

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

**In-vitro-Untersuchungen zu antifibrotischen Wirkungen
von β -Adrenozeptoragonisten und Glucocorticoiden
in primären equinen Bronchialfibroblasten**

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

eingereicht von
Jana Elisabeth Bonicelli (geb. Franke)
aus Dresden

Leipzig, 2015

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Manfred Coenen

Betreuer: apl. Professor Dr. Getu Abraham

Gutachter: apl. Professor Dr. Getu Abraham

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

Professor Dr. Kurt Racké
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Tag der Verteidigung: 03.11.2015

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Publikationsverzeichnis	II
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Airway-Remodelling bei obstruktiven Atemwegserkrankungen	3
2.2 Bedeutung von Bronchialfibroblasten und Myofibroblasten in den Atemwegen.....	5
2.3 β -Adrenozeptoren im Respirationstrakt.....	7
2.3.1 β -Adrenozeptor-Subtypen	7
2.3.2 Signaltransduktion und Regulation	8
2.3.3 Bedeutung von β -Adrenozeptoren bei Atemwegserkrankungen	9
2.4 Therapeutische Möglichkeiten bei Recurrent Airway Obstruction des Pferdes.....	11
2.4.1 β_2 -Adrenozeptoragonisten.....	12
2.4.2 Glucocorticoide	13
2.5 Fragestellung.....	15
3 Publikation 1	16
4 Publikation 2	25
5 Diskussion	34
5.1 Etablierung optimaler Kulturbedingungen für primäre equine Bronchialfibroblasten	34
5.2 Analyse der Effekte von β_2 -Agonisten und Glucocorticoiden auf zelluläre Eigenschaften und β -Adrenozeptoren.....	37
5.2.1 β -Adrenozeptorendichte und -subtypverteilung	37
5.2.2 Pharmakologische Beeinflussung der Proliferation und Differenzierung der equinen Bronchialfibroblasten	39
6 Zusammenfassung	44
7 Summary	46
8 Literaturverzeichnis	48
Danksagung	62

Abkürzungsverzeichnis

AZ	Adenylatzyklase
α -SMA	α -Smooth Muscle Aktin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
β ARK	β -Adrenozeptorkinase
B_{\max}	maximale Rezeptorzahl
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EBF	Equine Bronchialfibroblasten
EDA-Fibronektin	Extradomain-A-Fibronektin
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extrazellulär signalregulierte Proteinkinasen
ET-1	Endothelin-1
EZM	Extrazellulärarmatrix
FBS	Fetales Bovines Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GDP	Guanindiphosphat
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanintriphosphat
HS	Pferdeserum
ICYP	[¹²⁵ I]-(-)-Iodocyanopindolol
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor-1
IL	Interleukin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
RAO	Recurrent Airway Obstruction
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

- **Franke J**, Abraham G. Concomitant inhibition of primary equine bronchial fibroblast proliferation and differentiation by selective β_2 -adrenoceptor agonists and dexamethasone. Eur J Pharmacol. 2014;741:205–213.
doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.056
- **Franke J**, Abs V, Zizzadoro C, Abraham G. Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of equine bronchial fibroblasts. BMC Vet Res. 2014;10:119.
doi:10.1186/1746-6148-10-119
- Abraham G, Zizzadoro C, Kacza J, Ellenberger C, Abs V, **Franke J**, Schoon HA, Seeger J, Tesfaigzi Y, Ungemach FR. Growth and differentiation of primary and passaged equine bronchial epithelial cells under conventional and air-liquid-interface culture conditions. BMC Vet Res. 2011;7:26.
doi:10.1186/1746-6148-7-26

Vorträge

- **Franke J**, Abs V, Hochheim I, Wieczorek M, Abraham G. β -Adrenozeptor-abhängige Beeinflussung der Fibrose im Airway Remodelling. Leipziger Doktorandenforum (2013)
- **Franke J**, Abs V, Hochheim I, Wieczorek M, Abraham G. β -adrenergic Receptor-mediated Growth And Proliferation Of Equine Bronchial Fibroblasts. J Vet Pharmacol. Ther. 2012;35(3 Suppl):19-20. doi:10.1111/jvp.12004
- **Franke J**, Abs V, Hochheim I, Wieczorek M, Abraham G. Beeinflussung der Strukturproteine und β -adrenerger Rezeptoren der primären equinen Bronchialfibroblasten durch β -Agonisten. 21. VETPHARM-Symposium in Leipzig (2011)

Poster

- **Franke J**, Abs V, Hochheim I, Wieczorek M, Abraham G. Antifibrotic effects of β -adrenoceptor agonists and glucocorticoids in primary equine bronchial fibroblasts. *Pneumologie*. 2014; 68(S01):P86. doi:10.1055/s-0034-1367898
- **Franke J**, Abs V, Hochheim I, Wieczorek M, Abraham G. β_2 -Adrenoceptor stimulation inhibits equine bronchial fibroblast proliferation and transformation but does not affect collagen synthesis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2013;386 (Suppl 1):S23. doi:10.1007/s00210-013-0832-9
- **Franke J**, Abs V, Hochheim I, Wieczorek M, Abraham G. β -Adrenozeptor-abhängige Beeinflussung der Proliferation primärer equiner Bronchialfibroblasten. *Pneumologie*. 2012; 66(S01):P212. doi:10.1055/s-0032-1302596

1 Einleitung

Die Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen ist mit zunehmender Schädigung und fibrotischen Umbauvorgängen aller betroffenen Organe und Gewebe und daraus resultierenden Einschränkungen physiologischer Funktionen verbunden. Bei multifaktoriell bedingten Erkrankungen der Atemwege inkl. der Recurrent Airway Obstruction (RAO) des Pferdes sowie Asthma bronchiale und Chronic Obstructive pulmonary disease (COPD) des Menschen sind solche strukturellen Veränderungen häufig assoziiert mit Verdickung der Atemwegswand, subepithelialer Fibrose und Obstruktion der Atemwege. Sowohl bei RAO als auch bei Asthma besteht die Standardtherapie darin, die Bronchokonstriktion mit β_2 -Agonisten und die Entzündung mit Glucocorticoiden aufzuhalten. In den letzten Jahrzehnten konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht alle Patienten mit der empfohlenen Therapie ausreichend behandelt werden können und neue Ansatzpunkte der Therapie gefunden werden müssen. Daher konzentrieren sich neuere Forschungsarbeiten auf strukturelle Alterationen in den Atemwegen, das sogenannte Airway-Remodelling.

Die pathologische Ursache des Airway-Remodelling liegt in einer chronischen Entzündung und einer Verletzung des Epithels oder Endothels, die durch die permanente Aktivierung der Reparaturmechanismen zu einer überschießenden Wundheilung, Durchblutungsstörungen oder degenerativen Prozessen führen können, welche langfristig die normale Struktur der betroffenen Organe zerstören und so deren Funktion beeinträchtigen. In das betroffene Gewebe wandern viele proliferierende Fibroblasten ein und differenzieren dort zu Myofibroblasten. Hierbei werden verstärkt extrazelluläre Matrixproteine, insbesondere Kollagen und Entzündungsmediatoren sowie Zytokine durch diese Zellen synthetisiert und freigesetzt. Die genauen Mechanismen solcher Prozesse, die als wichtige Arzneimitteltargets angesehen werden können, sind jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Entzündungsbedingte strukturelle Veränderungen der Atemwege sind auch ein wesentliches Merkmal der RAO, gekennzeichnet durch subepitheliale Verdickung der Übergangsschicht der Basalmembran zum Bindegewebe und Obstruktion der Bronchien und Bronchiolen. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit dem β_2 -Agonisten Clenbuterol und Glucocorticoiden die Lungenfunktion verbessert, jedoch zu keiner Langzeitheilung führt. Airway-Remodelling könnte einer der Gründe des Therapieversagens sein. Ob hierbei Fibroblasten der equinen Atemwege eine Rolle spielen können, ist bisher jedoch nicht untersucht.

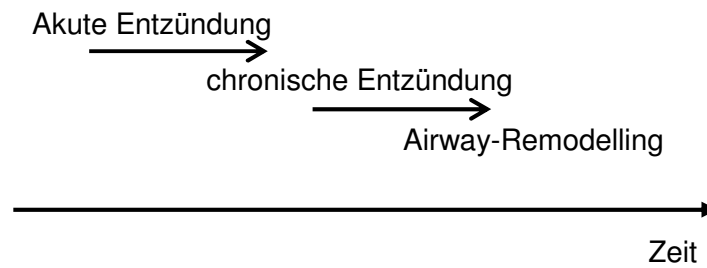
In der vorliegenden Untersuchung sollen zunächst primäre Bronchialfibroblasten isoliert, charakterisiert und kultiviert werden. Im nächsten Schritt sollen in diesen Zellen die β_2 -Rezeptorexpression und -eigenschaften charakterisiert werden. Anschließend soll die

Eignung dieser Zellen als Zellmodell zur Untersuchung der zellulären Proliferation und Transformation sowie der Regulation der de-novo-Synthese von extrazellulärer Matrix sowie α -Smooth Muscle Aktin (α -SMA) und deren Beeinflussung durch β_2 -Agonisten, Glucocorticoide sowie TGF- β überprüft werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Airway-Remodelling bei obstruktiven Atemwegserkrankungen

Chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen sind assoziiert mit umfangreichen, strukturellen Umbauvorgängen der Bronchialwand, die eine Hypertrophie der glatten Muskulatur und der submukösen Schleimdrüsen, eine Schädigung des bronchialen Epithels, eine Infiltration mit Entzündungszellen sowie die Ablagerung von Extrazellulärmatrix (EZM) umfassen und zur Verdickung der Atemwegswand und Beeinträchtigung der Lungenfunktion führen (FIXMAN et al. 2007, JEFFERY 2001, LECLERE et al. 2011, CARROLL et al. 1993). Es wird angenommen, dass dieses Airway-Remodelling die Konsequenz einer akuten oder chronischen Entzündung ist, unter Umständen aber auch vor einer Entzündung auftreten kann.



Airway-Remodelling umfasst dynamische Prozesse, die auf akuten Exazerbationen einer chronischen Entzündung basieren. Die klinischen und physiologischen Konsequenzen dieser Alterationen sind jedoch noch nicht genau bekannt. Allerdings zeigen In-vivo-Untersuchungen an Tiermodellen, dass strukturelle Veränderungen neben der klassischen Entzündung einen ausgeprägten Einfluss auf die Bronchialhyperreaktivität haben (DEKKERS et al. 2009).

Im Allgemeinen ist der Prozess des Remodelling besonders innerhalb der EZM ein kritischer Aspekt der Wundheilung in allen Organen (HINZ et al. 2007). Es ist eine komplexe, dynamische Reaktion auf eine Entzündung und Gewebeschädigung. Während die akute Entzündung bei der Recurrent Airway Obstruction (RAO) des Pferdes oder dem Asthma bronchiale des Menschen mit einem normalen Reparaturprozess einhergeht, ist bei chronischer Entzündung der normale Reparaturmechanismus so gestört, dass die Zusammensetzung und der Gehalt der Extrazellulärmatrix sowie die zelluläre und molekulare Organisation der Atemwegswand massiv verändert sind (AL-MUHSEN et al. 2011).

Der Vorgang des Airway-Remodelling schließt Interaktionen zahlreicher Komponenten und Wachstumsfaktoren ein, beispielsweise Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Epidermal

Growth Factor (EGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) sowie Zytokine, wie Interleukin (IL)-6, IL-13, IL-5 und IL-9. Diese begünstigen einzeln oder im Zusammenwirken eine Verdickung der Atemwegswand mit Hyperplasie der glatten Muskulatur, epithelialer Hypertrophie, Hyperplasie der Schleimdrüsen und Becherzellen (DOHERTY und BROIDE 2007). Diese strukturelle Reorganisation tritt nicht nur bei Patienten mit einer schwergradigen Ausprägung von RAO oder Asthma auf, sondern kann bereits im frühen Krankheitsstadium beobachtet werden. Dabei korreliert der Grad der Verdickung der Atemwegswand mit der Dauer und dem Schweregrad der Erkrankung sowie der Obstruktion (BENAYOUN et al. 2003).

Die Zunahme der Dichte der subepithelialen Schicht hängt häufig mit der wiederholten Ablösung des Epithels zusammen (HOLGATE et al. 2004). Die geschädigten Epithelzellen setzen TGF- β frei, welches als potenter pro-fibrotischer Faktor gilt und die Reparaturvorgänge im epithelialen Bereich hemmt. Dies begünstigt weitere Insulte im Bereich der Submukosa, in der eine erhöhte Anzahl an aktivierten Fibroblasten und Myofibroblasten EZM-Komponenten wie Kollagen und Proteoglykane akkumulieren. In diesem Konzept des Airway-Remodelling sind der Wachstumsfaktor TGF- β und Fibroblasten zentral von Bedeutung. TGF- β kann von zahlreichen Zelltypen gebildet und freigesetzt werden. In asthmatischen Atemwegen sind das Epithelium, Fibroblasten, Eosinophile Granulozyten und Makrophagen die Hauptquellen dieses Proteins. Ein wichtiger Aspekt mit großer Bedeutung für das Airway-Remodelling ist die stimulierende Wirkung von TGF- β auf Fibroblasten, um die Synthese von EZM-Komponenten zu erhöhen (HALWANI et al. 2011).

Während sich epitheliale Schädigung sowie Entzündung in asymptomatischen Phasen nahezu vollständig zurückbilden, bleiben sowohl die Hypertrophie der glatten Bronchialmuskulatur als auch die subepitheliale Fibrose über den gesamten Krankheitsverlauf erhalten (KARIYAWASAM et al. 2007, YAMAUCHI und INOUE 2007). Bereits früh im Krankheitsverlauf steigt in der Submukosa die Anzahl aktivierter, EZM-synthetisierender Fibroblasten und Myofibroblasten an, wodurch sich lange vor der klinischen Manifestation EZM-Proteine in der Bronchialwand ablagern und zur Verdickung der Submukosa und Basalmembran führen (GIZYCKI et al. 1997, POHUNEK et al. 2005, LAITINEN et al. 1996, ROCHE et al. 1989). Neben der reinen Zunahme der EZM verändert sich auch ihre qualitative Zusammensetzung. Während vermehrt Kollagen I, III und V, sowie EDA-Fibronektin und Proteoglykane abgelagert werden, ist ein gesteigerter Abbau von Kollagen IV und Elastin zu beobachten (ROCHE et al. 1989, NAM et al. 2012, BAI und

KNIGHT 2005, MEDEIROS MATSUSHITA et al. 2005, ROBERTS 1995, MAUAD et al. 1999).

Darüber hinaus ist bekannt, dass unterschiedliche Umweltfaktoren auch einen Einfluss auf das Airway-Remodelling haben. Diese können bei RAO eine wichtige Rolle spielen, wobei der Zusammenhang zwischen spezifischen Umweltfaktoren und Airway-Remodelling beim Pferd bisher nicht untersucht wurde (PIRIE 2014). Im Wesentlichen schädigen die Umwelttoxine jedoch das Epithel, welches mit der darunter liegenden mesenchymalen Schicht kommuniziert und somit den Prozess des Airway-Remodelling von der epithelialen Fläche bis zur Submukosa beschleunigen könnte.

2.2 Bedeutung von Bronchialfibroblasten und Myofibroblasten in den Atemwegen

Es ist zunehmend bekannt, dass entzündliche Prozesse das Airway-Remodelling via Cross-Talk-Mechanismen zwischen Entzündungs- und Mesenchymzellen regulieren (DOHERTY und BROIDE 2007, HOLGATE et al. 2004, ALKHOURI et al. 2014). Diese Cross-Talk-Mechanismen können als pharmakologisches Target therapeutisch von großem Nutzen sein. Allerdings sind die Vorgänge, die das Airway-Remodelling und die Kollagenablagerungen maßgeblich steuern, noch unzureichend verstanden. Die epitheliale Schicht bildet eine Barriere der Abwehr zwischen Außenmilieu und dem darunter liegenden Gewebe. Eine kritisch wichtige Stelle im Zusammenhang mit der RAO-Entwicklung beim Pferd ist deshalb das Bronchialepithelium, welches bei der Pathogenese der Entzündung und Hyperreaktivität in den Atemwegen eine wichtige Rolle spielt. Es ist auch beschrieben, dass die darunter liegenden glatten Muskelzellen aktiv bei Entzündungsprozessen der RAO und des Asthma beteiligt sind (SHIFREN et al. 2012).

Obwohl sowohl Epithel- als auch glatte Muskelzellen in der Lage sind, EZM und Entzündungsmediatoren zu bilden, haben Fibroblasten eine herausragende Bedeutung bei dem Prozess des Airway-Remodelling. Sie erhalten die Homöostase der EZM einschließlich Kollagen, Proteoglykanen, nichtkollagenen Glykoproteinen sowie Elastin. Außerdem koordinieren sie den Abbau der EZM, die sowohl die Basalmembran als auch das lockere Bindegewebe der Lamina propria bildet und die biomechanischen Eigenschaften der Atemwege bestimmt (DUNSMORE und RANNELS 1996).

Neben der essentiellen Bedeutung der Fibroblasten für die EZM-Bildung können sie auch EZM-abbauende Enzyme, proinflammatorische Faktoren und Modulatoren entzündlicher Reaktionen sowie regulatorische Moleküle inkl. Zytokine, Wachstumsfaktoren, Oberflächenantigene und Adhäsionsmoleküle bilden, über die sie das Mikroenvironment

beeinflussen. Die EZM wird als kritische Komponente der klassischen Wundheilung nach einer Gewebeschädigung angesehen und die Reaktion der Fibroblasten im Zusammenwirken mit Entzündungsmediatoren wie TGF- β bestimmt die Folge der Remodellereignisse (MAKINDE et al. 2007).

Der beteiligte Wundheilungsprozess ist durch ein gesteigertes Zell-Turnover der Fibroblasten charakterisiert. In der Frühphase der Wundheilung migrieren aktivierte, undifferenzierte Fibroblasten in das Wundgebiet und produzieren EZM. Sobald die Heilungsprozesse fortschreiten, differenzieren diese Fibroblasten unter dem Einfluss von TGF- β zu Myofibroblasten mit charakteristischen Merkmalen von Fibroblasten und glatten Muskelzellen (TOMASEK et al. 2002). Sie exprimieren kontraktile α -Smooth Muscle Aktin (α -SMA)-Filamente, die über Fokale Adhäsionen mit der EZM verknüpft sind und synthetisieren große Mengen an EZM-Matrix um den Gewebedefekt zu verschließen. Nach Abschluss der Wundheilung werden die Myofibroblasten unter dem Einfluss sinkender Zytokinkonzentrationen apoptotisch und die Fibroblasten übernehmen wieder die EZM-Homöostase (PHAN 2012, HINZ et al. 2007).

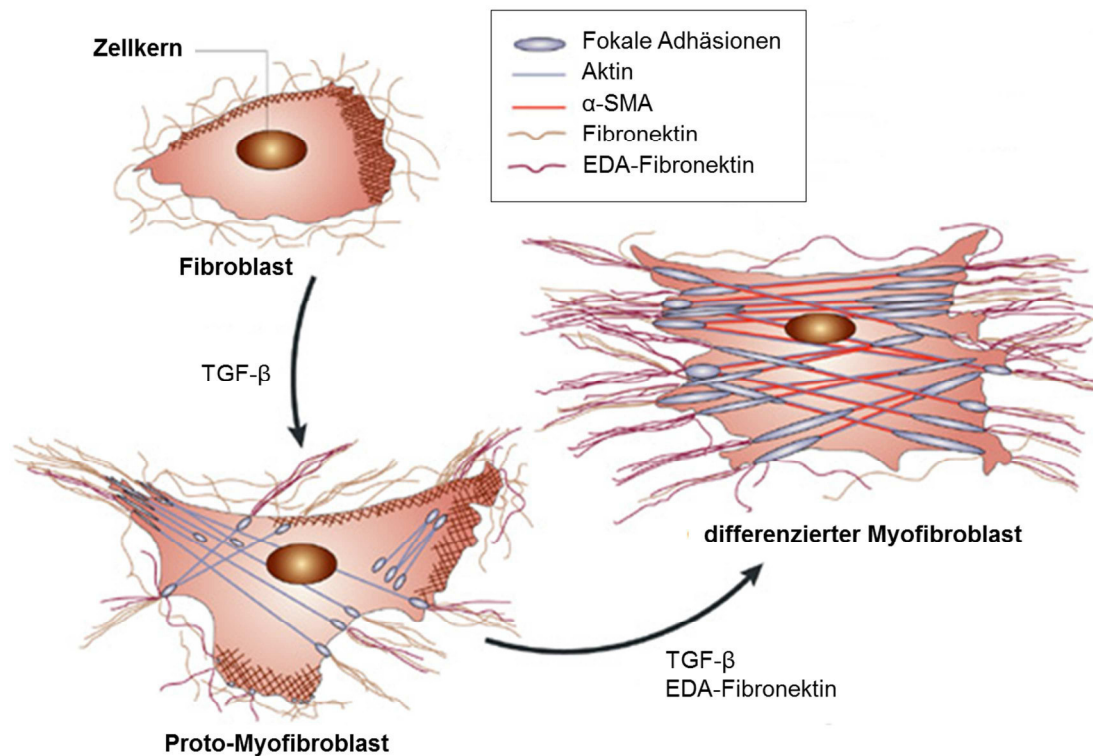


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten unter TGF- β -Einfluss (modifiziert nach TOMASEK et al. 2002)

Chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen sind stets mit einer dauerhaften Überexpression von α -SMA verbunden (BREWSTER et al. 1990), wobei nicht abschließend geklärt ist, ob die anhaltende Entzündung die Rekrutierung und Transformation der Myofibroblasten erhält oder die Fibroblasten eine Prädisposition zur Transformation zu Myofibroblasten besitzen (NAM et al. 2012). Fibroblasten aus den Atemwegen von Asthmatikern weisen ein großes Potential zur Differenzierung zu Myofibroblasten auf, wobei der fibrotische Prozess von immer neuen Exazerbationen stimuliert wird und vorrangig die Bronchien betrifft (MICHALIK et al. 2009, BREWSTER et al. 1990). Im Gegensatz dazu finden die fibrotischen Veränderungen bei der humanen COPD in den kleinen Bronchiolen sowie dem Übergang in die Alveolen statt (JEFFERY 2001, SALAZAR und HERRERA 2011). Die veränderte Zusammensetzung der EZM beeinflusst nachhaltig die Immunreaktion, indem sie Entzündungszellen gegenüber proinflammatorischen Signalen sensibilisiert, wodurch das Auftreten erneuter Exazerbationen begünstigt wird (ROMAN 1996). Die Bedeutung von Fibroblasten und Myofibroblasten bei der Pathogenese und dem Airway-Remodelling der RAO des Pferdes ist bisher hingegen nur unzureichend untersucht (ROMAN et al. 2013).

2.3 β -Adrenozeptoren im Respirationstrakt

2.3.1 β -Adrenozeptor-Subtypen

β -Adrenozeptoren gehören zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie besitzen einen extrazellulären N-Terminus, der gemeinsam mit den extrazellulären Enden der Transmembrandomänen die Bindungstasche für den Liganden bildet und einen intrazellulären C-Terminus, der gemeinsam mit der zweiten und dritten intrazellulären Schleife mit dem heterotrimären, stimulierenden Guaninnukleotid-bindenden Protein (G_s -Protein) interagiert (BARNES 1995).

Es werden 3 Subtypen des β -Adrenozeptors (β_1 , β_2 , β_3) unterschieden, die sich hinsichtlich ihrer Affinität zu Isoprenalin, Adrenalin und Noradrenalin unterscheiden. In Herzmuskelzellen dominiert der β_1 -Adrenozeptor-Subtyp und reguliert die Kontraktilität des Arbeitsmyokards und die Herzfrequenz. Im Gegensatz dazu vermittelt der β_2 -Subtyp vorrangig die Relaxation der glatten Muskulatur der Bronchien und des Uterus, während der β_3 -Subtyp mit der Lipolyse und Thermogenese im Fettgewebe assoziiert ist (FRIELLE et al. 1987, DIXON et al. 1986, EMORINE et al. 1989, ALEXANDER et al. 2001, COMAN et al. 2009).

2.3.2 Signaltransduktion und Regulation

Der β -Adrenozeptor wird durch die extrazelluläre Bindung von Agonistliganden aktiviert, wodurch die Signalweiterleitung initiiert wird. Hierbei führt die Bindung von β -Agonisten an den Rezeptor zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, welche die Interaktion mit dem G_s -Protein ermöglicht. G_s -Proteine bestehen aus drei Untereinheiten: der Guaninnukleotid-bindenden α -Untereinheit und den eng miteinander assoziierten β - und γ -Untereinheiten. Durch die Bindung des G_s -Proteins an den Rezeptor wird an der α -Untereinheit das GDP mit GTP ausgetauscht. Es folgt eine Dissoziation der G_s -Protein-Untereinheiten in α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die α -Untereinheit bindet an den Rezeptor- G_s GTP-Komplex. Dieser Komplex aktiviert nun das Effektorprotein Adenylatzyklase (AZ). Dieses Enzym katalysiert den Abbau von ATP in das cAMP und dadurch werden cAMP-abhängige Signalprozesse eingeleitet. Die Dauer der Signaltransduktion wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit limitiert. Dieses Enzym hydrolysiert GTP zu GDP; die Untereinheiten des G_s -Proteins lagern sich wieder zusammen, wodurch der Ruhezustand wieder hergestellt wird. Bei erneuter Bindung von Agonistliganden an den β -Adrenozeptor kann auch das G-Protein wieder aktiviert werden. Die Aktivierung der β -Adrenozeptor-vermittelten Signalübertragung wird entweder durch die Dissoziation des Agonisten vom Rezeptor oder durch autoregulatorische Mechanismen, wie die Desensibilisierung des Rezeptors beendet (BARNES 1995).

Die wiederholte Bindung von Agonisten führt zur Entwicklung einer Toleranz, die letztendlich einen Nachlass der Wirkung des Agonisten bewirkt. Mögliche Mechanismen der verminderten Ansprechbarkeit sind vielfältig. Zum einen gibt es die sogenannte homologe Desensibilisierung und zum anderen die sogenannte heterologe Desensibilisierung. Bei der homologen Desensibilisierung handelt es sich um einen Agonist-vermittelten Prozess, wobei bei der heterologen Desensibilisierung ein Wirkungsverlust, der unabhängig von der Präsenz des Agonisten ablaufen kann, auftritt. Bei der Agonist-vermittelten Toleranzentwicklung sind folgende Teilmechanismen für den β_2 -Adrenozeptor gut beschrieben:

- 1) Phosphorylierung und Entkopplung des Rezeptors
- 2) Rezeptor-Internalisierung
- 3) Rezeptor-Down-Regulation

Nach Agonistbindung wird der β -Adrenozeptor durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) (synonym: β -Adrenozeptorkinasen - β ARK) an Serin- bzw. Threoninresten des C-Terminus und der 3. intrazellulären Schleife phosphoryliert. Anschließend bindet das

inhibitorische Protein β -Arrestin an den phosphorylierten und agonist-gebundenen Rezeptor. Der phosphorylierte Rezeptor wird vom G_s -Protein entkoppelt und dadurch ist die Signalübertragung unterbrochen. Mit der Dissoziation des Liganden vom Rezeptor kann diese kurzfristige Desensibilisierung jedoch schnell wieder aufgehoben werden und der Rezeptor steht erneut für die weitere Signaltransduktion zur Verfügung (JOHNSON 2006).

Bei langzeitiger Stimulation des Rezeptors mit Agonisten assoziiert der Rezeptor-Arrestin-Komplex mit sogenannten Clathrin-coated pits der Zellmembran, die den Rezeptor via Endozytose in das Zellinnere verlagern (Sequestrierung oder Internalisierung), wodurch die Anzahl der membranständigen Rezeptoren abnimmt. Nach Abspaltung des Liganden kann der Rezeptor innerhalb von Stunden wieder an die Zelloberfläche zurückkehren (Resensibilisierung) oder er wird mittels Ubiquitinierung dem intrazellulären, lysosomalen Abbau zugeführt (Degradierung oder Down-Regulation) (MAYOR et al. 1998, SHENOY et al. 2001).

Die Down-Regulation ist mit einem irreversiblen Verlust der Rezeptoren verbunden. Sie kann auch auf der Ebene der Gentranskription, sowie Translation erfolgen, wobei durch eine verminderte Bildung bzw. eine gesteigerte Instabilität der mRNA weniger Rezeptoren synthetisiert werden. In allen Fällen ist die Resensibilisierung nur noch durch Neusynthese möglich (KOENIG und EDWARDSON 1997, COLLINS et al. 1991, HADCOCK et al. 1989).

2.3.3 Bedeutung von β -Adrenozeptoren bei Atemwegserkrankungen

Im Respirationstrakt werden der β_1 - und β_2 -Adrenozeptor-Subtyp exprimiert. Bei den meisten Spezies dominiert der β_2 -Subtyp. Innerhalb des Respirationstraktes wird dieser Rezeptor nicht nur in den glatten Muskelzellen, sondern auch in vielen anderen Zelltypen, wie Epithelzellen, Fibroblasten, Mastzellen und Neutrophilen Granulozyten exprimiert und vermittelt eine Vielzahl von Funktionen, die in der Tabelle 1 zusammengefasst sind. In den Atemwegen von Pferden wird ebenfalls vorwiegend der β_2 -Adrenozeptor-Subtyp exprimiert (> 75%) (ABRAHAM et al. 2003a). Auf den Epithelzellen des Respirationstraktes und intakten Lymphozyten des Pferdes konnte allerdings ausschließlich der β_2 -Adrenozeptor-Subtyp nachgewiesen werden (ABRAHAM et al. 2011, 2001). Bei Menschen konnten auch die Präsenz und die Bedeutung des β_2 -Subtypes in den Fibroblasten der Atemwege nachgewiesen werden (HONEGGER et al. 1986, LAMYEL et al. 2011). Allerdings liegen über die Expression und Funktion von β -Adrenozeptoren an den Atemwegsfibroblasten von Pferden bisher keine Erkenntnisse vor. Zahlreiche Studien deuten auf eine vielfältige β -Adrenozeptor-vermittelte Regulation von Zellfunktionen in Fibroblasten hin. So hemmt die Stimulation des β -Adrenozeptors sowohl die Migration (KOHYAMA et al. 2009) als auch die

Transformation von humanen Atemwegsfibroblasten zu Myofibroblasten (LAMYEL et al. 2011, BAOUZ et al. 2005, SABATINI et al. 2012) und reduziert die Synthese von Kollagen sowie Proteoglykanen (SALTZMAN et al. 1982, GOULET et al. 2007, TODOROVA et al. 2006). Auch die Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle, die die Migration und Aktivierung von Entzündungszellen fördern und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren können über die Aktivierung des β -Adrenozeptors gehemmt werden (SPOELSTRA et al. 2002, SILVESTRI et al. 2001, AHMEDAT et al. 2012). Der Einfluss der β -Adrenozeptoraktivierung auf die Regulation der Zellproliferation wird hingegen kontrovers diskutiert. Während die Stimulation des β -Adrenozeptors in verschiedenen Studien eine proliferationshemmende Wirkung auf humane Atemwegsfibroblasten hervorruft (LAMYEL et al. 2011, GOULET et al. 2007, LIU et al. 2004, SILVESTRI et al. 2001), können PICKHOLTZ et al. (2011) nach der Stimulation von Fibroblasten mit β_2 -Agonisten eine Proliferationssteigerung beobachten. In Studien von DESCALZI et al. (2008) beeinflusst der β -Adrenozeptor die Proliferation der Zellen hingegen nicht.

Tabelle 1: β -Adrenozeptoren an den Zelltypen des Respirationstraktes verschiedener Säugetiere
Verteilung und Funktion (modifiziert nach BARNES 1995)

Zelltyp	Subtyp	Funktion	Literatur
Glatte Muskelzellen	β_2	Relaxation Proliferation↓	(GOLDIE et al. 1982) (TOMLINSON et al. 1995)
Fibroblasten	β_2	Migration↓ EZM-Synthese↓ Transformation↓	(KOHYAMA et al. 2009) (SALTZMAN et al. 1982) (BAOUZ et al. 2005)
Epithelzellen	β_2	Zilienbewegung↑ Mukoziliäre Clearance↑	(DEVALIA et al. 1992) (SALATHE 2002)
Submuköses Drüsenepithel	β_1/β_2	Sekretion↑	(SALATHE 2002)
Clarazellen	β_2	Sekretion↑	(MASSARO et al. 1981)
Alveolarzellen Typ II	β_2	Surfactant↑	(MAK et al. 1996) (BROWN und LONGMORE 1981)
Mastzellen	β_2	Mediatorfreisetzung↓	(BUTCHERS et al. 1991)
Makrophagen	β_2	Mediatorfreisetzung↓	(BOSMANN et al. 2012) (DONNELLY et al. 2010)
Neutrophile Granulozyten	β_2	Degranulation↓ Chemotaxis↓	(YASUI et al. 2006) (SILVESTRI et al. 1999)
Eosinophile Granulozyten	β_2	Degranulation↓	(YASUI et al. 2006) (YUKAWA et al. 1990)
T-Lymphozyten	β_2	Zytokinfreisetzung↓	(LOZA et al. 2006)

2.4 Therapeutische Möglichkeiten bei Recurrent Airway Obstruction des Pferdes

Die Recurrent Airway Obstruction (RAO) ist eine chronische, entzündliche Atemwegserkrankung der adulten Pferde, die durch bronchiale Hyperreaktivität und eine variable Atemwegsobstruktion gekennzeichnet ist. In Phasen einer Exazerbation treten Bronchokonstriktion, Hyper- und Dyskrie sowie entzündliche Veränderungen der Atemwege mit einer Einschränkung der Lungenfunktion auf. Dies kann bis zum vollständigen Verlust der Leistungsfähigkeit des Tieres führen und ist bislang nicht heilbar.

Die Therapie der RAO kann grundsätzlich in die entlastende und die entzündungshemmende Medikation unterteilt werden. Zu den Symptom-entlastenden Arzneimitteln gehören die β_2 -Adrenozeptoragonisten (Bronchodilatoren). Diese sind Mittel der ersten Wahl und

wirken schnell der Bronchokonstriktion entgegen. Mittel der zweiten Wahl sind die Glucocorticoide. Sie stellen die wichtigste Maßnahme dar um das Entzündungsgeschehen in den Atemwegen zu vermindern. Methylxanthine gehören ebenfalls zu den Symptom-entlastenden Arzneimitteln und wirken als Bronchodilatoren. Aufgrund ihrer geringen therapeutischen Breite finden sie jedoch kaum Anwendung beim Pferd (LECLERE et al. 2011, PIRIE 2014).

2.4.1 β_2 -Adrenozeptoragonisten

Die therapeutisch zur Behandlung obstruktiver Atemwegserkrankungen eingesetzten, synthetischen Katecholamine zeichnen sich durch eine Selektivität für den β_2 -Adrenozeptor-Subtyp aus. Es gibt sowohl kurzwirksame (short-acting) β_2 -Agonisten mit einer Wirkungsdauer von 4 – 6 Stunden als auch langwirksame (long-acting) β_2 -Agonisten mit einer Wirkungsdauer von ca. 12 Stunden. Für die Anwendung beim Pferd ist nur das langwirksame Clenbuterol zugelassen (LÖSCHER 2014). In der Humanmedizin werden β_2 -Agonisten bei der Therapie von Asthma bronchiale vorwiegend zur Inhalationsbehandlung angewendet. Diese Applikationsart wird auch beim Pferd genutzt (DERKSEN et al. 1999). Allerdings ist gegenwärtig keine entsprechende Darreichungsform für das Clenbuterol vorhanden.

Die Hauptwirkung der β_2 -Agonisten besteht in der Relaxation der glatten Atemwegsmuskulatur durch die Stimulation der β_2 -Adrenozeptoren der glatten Muskelzellen aber auch der Epithelzellen der Atemwege. β_2 -Adrenozeptoragonisten bewirken darüber hinaus eine Verbesserung der Zilienbewegung und der mukoziliären Clearance, die über die β_2 -Adrenozeptoren vermittelt wird (TURGUT und SASSE 1989). Zusätzlich zu diesen Wirkungen wird eine Hemmung des Airway-Remodelling über die Stimulation des β_2 -Adrenozeptors diskutiert. Wie im Abschnitt 2.3.3 beschrieben, können β_2 -Agonisten in vitro die Proliferation der humanen Fibroblasten, die Matrixsynthese in diesen Zellen sowie die Transformation der Fibroblasten der Atemwege zu Myofibroblasten hemmen. Bisher liegen jedoch keine Untersuchungen vor, die zeigen können, inwieweit diese Wirkungen auch in equinen Bronchialfibroblasten auftreten können. Außerdem fehlen Daten zu Wirkmechanismus, Wirksamkeit und Wirkstärke von dem einzigen für Pferde zugelassenen β_2 -Agonisten Clenbuterol an Fibroblasten, die einen Aufschluss über die Beeinflussung des Airway-Remodelling in den Atemwegen geben können gänzlich.

Die langzeitige, alleinige Gabe von β_2 -Agonisten führt allerdings bei fast allen Patienten zur Desensibilisierung des β_2 -Adrenozeptors (vgl. Abschnitt 2.3.2), die mit einer klinisch relevanten, reversiblen Toleranzentwicklung verbunden ist (READ et al. 2012, HANEY und

HANCOX 2006). Dies resultiert in einem Wirkungsverlust der β_2 -Agonisten im Verlauf der Therapie, der sowohl bei Asthmapatienten, als auch bei an RAO-erkrankten Pferden mit einem Anstieg der Häufigkeit von Exazerbationen assoziiert ist. Bei täglicher Anwendung kann in Untersuchungen von READ et al. (2012) bei Pferden bereits nach 2 Wochen eine klinisch manifeste Toleranz gegenüber Clenbuterol nachgewiesen werden. Daher wird empfohlen eine Monotherapie mit Clenbuterol auf maximal 2 Wochen zu begrenzen, um dem Wirkungsverlust vorzubeugen.

2.4.2 Glucocorticoide

Glucocorticoide werden in der Therapie von RAO und Asthma bronchiale im Wesentlichen zur Hemmung der Entzündung und der Proliferation mesenchymaler Zellen und zur Reduktion der Ablagerung von EZM-Matrix in der Atemwegswand angewendet.

Bei der Therapie von RAO werden Glucocorticoide vorwiegend als add-on-Therapie zu Clenbuterol (oder anderen β_2 -Agonisten) parenteral oder oral eingesetzt. In der Humanmedizin finden Glucocorticoide als Mittel der ersten Wahl bei Asthma bronchiale von Erwachsenen und als add-on-Therapie beim Asthma von Kindern eine Verwendung und werden in der Regel als Inhalationstherapie eingesetzt (BARNES 2002). Abkömmlinge der oralen Glucocorticoide, die inhalativ beim Pferd verabreicht werden können sind Fluticasonpropionat, Beclometason-Dipropionat und Budesonid. Diese werden über Dosier-Aerosole (metered-dose inhaler) mit Hilfe spezieller Inhalationssysteme verabreicht (COUËTIL et al. 2005, COUËTIL et al. 2006, WILLIAMSON und DAVIS 2007).

Glucocorticoide sind die potentesten antiinflammatorischen Arzneimittel in der Therapie von RAO und Asthma. Sie hemmen die Entzündung über eine Verminderung der Infiltration und Aktivierung von Entzündungszellen in den Atemwegen. Außerdem supprimieren sie verschiedene Gene, die inflammatorische Zytokine, Chemokine und Peptide codieren und reduzieren somit die Bildung und Freisetzung dieser Entzündungsmediatoren (BARNES et al. 1998, LECLERE et al. 2011). Eine weitere Wirkung von Glucocorticoiden ist die Reduktion der glatten Muskulatur in den Atemwegen (LECLERE et al. 2012). In-vitro-Untersuchungen zeigen, dass dieser Effekt beim Menschen über die Proliferationshemmung der glatten Muskelzellen vermittelt werden kann (STEWART et al. 1995). Allerdings ist dieser Mechanismus noch nicht im Pferd untersucht. Zusätzlich zur entzündungshemmenden Wirkung und der Reduktion der glatten Atemwegsmuskulatur vermindern Glucocorticoide die Ablagerung von Kollagen in den Atemwegen von Pferden (LECLERE et al. 2012) und Menschen (CAPRAZ et al. 2007). Es gibt jedoch beim Pferd bisher keine Untersuchungen zu den daran beteiligten Wirkmechanismen in Atemwegsfibroblasten. In den

Atemwegsfibroblasten des Menschen vermindern Glucocorticoide die Synthese von Kollagen und Proteoglykanen (JACQUES et al. 2010, TODOROVA et al. 2006). Darüber hinaus besitzen Glucocorticoide eine ausgeprägte antiproliferative und transformationshemmende Wirkung auf humane Lungenfibroblasten. Dadurch können sie in den Atemwegen von Asthmatikern die Akkumulation von Fibroblasten und Myofibroblasten unterdrücken, die als Hauptquelle der EZM gelten (SABATINI et al. 2003, KELLY et al. 2010, SABATINI et al. 2012).

Darüber hinaus verstärken Glucocorticoide die Wirkung von β_2 -Agonisten (permissiver Effekt) über die Steigerung der Expression und Empfindlichkeit von β_2 -Adrenozeptoren (dadurch Abschwächung der Toleranzentwicklung von β_2 -Agonisten). Glucocorticoide wie Dexamethason können die Transkriptionsrate der β -Adrenozeptor-mRNA intensivieren. Dies führt zu einer vermehrten Expression des Rezeptors (HADCOCK et al. 1989). In-vivo-Untersuchungen von ABRAHAM et al. (2002, 2003b) zeigen, dass die parenterale Verabreichung von Glucocorticoiden nicht nur die desensibilisierende Wirkung von Clenbuterol auf equinen Lymphozyten aufhebt, sondern sogar die Dichte der β_2 -Adrenozeptoren erhöht. Die daraus resultierende Verbesserung der bronchodilatatorischen Wirkung von β_2 -Agonisten und die Verhinderung einer klinisch relevanten Toleranzentwicklung werden in der Therapie von RAO und Asthma ausgenutzt (PEARLMAN et al. 2013). Wie oben beschrieben spielen die Fibroblasten der Atemwege eine wichtige Rolle beim Airway-Remodelling im Zusammenhang mit RAO und Asthma. Das bedeutet, die Modulation dieser Zelltypen ist ebenfalls ein Ziel der therapeutischen Maßnahme. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass Glucocorticoide die Proliferations- und Differenzierungseigenschaften von Fibroblasten der humanen Atemwege in vitro beeinflussen können. Bisher liegen jedoch keine Untersuchungen vor, die zeigen können, inwieweit Glucocorticoide und die Arzneimittelinteraktion mit β_2 -Agonisten die Wirkungsstärke der Einzelsubstanzen im Zellmodell der equinen Fibroblasten beeinflussen können.

2.5 Fragestellung

Der Nachweis von Wandverdickung und entzündlichen Prozessen in den Atemwegen bei RAO des Pferdes gibt bisher nur indirekte Hinweise auf eine Beteiligung von Atemwegsfibroblasten an Remodelling-Prozessen, aber eine Beteiligung von extrazellulärer Matrix und die pharmakologische Modulation dieser Zelltypen wurden bisher nicht betrachtet. Deshalb werden in der vorliegenden Arbeit folgende Untersuchungen schrittweise und systematisch durchgeführt:

- 1) Um zunächst In-vitro-Untersuchungen durchführen zu können, ist es notwendig Bronchialfibroblasten aus den Pferdebronchien zu isolieren und diese zu charakterisieren. Hierbei sollen die Isolations- und Kulturbedingungen für diese Zellen definiert werden.
- 2) Weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, die Proliferations- und Differenzierungsprozesse der equinen Bronchialfibroblasten zu untersuchen.
- 3) Ein weiteres Anliegen besteht in der Identifizierung von β -Adrenozeptor-Subtypen und Regulationsmechanismen der Kollagensynthese sowie der Zelldifferenzierung unter dem Einfluss von β -Agonisten und Glucocorticoiden.

3 Publikation 1

Fetales bovines Serum fördert das Zellwachstum und die Ausbildung der fibroblastischen Morphologie von equinen Bronchialfibroblasten unter Kulturbedingungen besser als Pferdeserum

Franke et al. *BMC Veterinary Research* 2014, **10**:119
<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/10/119>



METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts

Jana Franke¹, Vanessa Abs¹, Claudia Zizzadoro² and Getu Abraham^{1*}

Abstract

Background: Airway fibroblasts have become a critical addition to all facets of structural lung tissue changes such as in human asthma and chronic obstructive pulmonary disease, but little is known about their role in the equine recurrent airway obstruction, a disease that resembles to the human asthma. Since the equine bronchial fibroblasts (EBF) have not been isolated and characterized yet, the use of defined medium was investigated.

Results: Primary EBF were cultured on non-collagen coated flasks without serum or in the presence of fetal bovine serum (FBS) or horse serum (HS) or in serum depleted medium. EBF cultured in serum-free basal media and those serum deprived were not able to proliferate and even exhibited considerable cell death. In media containing FBS or HS, proliferation of the cells was reproducible between different primary cultures and cells demonstrated expression of vimentin. Large variations were found in the ability of FBS and HS to support growth and differentiation of EBF in monolayer culture. Indications of growth-promoting actions, increasing passage number as well as maintaining fibroblast morphology were found rather in FBS than in HS. EBF culturing in HS needed longer doubling and confluence time. The protein content of the cell pellets was higher in EBF cultured in medium containing HS than FBS. Alpha-smooth muscle actin seemed to be less expressed in EBF cultured in medium containing FBS than those in HS.

Conclusions: In sum, serum addition to basal EBF medium enhanced EBF differentiation into myofibroblasts, and these findings are useful to develop in vitro fibroblast culture models that mimic in vivo physiological processes and to study airway disease mechanisms and remodeling.

Keywords: Airways, Primary bronchial fibroblasts, Cell culture, In vitro, Serum types

Background

Chronic airway diseases like human bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and the equine recurrent airway obstruction (RAO) principally characterized by bronchial hyperreactivity and airflow obstruction result from several factors including structural alterations of the airway wall and cell function. Such airway remodeling is a common feature of abnormal deposition of extracellular matrix (ECM) components in airway

mesenchymal layer associated with airway wall thickness [1-3]. Airway fibroblasts and those cells differentiated into myofibroblasts contribute to sub-epithelial fibrosis linked to airway remodeling by producing ECM proteins such as collagen, fibronectin and proteoglycans [4,5].

There are several well characterized human fetal lung fibroblast cell lines that are cultured in defined media and for use as in vitro cell model to study airway diseases and remodeling, for example, HFL-1 [6], IMR-90 [7], HEL299, MCR-5 [8], WI-38 [9] and GM 06114 [10]. Culture of primary bronchial fibroblasts exists for human [11,12], mice [13] and rats [14]. However, there is currently neither

* Correspondence: gabraham@rz.uni-leipzig.de

¹Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, University of Leipzig, An den Tierkliniken 15, Leipzig 04103, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



description of equine adult primary airway fibroblast cultures nor there are such cell lines for this species.

Not all cells have the same requirements for growth and survival. With this regard, for successful growth, maintenance and expression of differentiated metabolic functions of human or animal cells *in vitro*, either primary cultures or continuous cell lines, appropriate culture conditions are required that mimic the physiological conditions *in vivo and situ*. In fact, it is well known that serum represents a fundamental source of nutrients, cytokines and adhesive molecules necessary for *in vitro* cell growth, metabolism and to stimulate proliferation [15]. In serum-free medium, only the addition of growth factors could initiate mouse lung fibroblast proliferation [16]. On the other hand, proliferating primary cardiac and dermal fibroblasts as well as established cell lines have been synchronized into a non-dividing G_0 -phase to cell cycle by serum withdrawal [17] which favour fibrotic processes or cause cell death [18,19]. While significant advances are made to culture conditions of permanent cell lines, current research is lacking that compares cultures of primary airway fibroblasts in different serum origins added to a standard culture medium or serum depleted medium, and how this may affect their differentiation. The sera that most widely used are bovine origin (adult or new born or fetal origin); as well the horse serum has been seen as an alternative to provide growth factors and hormones in modern cell biology. Indeed, almost it is not known about the responses of primary airway fibroblast cultures to horse serum factors.

Aim of the present study was to develop a primary bronchial fibroblast culture technique and investigate the influence of horse serum in comparison to FBS on cell viability, morphology and immunocytochemical characteristics, cell proliferation and α -smooth muscle actin expression (α -sma) to further understand the mechanism of peribronchial fibrosis (airway remodelling) in the equine RAO.

Results

Effect of serum absence and serum withdrawal on primary EBF culture

Primary EBF cultured without serum presence in basic DMEM failed to attach and to proliferate and those attached, disappeared completely from the flask surfaces within 1-week of culture. Also, we tested whether confluent EBF cultured in DMEM can be affected by serum withdrawal. Serum withdrawal led to modification of EBF number in culture; they exhibited detachment within three days of serum starvation (data not shown). Even the addition of 10% FBS after 24 h did not significantly enhance EBF attachment and proliferation.

Cell viability and morphology under FBS and HS influence

Cell yield from digested bronchial tissue was consistent. Under both culture conditions, EBF were stained with

trypan blue and the percentage of viable cells was similar, usually > 95%. No significant evidence of cell necrosis or cell apoptosis was observed under inverted light microscopic analysis. With regard to cell morphology, EBF cultured in DMEM with 10% FBS appeared to be typically flattened and spindle-shaped (with a homogenous cytoplasm) over several weeks of passages compared to EBF cultured in DMEM with 10% HS (Figure 1A). In medium containing FBS, EBF were grown over the growth surface with only loose cell-cell-contact until reaching confluence and then formed tight parallel lines which remained as typical fibroblastic monolayer until passage 15. EBF between passages 16 – 20 started to change their morphology: cells were large, flat and more polygonal shaped, with a large, heterogeneous nucleus. At the same time, cell growth was rapidly reduced and cell viability was diminished. In contrast, EBF cultured in the presence of HS showed altered morphological changes within 2 days of culture; cells were small and more compact in shape combined with granular-like dark structures in the cytoplasm (Figure 1C). Moreover, cells grew in clusters and chains and failed to reach confluence within a week. This morphological behaviour of EBF was seen under this culture conditions until passage 7, but thereafter, EBF failed to proliferate regularly and decreased in their viability (passage 9). Under both culture conditions, most EBF (>99%) were positive for vimentin, but with more characteristic filamentous structures within the cytoplasm in medium containing FBS (Figure 1B) than in the presence of HS (Figure 1D).

Sera effects on cell population, proliferation and total protein

Number of passages and proliferation differed significantly between the two culture conditions. By routinely passaging primary EBF (once a week), EBF maintained their typical morphological fibroblastic properties up to passage 20 in culture medium containing fetal bovine serum, whereas EBF in horse serum did exhibit significantly limited proliferation rate merely up to passage 9 (Figure 2A). Under both experimental conditions, growth curves of EBF showed similar initial 24 h lag-phase. The population data began to exhibit significant differences between the two conditions until day 4 of EBF culture (Figure 2B). Cell doubling time was slow in the presence of horse serum, and here, it took significantly longer than in culture medium containing FBS (Figure 2C). Under culture conditions in the presence of FBS, primary EBF reached confluence on day 4 but not in the presence of HS. Indeed, significant differences between serum groups were not found on day 6 and 8. Total protein content of the cell monolayers did not reveal significant difference between the two experimental conditions until day five (Figure 2D), while after day six the amount of total protein increased under HS condition and statistically differed from FBS condition, though cell number was the vice versa.

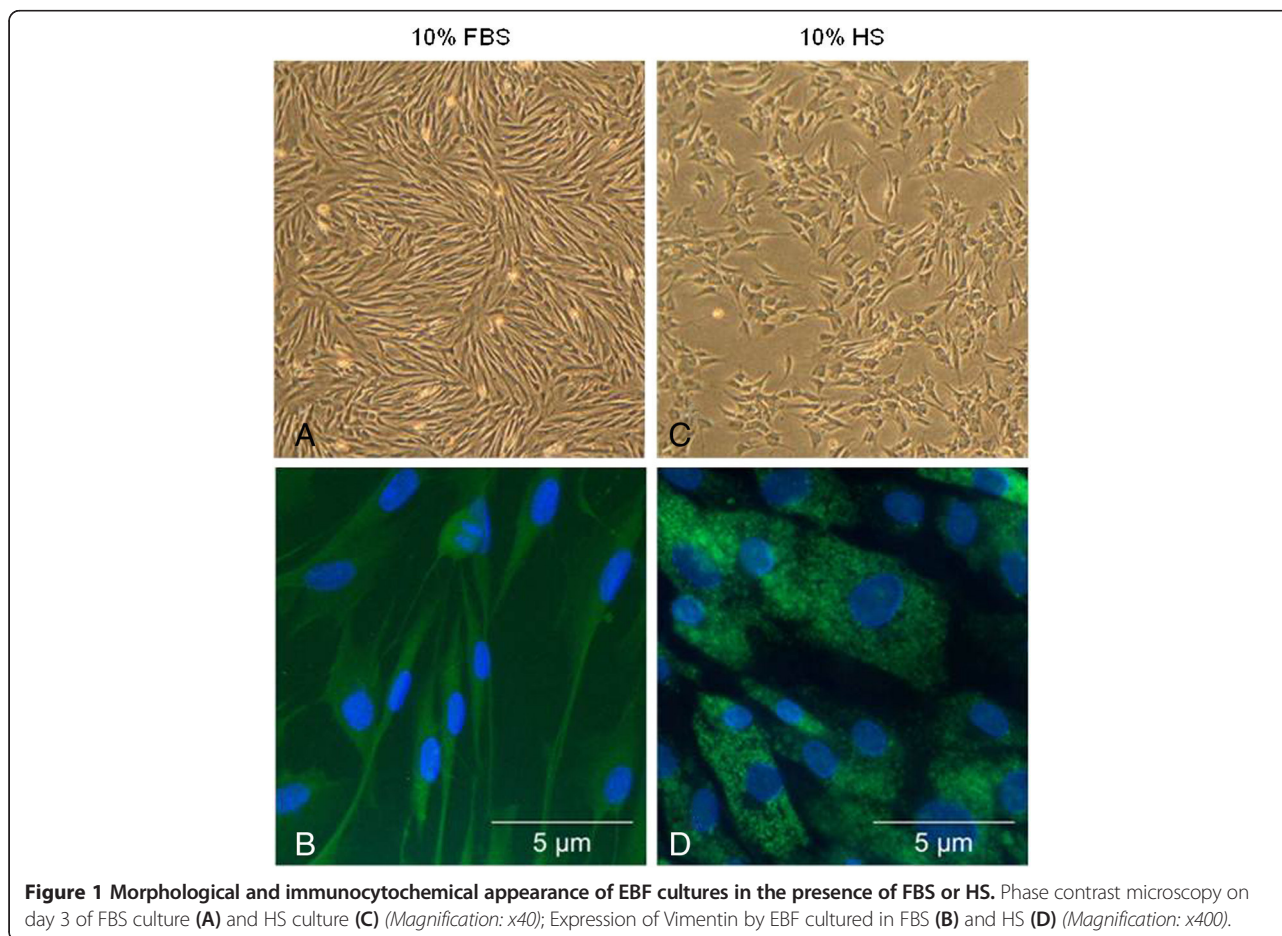


Figure 1 Morphological and immunocytochemical appearance of EBF cultures in the presence of FBS or HS. Phase contrast microscopy on day 3 of FBS culture (A) and HS culture (C) (Magnification: $\times 40$); Expression of Vimentin by EBF cultured in FBS (B) and HS (D) (Magnification: $\times 400$).

When two different batches of FBS and HS were compared on maximum passage, population doubling time and total protein content of EBF, there was no remarkable differences between them (Figure 3). Moreover, cell proliferation was compared between freshly isolated and cryopreserved EBF. We did not observe any effect of cryopreservation on EBF proliferation (Figure 4); so routinely, thawed cells could be used for experimental purposes.

Furthermore, we assessed the effect of time-dependent withdrawal of fetal bovine serum on cell proliferation in sub-confluent primary equine bronchial fibroblasts by [^3H]-thymidine incorporation assay (Figure 5). 10% FBS induced markedly EBF proliferation compared to EBF cultured under serum withdrawal for 24 and 48 h. Even if this investigation was carried out in two to four cell isolates ($n = 2$) in triplicates, the results indicate that after 48 h of FBS deprivation, cells almost stopped to proliferate in comparison to 24 hours serum withdrawal.

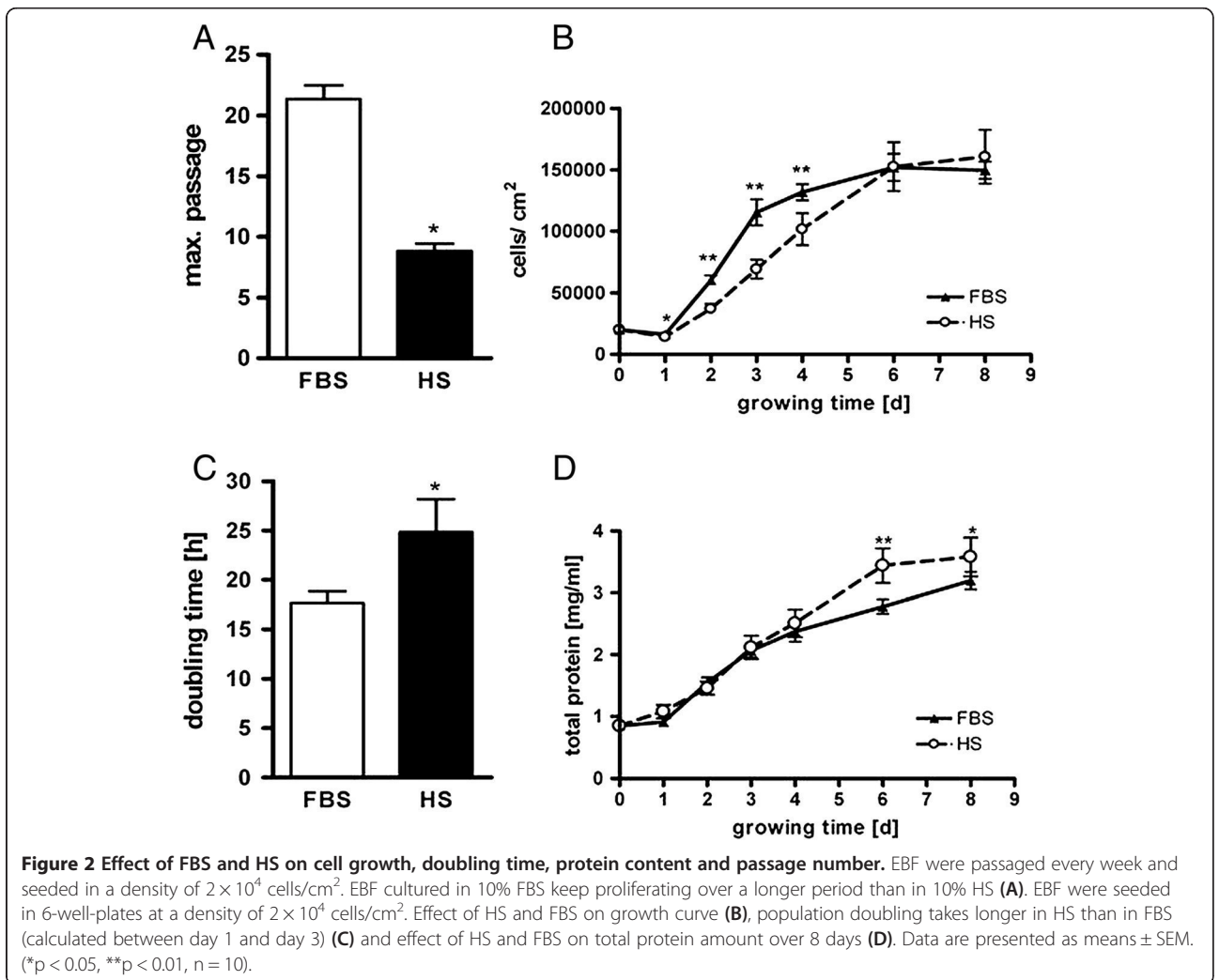
α -Smooth muscle actin expression

To evaluate differentiation of fibroblasts into myofibroblasts, the expression of α -SMA was assessed in cells under culture conditions in the presence of FBS and HS.

Under both experimental conditions, α -SMA was detectable in all cell lysates. In the presence of HS, α -SMA was significantly expressed in comparison to EBF cultured in medium containing FBS (Figure 6A). The expression of the control protein β -actin also differed between both culture conditions (Figure 6A); in the presence of HS, it tended to increase even if not statistically significant. Also, when two different batches of FBS and HS were used, and the effect on α -SMA and β -actin expression was compared, no significant difference was observed (Figure 6B, C).

Discussion

The overall aim of the present investigation was to assess viability, morphological and proliferation differences of primary bronchial fibroblasts of the horse subjected to basal medium without serum, or first serum containing but later serum-depleted medium, in the presence of fetal bovine serum or horse serum. The results highlight differences in examined parameters when primary EBF were cultured within these differing conditions. In the absence of serum, basal medium DMEM did not support EBF attachment and proliferation; serum withdrawal in sub-confluent EBF has also led to decreased cell proliferation



and attachment. The most important factors in significantly affecting cell growth and differentiation were the sera types added to basal DMEM. EBF cultures were established from freshly isolated EBF (P_0) or from frozen isolated EBF. Despite cryopreservation, the proliferation data generated from frozen cells were similar to those from freshly isolated and further cultured EBF.

After short-term trypsin digestion of peeled and minced equine bronchial mucosa and from cultures of epithelial cell mixture in DMEM containing FBS, we could observe a complete disappearance of epithelial cells within 1-week and instead five days later a complete coverage of culture flasks with viable primary equine bronchial fibroblasts. Thus, DMEM does not support epithelial cell growth despite the presence of serum. This isolation procedure is described, to our knowledge, the first time for these cells and resulted in reproducible large cell yields with typical mesenchymal cell properties. EBF cultured in serum-free DMEM were, however, not only unable to proliferate but also were non-adherent after seven days in culture. From

this result, indeed, it is difficult to point out the proteins which are present in serum and absent in the basal medium that are essential for primary EBF growth. The reason why EBF disappeared seems to be, even if we did not proof, the occurrence of apoptosis and necrosis. Thus, it can be argued that under serum-free conditions in our cultures EBF-specific growth factors which are usually present in serum are missing. But in many established permanent cell line culture under serum-free conditions [20,21] the serum-free environment did support growth and differentiation with clonal growth as well as mass culture (for review see [22]).

Although recent efforts have shown that human mesenchymal stem cells and primary epithelial cells can be isolated and expanded long-term in serum-free medium [23-26], no published work had shown whether human or animal primary airway fibroblasts are able to expand under serum-free conditions for long-term in culture. The selective nature of serum-free media formulations could be used in primary cultures of tissue explants by

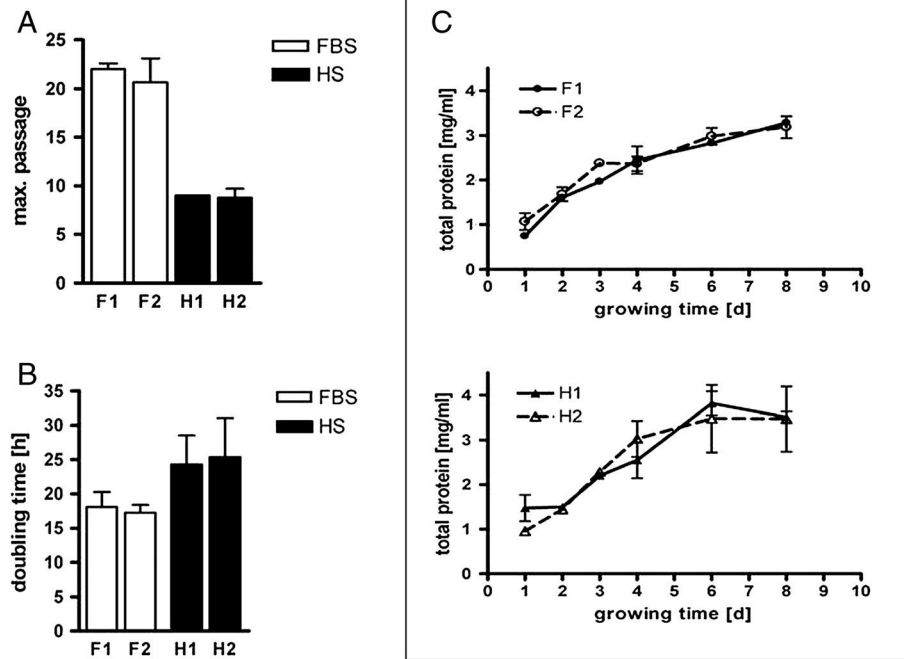


Figure 3 Effect of FBS and HS batches on EBF passage number, population doubling and total protein content. Under standard culture conditions as described in material and methods, cells were subjected to obtain (A) maximum passage number (n = 2), (B) population doubling (n = 5) and (C) total protein amount (n = 2). F1 and F2 represent FBS batches, and H1 and H2 the HS batches.

allowing growth suppression of other cell types which might quantitatively influence experiments with primary cells obtained from tumor tissues. Presumably, in our case, the serum-free condition should be optimized for enhanced primary fibroblast expansion by adding growth factors which have to be further investigated. In sum, understanding of these processes is essential in understanding the use of these cells as in vitro model and to study their role in airway remodelling during respiratory disease mechanisms.

The importance of serum supplementation for cell attachment, growth and passing of in vitro proliferating cells [27] as well as the influence of serum deprivation on permanent cell line proliferation and cycle [28] are

well known. On the other hand, no data are available on the effect of time-dependent serum withdrawal on primary airway fibroblast proliferation and differentiation. Since serum components might affect cell stimulation, many studies in vitro are conducted in the absence of serum, and cells can be deprived of serum for 1 – 8 days [29,30], and thus, the aim of the present study was to investigate the response to serum withdrawal for 24 to 48 hours in sub-confluent primary equine bronchial fibroblasts which were first cultured in DMEM containing 10% FBS. In our study, we have clearly demonstrated a marked time-dependent decrease in [³H]-thymidine incorporation in cells deprived of serum for 24 to 48 hours, suggesting discontinuation of proliferation in the absence of FBS.

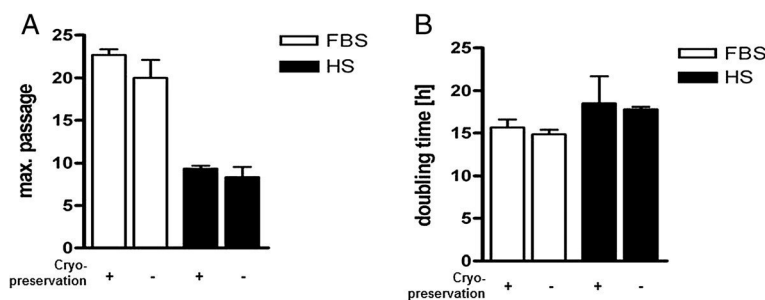
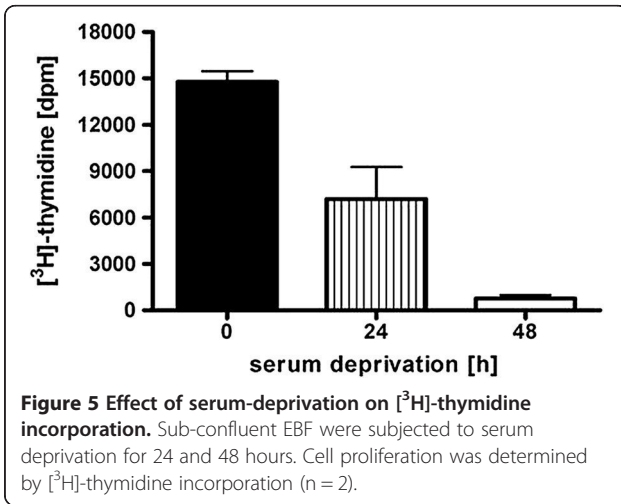


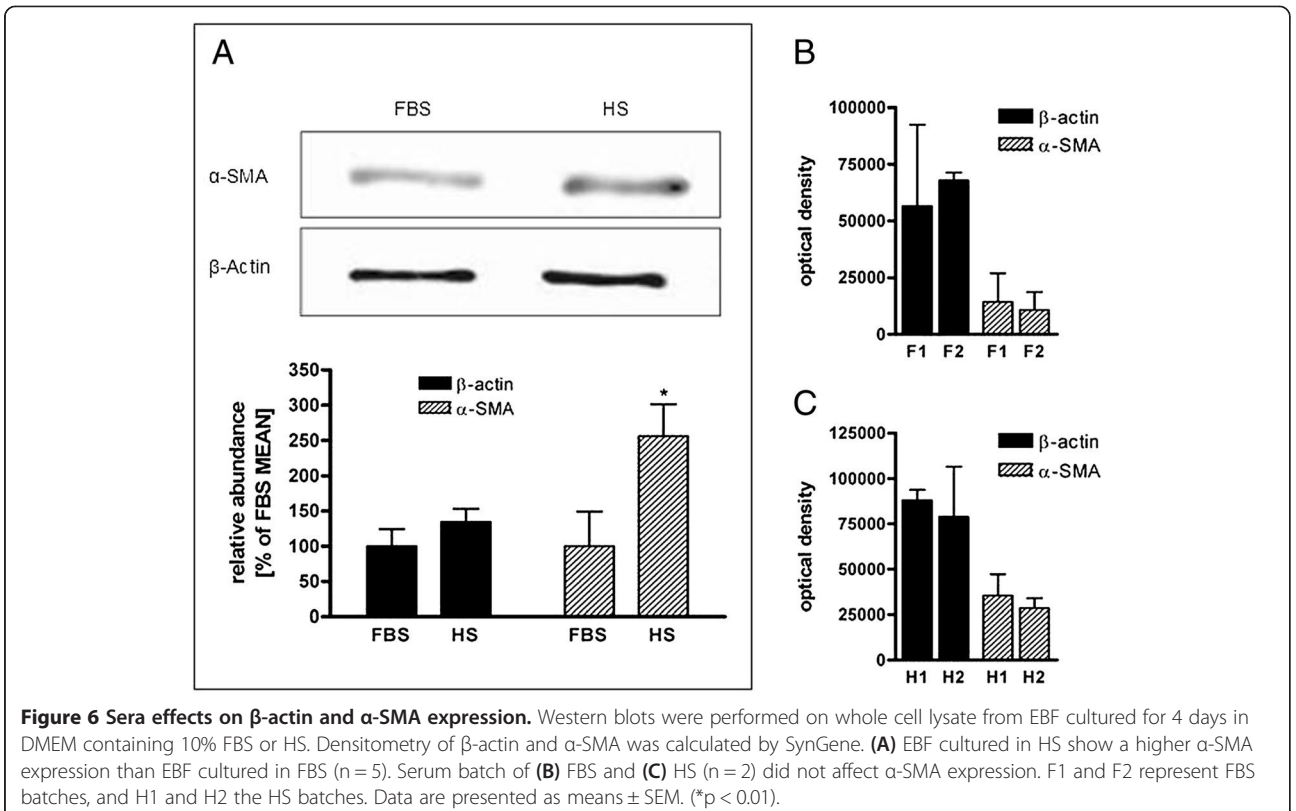
Figure 4 Effect of cryopreservation on EBF passage number and population doubling. Under standard culture conditions, cells were subjected to obtain (A) maximum passage number (n = 3) and (B) population doubling (n = 2). Thawed cells were used after 2 passages and treated as described under Figure 2.



After 72 hours of serum depletion many cells were floating in the medium and the number of attached cells was decreasing, indicating altering cell viability and morphology, in agreement with data found for cardiac fibroblasts [18]. These findings show that EBF in primary cultures are not able to adapt to serum deprivation for a given time, presumably sufficient serum growth factors are not available.

Moreover, we have tested the effects of sera types on proliferation, morphology, population doubling and viability of primary equine bronchial fibroblasts. The results

highlight striking differences in cell proliferation, morphology, passaging time and number as well as total protein amount and α -SMA expression when EBF were cultured within these differing conditions. Both FBS and HS are natural products, presumably, with varying concentrations of growth factors within different batches; however, the effects measured in our study were not dependent on batch/lot number. EBF grown in DMEM containing 10% FBS continue to proliferate even after reaching confluence, whereas these same cells, when cultured in DMEM containing 10% HS, had relatively limited proliferation rate, longer population doubling time and somehow quite different morphological features. Cells in HS were smaller, chain-forming and more compact in shape with dark cytoplasmic granules which can be related to the occurrence of abnormal protein accumulation than those in FBS, and they failed to reach confluence. In concordance, sera types affect other various cell types in a similar way: bovine adipocytes and sheep skeletal muscle satellite cells proliferated rapidly, when FBS was supplemented to growth medium instead of HS; thus, FBS-containing medium is often used as growth medium in these cultures [31,32]. On the contrary, equine chondrocytes could equally proliferate under both conditions [33]. Even if they are equine cells, it is noteworthy to find that EBF exhibit a preference for fetal bovine serum factors over the horse serum factors, whereas the vice versa has been seen for neural cells



[34]. Merely, early studies have proposed that horse serum is appropriate for neuronal cell cultures [34,35].

Moreover, despite the short passaging time and limited proliferation and population doubling rate, increased α -SMA expression was accompanied by higher protein amount in the presence of horse serum than in bovine serum, suggesting that HS might stimulate fibroblast differentiation into myofibroblasts. It is well known that myofibroblasts are able to produce large amount of extracellular matrix (ECM) proteins, as well as growth factors and cytokines and express cytoplasmic contractile structures including α -SMA. Thus, it seems that the horse serum increases the protein content in EBF by increasing synthesis of structural proteins, ECM and cytokines. Indeed, it is not yet known if differential expression of α -SMA and protein is functionally relevant.

Conclusions

Fetal bovine serum favors fibroblastic morphology with enhanced proliferation rate, population doubling, passage number and triggers cell differentiation (as vimentin staining showed), suggesting serum factors essential for the equine airway fibroblasts are available in the fetal bovine serum, whereas in the horse serum cells there were signs of degeneration or cell granularity. Moreover, we can conclude that serum withdrawal for 48 hours rather decrease EBF adaptation and enhance cell detachment than the 24 hour FBS depletion and in the latter case cell viability was though not altered, thus, EBF cultured in 10% FBS represent a good model allowing studying the response to drugs that influence cell proliferation and pathways of airway remodeling in airway diseases.

Study limitation: Animal serum is a complex mixture of a large number and variety of components; therefore, it is difficult to assess, at this stage, the significance of the observation that horse serum inhibits the programmed progress of equine airway cells through the lineage of differentiation in cultures.

Methods

Isolation and culture of equine bronchial fibroblasts

Primary equine bronchial fibroblasts were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 200 Units/ml Penicillin, 0.2 mg/ml Streptomycin, 5 mg/ml Amphotericin B (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). Surfaces of culture flask were not pretreated with adhesion supporting matrix like collagen.

Bronchial segment tissue samples were obtained from adult non-diseased slaughter horses of different breed, age and sex and slaughtered at local abattoirs (Freiberg, Germany). Primary equine bronchial fibroblasts (EBF) were isolated from these tissues. Briefly, the bronchial mucosa was removed from the bronchi, washed, minced to about 1-3 mm pieces, and 500 mg tissue were digested with

0.25% trypsin/EDTA (Sigma Aldrich, Deisehnhofen, Germany) in Hanks' balanced salt solution (HBSS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) in 50-ml Erlenmeyer glass flasks and incubated at 37°C for 2 hours in humidified atmosphere of 5% CO₂. Trypsinized samples were then filtered through sterile double-layered gauze and rinsed twice with ice-cold HBSS. Cell suspension was then further sieved through sterile nylon cell strainers (mesh size: 40 μ m) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and centrifuged two times to remove tissue debris.

To evaluate the effect of sera on proliferation and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts, we used at least two to three different lots of cell culture appropriate not inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and horse serum (HS) (Sigma Aldrich, Deisehnhofen, Germany). Since it was not the objective of the study, we did not compare different serum products of several companies. FBS is routinely used to culture other cell lines in our laboratory, and should be tested before use; thus, after cell isolation, final cell pellets were first re-suspended and cultured in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS) for at least up to two passages. Thereafter, EBF were trypsinized and sub-cultured under different conditions: a) in DMEM without serum, or b) first in DMEM containing FBS and then serum deprived, or c) in DMEM in the presence of 10% FBS or d) in DMEM in the presence of 10% horse serum (HS). Cells were routinely passaged every 7 days with replacement of medium every 2 to 3 days. Unless and otherwise specified; cells were routinely cultured in 75 cm² flasks (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany).

Cryopreservation and thawing of EBF

Certain density of isolated primary EBF were either provided for direct culturing or frozen in 1 ml DMEM containing 20% FBS, 10% DMSO (Sigma Aldrich, Deisehnhofen, Germany), penicillin, streptomycin and amphotericin B in liquid nitrogen until use. Also, some passages of EBF cultures were frozen. Cells were quickly thawed at 37°C in water bath and subsequently transferred into culture flasks with tempered culture medium (see above). Thawed cells were used for our study after 2 passages.

Cell viability, morphology and immunostaining

For cell counting and viability testing, cells were trypsinized and washed with PBS and stained with trypan blue dye (Sigma-Aldrich, Deisehnhofen, Germany). Cells excluding the dye were counted using Neubauer cell chamber. Also, after 1-week of EBF culture in two conditions, i.e., DMEM + FBS or DMEM + HS, fibroblasts were trypsinized, centrifuged and an aliquot was re-suspended in PBS with trypan blue.

EBF were plated into 75 cm² flasks at a density of 2×10^4 cells/cm² and grown in 10 ml defined DMEM in the presence of 10% FBS or HS. Cell morphology was evaluated under inverted light microscope (Olympus CKX41). Digital images were taken from cells at different days and at possible confluence.

Expression of intermediate filaments in primary cultured EBF was evaluated using immunofluorescence staining against vimentin using a primary mouse monoclonal antibody and a secondary anti-mouse FITC-antibody (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany). EBF were cultured under the indicated culture conditions on glass cover slips (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), washed twice with PBS after medium removal, and fixed in ice-cold acetone for 5 min at -20°C and immunostained as previously described [36].

Cell proliferation assay and population doubling time

To further assess the effects of sera types on cell proliferation and population doubling, EBF between passage 3 and 6 were transferred into 6-well plates (2×10^6 cells/cm²) and cell numbers were determined manually after day 1, 2, 3, 4, 6 and 8. Each time, the average from 2 wells was taken. The mean cell number was logarithmically transformed and the linear regression slope was calculated to derive the doubling time (DT). Proliferation rate was also determined in cryopreserved, thawed and cultured cells.

[³H]-thymidine assay

Furthermore, cell proliferation was measured by [³H]-thymidine incorporation assay [11]. EBF (40 000 – 60 000 cells/well) were seeded into 12-well plates, in DMEM in the presence of 10% FBS, grown until 60% confluence, and further cultured in the presence of 10% FBS or serum-withdrawn for 24 or 48 hours. In all three settings, [³H]-thymidine (37 kBq/well) (Perkin Elmer, Waltham, MA) was added to the culture medium. 24 hours after incubation of cells with [³H]-thymidine, cells were washed in ice-cold PBS and incorporated radioactivity was determined by liquid scintillation counting (Beckman LS 6500 Scintillation Counter). Also, in thawed and cultured EBF, proliferation experiments were performed about 1-week after thawing, to avoid a major increase in the number of cumulative population doublings compared to experiments done with fresh cells.

Cell growth determination

To measure the effect of sera on cellular growth, total protein was measured at defined time points during culture in 6-well plates by the colorimetric method [37]. In brief, EBF were rinsed twice in PBS and then trypsinized, centrifuged at $500 \times g$ for 10 min. After removal of the supernatant, cell pellets were resuspended in PBS and sonicated 4 rounds for 30 second. Crude cell lysates

were then diluted in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), incubated with copper in alkaline solution for 10 minutes at room temperature. After addition of Folin (Merck, Darmstadt, Germany), reduction of copper was completed within 45 minutes and quantitative analysis could be carried out by spectrophotometry at 660 nm (Beckman DU640 spectrophotometer, Beckman Coulter, Krefeld, Germany).

Western blot

Primary EBF grown in 6-well plates under different culture conditions were harvested and suspended in sample buffer (containing 2% SDS, 25% [v/v] glycerol, 60 mM Tris-HCl and 0.1% bromphenol blue, 14.4 mM β-mercaptoethanol, pH 6.8) and boiled for 5 min. Equal amounts of whole cell lysate (2.5×10^5 cells/ml) were subjected to SDS-PAGE; samples were separated on 12% acrylamide gel under reducing conditions and transferred to a nitrocellulose membrane (Whatman GmbH, Dassel, Germany). The membrane was then blocked in 3% BSA (PAA Laboratories) with TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.05% [v/v] Tween-20) for 1 h at room temperature. α-SMA was detected following an overnight incubation of samples with mouse monoclonal antibody against human anti-α-SMA (1:1000; Sigma-Aldrich) and β-actin was detected using mouse monoclonal antibody against human anti-β-actin (1:10,000; Sigma-Aldrich) in 3% BSA-TBST at 4°C. Band visualisation was performed using alkaline phosphatase conjugated secondary anti-mouse IgG antibody (1:5000; Promega GmbH, Mannheim, Germany) over 1 h at room temperature. Enzyme activity was detected using Western Blue stabilised substrate for alkaline phosphate (Promega). The membranes were digitalized and quantitated by densitometry analysis (SynGene, Cambridge, UK).

Data and statistical analysis

All data are expressed as means ± SEM. Statistical significance of differences was evaluated by paired two-tailed student's *t*-test using GraphPad Prism version 5.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). *P* < 0.05 was considered significant.

Competing interests

All authors declare that no Competing interests exist.

Authors' contributions

JF, VA, CZ and GA designed the research and wrote the paper. JF and VA performed the experiment and analyzed the data. JF analyzed the data and wrote the paper. GA analyzed the data, wrote and approved the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported financially by Frankenförder Forschungsgesellschaft mbH (Berlin, Germany). We thank the abattoirs of Freiberg and Jena for access to fresh bronchial tissue samples. We also thank Martina Wiecek for technical assistance.

Author details

¹Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, University of Leipzig, An den Tierkliniken 15, Leipzig 04103, Germany. ²Division of Veterinary Pharmacology and Toxicology, Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Bari, Strada Prov.le per Casamassima, km 3, Valenzano, BA 70010, Italy.

Received: 31 August 2013 Accepted: 20 May 2014

Published: 26 May 2014

References

- Jeffery PK: Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **164**:528–538.
- An SS, Bai TR, Bates JH, Black JL, Brown RH, Brusasco V, Chitano P, Deng L, Dowell M, Eidelman DH, Fabry B, Fairbank NJ, Ford LE, Fredberg JJ, Gerthoffer WT, Gilbert SH, Gosens R, Gunst SJ, Halayko AJ, Ingram RH, Irvin CG, James AL, Janssen LJ, King GG, Knight DA, Lauzon AM, Lakser OJ, Ludwig MS, Lutchen KR, Makym GN, et al: Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma. *Eur Respir J* 2007, **29**:834–860.
- Yamauchi K, Inoue H: Airway remodeling in asthma and irreversible airflow limitation-ECM deposition in airway and possible therapy for remodeling. *Allergol Int* 2007, **56**:321–329.
- Fernandes DJ, Bonacci JV, Stewart AG: Extracellular matrix, integrins, and mesenchymal cell function in the airways. *Curr Drug Targets* 2006, **7**:567–577.
- Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR: Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990, **3**:507–511.
- Ichikawa T, Sugiura H, Koarai A, Yanagisawa S, Kanda M, Hayata A, Furukawa K, Akamatsu K, Hirano T, Nakanishi M, Matsunaga K, Minakata Y, Ichinose M: Peroxynitrite augments fibroblast-mediated tissue remodeling via myofibroblast differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, **295**:L800–L808.
- Kolodnick JE, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal VJ, Moore BB: Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoicid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, **29**:537–544.
- Haag S, Matthiesen S, Juergens UR, Racké K: Muscarinic receptors mediate stimulation of collagen synthesis in human lung fibroblasts. *Eur Respir J* 2008, **32**:555–562.
- Liu X, Ostrom RS, Insel PA: cAMP-elevating agents and adenyl cyclase overexpression promote an antifibrotic phenotype in pulmonary fibroblasts. *Am Physiol Cell Physiol* 2004, **286**:C1089–C1099.
- Silvestri M, Fregonese L, Sabatini F, Dasic G, Rossi GA: Fluticasone and salmeterol downregulate in vitro, fibroblast proliferation and ICAM-1 or H-CAM expression. *Eur Respir J* 2001, **18**:139–145.
- Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, Haag S, Fuhrmann M, Stichnote C, Juergens UR, Racké K: Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006, **35**:621–627.
- Jacques E, Semlali A, Boulet LP, Chakir J: AP-1 overexpression impairs corticosteroid inhibition of collagen production by fibroblasts isolated from asthmatic subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010, **299**:L281–L287.
- Sugiura H, Liu X, Duan F, Kawasaki S, Togo S, Kamio K, Wang XQ, Mao L, Ahn Y, Ertl RF, Bargar TW, Berro A, Casale TB, Rennard SI: Cultured lung fibroblasts from ovalbumin-challenged "asthmatic" mice differ functionally from normal. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007, **37**:424–430.
- Warnken M, Haag S, Matthiesen S, Juergens UR, Racké K: Species differences in expression pattern of arginase isoenzymes and differential effects of arginase inhibition on collagen synthesis in human and rat pulmonary fibroblasts. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol* 2010, **381**:297–304.
- Bettger WJ, McKeehan WL: Mechanisms of cellular nutrition. *Physiol Rev* 1986, **66**:1–35.
- Kumar RK, O'Grady R, Li W, Smith LW, Rhodes GC: Primary culture of adult mouse lung fibroblasts in serum-free medium: responses to growth factors. *Exp Cell Res* 1991, **193**:398–404.
- Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J, Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO: The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 1999, **283**:83–87.
- Leicht M, Marx G, Karbach D, Gekle M, Köhler T, Zimmer HG: Mechanism of cell death of rat cardiac fibroblasts induced by serum depletion. *Mol Cell Biochem* 2003, **251**:119–126.
- Simm A, Bertsch G, Frank H, Zimmermann U, Hoppe J: Cell death of AKR-2B fibroblasts after serum removal: a process between apoptosis and necrosis. *J Cell Sci* 1997, **110**:819–828.
- Minotti S, Scicchitano BM, Nervi C, Scarpa S, Lucarelli M, Molinaro M, Adamo S: Vasopressin and insulin-like growth factors synergistically induce myogenesis in serum-free medium. *Cell Growth Differ* 1998, **9**:155–163.
- Goto S, Miyazaki K, Funabiki T, Yasumitsu H: Serum-free culture conditions for analysis of secretory proteinases during myogenic differentiation of mouse C2C12 myoblasts. *Anal Biochem* 1999, **272**:135–142.
- Barnes D, Sato G: Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* 1980, **22**:649–655.
- Agata H, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S, Yamazaki M, Tojo A, Kagami H: Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **382**:353–358.
- Chase LG, Lakshminpathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC: A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2010, **1**:8.
- Shibeshi W, Abraham G, Kneuer C, Ellenberger C, Seeger J, Schoon HA, Ungemach FR: Isolation and culture of primary equine tracheal epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2008, **44**:179–184.
- Gruener DC, Finkbeiner WE, Widdicombe JH: Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 1995, **268**:L347–L360.
- Honn KV, Singley JA, Chavin W: Fetal bovine serum: a multivariate standard. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975, **149**:344–347.
- Gos M, Miloszewska J, Swoboda P, Trembacz H, Skierski J, Janik P: Cellular quiescence induced by contact inhibition or serum withdrawal in C3H10T1/2 cells. *Cell Prolif* 2005, **38**:107–116.
- Hetzl M, Bachem M, Anders D, Trischler G, Faehling M: Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Lung* 2005, **183**:225–237.
- Chen M, Huang J, Yang X, Liu B, Zhang W, Huang L, Deng F, Ma J, Bai Y, Lu R, Huang B, Gao Q, Zhuo Y, Ge J: Serum starvation induced cell cycle synchronization facilitates human somatic cells reprogramming. *PLoS One* 2012, **7**:e28203.
- Fernyhough ME, Hausman GJ, Dodson MV: () Progeny from dedifferentiated bovine adipocytes display protracted adipogenesis. *Cells Tissues Organs (Print)* 2008, **188**:359–372.
- Wu H, Ren Y, Li S, Wang W, Yuan J, Guo X, Liu D, Cang M: In vitro culture and induced differentiation of sheep skeletal muscle satellite cells. *Cell Biol Int* 2012, **36**:579–587.
- Ahmed YA, Tatarczuch L, Pagel CN, Davies HM, Mirams M, Mackie EJ: Hypertrophy and physiological death of equine chondrocytes in vitro. *Equine Vet J* 2007, **39**:546–552.
- Fedoroff S, Hall C: Effect of horse serum on neural cell differentiation in tissue culture. *In Vitro* 1979, **15**:641–648.
- Moonen G, Nelson PG: Some physiological properties of astrocytes in primary cultures. In *Dynamic Properties of Glial Cells*. Edited by Schoffeniels E, Franck G, Hertz L, Towers DB. New York: Pergamon Press; 1978:389–393.
- Abraham G, Zizzadoro C, Kacza J, Ellenberger C, Abs V, Franke J, Schoon HA, Seeger J, Tesfaigzi Y, Ungemach FR: Growth and differentiation of primary and passaged equine bronchial epithelial cells under conventional and air-liquid-interface culture conditions. *BMC Vet Res* 2011, **7**:26.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, **193**:265–275.

doi:10.1186/1746-6148-10-119

Cite this article as: Franke et al.: Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. *BMC Veterinary Research* 2014 **10**:119.

4 Publikation 2

 β_2 -Agonisten und Dexamethason hemmen die Proliferation und Transformation bronchialer Fibroblasten im Pferd allein oder in Kombination

European Journal of Pharmacology 741 (2014) 205–213



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Concomitant inhibition of primary equine bronchial fibroblast proliferation and differentiation by selective β_2 -adrenoceptor agonists and dexamethasone



Jana Franke, Getu Abraham*

Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, University of Leipzig, An den Tierkliniken 15, 04103 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2014
 Received in revised form
 16 July 2014
 Accepted 21 July 2014
 Available online 14 August 2014

Keywords:

Primary bronchial fibroblasts
 Equine
 Proliferation
 Differentiation
 β_2 -agonists

Chemical compounds studied in this article:

Clenbuterol (PubChem SID: 24892782)

ABSTRACT

Altered airway cell proliferation plays an important role in the pathogenesis of human bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) as well as the equine recurrent airway obstruction (RAO) with consistent changes, i.e. narrowing the airway wall, explained by proliferation and differentiation of fibroblasts. In permanent cell lines, it has been suggested that β_2 -adrenoceptor agonists and glucocorticoids regulate cell proliferation via the β_2 -adrenoceptor pathway; indeed, no study was carried out in fresh isolated primary equine bronchial fibroblasts (EBF). We characterized the β -adrenoceptors in EBF, and compared effects of long-acting (clenbuterol) and short-acting (salbutamol and isoproterenol) β_2 -agonists and dexamethasone on proliferation, differentiation and collagen synthesis. High density (B_{max} ; 5037 ± 494 sites/cell) of β_2 -adrenoceptor subtype was expressed in EBF. β_2 -agonists inhibited concentration-dependently EBF proliferation with potency of clenbuterol > salbutamol > isoproterenol which was inhibited by ICI 118.551 and propranolol but not by CGP 20712A. In contrast, dexamethasone alone inhibited less EBF proliferation, but the effect was high when dexamethasone was combined with β_2 -agonists. Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) increased transformation of fibroblasts into myofibroblasts, which was inhibited by clenbuterol and dexamethasone alone and drug combination resulted in high inhibition rate. Collagen synthesis in EBF was rather hampered by dexamethasone than by β -agonists. Collectively, the expression of β_2 -adrenoceptor subtype in EBF and the anti-proliferative effect of clenbuterol suggest that β_2 -adrenoceptors are growth inhibitory and anti-fibrotic in EBF. These β_2 -agonist effects in EBF were synergistically enhanced by dexamethasone, providing the additive effects of glucocorticoids to counteract airway remodelling and morbidity of asthma and RAO.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the human asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and the equine recurrent airway obstruction (RAO), bronchial constriction has been related to airway remodelling with characteristic features of irreversible structural changes including injury and shedding of the airway epithelium, airway smooth muscle hyperplasia and hypertrophy, increased number of goblet and mucous cells and increased sub-epithelial extracellular matrix (ECM) deposition (Bousquet et al., 2000; Davies et al., 2003; Halwani et al., 2011; Kaup et al., 1990; Roche et al., 1989). Also, increased number of fibroblasts/myofibroblasts and their interactions with inflammatory cells have

been associated with airway inflammation and airway remodelling (Gabbriellini et al., 1994; Hoshino et al., 1998; Plante et al., 2006).

With this regards, fibroblasts are believed to participate in the development of airway architecture changes, because they are not only supposed to proliferate but also differentiate into myofibroblasts (McAnulty, 2007). The latter can be distinguished from quiescent fibroblasts based on the expression of the α -smooth muscle actin (α -SMA). Myofibroblasts are suggested as primary excessive producers and depositors of collagenous and non-collagenous matrix molecules which are responsible for tissue remodelling in asthma (Brewster et al., 1990; Descalzi et al., 2007). They are also able to produce pro-inflammatory and growth factors, including TGF- β_1 , CTGF, GM-CSF, IL-6, IL-8, eotaxin and endothelial growth factors (Richter et al., 2001; Wójcik et al., 2012; Zhang et al., 1995, 1996). Indeed, in vitro, TGF- β_1 has been found as potent inducer of transformation of fibroblasts into myofibroblasts (Evans et al., 2003; George, 2009). Thus, this factor, which is

* Corresponding author. Tel.: +49 341 9738 134; fax: +49 341 9738 149.
 E-mail address: gabraham@rz.uni-leipzig.de (G. Abraham).

released from damaged epithelial cells and myofibroblasts, has been implicated in the pathogenesis of chronic airway diseases (Halwani et al., 2011). Even though RAO has strong similarity to human asthma and horses could serve as large animal models, the contribution of airway fibroblasts to the chronic disease mechanism is not clearly known.

Current treatment of asthma, COPD and RAO, includes long- or short-acting β_2 -adrenoceptor agonists as bronchodilators. β_2 -agonists are, however, still controversial for long-term usage since they increase disease morbidity rate (Cates and Cates, 2012; Erdinc, 2011). Debated is also whether their additional effect can be related to airway inflammation and altered airway structure. Glucocorticoids are also important drugs to treat airway inflammation and have generally been controversially considered to have anti-fibrotic effects to limit airway remodelling (Goulet et al., 2007; Ward and Walters, 2005). In some studies in fibroblasts in vitro, these drugs enhanced fibroblast proliferation (Fouty et al., 2006) and in some they inhibit cell proliferation and the release of fibrotic factors (Sabatini et al., 2003; Wen et al., 2003). Bronchodilation is induced via activation of the β_2 -adrenoceptor systems by the β_2 -agonists; however, long-term usage of these drugs, e.g., the long-acting clenbuterol, results in receptor desensitization and downregulation in vivo (Abraham et al., 2002; Brodde et al., 1985) and might enhance disease morbidity. Glucocorticoids have been used alone or in combination with β_2 -agonists and they stimulated receptor expression and function (Abraham et al., 2002, 2003a).

In view of these effects and the importance of airway fibroblasts in airway structural changes, β_2 -adrenoceptor systems might play an important role in fibroblast proliferation and transformation. However, the expression of the β_2 -adrenoceptor in the equine fibroblasts has never been studied. The total paucity of knowledge in receptor properties in these cells and the effects of clenbuterol in the presence or absence of β -adrenoceptor subtype-selective antagonists, dexamethasone as well as salbutamol or isoproterenol on processes of bronchial fibroblast proliferation and differentiation into myofibroblasts have motivated us to start the investigation. Particular emphasis has been given to assess the first time the effect of the long-acting β_2 -agonist (LABA) clenbuterol alone or in combination with dexamethasone on cell proliferation, collagen synthesis and α -SMA-expression.

2. Materials and methods

2.1. Isolation and culture of primary fibroblasts from bronchial tissues

Primary cultures of equine bronchial fibroblasts (EBF) were established from macroscopically normal bronchial walls taken from lungs of healthy slaughter horses as recently described (Franke et al., 2014). In brief, the bronchial mucosa was manually peeled off the bronchus, washed with ice-cold HBSS without Ca^{2+} and Mg^{2+} (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), diced into small pieces and placed in Erlenmeyer bottles (500 mg tissue) with 10 ml 0.25% trypsin/0.6% EDTA (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany). After 2 h tissue dissociation time at 37 °C and 5% CO_2 , the enzymatic reaction was stopped by adding ice-cold HBSS containing 20% foetal bovine serum (FBS) (Gibco, Carlsbad, CA, USA). Tissue debris and fragments were removed by filtering the suspension through a double-layered gauze and subsequently through a 40- μm cell strainer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Following centrifugation at $200 \times g$ at 4 °C for 10 min, cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with low glucose (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) supplemented with 10% FBS, 200 U/ml penicillin, 0.2 mg/ml streptomycin and 5 mg/ml amphotericin B (PAA Laboratories GmbH, Pasching,

Austria). Cell culture medium was changed twice a week, and cells were passaged weekly at 1:4 split ratios and were used between passages 4 and 10. Cultured fibroblasts were identified and characterized by immunofluorescence staining using monoclonal mouse anti-vimentin and anti-mouse FITC-antibodies (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany).

2.2. β -adrenoceptor density and subtypes

β -adrenoceptor density and subtype distribution were determined by radioligand binding assay using [^{125}I]-(-)-iodocyanopindolol (ICYP) as recently described (Abraham et al., 2011). To determine the β -adrenoceptor subtype distribution, aliquots of viable EBF (2×10^5 cells/150 μl) were incubated with 80 pM ICYP in the presence or absence of increasing concentrations (10^{-10} – 10^{-4} M) of the β_2 -selective adrenoceptor antagonist ICI 118,551 or β_1 -selective adrenoceptor antagonist CGP 20712A at 37 °C for 90 min. Non-specific ICYP binding to cells was determined by adding high concentration (1 μM) of the non-selective β -adrenoceptor antagonist (\pm)-CGP 12177 to the reaction mixture. The incubation was terminated by the addition of 8 ml of ice-cold wash buffer (containing 10 mM Tris-base and 154 mM NaCl, pH 7.4) followed by a rapid vacuum filtration through pre-soaked Whatman GF/C glass fibre filters using a Brandl cell harvester (Brandl Biomedical Research and Development, Gaithersburg, MD, USA). Each filter paper was washed with an additional 8 ml of the wash buffer. The filter bound radioactivity was counted in Gamma Counter Wallac WIZARD 1470 (PerkinElmer Wallac GmbH, Freiburg, Germany) at an efficiency of > 80%. Specific binding was defined as the difference between total ICYP binding and non-specific binding. All assays were performed in duplicate.

To evaluate the effects of drugs and TGF- β 1 on receptor density and affinity, confluent EBF cultures in culture flasks were treated for 12 h with the β_2 -adrenoceptor selective agonists clenbuterol (long-acting β_2 -agonist, LABA) (10 μM) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) and salbutamol (short-acting β_2 -agonist, SABA) (10 μM) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany), the non-selective β -adrenoceptor agonist isoproterenol (10 μM) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany), dexamethasone (100 μM) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) or TGF- β 1 (10 ng/ml) (PeproTech GmbH, Hamburg, Germany). Thereafter, cells were trypsinized and washed twice in PBS and pellets were re-suspended in 1 ml incubation buffer (containing 10 mM Tris-base, 154 mM NaCl, 0.55 mM ascorbic acid, pH 7.4 at 25 °C). Cells were tested for viability, counted and the radioligand binding assay was carried out with six increasing ICYP concentrations ranging from 5 to 130 pM at 37 °C for 90 min as described above.

2.3. Fibroblast proliferation assay

Fibroblast proliferation was analysed by [^3H]-thymidine incorporation assay. EBF were plated in 12-well plates (5×10^4 cells/well in 2 ml DMEM/10% FBS). After culturing for 48 h, cells were washed with DMEM/0.5% FBS, and β -adrenoceptor agonists clenbuterol or salbutamol or isoproterenol at different concentrations (10^{-9} – 10^{-4} M) alone or in combination with selective (ICI 118,551, 0.1 μM ; CGP 20712A, 0.5 μM) and non-selective (propranolol, 1 μM) β -adrenoceptor antagonists were added in 2 ml of DMEM/0.5% FBS. Furthermore, the effect of dexamethasone (10^{-7} – 10^{-4}) on EBF proliferation was tested alone or in the presence of clenbuterol (10 nM), salbutamol (10 nM) or isoproterenol (10 μM). To each well 37 kBq [^3H]-thymidine (PerkinElmer, Waltham, MA) was added. After an additional incubation for 24 h, cells were washed in ice-cold phosphate buffered saline (PBS) and precipitated with 5% trichloroacetic acid (TCA) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) (Matthiesen et al., 2006). Cells were lysed

with 0.1% NaOH at 37 °C, neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 7.4), and 300 μ l of the supernatant was transferred into scintillation vials with scintillation cocktail (Rotiszint eco plus; Roth, Karlsruhe, Germany) for radioactivity counting (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The results of the incorporated [³H]-thymidine into the DNA were expressed as disintegrations per minute (dpm) per well and presented as the percentage of change (increase or decrease) in EBF proliferation after drug treatment compared to control cells.

2.4. Measurement of collagen synthesis and deposition in EBF

To evaluate the influence of LABA, SABA and glucocorticoids on collagen production and deposition by confluent EBF monolayers, the [³H]-proline incorporation assay was used as described elsewhere (Haag et al., 2008). In brief, EBF were trypsinized and plated in 12-well plates at a density of 2×10^4 cells/cm² and grown in 2 ml of 10% FBS supplemented DMEM until confluence. Thereafter, medium was removed and replaced by DMEM containing 2.5% FBS. After pre-incubating the cells with or without 10 μ M clenbuterol, salbutamol, isoproterenol or dexamethasone for 6 h, cultures were incubated for an additional 18 h with 37 kBq/well [³H]-proline. Moreover, the profibrotic effect of different FBS concentrations (0.5–5%) was also tested. [³H]-proline incorporation into collagen was determined as described below: after removing the medium, cells were washed with ice-cold PBS and precipitated subsequently with 1 ml/well 20% TCA for 1 h at 4 °C, followed by centrifugation at 16,000 \times g. The pellet was washed with 10% TCA by centrifugation at 16,000 \times g for 10 min. Pellets were lysed in 300 μ l of 0.2 M NaOH followed by neutralization with 300 μ l 0.2 M HCl. Aliquots of 300 μ l sample were digested with 100 μ l collagenase type 2 for 1 h at 37 °C to separate collagenase sensitive protein from total protein. Samples were further denatured with 50% TCA for 1 h at 4 °C and centrifuged again at 16,000 \times g for 10 min. 3 ml scintillation cocktail (Rotiszint eco plus; Roth) was added to 300 μ l of the supernatant and radioactivity was measured using a Beckman LS 6500 Scintillation Counter.

2.5. Western blot

The expression of α -SMA was assessed by immunoblotting. Briefly, sub-confluent primary equine bronchial fibroblasts were treated with 10 ng/ml TGF- β 1 in the presence or absence of dexamethasone (100 μ M), isoproterenol (100 μ M), salbutamol (10 μ M) or clenbuterol (10 μ M) in DMEM containing 0.5% FBS for 24 h. Cells were trypsinized, counted and prepared using the lysis buffer (containing 2% SDS, 25% [v/v] glycerol, 60 mM Tris-HCl and 0.1% bromphenol blue, 14.4 mM β -mercaptoethanol, pH 6.8). Equal amounts of whole cell lysate were resolved by SDS-PAGE gels (12%) and transferred to a nitrocellulose membrane (Whatman GmbH, Dassel, Germany). Membrane was then blocked with TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.05% [v/v] Tween-20) containing 3% BSA (PAA) for 1 h at room temperature and probed with target antibody. Detection was performed with mouse monoclonal anti- α -SMA antibody (1:1000) and monoclonal anti- β -actin antibody (1:10,000; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) in 3% BSA TBST overnight at 4 °C and revealed with alkaline phosphatase-conjugated secondary anti-mouse IgG antibody (1:5000; Promega, Fitchburg, WI, USA) for 1 h at room temperature. Enzyme activity was detected using Western Blue stabilised substrate for AP (Promega). Membranes were digitalized and semi-quantitated using densitometry (SynGene, Cambridge, UK).

2.6. Statistical analysis

Unless and otherwise noted, data are expressed as mean \pm S.E.M. of five independent experiments. Maximal receptor number (B_{max}) and dissociation constant (K_D) were analysed by nonlinear regression analysis (GraphPadPrism Software, San Diego). Statistical significance

of differences was evaluated by unpaired two-tailed student's *t*-test (β -adrenoceptor density) or one-way ANOVA followed by Dunnett's test. Probability values (*P*) < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. β -adrenoceptor subtypes and density

The ratio of β -adrenoceptor subtypes (β_1 and β_2) was measured by competitive displacement of ICYP binding with increasing concentrations of the β_2 -selective antagonist ICI 118.551 and β_1 -selective antagonist CGP 20712A. The concentration inhibition curves of both antagonists were steep monophasic, indicating the presence of exclusively one population of the β_2 -adrenoceptor subtype in primary equine bronchial fibroblasts (Fig. 1A). ICI 118.551 was more potent (> 10,000) than CGP 20712A in displacing the ICYP binding. ICYP binding to primary equine bronchial fibroblasts was saturable with maximal β -adrenoceptor concentration (B_{max}) of 5037 ± 494 binding sites/cell (Fig. 1B) and of high affinity with K_D value of 26.36 ± 3.23 pM ($n=6$) and remained similar between cultures.

3.2. Drug effects on receptor concentration and affinity

To evaluate whether the proliferation or differentiation of primary equine bronchial fibroblasts might be β -adrenoceptor-dependent, we first sought to provide the effects of subtype selective β -adrenoceptor

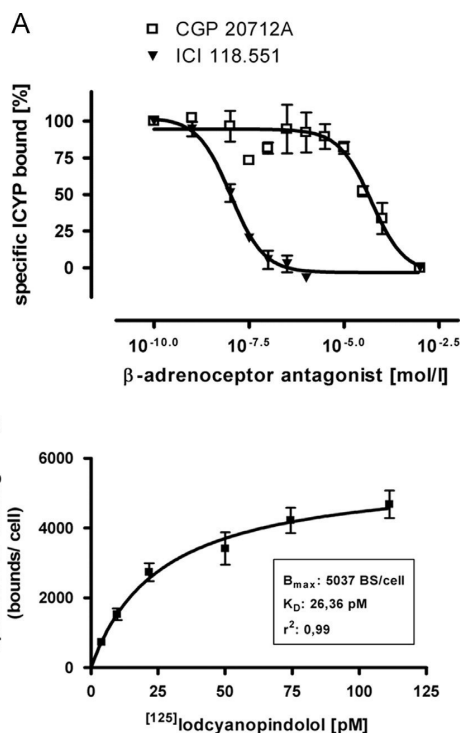


Fig. 1. Characterization of β -adrenoceptors by ICYP binding in primary equine bronchial fibroblasts (EBF). (A) Competitive displacement of ICYP binding by the β_2 -AR selective antagonist ICI 118.551 and β_1 -AR selective antagonist CGP 20712A in EBF; 100% binding represents the specific ICYP binding detected in the presence of 1 μ Mol/l (\pm)-CGP 12177 and in the absence of ICI 118.551 and CGP 20712A. (B) Saturation binding of ICYP to primary cultures of EBF. The data plotted are the mean \pm S.E.M. of five separate experiments (BS=binding sites).

agonists clenbuterol, salbutamol, isoproterenol and dexamethasone alone or in combination on the β_2 -adrenoceptor expression and affinity. The receptor number was modulated by these drugs, without any significant change in the affinity of ICYP. K_D values calculated from ICYP saturation binding curves obtained from non-treated control cells (26.36 ± 3.2 pM) did not statistically differ from those values obtained from isoproterenol (26.07 ± 6 pM), salbutamol (30.09 ± 8.6 pM) or clenbuterol (30.09 ± 3.6 pM) treated cells. After 12 h of EBF treatment, clenbuterol, salbutamol and isoproterenol alone or in the presence of dexamethasone significantly decreased the β_2 -adrenoceptor density (Fig. 2). Clenbuterol and salbutamol decreased B_{max} by $41.3 \pm 5.2\%$ and $59.1 \pm 8.6\%$ ($P < 0.01$), respectively. The effect was more pronounced when cells were treated with isoproterenol ($78.2 \pm 5.6\%$ receptor reduction; $P < 0.01$). In the presence of dexamethasone, these agonists did still decrease the receptor number, whereas treatment of EBF with dexamethasone alone ($100 \mu\text{M}$) resulted in a slight increase of the β_2 -adrenoceptor density even if it was not significant. TGF- $\beta 1$ did not affect the receptor density (Fig. 2). Also, the ICYP affinity to the receptor (K_D) was not significantly affected by treating primary EBF with dexamethasone (21.77 ± 5 pM vs. control) or TGF- $\beta 1$ (19.61 ± 2.7 pM vs. control).

3.3. Regulation of primary equine bronchial fibroblast proliferation by β_2 -agonists and dexamethasone alone or in combination

To examine whether the primary EBF proliferation is regulated by the long-acting β_2 -agonist (LABA) or short-acting β_2 -agonist (SABA) or non-selective β -agonist and/or glucocorticoids, cells were treated concentration-dependently with clenbuterol, salbutamol, isoproterenol or dexamethasone alone or in combination and proliferation was monitored by [^3H]-thymidine assay. As depicted in Fig. 3A, all these drugs significantly decreased EBF proliferation, indeed, with varying degrees of potency. β_2 -agonists caused down-regulation in EBF proliferation in the rank order clenbuterol > salbutamol > isoproterenol. Clenbuterol inhibited strongly the [^3H]-thymidine incorporation at all tested range of concentrations (10^{-9} – 10^{-5} M) (maximum inhibition 80%), salbutamol at concentration ranges between 10^{-8} and 10^{-5} M (maximum inhibition 80%) and isoproterenol only at concentrations greater than 10^{-5} M (maximum inhibition 50%). Dexamethasone also inhibited the EBF proliferation rate at concentration ranges between 10^{-6} and 10^{-4} M. At lower concentration ($< 1 \mu\text{M}$), it seems rather to enhance cell proliferation (Fig. 3A). As shown in Fig. 3B, the addition of β -agonists blocked the pro-proliferative effect of $0.1 \mu\text{M}$ dexamethasone. Indeed, the antiproliferative effect

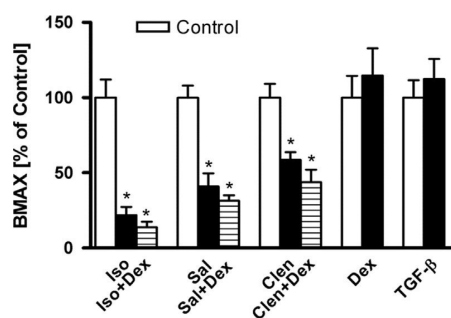


Fig. 2. Effects of β -agonists, dexamethasone and TGF- $\beta 1$ on β -adrenoceptor number. Sub-confluent EBF were cultured in DMEM containing 10% FBS without (control) or with $10 \mu\text{M}$ isoproterenol, salbutamol, clenbuterol and/or $100 \mu\text{M}$ dexamethasone or 10 ng/ml TGF- $\beta 1$ for 12 h. Maximal receptor density (B_{max}) was calculated from nonlinear regression analysis of the specific ICYP binding. Data are presented as mean \pm S.E.M. of five separate experiments. * $P < 0.01$ compared to control values.

of dexamethasone alone at concentrations higher than $10 \mu\text{M}$ was not synergistically enhanced by the addition of β -agonists (Fig. 3C).

3.4. Effects of β -adrenoceptor antagonists on β -agonist-stimulated EBF proliferation

We evaluated the effect of β -adrenoceptor subtype selective antagonists on [^3H]-thymidine incorporation in the presence of clenbuterol, salbutamol or isoproterenol. As demonstrated in Fig. 4A–C, the addition of the β -adrenoceptor antagonists differentially inhibited EBF proliferation. With this regards, the β_1 -antagonist CGP 20712A did not prevent the clenbuterol-, salbutamol- and isoproterenol-induced inhibition of EBF proliferation, whereas the presence of the β_2 -selective antagonist ICI 118.551 and non-selective β -antagonist propranolol prevented to a similar extent the growth inhibition caused by all three agonists. None of the antagonists alone affected significantly the [^3H]-thymidine incorporation in primary EBF (data not shown).

3.5. Serum- and drug-induced effects on collagen production

[^3H]-Proline incorporation assay was used to assess the effect of β -agonists and serum (FBS) on collagen deposition in confluent EBF. FBS significantly increased collagen deposition in a concentration-dependent manner over a concentration range between 0.5% and 5% ($P < 0.05$; Fig. 5A). 2.5% FBS initiated $174 \pm 35\%$ and 5% FBS $229 \pm 69\%$ [^3H]-proline incorporation above 0.5% FBS. In serum free medium, cells detached within 24 h and [^3H]-proline was not able to be incorporated into EBF; thus, 0.5% FBS was considered as control. On the other hand, as depicted in Fig. 5B, exposure of EBF to clenbuterol, salbutamol or isoproterenol for 24 h did not influence collagen deposition, whereas dexamethasone caused a decrease in [^3H]-proline incorporation at a concentration of $10 \mu\text{M}$.

3.6. TGF- $\beta 1$ increases but dexamethasone and β -agonists decrease α -SMA expression in primary equine bronchial fibroblasts

As TGF- $\beta 1$ is known to be the most potent inducer of α -SMA expression and fibroblast differentiation into myofibroblasts (Desmoulière et al., 1993), we investigated whether this effect can be regulated by β -agonists and dexamethasone. As shown in Fig. 6A, TGF- $\beta 1$ induced a significant increase in α -SMA expression. Dexamethasone and clenbuterol alone reduced significantly this TGF- $\beta 1$ -induced α -SMA expression (Fig. 6B). In contrast, adding salbutamol and isoproterenol alone to EBF cultures only marginally but not significantly reduced TGF- $\beta 1$ -induced α -SMA protein. When combined, β -agonists and dexamethasone additively and significantly decreased the TGF- $\beta 1$ -induced α -SMA expression (Fig. 6B).

4. Discussion

In primary bronchial fibroblasts, the presence of β -adrenoceptors and effects of β -agonists and/or dexamethasone on proliferation and differentiation have not been yet demonstrated. In the present study, we have shown that primary equine bronchial fibroblasts express population of β_2 -adrenoceptor subtype at high density (cf. Fig. 1), as the β_2 -selective antagonist ICI 118.551 (Bilski et al., 1983) inhibited ICYP binding with higher affinity (10,000-fold) than the β_1 -selective antagonist CGP 20712A (Dooley et al., 1986). ICYP binding was saturable and reversible and of high affinity. The K_D value was comparable to values obtained for other airway cell types (Abraham et al., 2004, 2011). There are no previous studies which examined the receptor concentrations

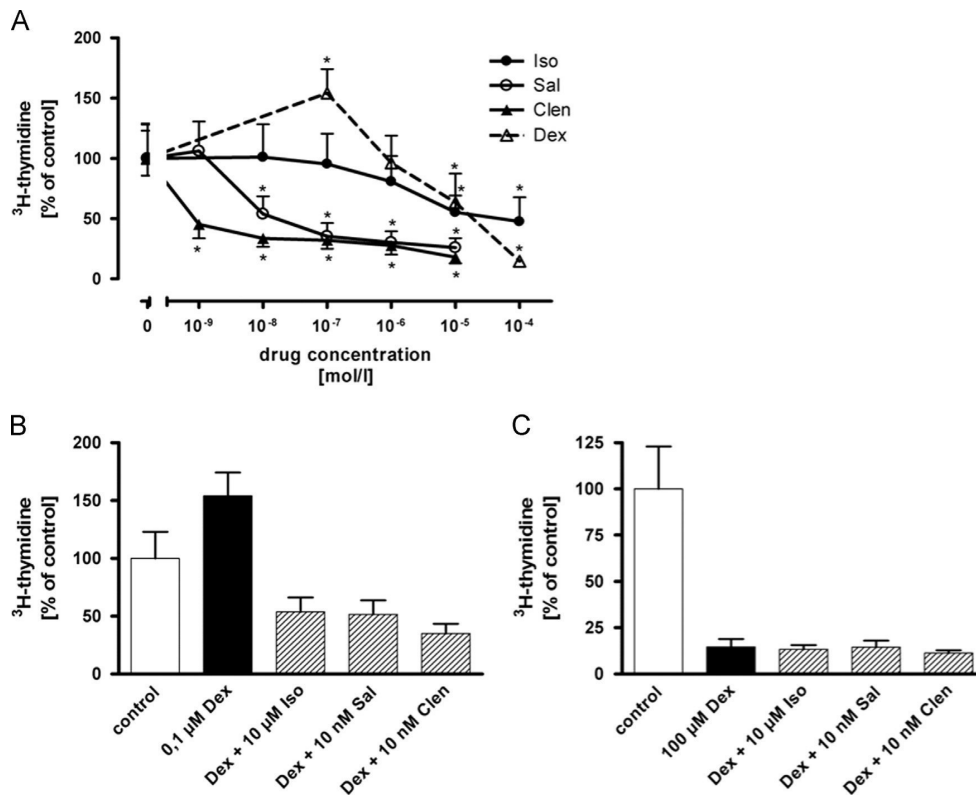


Fig. 3. Concentration-dependent influence of EBF proliferation by β -agonists and dexamethasone. (A) Sub-confluent EBF were treated with increasing concentrations of clenbuterol (10^{-9} – 10^{-5} mol/l), salbutamol (10^{-9} – 10^{-5} mol/l), isoproterenol (10^{-8} – 10^{-4} mol/l) and dexamethasone (10^{-7} – 10^{-4} mol/l). EBF were cultured in the absence (control) or presence of (B) 0.1 μ M and (C) 100 μ M dexamethasone alone or in combination with 10 μ M isoproterenol (Iso), 10 nM salbutamol (Sal) or 10 nM clenbuterol (Clen). Proliferation was measured by assessing the [³H]-thymidine incorporation. All values are mean \pm S.E.M. of five separate experiments. **P* < 0.05 compared to control values.

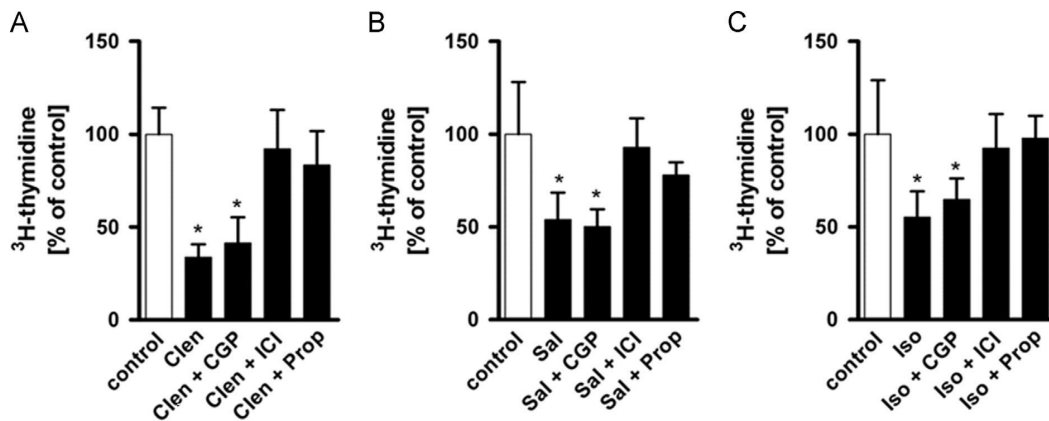


Fig. 4. Prevention of clenbuterol-, salbutamol- and isoproterenol-induced inhibition of [³H]-thymidine incorporation by selective and non-selective β -adrenoceptor antagonists. Sub-confluent EBF were incubated without (control) or with 10 nM clenbuterol (Clen) (A), 10 nM salbutamol (Sal) (B) and 10 μ M isoproterenol (Iso) (C) in the presence of 0.1 μ M β_2 -specific antagonist ICI 118.551 (ICI), 1 μ M non-selective β -adrenoceptor antagonist propranolol (Prop) and 0.5 μ M β_1 -specific antagonist CGP 20712A (CGP). Proliferation was measured by assessing the [³H]-thymidine incorporation. Data are presented as mean \pm S.E.M. of five separate experiments. **P* < 0.05 compared to control values.

in adult primary or permanent bronchial fibroblasts. Merely, Honegger et al. (1986) have detected the presence of β -adrenoceptors with B_{max} > 5000 binding sites/cell in lung fibroblasts from 14-week old human foetus, which is not comparable to our adult subject cells. Lamyel et al. (2011) have found the mRNA

of the β_2 -adrenoceptors in pulmonary fibroblasts but did not determine the absolute receptor number. The maximal receptor density (B_{max}) in EBF (5037 ± 494 receptors/cell) was, indeed, close to the numbers found in human primary airway epithelial cells (7000–9000 sites/cell) (Kelsen et al., 1995) and in cell lines of

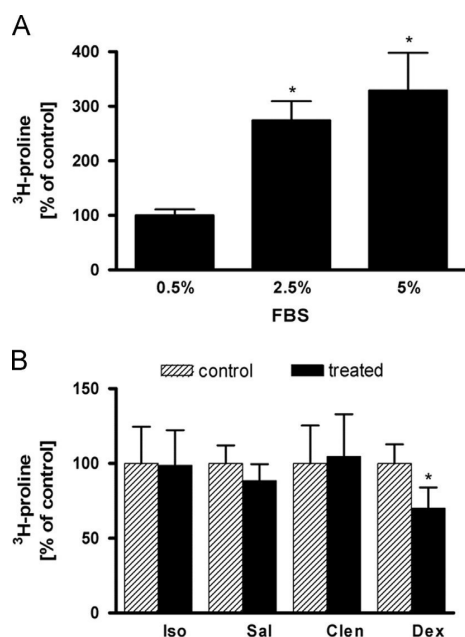


Fig. 5. Effect of serum on collagen production and effect of drugs on serum-induced collagen production in primary equine bronchial fibroblasts. Confluent EBF were cultured in serum-supplemented DMEM (serum concentrations: 0.5%, 2.5% and 5%) ($n=2$) (A) or in DMEM containing 0.5% FBS in the absence (control) or presence of 10 μ M of isoproterenol (Iso), salbutamol (Sal), clenbuterol (Clen) or dexamethasone (Dex) (B) for 24 h ($n=5$). After 6 h pre-incubation, collagen synthesis was assessed by [³H]-proline incorporation assay. Data are presented as mean \pm S.E.M. (* $P < 0.05$).

human bronchial epithelial cells 16HBE14o- (6423 \pm 895 binding sites/cell) (Abraham et al., 2004).

Stimulation (12 h) of these β_2 -adrenoceptors by clenbuterol, salbutamol or isoproterenol resulted clearly in receptor number decrease (cf. Fig. 2). Since glucocorticoids are important drugs in asthma/RAO therapy and their beneficial effect is not limited to counterpart inflammation but is known to modulate receptor expression, the effect of dexamethasone on β_2 -adrenoceptor density and EBF proliferation was investigated in vitro. Dexamethasone was not able to prevent the β -agonist-mediated reduction in β_2 -adrenoceptor density in EBF. This is vice versa to in vivo findings in which glucocorticoids upregulated the receptor number even in the presence of β_2 -agonists or alone (Abraham et al., 2002, 2003b; Brodde et al., 1985), by increasing the de novo synthesis of the receptor. Glucocorticoids increase, for example, the density of β_2 -adrenoceptors and enhance receptor activation by β_2 -agonists (Kalavantavanich and Schramm, 2000), while β_2 -agonists activate the glucocorticoid receptors and their signalling system to enhance the anti-mitogenic efficacy (Eickelberg et al., 1999).

Importantly, we have tested the effect of β_2 -agonists and/or dexamethasone on EBF growth and proliferation. With regard to the influence of β -agonists on EBF proliferation, the β_2 -selective and long-acting agonist (LABA) clenbuterol remarkably decreased concentration-dependently the intracellular DNA content, suggesting reduction in primary equine bronchial fibroblasts proliferation. Also, the short-acting β_2 -selective agonist (SABA) salbutamol, and to a lesser extent the non-selective β -agonist isoproterenol, inhibited bronchial fibroblast proliferation in a concentration-dependent manner, which correlated well with β -agonist-induced receptor decrease (see above). This antiproliferative effect seems to be mediated by stimulation of the β_2 -adrenoceptors, because

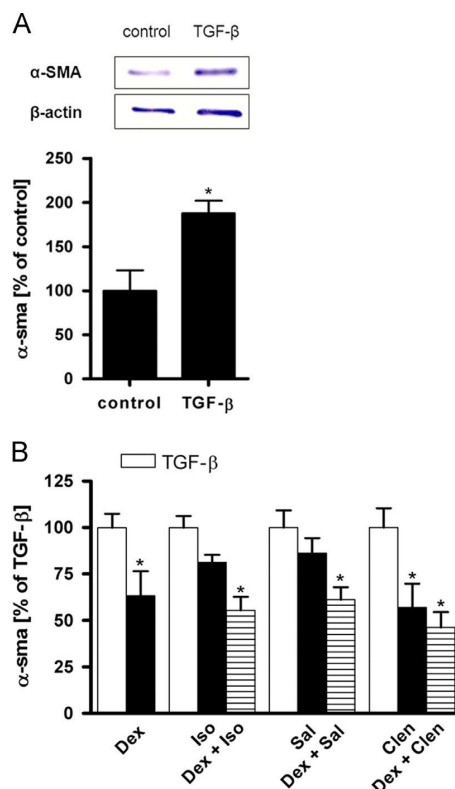


Fig. 6. α -SMA expression in primary equine bronchial fibroblasts. (A) Effect of TGF- β on α -SMA protein expression in EBF, immunoblots (upper) and relative intensity vs. β -actin (middle); (B) effect of 100 μ M isoproterenol (Iso), 10 μ M salbutamol (Sal), 10 μ M clenbuterol (Clen) and/or 100 μ M dexamethasone (Dex) on TGF- β -induced α -SMA expression, relative intensity vs. β -actin. Data are presented as mean \pm S.E. M. of five separate experiments. * $P < 0.05$ compared to control values.

co-stimulation of cells with β_2 -selective (ICI 118.551) and non-selective (propranolol) antagonists abolished the effects of clenbuterol, salbutamol and isoproterenol while the β_1 -selective antagonist CGP 20712A had no effect on cell proliferation, suggesting clearly the anti-mitogenic action of long-term β_2 -adrenoceptor activation and strong evidence for β_2 -subtype involvement, in agreement with data obtained from cultured permanent lung fibroblasts (MRC-5) (Lamyel et al., 2011) and human airway smooth muscle cells (Noveral and Grunstein, 1994). In other studies, however, salbutamol increased instead human bronchial fibroblast proliferation (Pickholtz et al., 2011) or β_2 -agonists did not affect proliferation of bronchial fibroblasts (Descalzi et al., 2008).

A possible explanation for β_2 -adrenoceptor-mediated inhibition of β -agonist-stimulated [³H]-thymidine incorporation, thus, cell proliferation, is presumably the continuous stimulation of the adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cAMP) production in EBF. Even if we did not measure cAMP accumulation in EBF, consistent with our findings, it has been often shown that β -agonists stimulate cAMP formation via activation of the β_2 -adrenoceptors in airway smooth muscle cells (Hall et al., 1992; Noveral and Grunstein, 1994; Tomlinson et al., 1995) and in permanent lung fibroblasts (Busto et al., 2000; Liu et al., 2004) and has been linked to inhibition of cell proliferation. On the contrary, other studies have reported pro-mitogenic action of cAMP elevation (Dumont et al., 1989) in liver cells (Boynton et al., 1981) and dog thyroid cells (Roger et al., 1983). Accordingly, the role of cAMP in regulating cell growth and proliferation seems controversial, perhaps because different cells types have been used in different experimental

conditions. It remains, indeed, to be elucidated whether such a cAMP signalling pathway also affects proliferation and differentiation of primary cultures of bronchial fibroblasts.

Also, we have shown for the first time that dexamethasone affected primary EBF growth in a dose-dependent manner: at concentrations less than 1 μ M dexamethasone moderately enhanced cell proliferation while high concentrations greater than 10 μ M suppressed cell proliferation, suggesting that the drug regulates cell growth in two ways in agreement with previous studies in corneal epithelial cells and dermal fibroblasts (Blumenkranz et al., 1984; Bourcier et al., 2000). Glucocorticoids at high concentrations inhibit cell division (Guerrero and Florini, 1980) and activity of fibroblast growth factors (Sabatini et al., 2003; Shull et al., 1995) or induce cell apoptosis and necrosis (Bourcier et al., 2000; Chen et al., 2006). Our data were also consistent with those from Kraft et al. (2001) and Pickholtz et al. (2011) that dexamethasone at low concentrations stimulated EBF proliferation, implying that dexamethasone has a mitogenic effect at low doses similar to physiological conditions.

With this regard, there are several mechanistic explanations which are speculative and are also an *important limitation of this study*: first, dexamethasone can stimulate G1-S phase cell cycle transition (Fouty et al., 2006); second, dexamethasone exerts cell proliferation through interaction between glucocorticoid receptor and the extracellular-signal regulated kinases (ERK)- and MAP-cascade which activate nuclear transcription factors involved in growth regulation (Jeon et al., 2003), but not examined in our study; and third, autocrine growth factors as well as receptors that promote cell proliferation and differentiation can be induced by dexamethasone in a dose-dependent manner (Dammeier et al., 1998; Warshamana et al., 1998; Ferrandina et al., 1992).

It was also interesting to note that combination of LABA or SABA with low dexamethasone concentration resulted in a significant decrease in cell proliferation (cf. Fig. 3B). This antiproliferative effect of the β_2 -agonists was not as strong as the effect seen when cells were treated with high concentration of dexamethasone (100 μ M) alone or in combination with β_2 -agonists. Nonetheless, this combined drug effects cannot account as synergistic drug effect, since the combination of both drug groups inhibited the EBF proliferation rate as similar as when cells were treated with high concentration dexamethasone alone (cf. Fig. 3C), in disagreement with the data found in human lung fibroblasts (Silvestri et al., 2001; Descalzi et al., 2008) and in airway smooth muscle cells (Roth et al., 2002). But our data support the finding from Todorova et al. (2006) who failed to show a synergistic antiproliferative effect of budesonide and formoterol in combination.

In airway inflammation, deposition of the extracellular matrix is one of the important factors that thicken the airway wall, and this can be influenced by abnormal serum content and growth factors. With this regard, another interesting aspect we assessed was whether exposure of EBF to serum enhances collagen synthesis in primary EBF, and whether this effect can be regulated by LABA/SABA or dexamethasone. Serum (FBS) increased concentration-dependently fibroblast proliferation and collagen synthesis in confluent cultures in agreement with Hetzel et al. (2005). Even if LABA/SABA strongly inhibited EBF proliferation, both drug groups did not surprisingly alter collagen deposition, indicating this effect does not involve β_2 -adrenoceptor stimulation, while other studies (Lamyel et al., 2011; Saltzman et al., 1982) showed rather decreased collagen synthesis by β_2 -agonists in permanent serum-starved lung fibroblasts. On the other hand, the dexamethasone-induced reduction in serum-induced collagen synthesis was in agreement with data found in human bronchial fibroblasts (Jacques et al., 2010).

Finally, further to cell proliferation and collagen synthesis, possible differentiation of fibroblasts into myofibroblasts is another important process in the progression of airway remodelling. TGF- β 1 increased

the expression of α -SMA protein in primary EBF, suggesting transition of fibroblasts into myofibroblasts and the role of TGF- β 1 as the most important pro-fibrotic cytokine in vivo (Howell and McNulty, 2006; Rahimi and Leof, 2007). But TGF- β 1 did not affect the β_2 -adrenoceptor density and affinity in EBF, contrasting the data found by Mak et al. (2000) and Ahmedat et al. (2012). These authors demonstrated TGF- β 1-induced reduction in β_2 -adrenoceptor expression and function in the human tracheal smooth muscle cells and cardiac fibroblasts and permanent pulmonary lung fibroblasts, respectively. The fact that TGF- β 1 did not alter β_2 -adrenoceptors in our cells, β_2 -agonists may act better via these receptors. Accordingly, clenbuterol showed the strongest effect, salbutamol and isoproterenol inhibited EBF transformation to a lesser extent, suggesting enhanced inhibition by long-acting β_2 -agonists via prolonged activation of the β_2 -adrenoceptor and cAMP signalling pathway. Dexamethasone reduced significantly as well the TGF- β 1-induced increase in α -SMA expression. This effect was synergistically enhanced when dexamethasone was added to those tested β -agonists. Concordant with our finding, some studies have shown that the transformation of fibroblasts into myofibroblasts decreases in the human lung when glucocorticoids are combined with β_2 -agonists (Baouz et al., 2005; Kelly et al., 2010; Sabatini et al., 2012), and thus, both drugs limit transformation into myofibroblasts in asthmatic/RAO airways.

5. Conclusion

In summary, we have demonstrated that proliferation of cultured primary equine bronchial fibroblasts that express exclusively β_2 -adrenoceptors is modestly inhibited by dexamethasone but largely by selective β_2 -agonists. Furthermore, LABA was more effective to inhibit transformation of fibroblasts into myofibroblasts and the combination of β_2 -agonists with dexamethasone enhanced this effect. The fact that the pro-proliferative effect of low dose dexamethasone was inhibited by the combination with β_2 -agonists provides potential therapeutic benefit. Accordingly, low dose glucocorticoids minimizes not only the participation of airway fibroblasts in airway remodelling but also airway inflammation with a minimum risk of adverse reactions expected from high glucocorticoid doses. We conclude that early treatments with β_2 -agonists (particularly long acting clenbuterol) and glucocorticoids alone or in combination inhibit triggers of airway remodelling and thus are beneficial in preventing morbidity of asthma and RAO.

Acknowledgements

We thank the abattoirs of Freiberg and Jena for access to fresh bronchial tissue samples. We also thank Ina Hochheim and Martina Wiczorek for excellent technical assistance.

References

- Abraham, G., Brodde, O.E., Ungemach, F.R., 2002. Regulation of equine lymphocyte beta-adrenoceptors under the influence of clenbuterol and dexamethasone. *Equine Vet. J.* 34, 587–593.
- Abraham, G., Kottke, C., Dhein, S., Ungemach, F.R., 2003a. Pharmacological and biochemical characterization of the beta-adrenergic signal transduction pathway in different segments of the respiratory tract. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1067–1081.
- Abraham, G., Schusser, G.F., Ungemach, F.R., 2003b. Dexamethasone-induced increase in lymphocyte beta-adrenergic receptor density and cAMP formation in vivo. *Pharmacology* 67, 1–5.
- Abraham, G., Kneuer, C., Ehrhardt, C., Honscha, W., Ungemach, F.R., 2004. Expression of functional beta2-adrenergic receptors in the lung epithelial cell lines 16HBE14o(-), Calu-3 and A549. *Biochim. Biophys. Acta* 1691, 169–179.
- Abraham, G., Shibeshi, W., Ungemach, F.R., 2011. Identification and characterization of β -adrenergic receptors in isolated primary equine tracheal epithelial cells. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 24, 174–181.

- Ahmedat, A.S., Warnken, M., Juergens, U.R., Paul Pieper, M., Racké, K., 2012. β_2 -adrenoceptors and muscarinic receptors mediate opposing effects on endothelin-1 expression in human lung fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.* 691, 218–224.
- Baouz, S., Giron-Michel, J., Azzarone, B., Giuliani, M., Cagnoni, F., Olsson, S., Testi, R., Gabbiani, G., Canonica, G.W., 2005. Lung myofibroblasts as targets of salmeterol and fluticasone propionate: inhibition of alpha-SMA and NF-kappaB. *Int. Immunol.* 17, 1473–1481.
- Bilski, A.J., Halliday, S.E., Fitzgerald, J.D., Wale, J.L., 1983. The pharmacology of a beta 2-selective adrenoceptor antagonist (ICI 118,551). *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5, 430–437.
- Blumenkranz, M.S., Claffin, A., Hajek, A.S., 1984. Selection of therapeutic agents for intraocular proliferative disease. *Cell culture evaluation. Arch. Ophthalmol.* 102, 598–604.
- Bourcier, T., Forgez, P., Borderie, V., Scheer, S., Rostène, W., Laroche, L., 2000. Regulation of human corneal epithelial cell proliferation and apoptosis by dexamethasone. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 4133–4141.
- Bousquet, J., Jeffery, P.K., Busse, W.W., Johnson, M., Vignola, A.M., 2000. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1720–1745.
- Boynon, A.L., Whitfield, J.F., MacManus, J.P., Armato, U., Tsang, B.K., Jones, A., 1981. Involvement of cAMP and cAMP-dependent protein kinase in the initiation of DNA synthesis by rat liver cells. *Exp. Cell Res.* 135, 199–211.
- Brewster, C.E., Howarth, P.H., Djukanovic, R., Wilson, J., Holgate, S.T., Roche, W.R., 1990. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3, 507–511.
- Brodde, O.E., Brinkmann, M., Schemuth, R., O'Hara, N., Daul, A., 1985. Terbutaline-induced desensitization of human lymphocyte beta2-adrenoceptors. Accelerated restoration of beta-adrenoceptor responsiveness by prednisone and ketotifen. *J. Clin. Invest.* 76, 1096–1101.
- Busto, R., Carrero, I., Zapata, P., Colás, B., Prieto, J.C., 2000. Multiple regulation of adenylyl cyclase activity by G-protein coupled receptors in human foetal lung fibroblasts. *Regul. Pept.* 95, 53–58.
- Cates, C.J., Cates, M.J., 2012. Regular treatment with formoterol for chronic asthma: serious adverse events. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4, CD006923.
- Chen, W.L., Lin, C.T., Yao, C.C., Huang, Y.H., Chou, Y.B., Yin, H.S., Hu, F.R., 2006. In-vitro effects of dexamethasone on cellular proliferation, apoptosis, and Na⁺-K⁺-ATPase activity of bovine corneal endothelial cells. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 14, 215–223.
- Dammeier, J., Beer, H.D., Brauchle, M., Werner, S., 1998. Dexamethasone is a novel potent inducer of connective tissue growth factor expression. Implications for glucocorticoid therapy. *J. Biol. Chem.* 273, 18185–18190.
- Davies, D.E., Wicks, J., Powell, R.M., Puddicombe, S.M., Holgate, S.T., 2003. Airway remodeling in asthma: new insights. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 215–225.
- Descalzi, D., Folli, C., Scordamaglia, F., Riccio, A.M., Gamalero, C., Canonica, G.W., 2007. Importance of fibroblasts-myofibroblasts in asthma-induced airway remodeling. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 1, 237–241.
- Descalzi, D., Folli, C., Nicolini, G., Riccio, A.M., Gamalero, C., Scordamaglia, F., Canonica, G.W., 2008. Anti-proliferative and anti-remodelling effect of beclomethasone dipropionate, formoterol and salbutamol alone or in combination in primary human bronchial fibroblasts. *Allergy* 63, 432–437.
- Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., Gabbiani, G., 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* 122, 103–111.
- Dooley, D.J., Bittiger, H., Reymann, N.C., 1986. CGP 20712A: a useful tool for quantitating beta 1- and beta 2-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 130, 137–139.
- Dumont, J.E., Jauniaux, J.C., Roger, P.P., 1989. The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends Biochem. Sci.* 14, 67–71.
- Eickelberg, O., Roth, M., Lörx, R., Bruce, V., Rüdiger, J., Johnson, M., Block, L.H., 1999. Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by beta2-adrenergic receptor agonists in primary human lung fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 274, 1005–1010.
- Erdinç, M., 2011. Beta-2 agonist discussions in asthma and a review of current data. *Tuber. Toraks* 59, 205–212.
- Evans, R.A., Tian, Y.C., Steadman, R., Phillips, A.O., 2003. TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp. Cell Res.* 282, 90–100.
- Ferrandina, G., Scambia, G., Benedetti Panici, P., Bonanno, G., Vincenzo, R., de Rumi, C., Bussa, S., Genuardi, M., Romano Spica, V., Spica Romano, V., Mancuso, S., 1992. Effects of dexamethasone on the growth and epidermal growth factor receptor expression of the OVCA 433 ovarian cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 83, 183–193.
- Fouty, B., Moss, T., Solodushko, V., Kraft, M., 2006. Dexamethasone can stimulate G1-S phase transition in human airway fibroblasts in asthma. *Eur. Respir. J.* 27, 1160–1167.
- Franke, J., Abs, V., Zizzadoro, C., Abraham, G., 2014. Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. *BMC Vet. Res.* 10, 119.
- Gabbriellini, S., Di Lollo, S., Stanflin, N., Romagnoli, P., 1994. Myofibroblast and elastic and collagen fiber hyperplasia in the bronchial mucosa: a possible basis for the progressive irreversibility of airway obstruction in chronic asthma. *Pathologica* 86, 157–160.
- George, S.J., 2009. Regulation of myofibroblast differentiation by convergence of the Wnt and TGF-beta1/Smad signaling pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 610–611.
- Goulet, S., Bihl, M.P., Gambazzi, F., Tamm, M., Roth, M., 2007. Opposite effect of corticosteroids and long-acting beta(2)-agonists on serum- and TGF-beta(1)-induced extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 210, 167–176.
- Guerriero, V., Florini, J.R., 1980. Dexamethasone effects on myoblast proliferation and differentiation. *Endocrinology* 106, 1198–1202.
- Haag, S., Matthiesen, S., Juergens, U.R., Racké, K., 2008. Muscarinic receptors mediate stimulation of collagen synthesis in human lung fibroblasts. *Eur. Respir. J.* 32, 555–562.
- Hall, I.P., Widdop, S., Townsend, P., Daykin, K., 1992. Control of cyclic AMP levels in primary cultures of human tracheal smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 107, 422–428.
- Halwani, R., Al-Muhsen, S., Al-Jahdali, H., Hamid, Q., 2011. Role of transforming growth factor-beta in airway remodeling in asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 127–133.
- Hetzel, M., Bachem, M., Anders, D., Trischler, G., Faehling, M., 2005. Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Lung* 183, 225–237.
- Honegger, U.E., Disler, B., Wiesmann, U.N., 1986. Chronic exposure of human cells in culture to the tricyclic antidepressant desipramine reduces the number of beta-adrenoceptors. *Biochem. Pharmacol.* 35, 1899–1902.
- Hoshino, M., Nakamura, Y., Sim, J., Shimojo, J., Isogai, S., 1998. Bronchial subepithelial fibrosis and expression of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 783–788.
- Howell, J.E., McNulty, R.J., 2006. TGF-beta: its role in asthma and therapeutic potential. *Curr. Drug Targets* 7, 547–565.
- Jacques, E., Semlali, A., Boulet, L.P., Chakir, J., 2010. AP-1 overexpression impairs corticosteroid inhibition of collagen production by fibroblasts isolated from asthmatic subjects. *Am. J. Physiol.: Lung Cell. Mol. Physiol.* 299, L281–L287.
- Jeon, J.W., Lee, S.J., Kim, J.B., Kang, J.J., Lee, J.H., Seong, G.J., Kim, E.K., 2003. Cellular proliferative effect of dexamethasone in immortalized trabecular meshwork cell (TM5) line. *Yonsei Med. J.* 44, 299–306.
- Kalavantavanich, K., Schramm, C.M., 2000. Dexamethasone potentiates high-affinity beta-agonist binding and g(s)alpha protein expression in airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.: Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, L1101–L1106.
- Kaup, F.J., Drommer, W., Deegen, E., 1990. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). I: alterations of the larger conducting airways. *Equine Vet. J.* 22, 343–348.
- Kelly, M.M., O'Connor, T.M., Leigh, R., Otis, J., Gwozdz, C., Gauvreau, G.M., Gauldie, J., O'Byrne, P.M., 2010. Effects of budesonide and formoterol on allergen-induced airway responses, inflammation, and airway remodeling in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 349–356 (e13).
- Kelsen, S.G., Higgins, N.C., Zhou, S., Mardini, I.A., Benovic, J.L., 1995. Expression and function of the beta-adrenergic receptor coupled-adenylyl cyclase system on human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152, 1774–1783.
- Kraft, M., Lewis, C., Pham, D., Chu, H.W., 2001. IL-4, IL-13, and dexamethasone augment fibroblast proliferation in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107, 602–606.
- Lamyel, F., Warnken-Uhlich, M., Seemann, W.K., Mohr, K., Kostenis, E., Ahmedat, A. S., Smit, M., Gosens, R., Meurs, H., Miller-Larsson, A., Racké, K., 2011. The β_2 -subtype of adrenoceptors mediates inhibition of pro-fibrotic events in human lung fibroblasts. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 384, 133–145.
- Liu, X., Ostrom, R.S., Insel, P.A., 2004. cAMP-elevating agents and adenylyl cyclase overexpression promote an antifibrotic phenotype in pulmonary fibroblasts. *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* 286, C1089–C1099.
- Mak, J.C., Rousell, J., Haddad, E.B., Barnes, P.J., 2000. Transforming growth factor-beta 1 inhibits beta2-adrenoceptor gene transcription. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362, 520–525.
- Matthiesen, S., Bahulayan, A., Kempkens, S., Haag, S., Fuhrmann, M., Stichnote, C., Juergens, U.R., Racké, K., 2006. Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35, 621–627.
- McAnulty, R.J., 2007. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 666–671.
- Noveral, J.P., Grunstein, M.M., 1994. Adrenergic receptor-mediated regulation of cultured rabbit airway smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Physiol.* 267, L291–L299.
- Pickholtz, E., Admon, D., Izhar, U., Berkman, N., Levi-Schaffer, F., 2011. Dexamethasone and salbutamol stimulate human lung fibroblast proliferation. *World Allergy Organ. J.* 4, 249–256.
- Plante, S., Semlali, A., Joubert, P., Bissonnette, E., Laviolette, M., Hamid, Q., Chakir, J., 2006. Mast cells regulate procollagen I (alpha 1) production by bronchial fibroblasts derived from subjects with asthma through IL-4/IL-4 delta 2 ratio. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 1321–1327.
- Rahimi, R.A., Leaf, E.B., 2007. TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J. Cell. Biochem.* 102, 593–608.
- Richter, A., Puddicombe, S.M., Lordan, J.L., Bucchieri, F., Wilson, S.J., Djukanovic, R., Dent, G., Holgate, S.T., Davies, D.E., 2001. The contribution of interleukin (IL)-4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 385–391.
- Roche, W.R., Beasley, R., Williams, J.H., Holgate, S.T., 1989. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1, 520–524.
- Roger, P.P., Servais, P., Dumont, J.E., 1983. Stimulation by thyrotropin and cyclic AMP of the proliferation of quiescent canine thyroid cells cultured in a defined medium containing insulin. *FEBS Lett.* 157, 323–329.
- Roth, M., Johnson, P.R., Rüdiger, J.J., King, G.G., Ge, Q., Burgess, J.K., Anderson, G., Tamm, M., Black, J.L., 2002. Interaction between glucocorticoids and beta2

- agonists on bronchial airway smooth muscle cells through synchronised cellular signalling. *Lancet* 360, 1293–1299.
- Sabatini, F., Silvestri, M., Sale, R., Serpero, L., Giuliani, M., Scarso, L., Favini, P., Rossi, G.A., 2003. Concentration-dependent effects of mometasone furoate and dexamethasone on foetal lung fibroblast functions involved in airway inflammation and remodeling. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 16, 287–297.
- Sabatini, F., Petecchia, L., Usai, C., Silvestri, M., Rossi, G.A., Miller-Larsson, A., Ricciardolo, F.L., 2012. Pharmacological modulation of the bradykinin-induced differentiation of human lung fibroblasts: effects of budesonide and formoterol. *J. Asthma* 49, 1004–1011.
- Saltzman, L.E., Moss, J., Berg, R.A., Hom, B., Crystal, R.G., 1982. Modulation of collagen production by fibroblasts. Effects of chronic exposure to agonists that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. J.* 204, 25–30.
- Shull, S., Meisler, N., Absher, M., Phan, S., Cutroneo, K., 1995. Glucocorticoid-induced down regulation of transforming growth factor-beta 1 in adult rat lung fibroblasts. *Lung* 173, 71–78.
- Silvestri, M., Fregonese, L., Sabatini, F., Dasic, G., Rossi, G.A., 2001. Fluticasone and salmeterol downregulate in vitro, fibroblast proliferation and ICAM-1 or H-CAM expression. *Eur. Respir. J.* 18, 139–145.
- Todorova, L., Gürcan, E., Miller-Larsson, A., Westergren-Thorsson, G., 2006. Lung fibroblast proteoglycan production induced by serum is inhibited by budesonide and formoterol. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 34, 92–100.
- Tomlinson, P.R., Wilson, J.W., Stewart, A.G., 1995. Salbutamol inhibits the proliferation of human airway smooth muscle cells grown in culture: relationship to elevated cAMP levels. *Biochem. Pharmacol.* 49, 1809–1819.
- Ward, C., Walters, H., 2005. Airway wall remodelling: the influence of corticosteroids. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 5, 43–48.
- Warshamana, G.S., Martinez, S., Lasky, J.A., Corti, M., Brody, A.R., 1998. Dexamethasone activates expression of the PDGF-alpha receptor and induces lung fibroblast proliferation. *Am. J. Physiol.* 274, L499–L507.
- Wen, F.Q., Kohyama, T., Sköld, C.M., Zhu, Y.K., Liu, X., Romberger, D.J., Stoner, J., Rennard, S.I., 2003. Glucocorticoids modulate TGF-beta production by human fetal lung fibroblasts. *Inflammation* 27, 9–19.
- Wójcik, K., Koczurkiewicz, P., Michalik, M., Sanak, M., 2012. Transforming growth factor- β_1 -induced expression of connective tissue growth factor is enhanced in bronchial fibroblasts derived from asthmatic patients. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 122, 326–332.
- Zhang, K., Flanders, K.C., Phan, S.H., 1995. Cellular localization of transforming growth factor-beta expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 147, 352–361.
- Zhang, S., Howarth, P.H., Roche, W.R., 1996. Cytokine production by cell cultures from bronchial subepithelial myofibroblasts. *J. Pathol.* 180, 95–101.

5 Diskussion

Fibroblasten regulieren die Extrazellulärmatrixhomöostase und die Wundheilung in der Atemwegswand bei obstruktiven Atemwegserkrankungen. Da die übermäßige Ablagerung von Extrazellulärmatrix (EZM) ein wichtiges Merkmal des Airway-Remodelling bei der RAO des Pferdes darstellt und Fibroblasten eine der Zellpopulationen mit der größten Bedeutung für den strukturellen Umbau der Atemwegswand sind, wird in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von β_2 -Agonisten und Dexamethason auf spezifische Zellfunktionen von equinen Bronchialfibroblasten überprüft. Diese Untersuchungen sollen Aussagen darüber erlauben, inwieweit die klassische pharmakologische Intervention von RAO beim Pferd das Airway-Remodelling beeinflussen kann. Zunächst wird ein Zellkulturmodell mit primären equinen Bronchialfibroblasten (EBF) etabliert und anschließend an diesem die Wirkung von Clenbuterol, Salbutamol, Isoproterenol und Dexamethason auf die Zelldifferenzierung, Matrixsynthese und die Rolle der β -Adrenozeptoren untersucht.

Die wichtigsten Ergebnisse, die in die Publikationen der kumulativen Dissertation eingeflossen sind, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Eine Langzeitkultur und erfolgreiche Zellpassage von equinen Bronchialfibroblasten (EBF) ist nur möglich in Gegenwart von Serum im Kulturmedium.
- 2) Fetales bovines Serum (FBS) unterstützt im Vergleich zu Pferdeserum (HS) besser die Ausbildung der fibroblastischen Zellmorphologie und das Zellwachstum.
- 3) Intakte equine Bronchialfibroblasten exprimieren ausschließlich den β_2 -Subtyp der Adrenozeptoren.
- 4) Clenbuterol hemmt sowohl die Proliferation als auch die Transformation von EBF zu Myofibroblasten stärker als Salbutamol, Isoproterenol und Dexamethason.
- 5) Durch die Kombination von β -Agonisten mit Dexamethason kann eine verstärkte Hemmung der Proliferation und Transformation von EBF festgestellt werden.

5.1 Etablierung optimaler Kulturbedingungen für primäre equine Bronchialfibroblasten

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit werden primäre equine Bronchialfibroblasten (EBF) isoliert, kultiviert und charakterisiert. Anschließend wird der Einfluss verschiedener Kulturmedien auf die Vitalität, Morphologie und Proliferation der Zellen geprüft. Ein Gemisch aus Fibroblasten und Epithelzellen wird zunächst mittels Trypsinverdau von Bronchialmukosa gesunder Schlachtpferde gewonnen. Die Zellen werden im Anschluss an die Isolation in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit dem fetalen bovinen Serum

(FBS) aufgenommen und kultiviert. Bereits nach durchschnittlich 5 Tagen entwickelt sich ein konfluenter Zellrasen aus EBF, während die Epithelzellen in DMEM trotz FBS-Zugabe nicht proliferieren und sich vollständig ablösen. Mit dieser neuen Isolationsmethode können erstmals erfolgreich große Mengen an einheitlich mesenchymalen Zellen aus den Atemwegen von Pferden gewonnen werden.

Um optimale Zellkulturbedingungen zu etablieren, werden zunächst Serumentypen im basalen EBF-Medium (DMEM) getestet. Die Zellkultur erfolgt in unterschiedlichen Kulturbedingungen, nämlich, in serumfreiem oder serumhaltigem basalem Kulturmedium. Als Sera werden fetales bovines Serum (FBS) und Pferdeserum (HS) geprüft. Darüber hinaus wird der Einfluss eines temporären Serumentzuges nach erfolgreicher Zellkultur im serumhaltigen Medium auf die Proliferation der EBF untersucht. Ohne Zugabe von Serum unterstützt das basale Kulturmedium weder die Anhaftung noch die Proliferation der EBF. Der Entzug von Serum bei subkonfluenten EBF-Kulturen führt ebenfalls zu einer Einschränkung der Proliferationsrate und zu einer vermehrten Ablösung der Zellen. Hingegen haften die EBF in serumhaltigem Kulturmedium innerhalb von 12 Stunden an der Wachstumsoberfläche und proliferieren sowohl in FBS als auch in HS. Die fehlende Anhaftung und Proliferation unter serumfreien Bedingungen deuten darauf hin, dass im basalen Kulturmedium Wachstumsfaktoren fehlen, die essentiell für die Kultur und das Wachstum von EBF sind und dass diese Wachstumsfaktoren im Serumzusatz enthalten sein können. Im Gegensatz zu den primären equinen Bronchialfibroblasten können viele permanente Zelllinien ohne Serum unter Erhalt der Proliferation und Differenzierung kultiviert werden (MINOTTI et al. 1998, GOTO et al. 1999, BARNES und SATO 1980). Auch verschiedene primäre Zellen, wie humane mesenchymale Stammzellen und primäre Epithelzellen können über einen langen Zeitraum in serumfreiem Medium kultiviert und passagiert werden (AGATA et al. 2009, CHASE et al. 2010, SHIBESHI et al. 2008, GRUENERT et al. 1995). Hingegen ist es bisher nicht untersucht, ob primäre Atemwegsfibroblasten langfristig ohne Serum in der Kultur wachsen können. Grundsätzlich besteht der Vorteil serumfreier Kulturmedien für Primärzellkulturen in der selektiven Unterstützung des Zellwachstums spezifischer Zelltypen bei gleichzeitiger Wachstumshemmung von kontaminierenden Zellen. Für die serumfreie Langzeitkultivierung primärer EBF ist jedoch eine Optimierung der Kulturbedingung durch Zugabe spezifischer Wachstumsfaktoren in das Kulturmedium notwendig (KUMAR et al. 1991).

In der Regel benötigen viele Zelltypen von Säugetieren Serum für die Anhaftung, das Wachstum und die Zellpassage (HONN et al. 1975). Allerdings können verschiedene Serumkomponenten experimentelle Untersuchungen verfälschen bzw. negativ beeinflussen,

weshalb zahlreiche Studien unter serumfreien Kulturbedingungen durchgeführt werden (HETZEL et al. 2005, CHEN et al. 2012). An permanenten Zelllinien ist die Auswirkung einer solchen vorübergehenden „Hungerphase“ auf verschiedene Zellfunktionen und den Zellzyklus bereits untersucht (GOS et al. 2005). Hingegen fehlen entsprechende Erkenntnisse über primäre Atemwegsfibroblasten. Daher wird der Einfluss eines Serumentzugs nach einer subkonfluenten EBF-Kultivierung untersucht. Dabei wurden die Zellen zuvor in DMEM mit 10%igem FBS kultiviert. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme des [³H]-Thymidin-Einbaus über 24 und 48 Stunden ohne Serum. Dies deutet darauf hin, dass eine Unterbrechung der Proliferation in Folge des Serumentzugs stattfindet. 72 Stunden nach dem Serumentzug ist die Mehrzahl der EBF abgelöst, was auf eine irreversible Schädigung der Zellen mit einem Verlust der Vitalität hinweist, und dass primäre EBF in Kultur nicht in der Lage sind sich an serumfreie Bedingungen anzupassen. In Übereinstimmung mit diesen Daten können ähnliche Effekte auch an kardialen Fibroblasten beobachtet werden (LEICHT et al. 2003) und stärken die Annahme, dass primäre Atemwegsfibroblasten der Pferde ohne Zusatz von Serum oder weitere Wachstumsfaktoren nicht in der Lage sind, zu proliferieren und differenzieren. Daraus kann geschlossen werden, dass Serumzusätze wie FBS und HS bei der Kultivierung von EBF eine Vielzahl an essenziellen Wachstumsfaktoren liefern können, wobei wiederum die unterschiedlichen Seren unterschiedliche Effekte hervorrufen können. Wir können feststellen, dass das FBS und HS die Proliferation, die Morphologie, die Kulturdauer, den Proteingehalt und die Expression von α -SMA in EBF unterschiedlich stark beeinflussen. In Gegenwart von FBS können gleichmäßige, schnell proliferierende EBF und eine markante Ausbildung eines konfluenten Zellrasens mit typischen morphologischen Eigenschaften für Fibroblasten (langgestreckt, spindelförmig) erhalten werden. Im Gegensatz dazu ist die Proliferation der Zellen in Anwesenheit von HS in DMEM langsamer und die Zellen zeigen Anzeichen einer schlechten Differenzierungsrate mit kleinen, polygonalen Zellkolonien sowie dunklen, zytoplasmatischen Granula. Vergleichbare Daten können auch bei anderen Zelltypen, wie bei bovinen Adipozyten und bei ovinen Myoblasten generiert werden (FERNYHOUGH et al. 2008, WU et al. 2012). Hierzu kann gezeigt werden, dass im FBS-haltigen Medium ebenfalls eine hohe Proliferationsrate beobachtet werden kann, während HS eine unvollständige, irreguläre Differenzierung der Zellen induziert, weshalb hier als Standardzusatz zum Kulturmedium FBS verwendet wird. Im Gegensatz dazu können equine Knorpelzellen unter beiden Serumzusätzen proliferieren (AHMED et al. 2007), während die Proliferation muriner neuronaler Zellen durch HS bevorzugt gefördert wird (FEDOROFF und HALL 1979, MOONEN und NELSON 1978). In unserer Untersuchung zeigen die EBF im HS-haltigen Medium allerdings eine signifikante Expression von α -SMA und einen hohen Proteingehalt, der darauf hinweist, dass HS die Transformation der Fibroblasten zu Myofibroblasten

stimuliert. Die hier beobachtete große Menge an EZM-Proteinen, Zytokinen und α -SMA spricht vermutlich für die Bedeutung der im HS vorhandenen Wachstumsfaktoren. Abgesehen von diesen Ergebnissen kann die unter HS unterstützte Bildung von intrazellulären Granula als Anzeichen für eine irreguläre Differenzierung angesehen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Zusatz von FBS im Vergleich zu HS die Proliferation, die Populationsverdopplung, die Passagenzahl der EBF und deren Differenzierung zu Myofibroblasten optimal fördert. Die Notwendigkeit des Serums kann bestätigt werden, denn angewachsene Zellen lösen sich bereits bei vorübergehendem Serumentzug vom Flaschenboden ab und können nicht weiter kultiviert werden. DMEM mit 10% FBS stellt sich deshalb als optimale Kulturbedingung der EBF dar und wird so in weiteren Untersuchungen verwendet.

5.2 Analyse der Effekte von β_2 -Agonisten und Glucocorticoiden auf zelluläre Eigenschaften und β -Adrenozeptoren

5.2.1 β -Adrenozeptorendichte und -subtypverteilung

Radioligandbindungsstudien haben gezeigt, dass β_2 -Adrenozeptoren im equinen Respirationstrakt weit verbreitet sind (Verhältnis von β_2 - zu β_1 -Adrenozeptor-Subtyp: 75:25) (ABRAHAM et al. 2003a). Sie werden in den Atemwegen nicht nur auf glatten Muskelzellen exprimiert, sondern auch auf anderen Zelltypen, wie Epithelzellen, Typ II Alveolarzellen und Mastzellen (siehe Punkt 2.3.3). Die Dichte der β_2 -Adrenozeptoren steigt von der Trachea zum Lungenparenchym an. Beim Pferd wurde die β_2 -Adrenozeptor-Expression bisher nur an Atemwegsepithelzellen und intakten Lymphozyten untersucht, auf denen ausschließlich der β_2 -Adrenozeptor-Subtyp nachgewiesen werden konnte (ABRAHAM et al. 2011, 2001). Über die Expression und Funktion von β -Adrenozeptoren auf equinen Bronchialfibroblasten stehen noch keine Erkenntnisse zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wird erstmalig gezeigt, dass primäre EBF ausschließlich den β_2 -Adrenozeptor-Subtyp exprimieren, da der hochselektive β_2 -Antagonist ICI 118,551 (BILSKI et al. 1983) die Bindung des Radioliganden [125 I]-(-)Iodocyanopindolol (ICYP) an den β -Adrenozeptor mit ca. 10000-fach höherer Affinität als der hochselektive β_1 -Antagonist CGP 20712A (DOOLEY et al. 1986) hemmt. Dieser Befund stimmt mit der Studie von LAMYEL et al. (2011) überein, in der ausschließlich die mRNA für den β_2 -Adrenozeptor-Subtyp in humanen Lungenfibroblasten nachgewiesen werden konnte. Die Dichte der β_2 -Adrenozeptoren auf den equinen Bronchialfibroblasten beträgt 5037 ± 494 Bindungsstellen/Zelle und entspricht der Rezeptordichte, die in humanen primären Atemwegsepithelzellen (KELSEN et al. 1995) und der humanen Bronchialepithelzelllinie 16HBE14o- festgestellt wurde (ABRAHAM et al. 2004). Allerdings

gibt es keine Vergleichsdaten bezüglich der β -Adrenozeptordichte der adulten primären oder permanenten Atemwegsfibroblasten. Lediglich in fetalen pulmonalen Fibroblasten konnte eine β -Adrenozeptordichte von > 5000 Bindungsstellen/Zelle festgestellt werden (HONEGGER et al. 1986), die jedoch mit der B_{\max} der EBF übereinstimmt.

Da β_2 -Agonisten als Mittel der ersten Wahl zur Behandlung von obstruktiven Atemwegserkrankungen verwendet werden und deren Wirkung über β_2 -Adrenozeptoren vermittelt wird, ist es notwendig, zu prüfen, inwieweit der hier zum ersten Mal in EBF nachgewiesene β_2 -Adrenozeptor durch eine Reihe von β -Agonisten sowie Glucocorticoiden moduliert werden kann. Bereits 12 Stunden nach der Behandlung der EBF mit den β_2 -selektiven Agonisten Clenbuterol und Salbutamol sowie dem nicht-selektiven β -Agonist Isoproterenol ist die Anzahl der β_2 -Adrenozeptoren signifikant reduziert, ohne dass sich die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor verändert. Dies deutet darauf hin, dass unabhängig von der Rezeptorselektivität β -Agonisten die Dichte des Rezeptors vermindern, und somit eine Rezeptor-Down-Regulation bewirken. Im Einklang mit den Daten der vorliegenden Arbeit konnte in humanen Lungenfibroblasten eine Abnahme der Transkriptionsrate der β_2 -Adrenozeptor-mRNA durch langzeitige Behandlung mit langwirksamen β_2 -selektiven Agonisten (Formoterol, Olodaterol) beobachtet werden (KÄMPFER et al. 2014).

Es ist bekannt, dass Glucocorticoide die Expression und die Anzahl der β_2 -Adrenozeptoren erhöhen (BARNES 2002, BLACK et al. 2009) und diese Art der Wirkung auch therapeutisch ausgenutzt wird. In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob Dexamethason den β_2 -Adrenozeptor der EBF beeinflussen kann. In dem getesteten Konzentrationsbereich beeinflusst Dexamethason die Anzahl der β_2 -Adrenozeptoren in EBF nicht. Auch die β -Agonist-vermittelte Abnahme der Rezeptorenzahl kann durch Dexamethason nicht aufgehoben werden. In In-vivo-Studien ist allerdings gezeigt worden, dass Glucocorticoide die Anzahl und die Funktion der β_2 -Adrenozeptoren z. B. in Lymphozyten erhöhen können sowie die β_2 -Agonist-vermittelte Downregulation verhindern (ABRAHAM et al. 2002, 2003b, BRODDE et al. 1985). Glucocorticoide sollen die de-novo-Synthese des Rezeptors bewirken. Die Glucocorticoid-vermittelte Expressionssteigerung des β_2 -Adrenozeptors erhöht darüber hinaus die Ansprechbarkeit des Rezeptors für β_2 -Agonisten (KALAVANTAVANICH und SCHRAMM 2000), während umgekehrt die β_2 -Agonisten den Glucocorticoidrezeptor aktivieren und somit die antiproliferative Wirkung der Glucocorticoide steigern können (EICKELBERG et al. 1999).

5.2.2 Pharmakologische Beeinflussung der Proliferation und Differenzierung der equinen Bronchialfibroblasten

Ein weiterer wichtiger Schwerpunkt unserer Untersuchung ist es, zu prüfen, inwieweit β_2 -Agonisten und/oder Dexamethason die Proliferationsrate und das Wachstum der EBF beeinflussen können. Unter den getesteten β_2 -Agonisten kann der lang-wirksame Agonist Clenbuterol den intrazellulären Einbau von Thymidin konzentrationsabhängig viel stärker verhindern als der kurzzeit-wirksame β_2 -Agonist Salbutamol gefolgt von dem nicht selektiven β -Agonisten Isoproterenol. Dies deutet darauf hin, dass die Proliferation von EBF durch β -Agonisten mit unterschiedlichen Potenzen gehemmt wird, nämlich: Clenbuterol > Salbutamol > Isoproterenol, und dies korreliert – wie oben beschrieben – mit der unterschiedlichen β -Agonist-vermittelten Abnahme der β_2 -Adrenozeptoren in EBF. Diese antiproliferative Wirkung der β -Agonisten scheint β_2 -Adrenozeptor vermittelt zu sein. Denn, eine Co-Stimulation der EBF mit dem β_2 -Antagonisten ICI 118,551 und mit dem nicht-selektiven β -Antagonisten Propranolol hemmt die antiproliferativen Wirkungen von Clenbuterol, Salbutamol und Isoproterenol, im Gegensatz zu dem β_1 -Antagonisten CGP 20712A (LAMYEL et al. 2011, NOVERAL und GRUNSTEIN 1994). Allerdings wird der Einfluss von β -Agonisten auf das Wachstum von Atemwegsfibroblasten kontrovers diskutiert. In Untersuchungen von PICKHOLTZ et al. (2011) steigert Salbutamol die Proliferation, während weitere β_2 -Agonisten in der Studie von DESCALZI et al. (2008) keinen Einfluss auf die Proliferation der Fibroblasten aufweisen. Verschiedene Studien deuten als Mechanismus der Proliferationshemmung auf eine Beteiligung der β -Agonist-induzierten kontinuierlichen Bildung von cAMP beispielsweise in glatten Muskelzellen und humanen Atemwegsfibroblasten hin (HALL et al. 1992, NOVERAL und GRUNSTEIN 1994, TOMLINSON et al. 1995, BUSTO et al. 2000, LIU et al. 2004). Allerdings gibt es auch Studien, die zeigen, dass der cAMP-Anstieg in anderen Zelltypen wie in Hepatozyten und caninen Thyreozyten die Proliferation fördern kann (DUMONT et al. 1989, BOYNTON et al. 1981, ROGER et al. 1983). Weitere Studien sollen zeigen, ob der cAMP-Signalweg bei der Regulation der Proliferation und Differenzierung der EBF und somit bei dem Airway-Remodelling eine Rolle spielen kann.

Des Weiteren kann in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass Dexamethason konzentrationsabhängig das Wachstum und die Proliferation primärer EBF beeinflusst. Aber dies erfolgt interessanterweise in zwei Phasen: In einer Konzentration unter 1 μ M fördert Dexamethason die Proliferation der Zellen, während hohe Konzentrationen über 10 μ M die Proliferation hemmen, in Übereinstimmung mit den Daten des Dexamethasoneffektes in humanen Kornealepithelzellen und dermalen Fibroblasten

(BOURCIER et al. 2000, BLUMENKRANZ et al. 1984). In hohen Konzentrationen können Glucocorticoide die Zellteilung (GUERRIERO und FLORINI 1980) und die Aktivität von Fibroblasten-Wachstumsfaktoren hemmen (SABATINI et al. 2003, SHULL et al. 1995) oder Apoptose bzw. Nekrose induzieren (BOURCIER et al. 2000, CHEN et al. 2006). Unser Befund stimmt mit den Daten von KRAFT et al. (2001) und PICKHOLTZ et al. (2011), in denen ebenfalls eine Stimulation der Proliferation von Fibroblasten der Atemwege in niedrigen Dexamethasonkonzentrationen beschrieben ist, überein, was auf Effekte von Dexamethason im Bereich der physiologischen Konzentrationen hindeutet. Obwohl der Wirkmechanismus niedriger Glucocorticoidkonzentrationen noch nicht aufgeklärt ist, haben Untersuchungen an humanen Atemwegsfibroblasten ergeben, dass Dexamethason vermutlich die G1-S-Phase im Zellzyklus stimulieren kann (FOUTY et al. 2006). Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass der Glucocorticoidrezeptor sowohl die Extrazellulär signalregulierte Proteinkinasen (ERK)- als auch die Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)-Kaskade, die nukleäre Transkriptionsfaktoren aktivieren und somit das Zellwachstum regulieren können, aktivieren kann (JEON et al. 2003). Niedrige Dexamethasonkonzentrationen können aber auch die Synthese von autokrin proliferationssteigernden Zytokinen und die Expression von Rezeptoren, die die Zellproliferation fördern, induzieren (DAMMEIER et al. 1998, WARSHAMANA et al. 1998, FERRANDINA et al. 1992). Diese Mechanismen sind jedoch spekulativ und sollen als Limitation unserer Untersuchung angesehen werden, jedoch sollen noch weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, um diese aufzuklären.

Es ist darüber hinaus sehr interessant zu beobachten, dass die Kombination von Clenbuterol oder Salbutamol mit Dexamethason in geringer Konzentration eine signifikante Abnahme der EBF-Proliferation bewirkt. Die Behandlung von EBF mit Clenbuterol, Salbutamol oder Isoproterenol und einer hohen Dexamethasonkonzentration verstärkt zusätzlich die β -Agonist-vermittelte Proliferationshemmung. Allerdings handelt es sich hierbei nicht um einen synergistischen Effekt, da die Kombination beider Wirkstoffklassen die EBF-Proliferation genauso stark hemmt, wie die Behandlung mit Dexamethason allein in hoher Konzentration. Die Daten der vorliegenden Arbeit stimmen mit Untersuchungen von TODOROVA et al. (2006) überein, in denen die Kombination von Budesonid und Formoterol ebenfalls keinen synergistischen antiproliferativen Effekt auf humane Lungenfibroblasten zeigen. Allerdings können SILVESTRI et al. (2001) und DESCALZI et al. (2008) nachweisen, dass Beclometason bzw. Fluticason und Salmeterol synergistisch die Proliferation menschlicher Lungenfibroblasten hemmen können.

Bei entzündlichen Atemwegserkrankungen ist die Ablagerung von EZM-Proteinen ein wichtiger Faktor, der bei der Verdickung der Atemwegswand entscheidend ist und welcher möglicherweise durch unterschiedliche Zusammensetzung des Serums und der Wachstumsfaktoren im Gewebe beeinflusst werden kann (SETLAKWE et al. 2014). In diesem Zusammenhang ist es wichtig, zu untersuchen, ob die Exposition der Zellen zum Serum die Kollagensynthese in primären EBF erhöht und ob diese durch β_2 -Agonisten oder Dexamethason reguliert werden kann. In konfluenten EBF erhöht das FBS konzentrationsabhängig die Zellproliferation und die Kollagensynthese in Übereinstimmung mit Daten von HETZEL et al. (2005). Obwohl Clenbuterol und Salbutamol die Proliferation von EBF stark hemmen, ist überraschenderweise die Kollagenablagerung durch diese Wirkstoffgruppen nicht verändert. Dies deutet darauf hin, dass der zuletzt genannte Effekt nicht über den β_2 -Adrenozeptor vermittelt wird. Wiederum zeigen andere Studien, dass β_2 -Agonisten in Abwesenheit von Serum die Kollagensynthese in Lungenfibroblasten hemmen können (LAMYEL et al. 2011, SALTZMAN et al. 1982). Andererseits ist die Dexamethason-vermittelte Hemmung der Serum-induzierten Kollagensynthese in EBF im Einklang mit den Daten aus humanen Bronchialfibroblasten (SABATINI et al. 2012).

Neben der Proliferation und Kollagensynthese ist die Transformation der EBF zu Myofibroblasten ein wichtiger Prozess im Airway-Remodelling. In der vorliegenden Arbeit induziert TGF- β innerhalb von 24 Stunden die Expression von α -SMA in EBF, was auf eine Transformation zu Myofibroblasten hinweist. Darüber hinaus bestätigt dieses Ergebnis die zentrale Bedeutung von TGF- β als wichtiges pro-fibrotisches Zytokin im equinen Respirationstrakt. Wie unter Punkt 2.2 beschrieben stellt TGF- β auch in den Atemwegen von Menschen den potentesten transformationsfördernden Faktor dar (HOWELL und MCANULTY 2006, RAHIMI und LEOF 2007).

Clenbuterol hemmt signifikant die Transformation von EBF zu Myofibroblasten. Im Vergleich dazu zeigen Salbutamol und Isoproterenol eine schwächere Wirkung. Vermutlich führt das langwirksame Clenbuterol zu einer anhaltenden Aktivierung des β_2 -Adrenozeptors sowie des cAMP-Signalweges und hat deshalb eine stärkere Wirkung als die kurzwirksamen β -Agonisten. Dexamethason reduziert wie in humanen Atemwegsfibroblasten signifikant die Transformation von EBF zu Myofibroblasten (SABATINI et al. 2012). Die transformationshemmende Wirkung wird synergistisch verstärkt, wenn Dexamethason mit β_2 -Agonisten kombiniert wird. Verschiedene Studien stimmen mit den vorliegenden Ergebnissen überein und zeigen, dass die Transformation zu Myofibroblasten in der humanen Lunge unterdrückt werden kann, wenn Glucocorticoide mit β_2 -Agonisten kombiniert werden (BAOUZ et al. 2005, KELLY et al. 2010, SABATINI et al. 2012). Daher könnte die

therapeutische Anwendung von β_2 -Agonisten und Glucocorticoiden die Myofibroblastentransformation auch in den Atemwegen von an RAO-erkrankten Pferden hemmen. Jedoch sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Untersuchungen an Lungenfibroblasten und glatten Atemwegsmuskelzellen des Menschen haben gezeigt, dass TGF- β auch die Expression des β_2 -Adrenozeptors hemmen und dadurch die rezeptorvermittelte Wirkung der β_2 -Agonisten einschränken kann (MAK et al. 2000, AHMEDAT et al. 2012). In EBF reduziert TGF- β jedoch weder die β_2 -Adrenozeptordichte noch die Affinität vom Rezeptor zum Liganden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine uneingeschränkte Wirkung der β_2 -Agonisten trotz hoher TGF- β -Konzentrationen möglich ist.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit belegen die Bedeutung eines In-vitro-Zellmodells und dass die Morphologie und Eigenschaften der primären EBF durch unterschiedliche therapeutisch eingesetzte Arzneimittel moduliert werden können. Eine wichtige Erkenntnis dieser Studie ist, dass Clenbuterol und Glucocorticoide bei der RAO-Therapie neben der bronchodilatatorischen und entzündungshemmenden Wirkung auch das Airway-Remodelling vermindern können. Außerdem scheint die Kombination von β_2 -Agonisten und Glucocorticoiden einen zusätzlichen therapeutischen Nutzen zu besitzen. So können bereits niedrige Glucocorticoiddosen bei simultaner Behandlung mit Clenbuterol nicht nur die Entzündung, sondern auch die Proliferation der EBF und deren Transformation zu Myofibroblasten hemmen. Dadurch kann das Risiko systemischer Nebenwirkungen reduziert werden, die bei hohen Glucocorticoiddosen auftreten können. Allerdings sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um die klinische Relevanz der vorliegenden Ergebnisse zu überprüfen.

Derzeit gibt es kein geeignetes Fibroblasten-Zellkulturmodell aus den Atemwegen von Pferden, das genutzt werden kann, um Mechanismen der RAO sowie Arzneimittelwirkungen in vitro zu untersuchen. Daher dient das in der vorliegenden Arbeit erstmalig etablierte und charakterisierte EBF-Modell der Erforschung von Signalwegen und neuen Arzneimitteltargets im Zusammenhang mit der Pathogenese der RAO insbesondere dem Atemwegs-Remodelling. Auf der Grundlage der vorliegenden Untersuchung und Ergebnisse sollen zelluläre Interaktionen, z. B. EBF mit bronchialen Epithelzellen oder mit Entzündungszellen, sowie die Regulation der Zellproliferation und Matrixbildungen, die bei Atemwegs-Remodelling der RAO eine Rolle spielen können, erforscht werden. Der Einfluss der autonomen Rezeptoren (Muskarin- und Adrenerge Rezeptoren), die als pharmakologische Targets in den Atemwegen dienen, auf solche Interaktionen, sollen im

Rahmen der Pathogenese der RAO untersucht werden. Einige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Schädigung der Atemwegsschleimhaut zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, wie Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1), Endothelin-1 (ET-1), FGF und TGF- β aus Epithelzellen, Fibroblasten und Entzündungszellen führen kann (HOLGATE et al. 2004, DOHERTY und BROIDE 2007). In-vitro-Untersuchungen an humanen Atemwegsfibroblasten deuten auf einen profibrotischen und proliferationsfördernden Effekt dieser Entzündungsmediatoren hin und zeigen, dass Fibroblasten unter dem Einfluss solcher Signalmoleküle selbst entzündungsfördernde Zytokine wie IL-6, IL-8, IL-13, GM-CSF und TGF- β freisetzen können (ALKHOURI et al. 2014). Allerdings ist die Wirkung von Entzündungsmediatoren auf das Airway-Remodelling in den equinen Atemwegen bisher nicht untersucht. In weiterführenden Untersuchungen am etablierten EBF-Kulturmodell kann daher die Synthese und Freisetzung von Entzündungsmediatoren in EBF untersucht, sowie die Wirkung verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren auf die Proliferation, die Kollagensynthese und die Transformation von EBF zu Myofibroblasten geprüft werden.

6 Zusammenfassung

Jana Elisabeth Franke

In-vitro-Untersuchungen zu antifibrotischen Wirkungen von β -Adrenozeptoragonisten und Glucocorticoiden in primären equinen Bronchialfibroblasten

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

Eingereicht im Mai 2015

47 S., 2 Publikationen, 1 Abb., 1 Tabelle, Lit. 144, Schlüsselwörter: Primäre Bronchialfibroblasten, Zellkultur, Serumtypen, Proliferation, Differenzierung, β_2 -Agonisten

Einleitung: Die Pathogenese chronisch entzündlicher Atemwegserkrankungen ist mit zunehmender Schädigung und fibrotischen Umbauvorgängen und daraus resultierenden Einschränkungen physiologischer Funktionen verbunden. Bei der Recurrent Airway Obstruction (RAO) des Pferdes sind solche strukturellen Veränderungen häufig assoziiert mit Verdickung der Atemwegswand, subepithelialer Fibrose und Obstruktion der Atemwege. Bei RAO besteht die Standardtherapie darin, die Bronchokonstriktion mit β_2 -Agonisten und die Entzündung mit Glucocorticoiden aufzuhalten. In den letzten Jahrzehnten konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht alle Patienten mit der empfohlenen Therapie ausreichend behandelt werden können und neue Ansatzpunkte der Therapie gefunden werden müssen. Daher konzentrieren sich neuere Forschungsarbeiten auf strukturelle Alterationen in den Atemwegen, das sogenannte Airway-Remodelling. **Zielsetzung:** In der vorliegenden Arbeit sollen zunächst primäre equine Bronchialfibroblasten (EBF) isoliert, charakterisiert und kultiviert werden. Im nächsten Schritt sollen in diesen Zellen die β_2 -Rezeptorexpression und -eigenschaften charakterisiert werden. Anschließend soll die Eignung dieser Zellen als Zellmodell zur Untersuchung der zellulären Proliferation und Transformation sowie der Regulation der de-novo-Synthese von extrazellulärer Matrix und deren Beeinflussung durch β_2 -Agonisten und Glucocorticoide allein oder in Kombination sowie TGF- β überprüft werden. **Material und Methoden:** Mittels enzymatischer Verdauung mit 0,25 % Trypsin werden die EBF aus den Bronchien von 10 gesunden Schlachtpferden isoliert und in DMEM kultiviert. Diese Zellen werden morphologisch, immunzytochemisch und funktionell in deren Eigenschaften in An- oder Abwesenheit von fetalem bovinem Serum (FBS) oder Pferdeserum (HS) charakterisiert. Die Dichte und Subtypverteilung von β -Adrenozeptoren wird mittels Radioligandbindungsstudien mit [125 I]-(-)-Iodocyanopindolol in Gegenwart von

Rezeptorsubtyp-selektiven β -Antagonisten (β_2 : ICI 118,551 und β_1 : CGP 20712A) in EBF untersucht. Der Einfluss von β_2 -Agonisten auf die Proliferation und Differenzierung der EBF sowie die Kollagensynthese wird mittels [3 H]-Thymidineinbauassay, Bestimmung von Gesamtprotein und α -Smooth Muscle Aktin (α -SMA) mit Lowrymethode und Western Blot-Analyse bzw. [3 H]-Prolininkorporationsassay ermittelt. Die statistische Signifikanz wird über einen t-Test für verbundene Stichproben oder eine One-Way-ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's Test ermittelt und das Signifikanzniveau wird $P \leq 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse: EBF können im DMEM-Medium nur in Gegenwart von Serum langfristig wachsen und kultiviert werden. In serum-freiem Medium und unter vorübergehendem Serumentzug können EBF nicht anhaften bzw. lösen sie sich ab. Die Effekte von FBS und HS auf EBF sind allerdings unterschiedlich. FBS fördert die Zellproliferation- und -verdopplungsrate sowie die Zellpassage bis zur Passage 20 signifikant besser als HS (max. 9 Passagen). Unter FBS entwickeln EBF eine für Fibroblasten charakteristische spindelförmige Morphologie aber eine schwache α -SMA-Expression, während unter HS die Zellen eine atypische, polygonale Morphologie zeigen, jedoch mit signifikant hohem α -SMA und Proteingehalt. Radioligandenbindungsstudien zeigen, dass EBF lediglich den β_2 -Adrenozeptorsubtyp mit einer maximalen Rezeptorendichte (B_{max}) von 5037 ± 494 Bindungsstellen/Zelle exprimieren. Die Behandlung der EBF mit β -Agonisten (Clenbuterol, Salbutamol, Isoproterenol) führt konzentrationsabhängig zur Abnahme dieser Anzahl der Rezeptoren mit unterschiedlicher Wirkungsstärke (Clenbuterol > Salbutamol > Isoproterenol), wobei Dexamethason diese nicht verändert. Diese Agonisten sowie auch Dexamethason hemmen die Proliferation der EBF, und dies kann in Gegenwart von ICI 118,551 aber nicht von CGP 20712A gehemmt werden, was auf den Einfluss des β_2 -Adrenozeptors hinweist. β_2 -Agonisten und Dexamethason gemeinsam resultieren in einer verstärkten Hemmung der EBF-Proliferation. Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1)-stimuliert die Transformation von EBF zu Myofibroblasten mit einer erhöhten Expression von α -SMA in EBF, welches eher durch Dexamethason als durch Clenbuterol gehemmt wird. Die Kollagensynthese wird nur durch Dexamethason signifikant gehemmt.

Schlussfolgerung: Das erstmalig etablierte EBF-Kulturmodell dient der Erforschung von Signalwegen und neuen Arzneimitteltargets im Zusammenhang mit der Pathogenese der equinen RAO insbesondere dem Atemwegs-Remodelling. So kann gezeigt werden, dass die Verwendung von β_2 -Agonisten allein oder in Kombination mit Glucocorticoiden eine Hemmung der Proliferation und Transformation von EBF in vitro bewirkt. Dies deutet auf einen zusätzlichen therapeutischen Nutzen von Clenbuterol und Glucocorticoiden hin und impliziert die Notwendigkeit eines frühzeitigen Einsatzes dieser Pharmaka bei der RAO des Pferdes.

7 Summary

Jana Elisabeth Franke

In-vitro analysis of the antifibrotic effects of β -adrenoceptor agonists and glucocorticoids in primary equine bronchial fibroblasts

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

Submitted in May 2015

47 pp., 2 publications, 1 fig., 1 table, ref. 144

Keywords: Primary bronchial fibroblasts, Cell Culture, Serum types, Proliferation, Differentiation, β_2 -agonists

Introduction: Pathogenesis of chronic inflammatory airway diseases includes deterioration and fibrotic remodelling of the airway wall. In equine Recurrent Airway Obstruction (RAO) such airway remodelling is accompanied by airway wall thickening, subepithelial fibrosis and narrowing of airway caliber explained by remarkable fibroblast proliferation and differentiation as well as subepithelial extracellular matrix deposition. Pharmacological treatment of RAO includes bronchodilation by β_2 -agonists and inhibition of airway inflammation by glucocorticoids. But airway remodelling provides further potential pharmacological targets.

Aim: In the present study a cell culture model of primary equine bronchial fibroblasts (EBF) should be established. β -adrenoceptors are characterized in EBF and effects of long-acting (clenbuterol) and short-acting (salbutamol, isoproterenol) β -agonists and dexamethasone on EBF proliferation, differentiation and collagen synthesis in these cells are investigated.

Material and methods: Primary EBF are isolated by trypsin digestion of bronchial tissues from healthy slaughter horses and cultured in the presence or absence of fetal bovine serum (FBS) or horse serum (HS). Cell morphology and properties are determined by light microscopy and immunocytostaining. The β -adrenoceptor density and affinity are assessed by radioligand binding assay using [125 I]-(-)-iodocyanopindolol. Cell proliferation and collagen synthesis are evaluated by [3 H]-thymidine and [3 H]-proline incorporation assay, respectively. Total protein is measured using the Lowry method and α -smooth muscle actin (α -SMA) by western blot analysis. Statistical significance of differences is evaluated by unpaired two-tailed student's t-test or One-Way ANOVA followed by Dunnet's post-hoc test. Values with $P < 0.05$ are considered significant.

Results: EBF cultured in serum-free basal media and those serum deprived are not able to proliferate and even exhibit detachment. Large variations are found in the ability of FBS and HS to support growth and differentiation of EBF in monolayer culture. Indications of growth-promoting actions, increasing passage number as well as maintaining fibroblast morphology are found rather in FBS than in HS. EBF cultured in HS need longer time for doubling and confluence. The protein content is higher in EBF cultured in HS containing medium than FBS and α -SMA seems to be less expressed in EBF cultured in FBS containing medium than in HS, suggesting FBS containing medium ideally suits for further long-term culture of EBF in pharmacological studies. EBF exclusively express the β_2 -adrenoceptor subtype with a maximal β -adrenoceptor density (B_{max}) of 5037 ± 494 binding sites/cell. B_{max} is decreased when cells are treated with β -agonists, but is not affected by dexamethasone. β_2 -agonists concentration-dependently inhibit EBF proliferation with rank order of potency clenbuterol > salbutamol >> isoproterenol, which is inhibited by ICI 118.551 (β_2 -selective antagonist) but not by CGP 20712A (β_1 -selective antagonist). β_2 -Agonists and dexamethasone inhibit EBF proliferation. Combination of β_2 -agonists with dexamethasone enhances inhibition of EBF-proliferation. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) increases transformation of fibroblasts into myofibroblasts which is inhibited by clenbuterol and dexamethasone alone while the effect due to drug combination is more pronounced. Collagen synthesis in EBF is rather inhibited by dexamethasone than by β -agonists.

Conclusion: EBF cultured in 10% FBS represent a good model allowing analysis of signaling pathways of airway remodelling in equine RAO and studying new drug targets for RAO therapy. β_2 -Agonists and glucocorticoids alone or in combination inhibit proliferation and transformation of EBF in vitro, thus, providing potential therapeutic benefit of these drug classes to counteract airway remodelling and morbidity of airway diseases and implicating early pharmacological intervention during RAO in horses.

8 Literaturverzeichnis

Abraham G, Brodde OE, Ungemach FR. Regulation of equine lymphocyte beta-adrenoceptors under the influence of clenbuterol and dexamethasone. *Equine Vet J.* 2002;34(6):587–93.

Abraham G, Brodde OE, Ungemach FR. Identification and characterisation of beta-adrenoceptors on intact equine peripheral blood lymphocytes with the radioligand (-)-[125I]-iodocyanopindolol. *Equine Vet J.* 2001;33(5):487–93.

Abraham G, Kneuer C, Ehrhardt C, Honscha W, Ungemach FR. Expression of functional beta2-adrenergic receptors in the lung epithelial cell lines 16HBE14o(-), Calu-3 and A549. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1691(2-3):169–79.

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.* 2003a;66(6):1067–81.

Abraham G, Schusser GF, Ungemach FR. Dexamethasone-induced increase in lymphocyte beta-adrenergic receptor density and cAMP formation in vivo. *Pharmacology.* 2003b;67(1):1–5.

Abraham G, Shibeshi W, Ungemach FR. Identification and characterization of β -adrenergic receptors in isolated primary equine tracheal epithelial cells. *Pulm Pharmacol Ther.* 2011;24(1):174–81.

Agata H, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S, Yamazaki M et al. Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;382(2):353–8.

Ahmedat AS, Warnken M, Juergens UR, Paul Pieper M, Racké K. β_2 -adrenoceptors and muscarinic receptors mediate opposing effects on endothelin-1 expression in human lung fibroblasts. *Eur J Pharmacol.* 2012;691(1-3):218–24.

Ahmed YA, Tatarczuch L, Pagel CN, Davies HM, Mirams M, Mackie EJ. Hypertrophy and physiological death of equine chondrocytes in vitro. *Equine Vet J.* 2007;39(6):546–52.

Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Nomenclature supplement. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(Supplement 1).

Alkhoury H, Poppinga WJ, Tania NP, Ammit A, Schuliga M. Regulation of pulmonary inflammation by mesenchymal cells. *Pulm Pharmacol Ther.* 2014;29(2):156–65.

Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q. Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(3):451–62.

Bai TR, Knight DA. Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. *Clin Sci.* 2005;108(6):463–77.

Baouz S, Giron-Michel J, Azzarone B, Giuliani M, Cagnoni F, Olsson S et al. Lung myofibroblasts as targets of salmeterol and fluticasone propionate: inhibition of alpha-SMA and NF-kappaB. *Int Immunol.* 2005;17(11):1473–81.

Barnes D, Sato G. Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell.* 1980; 22(3):649–55.

Barnes PJ. Beta-adrenergic receptors and their regulation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152(3):838–60.

Barnes PJ. Scientific rationale for inhaled combination therapy with long-acting beta2-agonists and corticosteroids. *Eur Respir J.* 2002;19(1):182–91.

Barnes PJ, Pedersen S, Busse WW. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(3 Pt 2):S1-53.

Benayoun L, Druilhe A, Dombret M, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(10):1360–8.

Bilski AJ, Halliday SE, Fitzgerald JD, Wale JL. The pharmacology of a beta 2-selective adrenoceptor antagonist (ICI 118,551). *J Cardiovasc Pharmacol.* 1983;5(3):430–7.

Black JL, Oliver BGG, Roth M. Molecular mechanisms of combination therapy with inhaled corticosteroids and long-acting beta-agonists. *Chest.* 2009;136(4):1095–100.

Blumenkranz MS, Claflin A, Hajek AS. Selection of therapeutic agents for intraocular proliferative disease. Cell culture evaluation. *Arch Ophthalmol.* 1984;102(4):598–604.

Bosmann M, Grailer JJ, Zhu K, Matthay MA, Sarma JV, Zetoune FS et al. Anti-inflammatory effects of β 2 adrenergic receptor agonists in experimental acute lung injury. *FASEB J*. 2012;26(5):2137–44.

Bourcier T, Forgez P, Borderie V, Scheer S, Rostène W, Laroche L. Regulation of human corneal epithelial cell proliferation and apoptosis by dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(13):4133–41.

Boynton AL, Whitfield JF, MacManus JP, Armato U, Tsang BK, Jones A. Involvement of cAMP and cAMP-dependent protein kinase in the initiation of DNA synthesis by rat liver cells. *Exp Cell Res*. 1981;135(1):199–211.

Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990;3(5):507–11.

Brodde OE, Brinkmann M, Schemuth R, O'Hara N, Daul A. Terbutaline-induced desensitization of human lymphocyte beta 2-adrenoceptors. Accelerated restoration of beta-adrenoceptor responsiveness by prednisone and ketotifen. *J Clin Invest*. 1985;76(3):1096–101.

Brown LA, Longmore WJ. Adrenergic and cholinergic regulation of lung surfactant secretion in the isolated perfused rat lung and in the alveolar type II cell in culture. *J Biol Chem*. 1981;256(1):66–72.

Busto R, Carrero I, Zapata P, Colás B, Prieto JC. Multiple regulation of adenylyl cyclase activity by G-protein coupled receptors in human foetal lung fibroblasts. *Regul Pept*. 2000;95(1-3):53–8.

Butchers PR, Vardey CJ, Johnson M. Salmeterol: a potent and long-acting inhibitor of inflammatory mediator release from human lung. *Br J Pharmacol*. 1991;104(3):672–6.

Capraz F, Kunter E, Cermik H, Ilvan A, Pocaç S. The effect of inhaled budesonide and formoterol on bronchial remodeling and HRCT features in young asthmatics. *Lung*. 2007;185(2):89–96.

Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(2):405–10.

Chase LG, Lakshmiathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(1):8.

Chen M, Huang J, Yang X, Liu B, Zhang W, Huang L et al. Serum starvation induced cell cycle synchronization facilitates human somatic cells reprogramming. *PLoS ONE* 2012;7(4):e28203. doi:10.1371/journal.pone.0028203.

Chen W, Lin C, Yao C, Huang Y, Chou Y, Yin H et al. In-vitro effects of dexamethasone on cellular proliferation, apoptosis, and Na⁺-K⁺-ATPase activity of bovine corneal endothelial cells. *Ocul Immunol Inflamm.* 2006;14(4):215–23.

Collins S, Caron MG, Lefkowitz RJ. Regulation of adrenergic receptor responsiveness through modulation of receptor gene expression. *Annu Rev Physiol.* 1991;53:497–508.

Coman OA, Păunescu H, Ghiță I, Coman L, Bădărău A, Fulga I. Beta 3 adrenergic receptors: molecular, histological, functional and pharmacological approaches. *Rom J Morphol Embryol.* 2009;50(2):169–79.

Couëtil LL, Art T, Moffarts B de, Becker M, Mélotte D, Jaspar F et al. Effect of beclomethasone dipropionate and dexamethasone isonicotinate on lung function, bronchoalveolar lavage fluid cytology, and transcription factor expression in airways of horses with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med.* 2006;20(2):399–406.

Couëtil LL, Chilcoat CD, DeNicola DB, Clark SP, Glickman NW, Glickman LT. Randomized, controlled study of inhaled fluticasone propionate, oral administration of prednisone, and environmental management of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 2005;66(10):1665–74.

Dammeier J, Beer HD, Brauchle M, Werner S. Dexamethasone is a novel potent inducer of connective tissue growth factor expression. Implications for glucocorticoid therapy. *J Biol Chem.* 1998;273(29):18185–90.

Dekkers BGJ, Maarsingh H, Meurs H, Gosens R. Airway structural components drive airway smooth muscle remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6(8):683–92.

Derksen FJ, Olszewski MA, Robinson NE, Berney C, Hakala JE, Matson CJ et al. Aerosolized albuterol sulfate used as a bronchodilator in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* 1999;60(6):689–93.

Descalzi D, Folli C, Nicolini G, Riccio AM, Gamalero C, Scordamaglia F et al. Anti-proliferative and anti-remodelling effect of beclomethasone dipropionate, formoterol and salbutamol alone or in combination in primary human bronchial fibroblasts. *Allergy*. 2008;63(4):432–7.

Devalia JL, Sapsford RJ, Rusznak C, Toumbis MJ, Davies RJ. The effects of salmeterol and salbutamol on ciliary beat frequency of cultured human bronchial epithelial cells, in vitro. *Pulm Pharmacol*. 1992;5(4):257–63.

Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*. 1986;321(6065):75–9.

Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(6):676–80.

Donnelly LE, Tudhope SJ, Fenwick PS, Barnes PJ. Effects of formoterol and salmeterol on cytokine release from monocyte-derived macrophages. *Eur Respir J*. 2010;36(1):178–86.

Dooley DJ, Bittiger H, Reymann NC. CGP 20712 A: a useful tool for quantitating beta 1- and beta 2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*. 1986;130(1-2):137–9.

Dumont JE, Jauniaux JC, Roger PP. The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends Biochem Sci*. 1989;14(2):67–71.

Dunsmore SE, Rannels DE. Extracellular matrix biology in the lung. *Am J Physiol*. 1996;270(1 Pt 1):L3-27.

Eickelberg O, Roth M, Lörx R, Bruce V, Rüdiger J, Johnson M et al. Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by beta2-adrenergic receptor agonists in primary human lung fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1999;274(2):1005–10.

Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C et al. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science*. 1989;245(4922):1118–21.

Fedoroff S, Hall C. Effect of horse serum on neural cell differentiation in tissue culture. *In Vitro*. 1979;15(8):641–8.

Fernyhough ME, Hausman GJ, Dodson MV. Progeny from dedifferentiated bovine adipocytes display protracted adipogenesis. *Cells Tissues Organs*. 2008;188(4):359–72.

Ferrandina G, Scambia G, Benedetti Panici P, Bonanno G, Vincenzo R de, Rumi C et al. Effects of dexamethasone on the growth and epidermal growth factor receptor expression of the OVCA 433 ovarian cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1992;83(2-3):183–93.

Fixman ED, Stewart A, Martin JG. Basic mechanisms of development of airway structural changes in asthma. *Eur Respir J*. 2007;29(2):379–89.

Fouty B, Moss T, Solodushko V, Kraft M. Dexamethasone can stimulate G1-S phase transition in human airway fibroblasts in asthma. *Eur Respir J*. 2006;27(6):1160–7.

Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(22):7920–4.

Gizycki MJ, Adelroth E, Rogers AV, O'Byrne PM, Jeffery PK. Myofibroblast involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997;16(6):664–73.

Goldie RG, Paterson JW, Wale JL. A comparative study of beta-adrenoceptors in human and porcine lung parenchyma strip. *Br J Pharmacol*. 1982;76(4):523–6.

Gos M, Miloszevska J, Swoboda P, Trembacz H, Skierski J, Janik P. Cellular quiescence induced by contact inhibition or serum withdrawal in C3H10T1/2 cells. *Cell Prolif*. 2005;38(2):107–16.

Goto S, Miyazaki K, Funabiki T, Yasumitsu H. Serum-free culture conditions for analysis of secretory proteinases during myogenic differentiation of mouse C2C12 myoblasts. *Anal Biochem*. 1999;272(2):135–42.

Goulet S, Bihl MP, Gambazzi F, Tamm M, Roth M. Opposite effect of corticosteroids and long-acting beta(2)-agonists on serum- and TGF-beta(1)-induced extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts. *J Cell Physiol*. 2007;210(1):167–76.

Gruenert DC, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am J Physiol.* 1995;268(3 Pt 1):L347-60.

Guerrero V, Florini JR. Dexamethasone effects on myoblast proliferation and differentiation. *Endocrinology.* 1980;106(4):1198–202.

Hadcock JR, Wang HY, Malbon CC. Agonist-induced destabilization of beta-adrenergic receptor mRNA. Attenuation of glucocorticoid-induced up-regulation of beta-adrenergic receptors. *J Biol Chem.* 1989;264(33):19928–33.

Hall IP, Widdop S, Townsend P, Daykin K. Control of cyclic AMP levels in primary cultures of human tracheal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 1992;107(2):422–8.

Halwani R, Al-Muhsen S, Al-Jahdali H, Hamid Q. Role of transforming growth factor- β in airway remodeling in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;44(2):127–33.

Haney S, Hancox RJ. Recovery from bronchoconstriction and bronchodilator tolerance. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2006;31(2-3):181–96.

Hetzel M, Bachem M, Anders D, Trischler G, Faehling M. Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Lung.* 2005;183(4):225–37.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007;170(6):1807–16.

Holgate ST, Holloway J, Wilson S, Bucchieri F, Puddicombe S, Davies DE. Epithelial-mesenchymal communication in the pathogenesis of chronic asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1(2):93–8.

Honegger UE, Disler B, Wiesmann UN. Chronic exposure of human cells in culture to the tricyclic antidepressant desipramine reduces the number of beta-adrenoceptors. *Biochem Pharmacol.* 1986;35(11):1899–902.

Honn KV, Singley JA, Chavin W. Fetal bovine serum: a multivariate standard. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1975;149(2):344–7.

Howell JE, McAnulty RJ. TGF-beta: its role in asthma and therapeutic potential. *Curr Drug Targets*. 2006;7(5):547–65.

Jacques E, Semlali A, Boulet LP, Chakir J. AP-1 overexpression impairs corticosteroid inhibition of collagen production by fibroblasts isolated from asthmatic subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol*. 2010;299(2):L281-7.

Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(10 Pt 2):S28-38.

Jeon JW, Lee SJ, Kim JB, Kang JJ, Lee JH, Seong GJ et al. Cellular proliferative effect of dexamethasone in immortalized trabecular meshwork cell (TM5) line. *Yonsei Med J*. 2003;44(2):299–306.

Johnson M. Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(1):18–24.

Kalavantavanich K, Schramm CM. Dexamethasone potentiates high-affinity beta-agonist binding and g(s)alpha protein expression in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;278(5):L1101-6.

Kämpfer N, Lamyel F, Schütz I, Warnken M, Hoffmann K, Kügelgen I von et al. Dual regulation of β 2-adrenoceptor messenger RNA expression in human lung fibroblasts by β 2-cAMP signaling; delayed upregulated inhibitors oppose a rapid in onset, direct stimulation of gene expression. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2014;387(7):649–57.

Kariyawasam HH, Aizen M, Barkans J, Robinson DS, Kay AB. Remodeling and airway hyperresponsiveness but not cellular inflammation persist after allergen challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(9):896–904.

Kelly MM, O'Connor TM, Leigh R, Otis J, Gwozd C, Gauvreau GM et al. Effects of budesonide and formoterol on allergen-induced airway responses, inflammation, and airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):349-356.e13.

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(6 Pt 1):1774–83.

Koenig JA, Edwardson JM. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18(8):276–87.

Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Itakura S, Kamitani S, Desaki M et al. Procaterol Inhibits Lung Fibroblast Migration. *Inflammation.* 2009;32(6):387–92.

Kraft M, Lewis C, Pham D, Chu HW. IL-4, IL-13, and dexamethasone augment fibroblast proliferation in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(4):602–6.

Kumar RK, O'Grady R, Li W, Smith LW, Rhodes GC. Primary culture of adult mouse lung fibroblasts in serum-free medium: responses to growth factors. *Exp Cell Res.* 1991;193(2):398–404.

Laitinen LA, Laitinen A, Altraja A, Virtanen I, Kämpe M, Simonsson BG et al. Bronchial biopsy findings in intermittent or "early" asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(5 Pt 2):S3-6; discussion S33-40.

Lamyel F, Warnken-Uhlich M, Seemann WK, Mohr K, Kostenis E, Ahmedat AS et al. The β 2-subtype of adrenoceptors mediates inhibition of pro-fibrotic events in human lung fibroblasts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2011;384(2):133–45.

Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, Relave F, Setlakwe EL, Beauchamp G et al. Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(5):589–96.

Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie J. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology.* 2011;16(7):1027–46.

Leicht M, Marx G, Karbach D, Gekle M, Köhler T, Zimmer H. Mechanism of cell death of rat cardiac fibroblasts induced by serum depletion. *Mol Cell Biochem.* 2003;251(1-2):119–26.

Liu X, Ostrom RS, Insel PA. cAMP-elevating agents and adenylyl cyclase overexpression promote an antifibrotic phenotype in pulmonary fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286(5):C1089-99.

Löscher W, Hrsg. *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren.* 9. Aufl. Stuttgart: Enke;2014.

Loza MJ, Foster S, Peters SP, Penn RB. Beta-agonists modulate T-cell functions via direct actions on type 1 and type 2 cells. *Blood*. 2006;107(5):2052–60.

Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(5):348–56.

Mak JC, Nishikawa M, Haddad EB, Kwon OJ, Hirst SJ, Twort CH et al. Localisation and expression of beta-adrenoceptor subtype mRNAs in human lung. *Eur J Pharmacol*. 1996;302(1-3):215–21.

Mak JC, Rousell J, Haddad EB, Barnes PJ. Transforming growth factor-beta1 inhibits beta2-adrenoceptor gene transcription. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000;362(6):520–5.

Massaro GD, Fischman CM, Chiang MJ, Amado C, Massaro D. Regulation of secretion in Clara cells: studies using the isolated perfused rat lung. *J Clin Invest*. 1981;67(2):345–51.

Mauad T, Xavier AC, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Elastosis and fragmentation of fibers of the elastic system in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(3):968–75.

Mayor F, Penela P, Ruiz-Gómez A. Role of G protein-coupled receptor kinase 2 and arrestins in beta-adrenergic receptor internalization. *Trends Cardiovasc Med*. 1998;8(5):234–40.

Medeiros Matsushita M de, da Silva LFF, dos Santos MA, Fernezlian S, Schrupf JA, Roughley P et al. Airway proteoglycans are differentially altered in fatal asthma. *J Pathol*. 2005;207(1):102–10.

Michalik M, Pierzchalska M, Legutko A, Ura M, Ostaszewska A, Soja J et al. Asthmatic bronchial fibroblasts demonstrate enhanced potential to differentiate into myofibroblasts in culture. *Med Sci Monit* 2009;15(7):BR194-201.

Minotti S, Scicchitano BM, Nervi C, Scarpa S, Lucarelli M, Molinaro M et al. Vasopressin and insulin-like growth factors synergistically induce myogenesis in serum-free medium. *Cell Growth Differ*. 1998;9(2):155–63.

Moonen G, Nelson PG. Some physiological properties of astrocytes in primary cultures. In: Schoffeniels E, Hrsg. *Dynamic properties of glia cells: An interdisciplinary approach to their*

study in the central and peripheral nervous system: an international symposium, held at Liège, Belgium from 29-31 August 1977. Oxford [Eng.], New York: Pergamon Press; 1978:389–93.

Nam YH, Lee SK, Sammut D, Davies DE, Howarth PH. Preliminary study of the cellular characteristics of primary bronchial fibroblasts in patients with asthma: expression of alpha-smooth muscle actin, fibronectin containing extra type III domain A, and smoothelin. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(1):20–7.

Noveral JP, Grunstein MM. Adrenergic receptor-mediated regulation of cultured rabbit airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol*. 1994;267(3 Pt 1):L291-9.

Pearlman DS, LaForce CF, Kaiser K. Fluticasone/Formoterol combination therapy compared with monotherapy in adolescent and adult patients with mild to moderate asthma. *Clin Ther*. 2013;35(7):950–66.

Phan SH. Genesis of the myofibroblast in lung injury and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2012;9(3):148–52.

Pickholtz E, Admon D, Izhar U, Berkman N, Levi-Schaffer F. Dexamethasone and salbutamol stimulate human lung fibroblast proliferation. *World Allergy Organ J*. 2011;4(12):249–56.

Pirie RS. Recurrent airway obstruction: A review. *Equine Vet J*. 2014;46(3):276–88.

Pohunek P, Warner JO, Turzíkóvá J, Kudrman J, Roche WR. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16(1):43–51.

Rahimi RA, Leof EB. TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J Cell Biochem*. 2007;102(3):593–608.

Read JR, Boston RC, Abraham G, Bauquier SH, Soma LR, Nolen-Walston RD. Effect of prolonged administration of clenbuterol on airway reactivity and sweating in horses with inflammatory airway disease. *Am J Vet Res*. 2012;73(1):140–5.

Roberts CR. Is asthma a fibrotic disease? *Chest*. 1995;107(3 Suppl):111S-117S.

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989;1(8637):520–4.

Roger PP, Servais P, Dumont JE. Stimulation by thyrotropin and cyclic AMP of the proliferation of quiescent canine thyroid cells cultured in a defined medium containing insulin. *FEBS Lett*. 1983;157(2):323–9.

Roman J. Extracellular matrix and lung inflammation. *Immunol Res*. 1996;15(2):163–78.

Roman J, Brown KK, Olson A, Corcoran BM, Williams KJ. An official American thoracic society workshop report: comparative pathobiology of fibrosing lung disorders in humans and domestic animals. *Ann Am Thorac Soc*. 2013;10(6):S224-9.

Sabatini F, Petecchia L, Usai C, Silvestri M, Rossi GA, Miller-Larsson A et al. Pharmacological modulation of the bradykinin-induced differentiation of human lung fibroblasts: effects of budesonide and formoterol. *J Asthma*. 2012;49(10):1004–11.

Sabatini F, Silvestri M, Sale R, Serpero L, Giuliani M, Scarso L et al. Concentration-dependent effects of mometasone furoate and dexamethasone on foetal lung fibroblast functions involved in airway inflammation and remodeling. *Pulm Pharmacol Ther*. 2003;16(5):287–97.

Salathe M. Effects of beta-agonists on airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(6 Suppl):S275-81.

Salazar LM, Herrera AM. Fibrotic response of tissue remodeling in COPD. *Lung*. 2011;189(2):101–9.

Saltzman LE, Moss J, Berg RA, Hom B, Crystal RG. Modulation of collagen production by fibroblasts. Effects of chronic exposure to agonists that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem J*. 1982;204(1):25–30.

Setlakwe EL, Lemos KR, Lavoie-Lamoureux A, Duguay J, Lavoie J. Airway collagen and elastic fiber content correlates with lung function in equine heaves. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307(3):L252-60.

- Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science*. 2001;294(5545):1307–13.
- Shibeshi W, Abraham G, Kneuer C, Ellenberger C, Seeger J, Schoon H et al. Isolation and culture of primary equine tracheal epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2008;44(7):179–84.
- Shifren A, Witt C, Christie C, Castro M. Mechanisms of remodeling in asthmatic airways. *J Allergy (Cairo)*. 2012;2012:316049.
- Shull S, Meisler N, Absher M, Phan S, Cutroneo K. Glucocorticoid-induced down regulation of transforming growth factor-beta 1 in adult rat lung fibroblasts. *Lung*. 1995;173(2):71–8.
- Silvestri M, Fregonese L, Sabatini F, Dasic G, Rossi GA. Fluticasone and salmeterol downregulate in vitro, fibroblast proliferation and ICAM-1 or H-CAM expression. *Eur Respir J*. 2001;18(1):139–45.
- Silvestri M, Oddera S, Lantero S, Rossi GA. beta 2-agonist-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is not associated with modification of LFA-1 and Mac-1 expression or with impairment of polymorphonuclear leukocyte antibacterial activity. *Respir Med*. 1999;93(6):416–23.
- Spoelstra FM, Postma DS, Hovenga H, Noordhoek JA, Kauffman HF. Additive anti-inflammatory effect of formoterol and budesonide on human lung fibroblasts. *Thorax*. 2002;57(3):237–41.
- Stewart AG, Fernandes D, Tomlinson PR. The effect of glucocorticoids on proliferation of human cultured airway smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1995;116(8):3219–26.
- Todorova L, Gürcan E, Miller-Larsson A, Westergren-Thorsson G. Lung fibroblast proteoglycan production induced by serum is inhibited by budesonide and formoterol. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;34(1):92–100.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(5):349–63.

Tomlinson PR, Wilson JW, Stewart AG. Salbutamol inhibits the proliferation of human airway smooth muscle cells grown in culture: relationship to elevated cAMP levels. *Biochem Pharmacol.* 1995;49(12):1809–19.

Turgut K, Sasse HH. Influence of clenbuterol on mucociliary transport in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Rec.* 1989;125(21):526–30.

Warshamana GS, Martinez S, Lasky JA, Corti M, Brody AR. Dexamethasone activates expression of the PDGF-alpha receptor and induces lung fibroblast proliferation. *Am J Physiol.* 1998;274(4 Pt 1):L499-507.

Williamson KK, Davis MS. Evidence-based respiratory medicine in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2007;23(2):215–27.

Wu H, Ren Y, Li S, Wang W, Yuan J, Guo X et al. In vitro culture and induced differentiation of sheep skeletal muscle satellite cells. *Cell Biol Int.* 2012;36(6):579–87.

Yamauchi K, Inoue H. Airway remodeling in asthma and irreversible airflow limitation-ECM deposition in airway and possible therapy for remodeling-. *Allergol Int.* 2007;56(4):321–9.

Yasui K, Kobayashi N, Yamazaki T, Agematsu K, Matsuzaki S, Nakata S et al. Differential effects of short-acting beta2-agonists on human granulocyte functions. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006; 139(1):1–8.

Yukawa T, Ukena D, Kroegel C, Chanez P, Dent G, Chung KF et al. Beta 2-adrenergic receptors on eosinophils. Binding and functional studies. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141(6):1446–52.

Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Getu Abraham für die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie seine unermüdliche Geduld und stets freundliche Hilfe bei der Entstehung dieser Dissertation. Auch für die kritische und konstruktive Durchsicht der Manuskripte möchte ich mich herzlich bedanken.

Bei Frau Martina Wieczorek und Frau Ina Hochheim möchte ich mich herzlich für die intensive und liebevolle Einweisung in die Laborarbeit und für die labortechnische Unterstützung bedanken.

Frau Dr. Claudia Zizzadoro danke ich für die kompetente Einführung in die Zellkulturtechniken.

Den Rossschlächtereien Ulrich Vogt aus Freiberg und Christian Wirth aus Grimma danke ich für die freundliche und unkomplizierte Bereitstellung des Probenmaterials.

Bei den Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und den produktiven Erfahrungsaustausch sowie das angenehme Arbeitsklima.

Für die finanzielle Unterstützung der Arbeit danke ich der Frankenförder Forschungsgesellschaft.

Der Akademie für Tiergesundheit e. V. danke ich für die Unterstützung in Form eines Kongressstipendiums zur Teilnahme am Internationalen 12. EAVPT-Kongress in Utrecht, Niederlande.

Ganz besonders möchte ich mich bei Fabrizio Bonicelli bedanken, der mir während der letzten Jahre immer zur Seite stand und auch während schwieriger Phasen beständig an mich geglaubt und mich motiviert hat.