einige Eigenschaften des nativen Atemwegsepithels aufweisen. Dass die aus den Pferdelungen isolierten Zellen tatsächlich epithelialen Ursprungs sind, wurde durch positive Zytokeratin-spezifische und negative Vimentin-spezifische immunzytochemische Färbungen nachgewiesen. Diese Zellkulturen können als Modell für den equinen Respirationstrakt und speziell für die weiterführende Untersuchung zur Pathophysiologie und Pharmakotherapie equiner obstruktiver Lungenerkrankungen genutzt werden.

## **5.2 Expression und Funktion $\beta$ -adrenerger Rezeptoren in primären equinen Trachealepithelzellen**

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die Existenz und Eigenschaften  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren und deren Funktion in isolierten und kultivierten equinen Trachealepithelzellen (ETEZ) mittels pharmakologischer und biochemischer Methoden untersucht. Die Hauptergebnisse dieser Studie sind, dass in frisch isolierten Zellen und Primärkulturen hauptsächlich der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptorsubtyp funktionell exprimiert wird. Die Expression  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren wurde mittels Radioligandenbindungsstudien, Westernblot und immunzytochemischen Analysen belegt. Die Funktionalität der nachgewiesenen Rezeptoren wurde durch die Messung der durch Agonisten-induzierten Bildung von intrazellulärem cAMP nachgewiesen.

Die Schlussfolgerung, dass ETEZ zu ca. 100% den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptorsubtyp exprimieren, basiert auf folgenden Beobachtungen:

Erstens passen die aus Verdrängungsexperimenten mit dem  $\beta_2$ -AR selektiven Antagonisten ICI 118.551 stammenden Bindungskurven von ICYP im Gleichgewichtszustand wesentlich besser zu einem „One-site binding model“, das nur eine Bindungsstelle voraussetzt, als zu einem Modell mit zwei Bindungsstellen. Die steile monophasische Konzentration-Inhibitionskurve (Abb. 25) spricht ebenfalls für die Anwesenheit des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptorsubtyps (ABRAHAM et al. 2004). Andererseits zeigte sich in den Kurven aus der Verdrängung von ICYP durch den  $\beta_1$ -AR selektiven Antagonisten CGP 20712A ein Plateau mit einer extremen Rechtsverschiebung (Abb. 25) trotz steigender Konzentrationen von CGP 20712A. Die Affinität von CGP 20712A für den  $\beta_2$ -Subtypen war ferner über 10.000-fach niedriger als die von ICI 118.551. Des Weiteren führte die Transformation der ICYP-Bindungsdaten in Scatchard-Plots (Abb. 23 und 24, Insets) zu annähernd linearen Kurvenverläufen und spricht somit für die Existenz einer homogenen Population des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptorsubtyps in ETEZ.

Zweitens wurde die Aktivierung und damit die Funktionalität von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren in ETEZ indirekt über die Stimulation der Bildung von intrazellulärem cAMP nachgewiesen. Die relativen Wirkungen von Epinephrin, Norepinephrin und Isoproterenol, die intrazelluläre Bildung von cAMP über den basalen Spiegel hinaus zu stimulieren (Abb. 28), sind mit der Funktion von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren in der Zellmembran von ETEZ zu erklären. Isoproterenol ist seinem  $EC_{50}$ -Wert nach etwa 1000-fach stärker wirksam als Epinephrin und etwa 6000-fach stärker als Norepinephrin. Die Rangfolge der relativen Wirkpotenz, Isoproterenol > Epinephrin > Norepinephrin, ist charakteristisch für  $\beta_2$ -adrenerge regulierte Systeme (LANDS et al. 1967).

Das Ausmaß der cAMP-Bildung in ETEZ nach Stimulation durch Isoproterenol war ca. 1000-fach höher (nanomolarer Bereich) als die cAMP-Bildung in anderen primären Atemwegsepithelzellen und Zelllinien (picomolarer Bereich). Die maximale Isoproterenol-induzierte cAMP-Bildung betrug 50 nmol/10<sup>6</sup> Zellen für frisch isolierte ETEZ (Abb. 28) und 27 nmol/10<sup>6</sup> Zellen für Primärkulturen (Abb. 28). In tracheobronchialen Epithelzellen des Kaninchens belief sich die cAMP-Bildung durch Isoproterenol auf 49-74 pmol/10<sup>6</sup> Zellen (KELSEN et al. 1994) und 42 pmol/10<sup>5</sup> Zellen in frisch isolierten humanen Tracheozyten (KELSEN et al. 1995). ABRAHAM et al. (2004) stellten eine cAMP-Bildung von 57

pmol/10<sup>6</sup> Zellen and 65 pmol/10<sup>6</sup> Zellen in den Atemwegsepithelzelllinien 16HBE14o- und Calu-3 fest. In frisch isolierten ETEZ war die maximale Isoproterenol-induzierte cAMP-Bildung höher als in Zellen aus der Primärkultur. Eine Erklärung hierfür mag sein, dass die maximale Rezeptordichte ( $B_{\max}$ ) bei frisch isolierten Zellen signifikant höher war als bei Zellen aus der Primärkultur (Tabelle 2). Die  $\beta$ -adrenerge Rezeptordichte bestimmt letztendlich die maximal mögliche Wirkung von Isoproterenol (GEORGE et al. 1986).

Die cAMP-Konzentration in primären ETEZ wurde mit der AlphaScreen-Methode gemessen. Dieser hochsensitive, nicht-radioaktive Assay verwendet sehr kleine Volumina (Gesamt: 25  $\mu$ l) und ist geeignet, im hohen Durchsatz eine große Anzahl an Proben zu bestimmen.

Um die Schlussfolgerung, dass  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren verantwortlich für den Isoproterenol-stimulierten Effekt sind, zu verifizieren und um den beteiligten Rezeptorsubtyp zu finden, war es notwendig zu demonstrieren, dass  $\beta$ -agonistische Effekte durch die entsprechenden  $\beta$ -adrenergen Antagonisten ICI 118.551 ( $\beta_2$ -selektiv) oder CGP 20712A ( $\beta_1$ -selektiv) zu inhibieren sind. Wie zu erwarten, wurde die Isoproterenol-induzierte Erhöhung der cAMP-Bildung durch eine Behandlung sowohl frisch isolierter Zellen als auch der Primärkultur mit 100 nM ICI 118.551 signifikant antagonisiert, jedoch nicht in Anwesenheit von 300 nM CGP 20712A (Abb. 29). Dies zeigt klar, dass der Mechanismus der cAMP-Bildung nach Behandlung von ETEZ mit adrenergen Rezeptoragonisten auf eine Aktivierung der  $\beta_2$ -Rezeptorsubtypen zurückzuführen ist. Wenn die Population  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren hauptsächlich aus  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptorsubtypen bestünde, würde man auch erwarten, dass eine agonistisch induzierte cAMP-Erhöhung durch die Anwesenheit des Antagonisten ICI 118.551 verhindert wird, nicht jedoch durch CGP 20712A. Zusammenfassend wird durch diese Daten gezeigt, dass in Gegenwart einer  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -spezifischen Rezeptorblockade die Konzentration-Wirkungskurven für die Isoproterenol-induzierte cAMP-Bildung in primären ETEZ auf eine Beteiligung von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren hinweisen und nicht auf eine Beteiligung von  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit zum ersten Mal die Beobachtung gemacht, dass durch die Behandlung primärer ETEZ mit  $\beta$ -adrenergen Agonisten eine statistisch signifikante Erhöhung der intrazellulären cAMP-Bildung über den Basalspiegel hinaus resultiert und dass sich diese Wirkung ebenso statistisch signifikant wieder durch den Rezeptorsubtypspezifischen Antagonisten ICI 118.551 inhibieren lässt. Dies spricht dafür, dass die in den ETEZ gefundenen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren funktionell in der Lage sind, agonistische

Liganden-induzierte Signale durch die Membran in die Zelle zu übertragen. Damit werden die bei einer Reihe von Zelltypen bekannten Befunde für Lungenepithelzellen, dass die Bindung von Agonisten an  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt (NIJKAMP et al. 1992), auch für ETEZ bestätigt. Den so generierten ETEZ ist somit ein für die autonome Regulation von Lungenepithelzellen wichtiger Signaltransduktionsweg in Kultur erhalten geblieben.

Drittens weisen die Ergebnisse der Westernblotanalysen und immunzytochemischen Färbungen von Zellmembranen mittels Anti- $\beta_2$ -adrenergen Rezeptorantikörpern auf eine Expression von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren hin. Die Analyse der Westernblots zeigte Proteinbanden bei einem Molekulargewicht von 72 kDa. Normalerweise haben  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren durch posttranslationale Modifizierungen ein höheres Molekulargewicht als aufgrund ihrer Sequenz zu erwarten wäre. Als Ursache hierfür ist z.B. eine Glykosylierung zu nennen (GEORGE et al. 1986). Mittels unterschiedlicher Methoden, wie z.B. Affinitätschromatographie und Gelelektrophorese, aufgereinigte  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren aus Lungen unterschiedlicher Säuger zeigten nahezu identische Massen von 64-67 kDa (BENOVIC et al. 1984; GEORGE et al. 1986; INSOFIT et al. 1986). Der Nachweis der Expression von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren im Westernblot wurde noch bekräftigt durch die immunzytochemische Färbung intakter Zellen, welche einen direkten Beweis für Lokalisation der  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren auf der Zellmembran der ETEZ lieferte.

Das hier vorliegende Ergebnis, dass primäre ETEZ funktionelle  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren exprimieren, stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Daten funktioneller  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren in Lungenepithelzellen einiger Säugerarten, wie dem Frettchen (KERCSMAR et al. 1991), dem Kaninchen (KELSEN et al. 1994; MARDINI et al. 1994), dem Hund (MICHAEL 1986; LAZARUS et al. 1984), der Kuh (MADISON et al. 1989), der Maus (McGRAW et al. 2000) und dem Menschen (DAVIS et al. 1990; KELSEN et al. 1995; KELSEN et al. 2000) überein.

Die vorliegenden Resultate aus den Radioligandenbindungsstudien mit intakten ETEZ demonstrieren eine höhere Rezeptordichte in frisch isolierten Zellen ( $12727 \pm 883,6$  Bindungsstellen/Zelle), als bei in Primärkultur gehaltenen ETEZ ( $3730 \pm 212$  Bindungsstellen/Zelle). Allerdings waren die Affinitätskonstanten nicht signifikant verschieden ( $31,78 \pm 6,57$  pM vs.  $15,26 \pm 3,37$  pM). Der Grund für die unterschiedlichen

Rezeptordichten bei frischen und in Primärkultur gehaltenen ETEZ könnte damit erklärt werden, dass die isolierten ETEZ in serumfreiem Medium kultiviert wurden, und Serum die Proteinexpression in verschiedenen Zelltypen induzieren kann.

Die Rezeptordichte in frisch isolierten ETEZ war vergleichbar mit der von KELSEN et al. (1995) berichteten, die ein  $B_{\max}$  von 8900 Rezeptoren/Zelle in frisch isolierten humanen Trachealepithelzellen fanden, von denen 80% dem  $\beta_2$ -Subtyp entsprachen. MARDINI et al. (1994) berichteten eine  $B_{\max}$  von 10700 Rezeptoren/Zelle in frisch isolierten Trachealepithelzellen des Kaninchens mit 85%  $\beta_2$ -Rezeptoren. Die Bindungsaffinität ( $K_D$ ) für den Radioliganden ICYP in frisch isolierten ETEZ war vergleichbar mit der, die von DAVIS et al. (1990) ( $K_D$  von  $35 \pm 14$  pM) und KELSEN et al. (2000) ( $K_D$  von 29,70 pM) in frisch isolierten humanen Trachealepithelzellen gefunden wurde. Die  $K_D$  für ETEZ in Primärkultur war auch vergleichbar mit der  $K_D$  von  $25 \pm 13$  pM für primäre humane Trachealepithelzellkulturen (DAVIS et al. 1990) und der  $K_D$  von  $20 \pm 3$  pM für Kulturen boviner submuköser Trachealdrüsenzellen (MADISON et al. 1989). Auch ABRAHAM et al. (2004) fanden in den humanen Lungenepithelzelllinien Calu-3 und 16HBE14o(-)  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren mit einer  $B_{\max}$  von  $9980 \pm 1127$  bzw.  $6423 \pm 895$  Bindungsstellen/Zelle und einer  $K_D$  von  $32 \pm 2,70$  pmol/l bzw.  $25 \pm 1,10$  pmol/l. Die Variabilität der gemessenen Bindungsparameter von Lungenepithelzellen mag in Spezies-spezifischen Unterschieden und verschiedenen experimentellen Bedingungen begründet liegen.

Vergleicht man die Bindung von ICYP an ETEZ mit der an anderen Zellen, welche  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren exprimieren, wie z.B. zirkulierende Lymphozyten und Skelettmuskelzellen, wird deutlich, dass die in dieser Arbeit gefundenen Bindungsparameter mit denen durch verschiedene Autoren beschriebenen Werten übereinstimmen. So dokumentieren ABRAHAM et al. (2004)  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren in Kälberlymphozyten mit einer  $K_D$  von  $17,23 \pm 2,80$  pmol/l, einer Rezeptordichte von  $987 \pm 89$  Bindungsstellen/Zelle und in equinen Lymphozyten mit einer  $K_D$  von  $14,40 \pm 1,70$  pmol/l und einer  $B_{\max}$  von  $320 \pm 20$  Rezeptoren/Zelle (ABRAHAM et al. 2001). Auch für humane Lymphozyten wurden Werte für  $K_D$  von  $57 \pm 7,10$  pmol/l und  $B_{\max}$  von  $1,56 \pm 0,20$  fmol / $10^6$  Zellen berichtet (BRODDE et al. 1981). Humane Skelettmuskelzellen, die nur  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren exprimieren, weisen eine  $K_D$  von  $24 \pm 2,20$  pmol/l (LIGGETT et al. 1988) auf.

Zusammenfassend wurde nachgewiesen, dass equine Trachealepithelzellen (ETEZ) hauptsächlich  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptorsubtypen exprimieren; die Zellen behielten in vitro unter Kulturbedingungen bedeutende, funktionelle Eigenschaften der Epithelzellen, da eine Konzentrations-abhängige Wirkung auf die Stimulation mit  $\beta$ -adrenergen Agonisten hin in Form einer erhöhten cAMP-Bildung erfolgte. Somit ist der Rezeptor funktionell an das Adenylatzyklase-System gekoppelt und es entstehen maßgebliche Mengen des intrazellulären Signalmoleküls cAMP. Folglich sollte es möglich sein, an Trachealepithelzellen in vitro-Studien durchzuführen, um die molekularen Mechanismen der Regulation der Aktivität von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren an den Epithelzellen der Lunge bei physiologischen und pathophysiologischen Zuständen der Atemwege des Pferdes auf molekularer Ebene besser zu verstehen und daraus Evidenz-basierte Therapieprotokolle für die RAO des Pferdes zu entwickeln.

### **5.3 Ausblick**

Die Etablierung von Zellkulturen primärer Lungenepithelzellen als Modell zur Erforschung equiner respiratorischer Erkrankungen ist ein aus verschiedenen Gründen nützliches Werkzeug, um Tierversuche zu ersetzen. Die Zellen können z.B. als geeignetes Modell fungieren, um speziell die Pathophysiologie der equinen RAO und deren molekulare Genese besser zu verstehen. Zum Beispiel kann die Rolle sowohl der aus den Epithelzellen stammenden Zytokine und Chemokine, als auch der exprimierten Rezeptoren wie z.B. der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren untersucht werden und so die Entwicklung ursächlich wirkender Pharmaka vorangetrieben werden. Wegen der enormen Bedeutung des Lungenepithels, ist die wissenschaftliche Aufklärung der genauen Funktionen und Mechanismen dieses Gewebes sicherlich ein wichtiger Schritt zur Entwicklung neuer Therapien für Lungenerkrankungen. Allerdings weisen Primärkulturen von Lungenepithelzellen eine Reihe von Einschränkungen wie z.B. eine kurze Lebensdauer auf. Durch Transformation oder Immortalisierung primärer Lungenepithelzellen, mit dem Ziel, permanente Zelllinien zu etablieren, könnte dieser Nachteil umgangen werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Workineh Shibeshi Alemayehu

Etablierung und Charakterisierung primärer equiner Trachealepithelzellen: Ein in vitro-Modell zur Untersuchung der Expression und Funktion pulmonaler  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren

Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im August 2009

100 Seiten, 29 Abbildungen, 2 Tabellen, 266 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Pferd, Trachea, Zellkultur, Epithelzellen,  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, cAMP

Die Kultivierung equiner Trachealepithelzellen stellt ein nützliches Modell dar, die (patho)-physiologischen Mechanismen der obstruktiven Atemwegserkrankungen des Pferdes auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit war es, Methoden für die Isolation, Charakterisierung und weitergehende Kultivierung equiner Trachealepithelzellen (ETEZ) zu etablieren und validieren und die Expression und Funktionalität der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren an frisch isolierten ETEZ und deren Primärkulturen mittels pharmakologischer und biochemischer Verfahrenstechniken zu analysieren. Epithelzellen wurden durch Trypsinverdau aus der Trachea gesunder Pferde gewonnen, indem zuerst die Mukosa der Trachea freigelegt und diese dann vom darunterliegenden Bindegewebe stumpf getrennt wurde. Das gewonnene Gewebe wurde zerkleinert und enzymatisch mit 0,25% Trypsin-EDTA-Lösung für 2 h bei 37°C verdaut. Durch Siebung und Zentrifugation wurden die Zellen gereinigt, vereinzelt und gesammelt, wobei kontaminierende Fibroblasten später durch differentielle Adhäsion von den Epithelzellen getrennt wurden. Die isolierten Zellen wurden sowohl licht- bzw. elektronenmikroskopisch charakterisiert, als auch immunzytochemisch hinsichtlich Zytokeratin (für Epithelzellen) und Vimentin (für Fibroblasten) gefärbt. Die durchschnittliche Zellausbeute wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt und betrug  $6,10 \pm 0,63 \times 10^6$  Zellen pro 500 mg zerkleinertem Gewebe ( $n = 11$ ). Die Zellvitalität wurde mittels Trypanblau-Färbung ermittelt und betrug  $94,70 \pm 1,17\%$  ( $n = 11$ ). Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass  $93,57 \pm 1,67\%$  ( $n = 11$ ) der frisch isolierten Zellen und ca. 100% ( $n = 5$ ) der Primärkulturen auf Zytokeratin 5/6/18 positiv reagierten. Auf Anti-Vimentin reagierten dagegen nur  $9,83 \pm 0,94\%$  ( $n = 11$ ) der Zellen positiv. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $6,90 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in serumfreiem AECGM ausgesät und bildeten innerhalb einer Woche einen konfluenten Monolayer. Die konfluenten Zellen wurden mittels

Dispase II abgelöst. Die erste (P<sub>1</sub>) und die zweite (P<sub>2</sub>) Passage konnte erfolgreich in serumfreien AECGM kultiviert und auf der Stufe P<sub>2</sub> 30 Tage lang gehalten werden.

Weitethin wurden die Expression und Funktionalität der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren in frisch isolierten und kultivierten Epithelzellen untersucht. Mittels Radioligandenbindungsstudien, Westernblot, Immunfluoreszenzfärbung und cAMP-Assays konnten erstmalig die Dichte, Affinität, Subtypen, Proteinexpression und zelluläre Lokalisation der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren sowie die Rezeptorfunktion bestimmt werden. Messungen an frisch isolierten ETEZ ergaben für die mittlere Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von  $31,78 \pm 6,57$  pM ( $n = 7$ ) und eine maximale  $\beta$ -adrenerge Rezeptordichte ( $B_{Max}$ ) von  $12727 \pm 883,6$  Bindungsstellen/Zelle ( $n = 7$ ) ermittelt aus Sättigungsexperimenten mit dem  $\beta$ -adrenergen Rezeptorantagonisten [<sup>125</sup>I] Iodocyanopindolol (ICYP) in Anwesenheit des nicht selektiven  $\beta$ -Rezeptorantagonisten ( $\pm$ )-CGP 12177. Für Primärkulturen ergaben sich Werte für  $K_D$  von  $15,26 \pm 3,37$  pM ( $n = 6$ ) und für  $B_{Max}$  von  $3730 \pm 212$  Bindungsstellen/Zelle ( $n = 6$ ). Bei Verdrängungsexperimenten wurde die ICYP konzentrationsabhängig durch den  $\beta_2$ -selektiven Rezeptorantagonisten ICI 118.551 und den  $\beta_1$ -selektiven Rezeptorantagonisten CGP 20712A verdrängt, wobei für ICI 118.551 eine 10.000-fach höhere Affinität ( $K_i = 1,74 \pm 0,15$  nM in frisch-isolierten Zellen und  $1,19 \pm 0,41$  nM in Primärkultur) gezeigt wurde als für CGP 20712A ( $K_i = 17 \pm 7,90$   $\mu$ M in frisch isolierten Zellen). Die cAMP-Bildung wurde in frisch isolierten ETEZ konzentrationsabhängig durch die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoragonisten Isoproterenol, Epinephrin und Norepinephrin in der Reihenfolge ihrer Potenz mit einer  $EC_{50}$  von 58 nM ( $n = 6$ ), 13,60  $\mu$ M ( $n = 6$ ) bzw. 0,43 mM ( $n = 6$ ) stimuliert. Diese cAMP-Bildung konnte durch Behandlung der Zellen mit 100 nM der  $\beta_2$ -selektiven ICI 118.551, nicht aber durch 300 nM des  $\beta_1$ -selektiven CGP 20712A blockiert werden. Mit einem  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptorantikörper konnte eine 72 kDa Proteinbande und mit demselben Antikörper in der Fluoreszenzfärbung Rezeptorantigene auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnten mit dem etablierten Protokoll große Mengen equiner Trachealepithelzellen isoliert und kultiviert werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen erstmalig, dass primäre equine Trachealepithelzellen funktionale  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren exprimieren und das Protokoll zur Etablierung eines zellbasierten Modells geeignet ist, um in vitro verschiedene Funktionen und eine Pharmaka-induzierte Regulation der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade hinsichtlich physiologischer und pathophysiologischer Zustände bei Atemwegserkrankungen des Pferdes und hierfür relevante pharmakologische und toxikologische Zielstrukturen untersuchen zu können.

## 7 SUMMARY

Workineh Shibeshi Alemayehu

Establishment and characterization of primary equine tracheal epithelial cell culture: An in-vitro model for the study of expression and function of pulmonary  $\beta$ -adrenergic receptors.

Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted August 2009

100 pages, 29 figures, 2 tables, 266 references

Keywords: horse, trachea, cell culture, epithelial cells,  $\beta$ -adrenergic receptor, cAMP

Culture of airway epithelial cells is a useful model to investigate physiology of airway epithelia and airway disease mechanisms, like equine recurrent airway obstruction (RAO). The objective of the study presented here was to establish validated techniques for isolation, characterization and serial culture of equine tracheal epithelial cells (ETEC), and to study  $\beta$ -adrenergic receptor expression and function in freshly isolated epithelial cells and primary cultures of these cells using pharmacological and biochemical methods. Epithelial cells were isolated from trachea of normal horses by exposing and stripping the mucosal epithelium. The tissue was minced and dissociated enzymatically using 0.25% trypsin-EDTA solution for 2h at 37 °C. Cells were collected by sieving and centrifugation and contaminating fibroblasts were removed by differential adhesion. Isolated cells and cultures were characterized by light and electron microscopy and immunocytochemical staining for cytokeratins for epithelial cells and vimentin for fibroblasts. The average cell yield determined using a Neubauer counting chamber was  $6.10 \pm 0.63 \times 10^6$  cells per 500 mg tissue (n =11), and cell viability as assessed by trypan blue exclusion test was  $94.70 \pm 1.17\%$  ( n =11). Immunofluorescent staining showed that  $93.57 \pm 1.67\%$  ( n = 11) freshly isolated cells, and nearly 100 % ( n = 5) of primary cultures to be immunopositive for cytokeratin 5/6/18. Anti-vimentin antibody labelled not more than  $9.83 \pm 0.94\%$  of the cells ( n = 11). Cells seeded at a density of  $6.90 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in serum-free airway epithelial cell growth medium formed confluent monolayers usually within a week. Confluent cells were dissociated using dispase II and first passages (P<sub>1</sub>) and second passages (P<sub>2</sub>) were successfully established in the same serum-free medium and cultures could be maintained at the level of P<sub>2</sub> over 30 days.

On the other hand, the expression and function of  $\beta$ -adrenergic receptors was studied from freshly isolated and primary cultures of equine tracheal epithelial cells. This study for the first time reports  $\beta$ -adrenergic receptor density, affinity, subtype, receptor protein expression, cellular localization and function, assessed by radioligand binding, western blotting, immunofluorescence staining and assay of cAMP accumulation. In freshly isolated ETEC, the mean equilibrium dissociation constant ( $K_D$ ) and the maximum  $\beta$ -adrenergic receptor density ( $B_{Max}$ ) determined by saturation binding using the  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist [ $^{125}$ I] iodocyanopindolol (ICYP) in the presence of the non-selective  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist ( $\pm$ )-CGP 12177, were  $31.78 \pm 6.57$  pM ( $n = 7$ ) and  $12727 \pm 883.6$  binding sites/cell ( $n = 7$ ) respectively. The values for  $K_D$  and  $B_{Max}$  were  $15.26 \pm 3.37$  pM ( $n = 6$ ) and  $3730 \pm 212$  binding sites/cell ( $n = 6$ ) respectively for primary cultures. In competitive binding experiments, selective  $\beta_2$ -adrenergic receptor antagonist ICI 118.551 inhibited concentration-dependently ICYP binding with 10,000-fold higher affinity ( $K_i = 1.74 \pm 0.15$  nM in fresh isolates and  $1.19 \pm 0.41$ nM in primary cultures) than CGP 20712A (selective  $\beta_1$ -adrenergic receptor antagonist) which displayed a value of  $K_i = 17 \pm 7.90$   $\mu$ M in fresh isolates. In fresh ETEC cells, isoproterenol, epinephrine and norepinephrine induced cAMP production with a rank order of  $EC_{50}$  of 58 nM ( $n = 6$ ), 13.60  $\mu$ M ( $n = 6$ ) and 0.43 mM ( $n = 6$ ), respectively, which could be significantly attenuated by 100 nM of  $\beta_2$ -selective ICI 118.551, but not by 300 nM of  $\beta_1$ -selective CGP 20712A. Western blot analysis with  $\beta_2$ -adrenergic receptor antibody revealed a protein band of 72 kDa and fluorescent staining of cells with same antibody localizing receptor antigens on the cell membrane. In conclusion in the present study, a high-yield protocol for isolation and culture of equine tracheal epithelial cells could be established. These data provide the first lines of evidence establishing that primary equine tracheal epithelial cells express functional  $\beta_2$ -adrenergic receptor proving the potential use of cell-based models as *in vitro* tool to study various functions and drug-induced regulations of the  $\beta$ -adrenergic receptor signaling in (patho) physiological states in of equine airway diseases as well as pharmacological and toxicological targets relevant to airway diseases.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Abraham G, Brodde OE, Ungemach FR. Identification and characterisation of beta-adrenoceptors on intact equine peripheral blood lymphocytes with the radioligand (-)-[<sup>125</sup>I]-iodocyanopindolol. *Equine Vet J.* 2001;33:487-493.
- 2 Abraham G, Gottschalk J, Ungemach FR. Possible role of dexamethasone in sensitizing the beta-2-adrenergic receptor system in vivo in calves during concomitant treatment with clenbuterol. *Pharmacology.* 2004a;72:196-204.
- 3 Abraham G, Kneuer C, Ehrhardt C, Honscha W, Ungemach FR. Expression of functional beta 2-adrenergic receptors in the lung epithelial cell lines 16HBE14o (-), Calu-3 and A549. *Biochim Biophys Acta.* 2004b;1691:169-179.
- 4 Abraham G, Kottke C, Ammer H, Dhein S, Ungemach FR. Segment-dependent expression of muscarinic acetylcholine receptors and G-protein coupling in the equine respiratory tract. *Vet Res Commun.* 2007;31:207-226.
- 5 Abraham G, Kottke C, Dhein S, Ungemach FR. Agonist-independent alteration in beta-adrenoceptor-G-protein-adenylate cyclase system in an equine model of recurrent airway obstruction. *Pulm Pharmacol Ther.* 2006;19:218-229.
- 6 Abraham G, Kottke C, Dhein S, Ungemach FR. Pharmacological and biochemical characterization of the beta-adrenergic signal transduction pathway in different segments of the respiratory tract. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:1067-1081.
- 7 Abraham G, Kottke C, Ungemach FR. Equine recurrent airway obstruction does not alter airway muscarinic acetylcholine receptor expression and subtype distribution. *J Vet Pharmacol Ther.* 2007;30:401-409.
- 8 Abraham G. Charakterisierung  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren auf Pferdelymphozyten und deren Regulation unter dem Einfluß von Clenbuterol und Dexamethason [Dissertation med.vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2001.
- 9 Adam EC, Holgate ST, Fildew CJ, Lackie PM. Role of carbohydrates in repair of human respiratory epithelium using an in vitro model. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:1398-1404.
- 10 Ainsworth DM, Wagner B, Franchini M, Grünig G, Erb HN, Tan JY. Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 2006;67:669-77.
- 11 Amend AM, Guan XM. Cloning, sequencing, and expression of the rhesus monkey beta 2 adrenergic receptor. *DNA Cell Biol.* 1995;14:753-757.

- 12 Aizawa H, Inoue H, Takada S, Koto H, Ikeda T, Hirose T. Inhibition of airway smooth muscle contraction by airway epithelium in human bronchus. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*. 1991;29:1569-1573.
- 13 Baeza-Squiban AE, Boisvieux-Ulrich C, Guilianelli OH, Geraud G, Guennou C, Marano F. Extracellular matrix-dependent differentiation of rabbit tracheal epithelial cells in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1994;30:56-67.
- 14 Bai TR. Abnormalities in airway smooth muscle in fatal asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1990;41:552-557.
- 15 Bai Y, Sanderson MJ. Airway smooth muscle relaxation results from a reduction in the frequency of  $Ca^{2+}$  oscillations induced by a cAMP-mediated inhibition of the IP3 receptor. *Respir Res*. 2006;7:34.
- 16 Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*. 2004;23:327-333.
- 17 Barnes PJ, Nadel JA, Skoogh BE, Roberts JM. Characterization of beta adrenoceptor subtypes in canine airway smooth muscle by radioligand binding and physiological responses. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983;225:456-461.
- 18 Beck LA, Tancowny B, Brummet ME, Asaki SY, Curry SL, Penno MB, Foster M, Bahl A, Stellato C. Functional analysis of the chemokine receptor CCR3 on airway epithelial cells. *J Immunol*. 2006;177:3344-3354.
- 19 Beisswenger C, Kandler K, Hess C, Garn H, Felgentreff K, Wegmann M, Renz H, Vogelmeier C, Bals R. Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense. *J Immunol*. 2006;177:1833-1837.
- 20 Benovic JL, Shorr RG, Caron MG, Lefkowitz RJ. The mammalian beta 2-adrenergic receptor: purification and characterization. *Biochemistry*. 1984;23:4510-4518.
- 21 Bento AM, Hershenson MB. Airway remodelling: potential contributions of subepithelial fibrosis and airway smooth muscle hypertrophy/hyperplasia to airway narrowing in asthma. *Allergy Asthma Proc*. 1998;19:353-358.
- 22 Berthiaume Y, Matthay MA. Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007;159:350-359.
- 23 Bertrand C, Tschirhart E. Epithelial factors: modulation of the airway smooth muscle tone. *Fundam Clin Pharmacol*. 1993;7:261-273.
- 24 Björnsdóttir US, Cypcar DM. Asthma: an inflammatory mediator soup. *Allergy*. 1999;54:55-61.

- 25 Blouquit-Laye S, Chinet T. Ion and liquid transport across the bronchiolar epithelium. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;159:278-282.
- 26 Boland S, Boisvieux-Ulrich E, Houcine O, Baeza-Squiban A, Pouchelet M, Schoëvaërt D, Marano F. TGF beta 1 promotes actin cytoskeleton reorganization and migratory phenotype in epithelial tracheal cells in primary culture. *J Cell Sci.* 1996;109:2207-2219.
- 27 Bonnans C, Gras D, Chavis C, Mainprice B, Vachier I, Godard P, Chanez P. Synthesis and anti-inflammatory effect of lipoxins in human airway epithelial cells. *Biomed Pharmacother.* 2007;61:261-267.
- 28 Boterman M, Smits SR, Meurs H, Zaagsma J. Protein kinase C potentiates homologous desensitization of the beta 2-adrenoceptor in bovine tracheal smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 2006;529:151-156.
- 29 Breeze RG, Wheeldon EB. The cells of the pulmonary airways. *Am Rev Respir Dis.* 1977;116:705-707.
- 30 Brockman-Schneider RA, Amineva SP, Bulat MV, Gern JE. Serial culture of murine primary airway epithelial cells and ex vivo replication of human rhinoviruses. *J Immunol Methods.* 2008;339:264-269.
- 31 Brodde OE, Enge G, Hoyer DK, Bock D, Weber F. The  $\beta$ -adrenergic receptor in human lymphocytes: Subclassification by the use of a new radio-ligand,  $^{125}\text{I}$ -iodocyanopindolol. *Life Sci.* 1981;29:2189-2198.
- 32 Brodde OE. Beta-1 and beta-2 adrenoceptor polymorphisms: functional importance, impact on cardiovascular diseases and drug responses. *Pharmacol Ther.* 2008;117:1-29.
- 33 Brown RA, Clarke GW, Ledbetter CL, Hurle MJ, Denyer JC, Simcock DE, Coote JE, Savage TJ, Murdoch RD, Page CP, Spina D, O'Connor BJ. Elevated expression of adenosine A1 receptor in bronchial biopsy specimens from asthmatic subjects. *Eur Respir J.* 2008;31:311-319.
- 34 Bünemann M, Hosey MM. G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol.* 1999;517:5-23.
- 35 Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev.* 2003;24:765-781.
- 36 Carstairs JR, Nimmo AJ, Barnes PJ. Autoradiographic visualization of beta-adrenoceptor subtypes in human lung. *Am Rev Respir Dis.* 1985;132:541-547.

- 37 Carswell H, Nahorski SR. Beta-adrenoceptor heterogeneity in guinea-pig airways: comparison of functional and receptor labelling studies. *Br J Pharmacol.* 1983;79:965-971.
- 38 Chen WS, Hao TL, Wang X, Tian D, Wu RL. Rapid isolation and culture of pig airway epithelial cells. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2005;34:685-687.
- 39 Chen J, Chen Z, Narasaraaju T, Jin N, Liu L. Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs. *Lab Invest.* 2004;84:727-735.
- 40 Chen XH, Harden TK, Nicholas RA. Molecular cloning and characterization of a novel beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 1994;269:24810-24819.
- 41 Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 1973;22:3099-3108.
- 42 Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. High-resolution crystal structure of an engineered human  $\beta_2$ -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science.* 2007;318:1258-1265.
- 43 Chevillard M, Hinnrasky J, Zahm JM, Plotkowsky MC, Puchelle E. Proliferation, differentiation and ciliary beating of human respiratory ciliated cells in primary culture. *Cell Tissue Res.* 1991;264:49-55
- 44 Chung KF. Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets.* 2006;7:675-681.
- 45 Clarke LL, Burns KA, Bayle JY, Boucher RC, Van Scott MR. Sodium- and chloride-conductive pathways in cultured mouse tracheal epithelium. *Am J Physiol.* 1992;263:L519-L525.
- 46 Coulson FR, Fryer AD. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther.* 2003;98:59-69.
- 47 Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohri T, Chin L, Eng K, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, Gruenert DC. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;10:38-47.
- 48 Cozens AL, Yezzi MJ, Yamaya M, Steiger D, Wagner JA, Garber SS, Chin, Simon EM, Cutting GR, Gardner P, Friend DS, Basbaum CB, Gruenert DC . A transformed human epithelial cell line that retains tight junctions post crisis. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1992;28:735-744.

- 49 Craviso GL. Generation of functionally competent single bovine adrenal chromaffin cells from cell aggregates using the neutral protease dispase. *J Neurosci Methods*. 2004;30:275-281.
- 50 Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5:772-777.
- 51 Danielian PS, Bender Kim CF, Caron AM, Vasile E, Bronson RT, Lees JA. E2f4 is required for normal development of the airway epithelium. *Dev Biol*. 2007;305:564-576.
- 52 Daniely Y, Liao G, Dixon D, Linnoila RI, Lori A, Randell S H, Oren M, Jetten AM. Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287:C171-C181.
- 53 Davidson DJ, Gray MA, Kilanowski FM, Tarran R, Randell SH, Sheppard DN, Argent BE, Dorin JR. Murine epithelial cells: isolation and culture. *J Cyst Fibros*. 2004;3:59-62.
- 54 Davidson DJ, Kilanowski FM, Randell SH, Sheppard DN, Dorin JR. A primary culture model of differentiated murine tracheal epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279:L766-L778.
- 55 Davies MN, Secker A, Freitas AA, Mendao M, Timmis J, Flower DR. On the hierarchical classification of G protein-coupled receptors. *Bioinformatics*. 2007;23:3113-3118.
- 56 Davis CW, Abdullah LH. In vitro models for airways mucin secretion. *Pulm Pharmacol Ther*. 1997;10:145-155.
- 57 Davis IC, Matalon S. Epithelial sodium channels in the adult lung-important modulators of pulmonary health and disease. *Adv Exp Med Biol*. 2007;618:127-140.
- 58 Davis PB, Silski CL, Kerckmar CM, Infeld M. Beta-adrenergic receptors on human tracheal epithelial cells in primary culture. *Am J Physiol*. 1990;258:C71-C76.
- 59 Deaton CM. The role of oxidative stress in an equine model of human asthma. *Redox Rep*. 2006;11:46-52.
- 60 De Buysscher E, Kennedy J, Mendicino J. Synthesis of mucin glycoproteins by epithelial cells isolated from swine trachea by specific proteolysis. *In Vitro*. 1984;20:433-446.
- 61 De Jong PM, van Sterkenburg MA, Kempenaar JA, Dijkman JH, Ponc M. Serial culturing of human bronchial epithelial cells derived from biopsies. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1993;29:379-387.

- 62 Derksen FJ. Applied respiratory physiology, in equine respiratory disorders, J.Beech, Editor, Lea & Febiger: Philadelphia, PA. 1991;1-26.
- 63 Dimova S, Brewste ME, Noppe M, Jorissen M, Augustijns P. The use of human nasal in vitro cell systems during drug discovery and development. *Toxicol In Vitro*. 2005;19: 107-122.
- 64 Doherty GM, Christie SN, Skibinski G, Puddicombe SM, Warke TJ, de Courcey F, Cross AL, Lyons JD, Ennis M, Shields MD, Heaney LG. Non-bronchoscopic sampling and culture of bronchial epithelial cells in children. *Clin Exp Allergy*. 2003;33:1221-1225.
- 65 Dorscheid DR, Conforti AE, Hamann KJ, Rabe KF, White SR. Characterization of cell surface lectin-binding patterns of human airway epithelium. *Histochem J*. 1999; 31:145-151.
- 66 Dzimiri N. Regulation of  $\beta$ -adrenoceptor signaling in cardiac function and disease. *Pharmacol Rev*. 1999;51:465-501.
- 67 Endres M, Leinase I, Kaps C, Wentges M, Unger M, Olze H, Ringe J, Sittinger M, Rotter N. Changes in the gene expression pattern of cytokeratins in human respiratory epithelial cells during culture. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2005;262:390-396.
- 68 Evans CM, Kim K, Tuvim MJ, Dickey BF. Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects. *Curr Opin Pulm Med*. 2009;15:4-11.
- 69 Faisy C, Risse PA, Naline E, Guerot E, Fagon JY, Devillier P, Advenier C. Phosphodiesterase 4 inhibitors modulate beta 2-adrenoceptor agonist-induced human airway hyperresponsiveness. *Life Sci*. 2006;79:1929-1935.
- 70 Fang Y, Lahiri J, Picard L. G protein-coupled receptor microarrays for drug discovery. *Drug Discov Today*. 2003;8:755-761.
- 71 Feldman RD, Gros R. New insights into the regulation of cAMP synthesis beyond GPCR/G protein activation: implications in cardiovascular regulation. *Life Sci*. 2007;81:267-271.
- 72 Feng Q, Zhang Y, Li Y, Liu Z, Zuo J, Fang F. Two domains are critical for the nuclear localization of soluble adenylyl cyclase. *Biochimie*. 2006;88:319-328.
- 73 Finkelstein JN, Maniscalco WM, Shapiro DL. Properties of freshly isolated type II alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* .1983;762:398-404.
- 74 Fira-Mladinescu O, Tudorache V, Mihăicută S, Muntean D. New concepts in the pathogenesis and pathophysiology of COPD. *Pneumologia*. 2007;56:26-31.

- 75 Fischer A, Folkerts G, Geppetti P, Groneberg DA. Mediators of asthma: nitric oxide. *Pulm Pharmacol Ther.* 2002;15:73-81.
- 76 Folkerts G, Nijkamp FP. Airway epithelium: more than just a barrier. *Trends Pharmacol Sci.* 1998;19:334-341.
- 77 Forbes B. Human airway epithelial cell lines for in vitro drug transport and metabolism studies. *Pharm Sci Technol Today.* 2000;3:18-27.
- 78 Forrest IA, Murphy DM, Ward C, Jones D, Johnson GE, Archer L, Gould FK, Cawston TE, Lordan JL, Corris PA. Primary airway epithelial cell culture from lung transplant recipients. *Eur Respir J.* 2005;26:1080-1085.
- 79 Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 3<sup>rd</sup>.ed. Wiley-Liss, Inc. 1994;146.
- 80 Fuchs E. Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation. *Trends Genet.* 1988;4:277-281.
- 81 Fuchs S, Hollins AJ, Laue M, Schaefer UF, Roemer K, Gumbleton M, Lehr CM. Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C. *Cell Tissue Res.* 2003;311:31-45.
- 82 Gao X, Ray R, Xiao Y, Barker PE, Ray P. Inhibition of sulfur mustard-induced cytotoxicity and inflammation by the macrolide antibiotic roxithromycin in human respiratory epithelial cells. *BMC Cell Biol.* 2007;8:17.
- 83 George ST, Ruoho AE, Malbon CC. N-glycosylation in expression and function of beta-adrenergic receptors. *Biol Chem.* 1986;261:16559-16564.
- 84 Gerber V, Swinburne JE, Blott SC, Nussbaumer P, Ramseyer A, Klukowska-Rötzler J, Dolf G, Marti E, Burger D, Leeb T. Genetics of recurrent airway obstruction (RAO). *Dtsch Tierärztl Wochenschr.* 2008;115:271-275.
- 85 Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51:1417-1423.
- 86 Giembycz MA, Newton R. Beyond the dogma: novel beta2-adrenoceptor signalling in the airways. *Eur Respir J.* 2006;27:1286-1306.
- 87 Gilman AG. G proteins: transducers of receptor generated signals. *Annu Rev Biochem.* 1987;57:615-649.

- 88 Goldie RG, Spina D, Henry PJ, Lulich KM, Paterson JW. In vitro responsiveness of human asthmatic bronchus to carbachol, histamine, beta-adrenoceptor agonists and theophylline. *Br J Clin Pharmacol.* 1986;22:669-676.
- 89 Goldman WE, Baseman JB. Selective isolation and culture of a proliferating epithelial cell population from the hamster trachea. *In Vitro.* 1980;16:313-319.
- 90 Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res.* 2006;7:73.
- 91 Gray T, Coakley R, Hirsh A, Thornton D, Kirkham S, Koo JS, Burch L, Boucher R, Nettekheim P. Regulation of MUC5AC mucin secretion and airway surface liquid metabolism by IL-1beta in human bronchial epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286:L320-L330.
- 92 Gray TE, Guzman K, Davis CW, Abdullah LH, Nettekheim P. Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996;14:104-112.
- 93 Greene CM, McElvaney NG. Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2005;53:418-427.
- 94 Gruenert DC, Basbaum CB, Welsh MJ, Li M, Finkbeiner WE, Nadel JA. Characterization of human tracheal epithelial cells transformed by an origin-defective simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:5951-5955.
- 95 Gruenert DC, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am J Physiol.* 1995;268:L347-L360.
- 96 Gwilt CR, Donnelly LE, Rogers DF. The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacol Ther.* 2007;115:208-222.
- 97 Hackett T, Knight DA. The role of epithelial injury and repair in the origins of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007;7:63-68.
- 98 Halldorsson S, Asgrimsson V, Axelsson I, Gudmundsson GH, Steinarsdottir M, Baldursson O, Gudjonsson T. Differentiation potential of a basal epithelial cell line established from human bronchial explant. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2007;43:283-289.
- 99 Hattori R, Shimizu S, Majima Y, Shimizu T. EP4 agonist inhibits lipopolysaccharide-induced mucus secretion in airway epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2008;117:51-58.

- 100 Hauber HP, Zabel P. Emerging mucus regulating drugs in inflammatory and allergic lung disease. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2008;7:30-34.
- 101 Hausdorff WP, Lohse MJ, Bouvier M, Liggett SB, Caron MG, Lefkowitz RJ. Two kinases mediate agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *Symp Soc Exp Biol*. 1990;44:225-240.
- 102 Heckman CA, Marchok AC, Nettekheim P. Respiratory tract epithelium in culture: concurrent growth and differentiation during establishment. *J Cell Sci*. 1987;32:269-291.
- 103 Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, Zhang YJ, Weismüller KH, Godowski PJ, Ganz T, Randall SH, Modlin RL. Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol*. 2003;171:6820-6826.
- 104 Hicks WJr, Hall L 3rd, Sigurdson L Stewart C, Hard R, Winston J, Lwebuga-Mukasa J. Isolation and characterization of basal cells from human upper respiratory epithelium. *Exp Cell Res*. 1997;237:357-363.
- 105 Hoffman EA, Chiplunkar R, Casale TB. CT scanning confirms beta receptor distribution is greater for small versus large airways (abstract). *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155:855.
- 106 Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int*. 2008;57:1-10.
- 107 Hoshino M, Morita S, Iwashita H, Sagiya Y, Nagi T, Nakanishi A, Ashida Y, Nishimura O, Fujisawa Y, Fujino M. Increased expression of the human Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel 1 (CaCC1) gene in the asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1132-1136.
- 108 Hsieh FH, Sharma P, Gibbons A, Goggans T, Erzurum SC, Haque SJ. Human airway epithelial cell determinants of survival and functional phenotype for primary human mast cells. *PNAS*. 2005;102:14380-14385.
- 109 Insoft R, Sawutz DG, Homcy CJ. Purification and characterization of the beta 2-adrenergic receptor from calf lung. *Biochim Biophys Acta*. 1986;861:345-352.
- 110 Ito Y, Tashiro K. Possible roles of airway epithelial cells in the control of airway smooth muscle tone. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1994;103:141-150.
- 111 Janssen LJ, Daniel EE. Classification of postjunctional beta adrenoceptors mediating relaxation of canine bronchi. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991;256:670-676.
- 112 Jassal D, Han RN, Canigia I, Post M, Tanswell AK. Growth of distal fetal rat lung epithelial cells in defined serum free medium. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1991;27:625-632

- 113 Jeffery PK. Differences and similarities between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Clin Exp Allergy*. 1999;2:14-26.
- 114 Jetten AM, George MA, Smits HL, Vollberg TM. Keratin13 expression is linked to squamous differentiation in rabbit tracheal epithelial cells and down-regulated by retinoic acid. *Exp Cell Res* .1989;182:622-634.
- 115 Joshi PC, Applewhite L, Mitchell PO, Fernainy K, Roman J, Eaton DC, Guidot DM. GM-CSF receptor expression and signaling is decreased in lungs of ethanol-fed rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291:L1150-L1158.
- 116 Kaartinen L, Nettesheim P, Adler KB, Randell SH. Rat tracheal epithelial cell differentiation in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1993;29:481-492.
- 117 Kasaian MT, Miller DK. IL-13 as a therapeutic target for respiratory disease. *Biochem Pharmacol*. 2008;76:147-155.
- 118 Kaup FJ, Drommer W, Damsch S, Deegen E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). II: Pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region . *Equine Vet J*. 1990;22:349-355.
- 119 Kelly E. G-protein-coupled receptor dephosphorylation at the cell surface. *Br J Pharmacol*. 2006;147:235-236.
- 120 Kelsen SG , Anakwe O, Aksoy MO, Reddy PJ, Dhanasekaran N. IL-1 beta alters beta-adrenergic receptor adenylyl cyclase system function in human airway epithelial cells. *Am J Physiol*. 1997;273: L694-L700.
- 121 Kelsen SG, Zhou S, Anakwe O, Mardin I, Higgins N, Benovic JL. Expression of the beta-adrenergic receptor-adenylyl cyclase system in basal and columnar airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1994;267:L456-L463.
- 122 Kelsen SG, Ciccolella D, Brennan K. Brush biopsy and culture of airway epithelial cells:  $\beta$ -adrenoceptor system function. *Methods in Molecular Medicine in Asthma mechanisms and protocols*. 2000;44:41-52.
- 123 Kelsen SG, Higgins NC, Zhou S, Mardini IA, Benovic JL. Expression and function of the beta-adrenergic receptor coupled-adenylyl cyclase system on human airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:1774-1783.
- 124 Kelsen SG, Mardini IA, Zhou S, Benovic JL, Higgins NC. A technique to harvest viable tracheobronchial epithelial cells from living human donors. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;7:66-72.

- 125 Kemp SJ, Thorley AJ, Gorelik J, Seckl MJ, O'Hare MJ, Arcaro A, Korchev Y, Goldstraw P, Tetley TD. Immortalization of human alveolar epithelial cells to investigate nanoparticle uptake. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39:591-597.
- 126 Kercksmar CM, Chung Y, Davis PB. Receptor-mediated cAMP production in adult and infant ferret tracheal epithelium. *Pediatr Res.* 1991;30:75-82.
- 127 Kesimer M, Kirkham S, Pickles RJ, Henderson AG, Alexis NE, Demaria G, Knight D, Thornton DJ, Sheehan JK. Tracheobronchial air-liquid interface cell culture: a model for innate mucosal defense of the upper airways? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;296:L92-L100.
- 128 Kim SW, Hong JS, Ryu SH, Chung WC, Yoon JH, Koo JS. Regulation of mucin gene expression by CREB via a nonclassical retinoic acid signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2007;27:6933- 6947.
- 129 Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther.* 2006;111:476-494.
- 130 Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology.* 2003;8:432-446.
- 131 Koga Y, Satoh S, Sodeyama N, Hashimoto Y, Yanagisawa T, Hirshman CA. Role of acetylcholinesterase in airway epithelium-mediated inhibition of acetylcholine induced contraction of guinea-pig isolated trachea. *Eur J Pharmacol.* 1992;220:141-146.
- 132 Kondo M, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. Cultures of bovine tracheal epithelium with differentiated ultrastructure and ion transport. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1993;29:19-24.
- 133 Kunzelmann K, Mall M. Pharmacotherapy of the ion transport defect in cystic fibrosis: role of purinergic receptor agonists and other potential therapeutics. *Am J Respir Med.* 2003;2:299-309.
- 134 Laan TT, Bull S, Pirie RS, Fink-Gremmels J. The anti-inflammatory effects of IV administered clenbuterol in horses with recurrent airway obstruction. *Vet J.* 2006;171:429-437.
- 135 Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Braun TG. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature.* 1967;214:597-598
- 136 Lazarus SC, Basbaum CB, Gold WM. Localization of cAMP in dog and cat trachea: effects of  $\beta$ -adrenergic agonists. *Am J Physiol.* 1984;247:C327-C334.
- 137 Lechner JF, Haugen A, McClendon IA, Pettis EW. Clonal growth of normal adult human bronchial epithelial cells in a serum-free medium. *In Vitro.* 1982;18:633-642.

- 138 Liebler JM, Borok Z, Li X, Zhou B, Sandoval AJ, Kim KJ, Crandall ED. Alveolar epithelial type I cells express beta 2-adrenergic receptors and G-protein receptor kinase 2. *J Histochem Cytochem.* 2004;52:759-767.
- 139 Liggett SB, Shah SD, Cryer PE. Characterization of beta-adrenergic receptors of human skeletal muscle obtained by needle biopsy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1988;254:E795-E798.
- 140 Limbird LE (Ed). Identification of receptors using direct radioligand binding techniques. In: Limbird LE. *Cell Surface Receptors: A Short Course on Theory and Methods*, ed 2. Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA: 61–100.
- 141 Lin C, Holland RE Jr, Williams NM, Chambers TM. Cultures of equine respiratory epithelial cells and organ explants as tools for the study of equine influenza virus infection. *Arch Virol.* 2001;146:2239-2247.
- 142 Lin CF, Tsai CH, Cheng CH, Chen YS, Tournier F, Yeh TH. Expression of Toll-like receptors in cultured nasal epithelial cells. *Acta Otolaryngol.* 2007;127:395-402.
- 143 Lin H, Li H, Cho HJ, Bian S, Roh HJ, Lee MK, Kim JS, Chung SJ, Shim CK, Kim DD. Air-liquid interface (ALI) culture of human bronchial epithelial cell monolayers as an in vitro model for airway drug transport studies. *J Pharm Sci.* 2007;96:341-350.
- 144 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;93:265-275.
- 145 Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.* 2002;115:455-465.
- 146 Ma W, Korngreen A, Weil S, Cohen EB, Priel A, Kuzin L, Silberberg SD. Pore properties and pharmacological features of the P2X receptor channel in airway ciliated cells. *J Physiol.* 2006;571:503-517.
- 147 Madison JM, Basbaum CB, Brown JK, Finkbeiner WE. Characterization of beta-adrenergic receptors in cultured bovine tracheal gland cells. *Am J Physiol.* 1989;256:C310-C314.
- 148 Marcet B, Boeynaems JM. Relationships between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, extracellular nucleotides and cystic fibrosis. *Pharmacol Ther.* 2006;112:719-732.
- 149 Mardini IA, Higgins NC, Zhou S, Benovic JL, Kelsen SG. Functional behavior of the beta-adrenergic receptor-adenylyl cyclase system in rabbit airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;11:287-295.

- 150 Margarit G, Belda J, Casan P, Sanchis J. Expansion of primary bronchial epithelial cell cultures. *Arch Bronconeumol.* 2005;41:524-527.
- 151 Martin WR, Brown C, Zhang YJ, Wu R. Growth and differentiation of primary tracheal epithelial cells in culture: regulation by extracellular calcium. *J Cell Physiol.* 1991;147:138-148.
- 152 Mathias NR, Yamashita F, Lee VHL. Respiratory epithelial cell culture models for evaluation of ion and drug transport. *Adv Drug Deliv Rev.* 1996;22:215-249.
- 153 Matthay MA, Robriquet L, Fang X. Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2:206-213.
- 154 Matushansky I, Radparvar F, Skoultchi AI. CDK6 blocks differentiation: coupling cell proliferation to the block to differentiation in leukemic cells. *Oncogene.* 2003;22:4143-4149.
- 155 McDowell EM, Keenan KP, Huang M. Restoration of mucociliary tracheal epithelium following deprivation of vitamin A. A quantitative morphologic study. *Virchows Arch. Pathol.* 1984;45:221-240.
- 156 McGraw DW, Forbes SL, Mak JC, Witte DP, Carrigan PE, Leikauf GD, Liggett SB. Transgenic overexpression of  $\beta_2$ -adrenergic receptors in airway epithelial cells decreases bronchoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279:L379-L389.
- 157 McGraw DW, Donnelly ET, Eason MG, Green SA, Liggett. Role of beta ARK in long-term agonist-promoted desensitisation of the beta 2-adrenergic receptor. *Cell Signal.* 1998;10:197-204.
- 158 McGraw DW, Mihlbachler KA, Schwarb MR, Rahman FF, Small KM, Almoosa KF. Airway smooth muscle prostaglandin-EP1 receptors directly modulate beta 2-adrenergic receptors within a unique heterodimeric complex. *J Clin Invest.* 2006;116:1400-1409.
- 159 McGraw DW, Liggett SB. Molecular mechanisms of beta2-adrenergic receptor function and regulation. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2:292-6;311-312.
- 160 Michael JW. Adrenergic regulation of ion transport by primary cultures of canine tracheal epithelium: cellular electrophysiology. *J Membr Biol.* 1986;91:121-128.
- 161 Million M, Larcher J, Laoukili J, Bourguignon D, Marano F, Tournier F. Polyglutamylation and polyglycylation of alpha- and beta-tubulins during in vitro ciliated cell differentiation of human respiratory epithelial cells. *Journal of Cell Science.* 1999;112:4357-4366.
- 162 Munakata M. Airway remodelling and airway smooth muscle in asthma. *Allergol Int.* 2006;55:235-243.

- 163 Nakakuki S. The bronchial tree and lobular division of the horse lung. *J Vet Med Sci.* 1993;55:435-438.
- 164 Nash MS, Osborne NN. Cell surface receptors associated with the retinal pigment epithelium: the adenylate cyclase and phospholipase c signal transduction pathways. *Prog Retin Eye Res.* 1996;15:501-546.
- 165 Nettesheim P, Jetten AM, Inayama Y, Brody AR, George M A, Gilmore LB, Gray T, Hook GER. Pathways of Differentiation of Airway Epithelial Cells. *Environ Health Perspect.* 1990;85:317-329.
- 166 Nijkamp FP. Beta-adrenergic receptors in the lung: an introduction. *Life Sci.* 1993;52:2073-2082.
- 167 Nijkamp FP, Engels F, Henricks PA, Van Oosterhout AJ. Mechanisms of beta-adrenergic receptor regulation in lungs and its implications for physiological responses. *Physiol Rev.* 1992;72:323-367.
- 168 Nikolaev VO, Lohse MJ. Monitoring of cAMP synthesis and degradation in living cells. *Physiology (Bethesda).* 2006;21:86-92.
- 169 Ninomiya H, Yu XY, Uchida Y, Hasegawa S, Spannhake EW. Specific binding of endothelin-1 to canine tracheal epithelial cells in culture. *Am J Physiol.* 1995;268:L424-L431.
- 170 Ohrui T, Yamauchi K, Sekizawa K, Ohkawara Y, Maeyama K, Sasaki M, Takemura M, Wada H, Watanabe T, Sasaki H. Histamine N-methyltransferase controls the contractile response of guinea pig trachea to histamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;261:1268-1272.
- 171 Omar A, Krebs A. An analysis of pancreatic enzymes used in epidermal separation. *Arch Derm Res.* 1975;253:203-212.
- 172 Oostendorp J, Meurs H, Adriaan Nelemans S, Zaagsma J, Kauffman HF, Postma DS, Boddeke HW, Biber K. Cloning, pharmacological characterization, and polymorphism screening of the guinea pig beta (2)-adrenoceptor. *Eur J Pharmacol.* 2002;457:1-10.
- 173 Page CP, Spina D. Beta 2-agonists and bronchial hyperresponsiveness. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2006;31:143-162.
- 174 Parameswaran K, Willems-Widyastuti A, Alagappan VK, Radford K, Kranenburg AR, Sharma HS. Role of extracellular matrix and its regulators in human airway smooth muscle biology. *Cell Biochem Biophys.* 2006;44:139-146.

- 175 Park KS, Wells JM, Zorn AM, Wert SE, Laubach VE, Fernandez LG, Whitsett JA. Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34:151-157.
- 176 Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K. Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene.* 2001;269:3-25.
- 177 Patton JS, Platz RM. Systemic delivery of peptides and proteins through the pulmonary route. *J Aerosol Med.* 1993;6:53.
- 178 Penn RB, Benovic JL. Regulation of heterotrimeric G protein signaling in airway smooth muscle. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5:47-57.
- 179 Pilewski JM, Albelda SM. Adhesion molecules in the lung. An overview. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:S31-S37.
- 180 Philips HJ. Dissociation of single cells from lung or kidney tissues with elastase. In *Vitro Cell Dev Bio.* 1972; 8.
- 181 Pirie M, Pirie HM, Cranston S, Wright NG. An ultrastructural study of the equine lower respiratory tract. *Equine Vet J.* 1990;22:338-342.
- 182 Plopper C, George JSt, Cardoso W, Wu R, Pinkerton K, Buckpitt A. Development of airway epithelium: patterns of expression for markers of differentiation. *Chest.* 1992;101:2-5.
- 183 Plopper CG, Mariassy AT, Wilson DW, Alley JL, Nishio SJ, Nettekheim P. Comparison of nonciliated tracheal epithelial cells in six mammalian species: ultrastructure and population densities. *Exp Lung Res.* 1983;5:281-294.
- 184 Pohl C, Hermanns MI, Uboldi C, Bock M, Fuchs S, Dei-Anang J, Mayer E, Kehe K, Kummer W, Kirkpatrick CJ. Barrier functions and paracellular integrity in human cell culture models of the proximal respiratory unit. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72:339-49.
- 185 Premont RT, Matsuoka I, Mattei MG, Pouille Y, Defer N, Hanoune J. Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 1996;271:13900-13907.
- 186 Profita M, Giorgi RD, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, Gjomarkaj M, Bonsignore G, Bousquet J, Vignola AM. Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy.* 2005;60:1361-1369.
- 187 Radi ZA, Ackermann MR. Growth of differentiated ovine tracheal epithelial cells in vitro. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2004;51:167-170.

- 188 Raeburn D, Webber SE. Proinflammatory potential of the airway epithelium in bronchial asthma. *Eur Respir J.* 1994;7:226-233.
- 189 Raeburn D. Putative role of epithelial derived factors in airway smooth muscle reactivity. *Agents Actions Suppl.* 1990;31:259-274.
- 190 Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol.* 2003;36:95-109.
- 191 Rahman I. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy. *Treat Respir Med.* 2005;4:175-200.
- 192 Randell SH, Comment CE, Ramaekers FCS, Nettekshim P. Properties of rat tracheal epithelial cells separated on expression cell surface  $\alpha$ -galactosyl end groups. *Am J Respir Cell Mol Bio.* 1991; 4:544-554.
- 193 Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK. Crystal structure of the human  $\beta_2$  -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* 2007;450:383-387.
- 194 Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, McMenamin MG, Lechner JF, Su RT, Brash DE, Park JB, Rhim JS, Harris CC. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* 1988;48:1904-1909.
- 195 Rens-Domiano S, Hamm HE. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J.* 1995;9:1059-1066.
- 196 Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:281-312.
- 197 Rios CD, Jordan BA, Gomes I, Devi LA. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol Ther.* 2001;92:71-87.
- 198 Robinson NE, Berney C, Eberhart S, deFeijter-Rupp HL, Jefcoat AM, Cornelisse CJ, Gerber VM, Derksen FJ. Coughing, mucus accumulation, airway obstruction, and airway inflammation in control horses and horses affected with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 2003;64:550-557.
- 199 Robinson NE. Airway physiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1992;22: 1043-1064.
- 200 Robinson NE, Derksen FJ, Olszewski MA, Buechner-Maxwell VA. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *BrVet J.* 1996;152:283-306.

- 201 Rogers DF. Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. *Respir Care*. 2007;52:1134-1146.
- 202 Rose MC, Lynn WS, Kaufman B. Resolution of the major components of human lung mucosal gel and their capabilities for reaggregation and gel formation. *Biochemistry*. 1979;18:4030-4037.
- 203 Rose MC and Gendler SJ (Eds). Airway mucin genes and gene products. In: Rogers DF, Lethem MI. *Airway Mucus. Basic mechanisms and clinical perspectives*. Boston, MA: Birkhauser Verlag. 1997;41-66.
- 204 Rose MC, Piazza FM, Chen YA, Alimam MZ, Bautista MV, Letwin N, Rajput B. Model systems for investigating mucin gene expression in airway diseases. *J Aerosol Med*. 2000;13:245-261.
- 205 Rosenthal W, Schultz G. Guanidine nucleotide binding proteins as membrane signal transduction components and regulators of enzymatic effectors. *Klin Wochenschr*. 1988;66:511-523.
- 206 Rowe RK, Brody SL, Pekosz A. Differentiated cultures of primary hamster tracheal airway epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2004;40:303-311.
- 207 Ryhner T, Müller N, Balmer V, Gerber V. Increased mucus accumulation in horses chronically affected with recurrent airway obstruction is not associated with up-regulation of CLCA1, EGFR, MUC5AC, Bcl-2, IL-13 and INF-gamma expression. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;125:8-17.
- 208 Saffitz JE, Liggett SB. Subcellular distribution of beta 2-adrenergic receptors delineated with quantitative ultrastructural autoradiography of radioligand binding sites. *Circulation Research*. 1992;70:1320-1325.
- 209 Sajjan US, Sylvester FA, Forstner JF. Cable-piliated *Burkholderia cepacia* binds to cytokeratin 13 of epithelial cells. *Infect Immun*. 2000;68:1787-1795.
- 210 Salathe M. Effects of beta-agonists on airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:S275-S281.
- 211 Salomon FV (Hrsg). *Lunge des Pferdes, Lappung und Bronchialbaum Dorsalansicht*: In Salomon FV, Geyer H, Gille U. *Anatomie für die Tiermedizin*. 2. Auflage. Enke Verlag Stuttgart. 2008;353.
- 212 Sartori C, Matthay MA, Scherrer U. Transepithelial sodium and water transport in the lung. Major player and novel therapeutic target in pulmonary edema. *Adv Exp Med Biol*. 2001;502:315-338.

- 213 Scatchard G. The interaction of proteins for molecules and ions. *Ann NY Acad Sci.* 1949;51:660-672.
- 214 Scheer A, Fanelli F, Diviani D, de Benedetti PG, Cotecchia S. Structure-Function Relationships of the  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptor. *European Urology.* 1999;36:11-16.
- 215 Schor SL. The effects of EGTA and trypsin on the serum requirements for cell attachment to collagen. *J Cell Sci.* 1979;40:271-279.
- 216 Schumann BL, Cody TE, Miller ML, Leikauf GD. Isolation, characterization, and long-term culture of fetal bovine tracheal epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1988;24:211-216.
- 217 Seahorn TL, Beadle RE. Summer pasture-associated obstructive pulmonary disease. *Equine pract.* 1994;16:39-41.
- 218 Shannon JM, Gebb SA, Nielsen LD. Induction of alveolar type II cell differentiation in embryonic tracheal epithelium in mesenchyme-free culture. *Development.* 1999;126:1675-1688.
- 219 Siddiqui S, Martin JG. Structural aspects of airway remodelling in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2008;8:540-547.
- 220 Sime A, McKellar Q, Nolan A. Method for the growth of equine airway epithelial cells in culture. *Res Vet Sci.* 1997;62:30-33.
- 221 Smith JJ, Karp PH, Welsh MJ. Defective fluid transport by cystic fibrosis airway epithelia. *J Clin Invest.* 1994;93:1307-1311.
- 222 Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell.* 1996;85:229-236.
- 223 Spina D, Rigby RJ, Paterson JW, Goldie RG. Autoradiographic localization of  $\beta$ -adrenoceptors in asthmatic human lung. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140:1410-1415.
- 224 Steimer A, Franke H, Haltner-Ukomado E, Laue M, Ehrhardt C, Lehr CM. Monolayers of porcine alveolar epithelial cells in primary culture as an in vitro model for drug absorption studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;66:372-382.
- 225 Steimer A, Laue M, Franke H, Haltner-Ukomado E, Lehr CM. Porcine alveolar epithelial cells in primary culture: morphological, bioelectrical and immunocytochemical characterization. *Pharm Res.* 2006;23:2078-2093.
- 226 Stosiek P, Kasper M, Moll R. Changes in cytokeratin expression accompany squamous metaplasia of the human respiratory epithelium. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;421:133-141.

- 227 Strosberg AD, Pietri-Rouxel F. Function and regulation of the beta 3-adrenoceptor. *Trends Pharmacol Sci.* 1996;17:373-381.
- 228 Strosberg AD. Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:421-450.
- 229 Stuart-Smith K, Vanhoutte PM. Airway epithelium modulates the responsiveness of porcine bronchial smooth muscle. *J Appl Physiol.* 1988;65:721-727.
- 230 Sun W, Wu R, Last JA. Effects of exposure to environmental tobacco smoke on a human tracheobronchial epithelial cell line. *Toxicology.* 1995;100:163-174.
- 231 Sun Y, McGarrigle D, Huang XY. When a G protein-coupled receptor does not couple to a G protein. *Mol Biosyst.* 2007;3:849-854.
- 232 Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36:461-480.
- 233 Suzuki S, Takeuchi K, Ishinaga H, Basbaum C, Majima Y. Leukotriene D4 upregulates MUC2 gene transcription in human epithelial cells. *Pharmacology.* 2008;81:221-228.
- 234 Sweeney C, Fambrough D, Huard C, Diamonti AJ, Lander ES, Cantley LC, Carraway KL. Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. *J Biol Chem.* 2001;276:22685-22698.
- 235 Swinney DC. Applications of binding kinetics to drug discovery: translation of binding mechanisms to clinically differentiated therapeutic responses. *Pharmaceutical medicine.* 2008;22:23-34.
- 236 Takeyama K, Dabbagh K, Lee HM, Agustí C, Lausier JA, Ueki IF, Grattan KM, Nadel JA. Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1999;96:3081-3086.
- 237 Takeyama K, Tamaoki J, Chiyotani A, Sakai N, Kanemura T. Stimulation of ciliary motility by beta 3-adrenoceptor agonist rabbit tracheal epithelium. *Kokyu To Junkan.* 1993;41:993-997.
- 238 Takizawa T. Structure and function of airway epithelial cells. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* 1990;28:1547-1556.
- 239 Tamaoki J, Chiyotani A, Sakai N, Konno K. Stimulation of ciliary motility mediated by atypical beta-adrenoceptor in canine bronchial epithelium. *Life Sci.* 1993;53:1509-1515.
- 240 Tamaoki J. Mechanism and management of airway hypersecretion in obstructive lung disease. *Nippon Rinsho.* 1999;57:2056-2061.

- 241 Taylor DR, Drazen JM, Herbison GP, Yandava CN, Hancox RJ, Town GI. Asthma exacerbations during long term beta agonist use: influence of beta(2) adrenoceptor polymorphism. *Thorax*. 2000;55:762-767.
- 242 Tesfaigzi Y. Regulation of mucous cell metaplasia in bronchial asthma. *Curr Mol Med*. 2008;8:408-415.
- 243 Tobin AB, Butcher AJ, Kong KC . Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29:413-420.
- 244 Tobin AB. G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br J Pharmacol*. 2008;1:S167-S176.
- 245 Tohda Y, Haraguchi R, Itoh M, Ohkawa K, Kubo H, Fukuoka M, Nakajima S. Role of muscarinic acetylcholine receptors in a guinea pig model of asthma. *Int Immunopharmacol*. 2002;2:1521-1527.
- 246 Tosi MF, Stark JM, Smith CW, Hamedani A, Gruenert DC, Infeld MD. Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: effects on neutrophil-epithelial cell adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;7:214-221.
- 247 Tran TM, Friedman J, Qunaibi E, Baameur F, Moore RH, Clark RB. Characterization of agonist stimulation of cAMP-dependent protein kinase and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor using phosphoserine-specific antibodies. *Mol Pharmacol*. 2004;65:196-206.
- 248 Ulrich M, Döring G. Three-dimensional human airway epithelial cell cultures. *J Cyst Fibros*. 2004;2:55-57.
- 249 Van Itallie CM, Anderson JM. The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1:38-41.
- 250 Verger C, Imbenotte J. The inhibitory effect of serum on cell attachment can be prevented by cobalt-protoporphyrin IX. *Cell Biol Int Rep*. 1988;12:115-122.
- 251 Voynow JA. What does mucin have to do with lung disease? *Paediatr Respir Rev*. 2002;3:98-103.
- 252 Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*. 2005;85:159-204.
- 253 Whalen EJ, Foster MW, Matsumoto A, Ozawa K, Violin JD, Que LG, Nelson CD, Benhar M, Keys JR, Rockman HA, Koch WJ, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Stamler JS. Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by s-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Cell*. 2007;129:511-522.

- 254 Wickstrom C, Davies JR, Eriksen GV, Veerman EC, Carlstedt I. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem J.* 1998;334: 685-693.
- 255 Widdicombe JH, Coleman DL, Finkbeiner WE, Friend DS. Primary cultures of the dog's tracheal epithelium: fine structure, fluid, and electrolyte transport. *Cell Tissue Res.* 1987;24:95-103.
- 256 Wilkens JH, Becker A, Wilkens H, Emura M, Riebe-Imre M, Plein K, Schöber S, Tsikas D, Gutzki FM, Frölich JC. Bioassay of a tracheal smooth muscle-constricting factor released by respiratory epithelial cells. *Am J Physiol.* 1992;263:L137- L141.
- 257 Wisniewski L, Jornot L, Dudev T, Pagano A, Rochat T, Lacroix JS, Suter S, Chanson M. Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34:39-48.
- 258 Wong AM, Chow AW, Au SC, Wong CC, Ko WH. Apical vs. basolateral p2y6 receptor-mediated Cl<sup>-</sup> secretion in immortalized bronchial epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40:733-45.
- 259 Wu R, Yankaskas J, Cheng E, Knowles MR, Boucher R. Growth and differentiation of human nasal epithelial cells in culture. Serum-free, hormone-supplemented medium and proteoglycan synthesis. *Am Rev Respir Dis.* 1985;132:311-320.
- 260 Wu R, Zhao YH, Chang MM. Growth and differentiation of conducting airway epithelial cells in culture. *Eur Respir J.* 1997;10:2398-403.
- 261 Wyatt TA, Spurzem JR, May K, Sisson JH. Regulation of ciliary beat frequency by both PKA and PKG in bovine airway epithelial cells. *Am J Physiol.* 1998;275:L827-L835.
- 262 Xu J, Tian J, Grumelli SM, Haley KJ, Shapiro SD. Stage-specific effects of cAMP signaling during distal lung epithelial development. *J Biol Chem.* 2006;281:38894-38904.
- 263 Yeh TH, Tsai CH, Chen YS, Hsu WC, Cheng CH, Hsu CJ, Lee SY. Increased communication among nasal epithelial cells in air-liquid interface culture. *Laryngoscope.* 2007;117:1439-1444.
- 264 You Y, Richer EJ, Huang T, Brody SL. Growth and differentiation of mouse tracheal epithelial cells: selection of a proliferative population. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283:L1315-L1321.
- 265 Zhang Y, Schmidt RJ, Foxworthy P, Emkey R, Oler JK, Large TH, Wang H, Su EW, Mosior MK, Eacho PI, Cao G. Niacin mediates lipolysis in adipose tissue through its G-protein coupled receptor HM74A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334:729-732.

266 Zhu WZ, Chakir K, Zhang S, Yang D, Lavoie C, Bouvier M, Hébert TE, Lakatta EG, Cheng H, Xiao RP. Heterodimerization of beta1- and beta 2-adrenergic receptor subtypes optimizes beta-adrenergic modulation of cardiac contractility. *Circ Res.* 2005;97:244-251.

## 9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Fritz Rupert Ungemach danke ich für die interessante Themenstellung, die Übernahme der Betreuung sowie für die Schaffung hervorragender Rahmenbedingungen.

Mein besonderer Dank geht auch an meinen Zweitbetreuer Herrn PD Dr. Getu Abraham für die Unterweisung und Ratschläge, seine Ideen und große Unterstützung und die Einführung in das Fachgebiet der Lungenpharmakologie. Vielen Dank für seine Geduld, mich in die Methodik einzuführen, vor allem während der ersten Jahre im Labor und insbesondere für die vielen anregenden Diskussionen und die kritische Durchsicht meiner Dissertationsschrift.

Weiterhin bin ich allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig für die freundliche Aufnahme, die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung in Labor zu Dank verpflichtet. Besonders bin ich Herrn Stefan Lindner für sein kritisches Lesen und die nützlichen Anmerkungen zu meiner Dissertation sehr dankbar. Desweiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern des Veterinär-Physiologisch-Chemischen Instituts, des Instituts für Veterinär-Pathologie, für Parasitologie und des Veterinär-Anatomischen Instituts für die gute Zusammenarbeit.

Ich bin der Veterinärmedizinischen Fakultät der Addis Ababa Universität für die Gewährung eines Fortbildungsurlaubs dankbar.

Mein Dank geht an Prof. Getachew Abebe, Prof. Eyasu Makonnen, Dr. Bayleyegn Molla und Dr. Wondyefraw Mekonnen, die mir den Weg geebnet haben, nach Deutschland zu kommen und hier zu studieren.

Diese Arbeit wurde durch die Ernst Weber-Stiftung unterstützt und mein Dank gilt dieser Stiftung. Gefördert wurde sie durch ein Doktorandenstipendium des Deutschen Akademischen Austausch Dienstes (DAAD), dem ich auch für die außerfachliche Unterstützung herzlich danken möchte.

Ich danke meinen Familienmitgliedern und meinen Freunden Fikru Nigussie, Mehari Endale, Wondim Getahun, Bishaw Belew, Takele Belay und vielen anderen für ihre moralische Unterstützung während meines Studiums.