

## 1 Einleitung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung ist eine Erkrankung, die nicht nur die Patienten in ihrer Lebensqualität stark einschränkt, sondern auch die Lebenszeit der Betroffenen durch die häufig auftretenden Komplikationen und Folgen verkürzt. Außerdem entstehen durch diese chronische Krankheit immens hohe Kosten für das Gesundheitssystem. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass auf der Pathogenese und der sich daraus ergebenden Therapie ein besonderes Augenmerk liegt. Bisher gibt es aber noch keine kausalen Behandlungsmöglichkeiten [27], so dass die vorhandenen Medikamente und Maßnahmen nur symptomatisch in das Krankheitsgeschehen eingreifen.

Einen großen Stellenwert haben dabei Medikamente, die zu einer Bronchodilatation führen, wie z.B. Anticholinergika. Diese führen durch eine Blockade des Acetylcholin-vermittelten Tonus am Muskarinrezeptor zu einer Bronchodilatation. Hierzu zählt u.a. das Tiotropiumbromid, ein langwirksames Anticholinergikum, das, wie in Studien gezeigt werden konnte, nicht nur zu einem Anstieg des FEV<sub>1</sub>-Wertes im Vergleich zur Verwendung von Ipratropiumbromid, einem kurzwirksamen Anticholinergikum, führt [92], sondern auch eine Verringerung der Dyspnoe bewirkt.

Darüber hinaus, senkt dieses Medikament nicht nur die Inzidenz von Exazerbationen der Patienten, sondern verlängert auch die Zeit bis zum Auftreten der ersten Exazerbation oder bis zum ersten Krankenhausaufenthalt [26]. Gerade bei diesem Wirkspektrum liegt die Vermutung nahe, dass die Wirkung nicht nur auf einer alleinigen Bronchodilatation liegt. Vielmehr scheint die Blockade von muscarinergen M<sub>3</sub>-Rezeptoren auch einen antiinflammatorischen Aspekt zu beinhalten. Im Umkehrschluss stellt sich daher die Frage, ob die Stimulation des cholinergen Systems im menschlichen Körper zu einer inflammatorischen Antwort führt.

Vor allem bei der COPD könnte dies entscheidend für das Verständnis der Pathogenese sein, weshalb wir uns in dieser Arbeit mit dieser Frage näher beschäftigten.

## 1.1 Definition der COPD

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) wurde von der GOLD-Initiative als eine chronische Erkrankung definiert, die durch eine nicht vollständig reversible und progredient verlaufende Atemwegsobstruktion charakterisiert ist. Die pathophysiologische Grundlage ist eine chronische pulmonale Entzündungsreaktion, die meist durch inhalative Noxen ausgelöst und unterhalten wird [28].

Allerdings stellt die COPD einen Summationsbegriff dar, der die chronische Bronchitis, eine chronische Atemwegsobstruktion und ein Lungenemphysem zusammenfasst, wobei diese Krankheitsbilder individuell unterschiedlich schwer bei den Patienten ausgeprägt sein können [65].

Die chronische Bronchitis manifestiert sich bei den Betroffenen als permanenter oder immer wieder auftretender Husten mit oder ohne Auswurf [27, 65]. Definitionsgemäß dauern diese Symptome länger an (mindestens drei aufeinander folgende Monate in zwei aufeinander folgenden Jahren) [32, 95].

Die chronische Atemwegsobstruktion zeigt sich in der Lungenfunktionsanalytik an verschiedenen Parametern, wobei hier die Verminderung des FEV<sub>1</sub>-Wertes im Vordergrund steht. Anhand der Veränderungen in der Spirometrie wird die COPD in verschiedene Schweregrade eingeteilt. Eine Übersicht dazu gibt Tabelle 1.

Stadium	FEV <sub>1</sub> (% Soll)	FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	Klinische Symptome
I: leichte COPD	≥ 80	< 70	fakultativ Husten und Auswurf
II: mäßige COPD	50-79	< 70	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Belastungsdyspnoe</li> <li>• fakultativ Husten und Auswurf</li> </ul>
III: schwere COPD	30-49	< 70	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zunehmende Dyspnoe</li> <li>• fakultativ Husten und Auswurf</li> <li>• Müdigkeit</li> <li>• verminderte Belastbarkeit</li> </ul>
IV: sehr schwere COPD	< 30 oder < 50 (bei Anzeichen für respiratorische Insuffizienz)	< 70	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ruhedyspnoe</li> <li>• Rechtsherzinsuffizienz</li> <li>• Husten und Auswurf</li> </ul>

**Tabelle 1:**

Schweregradeinteilung der COPD nach Lungenfunktionsänderungen und klinischen Symptomen, gemäß der GOLD-Klassifikation 2006 [28]

Im Gegensatz zum Asthma bronchiale ist diese Atemwegsobstruktion progredient und nach Gabe eines kurzwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten weder variabel noch reversibel (FEV<sub>1</sub>-Veränderung < 15 %<sub>soll</sub> und < 200 ml) [27]. Mit Fortschreiten kommt es bei vielen Patienten zu einer irreversiblen Erweiterung der distal der Bronchioli liegenden Lufträume durch Destruktion der Wände [32] und damit zur Ausbildung eines Emphysems. Dieses Emphysem und die zunehmende Atemwegsobstruktion führen beim Patienten zu Dyspnoe. Diese tritt erst nur bei Belastung auf, später aber auch in Ruhe, was von den Betroffenen als besonders belastend und als die Lebensqualität einschränkend empfunden wird [28].

## 1.2 Epidemiologie und Mortalität

Die Prävalenz und die Mortalität dieser Erkrankung variieren weltweit sehr stark nicht nur in den verschiedenen Ländern, sondern auch in den unterschiedlichen ethnischen Gruppen [74]. In Deutschland wird die Prävalenz mit etwa 10 bis 12 % angegeben [65], wobei die Dunkelziffer weitaus höher liegen dürfte. Einige Autoren gehen davon aus, dass nur etwa ein Viertel aller Fälle diagnostiziert wird [75]. Dies liegt wohl unter anderem daran, dass das Krankheitsbild sehr variabel ist und viele betroffenen Patienten erst spät einen Leidensdruck empfinden, so dass die Erkrankung erst in den schwereren Stadien diagnostiziert wird [65].

Derzeit nimmt die COPD den sechsten Platz in der Todesursachenstatistik weltweit ein. Allerdings werden die Todesfälle in den kommenden Jahren so stark zunehmen, dass Schätzungen davon ausgehen, dass diese Erkrankung schon im Jahr 2020 auf Platz drei dieser Statistik zu finden sein dürfte [3, 59, 65]. Vor allem in der Gruppe der Frauen konnte eine deutliche Zunahme der Todesfälle beobachtet werden. Zwischen 1980 und dem Jahr 2000 hat sich die Mortalität in den USA bei diesen fast verdoppelt.

Auch steigt die Mortalität mit zunehmendem Alter stark an, was wohl an der Erkrankungsdauer und dem damit zunehmenden Vorkommen von Komplikationen, wie ein Cor pulmonale oder einer respiratorischen Insuffizienz, liegt [61, 65].

Für die Jahre 1966 bis 1995 wurde gezeigt, dass die altersbezogenen Todesfälle für kardiovaskuläre Erkrankungen um ca. die Hälfte zurückgingen, während diese bei der COPD im gleichen Zeitraum um ca. 70 % zunahmen [60]. Diese Daten machen deutlich, wie wichtig es ist, nicht nur die Pathomechanismen der COPD weiter aufzudecken, um neue Strategien für die Therapie zu entwickeln, sondern auch neue Wege der Prävention zu finden.

## 1.3 Risikofaktoren

Die COPD stellt eine Erkrankung dar, die maßgeblich durch exogene Noxen ausgelöst wird. Eine individuelle Disposition scheint aber ebenfalls eine Rolle zu spielen, was am deutlichsten durch die Beobachtung wird, dass nicht jeder Raucher an einer chronischen Bronchitis oder einer COPD erkrankt. Im Folgenden soll nun auf einige der gesicherten und wahrscheinlichen Risikofaktoren einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung näher eingegangen werden.

### 1.3.1 Zigarettenrauchen

Das Inhalationsrauchen stellt mit Abstand den wichtigsten Risikofaktor für die Entwicklung einer COPD dar. Ca. 90 % der Erkrankungsfälle werden durch diese inhalative Noxe verursacht. Jedoch erkranken nicht alle Raucher an einer chronischen obstruktiven Lungenerkrankung, sondern nur ca. 10-20 % [24, 90].

Bei diesen empfänglichen Rauchern kommt es zu einer langsam progredienten Abnahme der Lungenfunktion, die sich in einem Abfall der Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>) zeigt. Dieser Abfall liegt deutlich über dem der Altersnorm entsprechenden Verminderung der FEV<sub>1</sub>. Bei Normalpersonen kann mit einer jährlichen Abnahme um ca. 25 bis 30 ml ab dem 30. Lebensjahr gerechnet werden, bei starken Rauchern (> 15 Zigaretten pro Tag) kann dieser Wert auf 80 ml/Jahr ansteigen [14, 24]. Außerdem wurde bei diesen Rauchern in Abhängigkeit von der konsumierten Zigarettenmenge eine Zunahme der klinischen Symptome, wie Auswurf und Dyspnoe, beobachtet [35]. Die Faktoren, die einen Raucher für die Entwicklung einer COPD empfänglicher machen, sind noch nicht genau geklärt, genetische Ursachen dürften aber eine Rolle spielen [1].

Auch das Rauchen während der Schwangerschaft scheint ein Risiko für die betroffenen Kinder darzustellen, später an einer COPD zu erkranken. Man konnte zeigen, dass diese Kinder signifikant geringere Lungenfunktionsparameter aufweisen als Kinder von nicht rauchenden Müttern [15]. Als Ursachen werden zum einen der Einfluss des Rauchens auf das Lungenwachstum und – Entwicklung *in utero*, zum anderen eine Unterdrückung des Immunsystems diskutiert [37, 58, 84].

### 1.3.2 Emissionen

Die Bedeutung von Luftverschmutzung für die Entwicklung einer COPD ist nach wie vor umstritten. Vor allem Partikel, die durch fossile Brennstoffe entstehen, Schwefeldioxid ( $\text{SO}_2$ ) und Nitrogenoxide ( $\text{NO}_x$ ), die im Straßenverkehr freigesetzt werden, geben immer wieder Anlass zu Diskussionen. Studien konnten aber belegen, dass in belasteten Gegenden häufiger Symptome wie Mukushypersekretion und Atemnot auftraten und vermehrt die Diagnose einer COPD oder eines Emphysems gestellt wurde [82]. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen der Luftverschmutzung und sowohl der Mortalität als auch der Häufigkeit von Krankenhausaufenthalten infolge einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung festgestellt werden [91].

Weiterhin scheint die Luftverschmutzung einen Einfluss auf die Lungenfunktion von Kindern zu haben. Kinder in belasteten Gebieten zeigten in der Lungenfunktionsanalytik eine geringere Lungenentwicklung und ein niedrigeres  $\text{FEV}_1$  als Gleichaltrige in weniger belasteten Gebieten [82]. In computertomographischen Untersuchungen solcher Jugendlichen und Kinder fanden sich morphologische Veränderungen, die am ehesten mit einer bronchialen, peribronchialen und/oder alveolären Entzündungsreaktionen vereinbar waren [10].

In tierexperimentellen Versuchen an Ratten konnte der proinflammatorische Effekt von Partikeln in der Atemluft belegt werden. Es wurde festgestellt, dass es durch die

Exposition mit solchen Partikeln zu einem Einstrom von neutrophilen Granulozyten, einer Zunahme der Epithelpermeabilität und der vermehrten Produktion von TNF- $\alpha$  durch Leukozyten kam. Dies deutete auf eine Epithelschädigung und eine Entzündungsreaktion hin [51].

All diese Aspekte machen deutlich, dass auch die Luftverschmutzung als Risikofaktor für die COPD eine Rolle spielt.

### **1.3.3 Berufsbedingte inhalative Noxen**

Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen obstruktiven Lungenerkrankung stellen berufsbedingte inhalative Noxen dar. Dabei spielen nicht nur anorganische, sondern auch organische Stäube eine Rolle.

Hierbei wäre z.B. die Silikose als eine Peumokoniose zu nennen, die durch die inhalative Einwirkung von kristallinem Quarz, Cristobalit und Tridymit entsteht und mit der Entwicklung einer gemischten Ventilationsstörung (Nebeneinander von Restriktion, Obstruktion und Überblähung) einhergeht.

Auf Seiten der organischen Stäube kann die Exposition mit Holzstaub oder mit Baumwollstaub zu chronischen Verläufen mit einer zunehmenden irreversiblen Verschlechterung der Lungenfunktion im Sinne einer COPD führen [65]. Allerdings ist es oftmals schwer, diesen Einfluss genau zu charakterisieren, vor allem dann, wenn die Betroffenen zusätzlich rauchen. Studien konnten aber zeigen, dass eine Staubexposition unabhängig vom Zigarettenrauchen einen negativen Einfluss auf die Lungenfunktion hatte [42, 83].

### **1.3.4 Virale und bakterielle Entzündungen**

Schon in den siebziger und achtziger Jahren gaben epidemiologische Untersuchungen einen Hinweis darauf, dass virale oder bakterielle Entzündungen des Respira-

tionstraktes in der Kindheit ein Risikofaktor für die Entwicklung einer COPD im Erwachsenenalter darstellen könnten. Die erhobenen Daten zeigten, dass Kinder mit häufigen bronchopulmonalen Infekten später einen höheren Verlust des FEV<sub>1</sub>-Wertes in Kombination mit dem Rauchen entwickelten als andere Kinder [9, 71].

Neuere Untersuchungen mit Adenoviren zeigten, dass deren DNA bei COPD-Patienten häufiger nachgewiesen werden konnten als in vergleichbaren gesunden Rauichern.

Außerdem exprimieren alveolare und bronchiale Epithelzellen virale Proteine, wobei die Höhe dieser Expression mit Zunahme der Erkrankungsschwere ebenfalls anstieg. Durch den Einbau der viralen DNA in die bronchialen Epithelzellen kam es zu einer Interaktion mit epithelialen Transkriptionsfaktoren, was zu einer vermehrten Bildung von IL-8, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), TGF-β (transforming growth factor β) und CTGF (connective tissue growth factor) führte, die sowohl eine Rolle bei der chronischen Entzündung als auch beim Remodelling spielen [33].

Aber auch Bakterien scheinen einen Beitrag zur Pathogenese der COPD zu leisten. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Höhe des Antikörpertiters gegen *Chlamydia pneumoniae* mit der Schwere des Emphysems und der Abnahme der Diffusionskapazität korrelierte. Dieses intrazelluläre Bakterium bewirkte weiterhin eine vermehrte Freisetzung von TNF-α aus Monozyten, von MMP-9 (Matrixmetalloproteinase 9) aus Makrophagen [49] und von GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) aus bronchialen Epithelzellen [48] und gibt damit ein Beispiel, wie Bakterien auf vielfältige Art und Weise zur Entstehung einer COPD beitragen können, wobei möglicherweise ein synergistischer Effekt mit Zigarettenrauch besteht [33].

### 1.3.5 Alpha-1-Proteaseinhibitormangel

Bei dem Alpha-1-Proteaseninhibitormangel handelt es sich um den einzigen gesicherten genetischen Faktor, der für die Entstehung eines Lungenemphysems verantwortlich ist. Bei 0,02 % der mitteleuropäischen Bevölkerung liegt ein hereditärer homozygoter Defekt dieses in der Leber gebildeten Glykoproteins vor. Dadurch werden Serumproteininasen (Elastase, (Chymo)Trypsin, Kollagenasen, u.v.m) nicht mehr ausreichend inhibiert, was zu einem mangelhaften Antiproteininasenschutz in der Lunge und zu der Entstehung eines Lungenemphysems führt. Allerdings werden max. 2 % aller Emphyseme durch diesen hereditären Faktor ausgelöst [65].

### 1.3.6 Soziale Faktoren

Der sozioökonomische Status hat nicht nur einen Einfluss auf die Prävalenz der COPD, sondern auch auf die Morbidität und Letalität dieser Erkrankung. Ursächlich sind wohl, neben dem höheren Zigarettenkonsum, die schlechteren Arbeitsbedingungen und die Wohnverhältnisse (Schmutz, belastete Wohngegend) [67].

Die Rolle der Ernährung bei der Entwicklung einer COPD ist nach wie vor umstritten. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine katabole Stoffwechsellsage zur Entwicklung eines Emphysems führen kann [70]. Außerdem traten bei Patientinnen, die an einer *Anorexia nervosa* litten und damit chronisch mangelernährt waren, in der Computertomographie emphysemähnliche Veränderungen auf [19].

Dies deutet darauf hin, dass die Nutrition einen Einfluss auf die Entstehung von Lungfunktionsänderungen haben könnte. Dieser spielt jedoch im Vergleich zu den oben genannten Risikofaktoren nur eine untergeordnete Rolle.

Als gesichert gilt allerdings, dass die Unterernährung einen wichtigen Prognosefaktor darstellt, da diese mit der COPD-Mortalität korreliert [23]. Die pulmonale Kachexie kommt durch ein Missverhältnis der durch die Nahrung zugeführten Energie und dem

durch vermehrte Atemarbeit erhöhten Energiebedarf zustande. Eine Verschlechterung der Lungenfunktion ist die Folge [65].

### **1.3.7 Geschlecht**

In der Vergangenheit lag die Prävalenz und die Mortalität bei Männern deutlich über denen der Frauen, so dass das Geschlecht als weiterer Risikofaktor diskutiert wurde. Neuere Analysen aber zeigten, dass sich die Zahlen in den letzten Jahren fast angeglichen haben, was unter anderem an dem veränderten Rauchverhalten bei Frauen liegen dürfte [54].

In einigen Studien wurde sogar angenommen, dass Frauen empfindlicher auf Zigarettenrauch reagieren und damit eher eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung entwickeln [76, 97]. Dieser Aspekt erscheint vor allem in Anbetracht der steigenden Zahl von rauchenden Frauen als bedeutsam.

## 1.4 Pathologie, Pathogenese und Pathophysiologie

Die zellulären und molekularen Mechanismen, die für die Entstehung einer COPD verantwortlich sind, sind vielfältig und komplex.

Durch endogene und/oder exogene Faktoren kommt es zu einer Entzündungsreaktion, und zwar nicht nur im bronchialen und bronchiolären, sondern auch im alveolären Bereich [27]. Diese Entzündung chronifiziert sich bei Fortbestehen der Noxen und unterscheidet sich damit von der normalen Entzündungsreaktion, die im Respirationstrakt als Antwort auch bei gesunden Rauchern gefunden wird.

Durch bestimmte Inhaltsstoffe des Zigarettenrauchs werden Alveolarmakrophagen aktiviert und zur Freisetzung verschiedener Mediatoren stimuliert. Dazu gehören u.a. Zytokine (z.B. IL-1, -6, -8, Interferon- $\gamma$ , Wachstumsfaktoren, TNF- $\alpha$ ), Proteasen (z.B. Cathepsin L, Elastase [MMP-12], Gelatinase [MMP-9], Collagenase [MMP-1]), aber auch Oxidantien (Superperoxid-Anion, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikal) und Enzyme (z.B. Lysozym, Hydrolasen) [3].

Es konnte gezeigt werden, dass die Zahl der Makrophagen im Lungengewebe, in der bronchioalveolären Lavage (BAL) und im Sputum von Patienten mit COPD stark erhöht ist. Außerdem korreliert ihre Zahl mit der Schwere der Erkrankung [21]. Diese Erhöhung kommt wahrscheinlich dadurch zustande, dass vermehrt Monozyten aus dem peripheren Blut durch selektive Chemokine (z.B. MCP-1), die u.a. Makrophagen produzieren, angelockt werden. Auch hier fand sich eine erhöhte Menge dieser Chemokine im Sputum und der BAL von betroffenen Patienten [11, 89]. Andere Autoren gehen davon aus, dass die Makrophagen bei Rauchern und Patienten mit COPD ein verlängertes Überleben in der Lunge besitzen, was ebenfalls eine erhöhte Zahl dieser Zellen erklären würde [88].

Durch die Freisetzung der oben genannten zellulären sekretorischen Produkte kommt es zum Einwandern und zur Aktivierung anderer Enzündungszellen.

Eine wichtige Rolle spielt bei der COPD der neutrophile Granulozyt, der in der Lage ist verschiedene Metalloproteasen (MMP-8, MMP-9, Collagenase, Gelatinase) und Serine-Proteasen (neutrophile Elastase, Cathepsin G, Proteininasen) zu produzieren und zu sezernieren. Diese Metabolite und Enzyme können das Lungengewebe angreifen und zu Alveolardestruktion führen [27]. Dies könnte erklären, warum die erhöhte Zahl der neutrophilen Granulozyten in einer Lungenbiopsie und im Sputum von Patienten mit COPD nicht nur mit dem Schweregrad der Erkrankung [21, 43], sondern auch mit dem Abfall der Lungenfunktion korrelierten [79].

Außerdem ist die sezernierte neutrophile Elastase in der Lage die Mukusproduktion aus submukösen Drüsen und Becherzellen zu stimulieren [77, 96], die Mukuszusammensetzung zu verändern und die Zilienmotilität zu inhibieren, was einen wichtigen Faktor für die Dyskinesie bei COPD-Patienten darstellt. Weiterhin wirkt diese Elastase direkt zytotoxisch auf die Epithelzellen der Atemwege [40, 50, 93].

Die Rolle der T-Lymphozyten in der Pathogenese der COPD ist nach wie vor nicht endgültig geklärt. Ihre Zahl ist im Parenchym, den peripheren und zentralen Atemwegen von COPD-Patienten erhöht und es besteht eine Korrelation zur Atemwegsdestruktion und – obstruktion. Auffällig ist außerdem, dass die CD8+ Zellen deutlich stärker erhöht sind als die CD4+ Zellen [53, 63, 69]. Die Ursachen für diesen Anstieg sind nach wie vor unklar, es wäre aber möglich, dass dieser ein Ausdruck für die chronische Kolonisation von Bakterien und Viren im unteren Respirationstrakt von COPD-Patienten darstellt [36]. Eine weitere Ursache könnte in der durch Proteasen oder direkt durch Zigarettenrauch verursachten Lungenschädigung und der damit verbundenen Aktivierung des Immunsystems zu suchen sein [17].

Die oben beschriebene Entzündungsreaktion und die Gewebeschädigung führen zu einem Remodelling des Parenchyms und der Atemwege. Darin beinhaltet ist eine Hyperplasie der Becherzellen und der submukösen Drüsen, was zu einer Mukusüberproduktion in das Lumen und zu dessen Verlegung führt.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die glatte Muskulatur der kleinen Atemwege deutlich hypertrophiert, wobei man davon ausgeht, dass dies einen weiteren wichtigen Faktor für Entwicklung der Lungenfunktionsänderungen im Sinne einer Obstruktion darstellen könnte [41].

Im Laufe der Erkrankung und mit Zunahme der Erkrankungsschwere verdicken sich die Bronchialwände durch die Bildung von Lymphfollikeln und die Ablagerung von Kollagen. Auch hier sind die genauen Zusammenhänge noch nicht eindeutig geklärt, man weiß aber, dass wohl verschiedene Wachstumsfaktoren eine Rolle spielen dürften. Hierzu gehört z.B. TGF- $\beta$  (transforming growth factor - $\beta$ ), das in den peripheren Atemwegen von COPD-Patienten vermehrt in den Epithelzellen exprimiert wird [20, 85]. Dieser Wachstumsfaktor könnte über die Bildung von CTGF (connective tissue growth factor) die Fibrosierung der kleinen Atemwege fördern und somit ebenfalls zu einer Limitierung des Atemflusses führen [3, 13, 38].

Ein weiterer Aspekt stellt die Alveolardestruktion und der damit verbundene Elastizitätsverlust dar, der durch mangelhafte Reparaturmechanismen zur Ausbildung eines panazinären und zentrilobulären Emphysems mit massiver Überblähung der Lunge führt [3, 27]. Dies bewirkt eine Erhöhung der Atemarbeit und einen Verlust der Gas austauschfläche, was sich bei den Patienten in Form von Dyspnoe bemerkbar macht [28].

Neuerdings wird auch der Rolle von bronchialen Epithelzellen in der Pathogenese der COPD mehr und mehr Aufmerksamkeit geschenkt, da die traditionelle Sicht einer alleinigen physio-chemischen Barrierefunktion, mit der Aufgabe Mukus zu produzie-

ren und ihn abzutransportieren, nur noch zum Teil zutrifft. Epithelzellen stellen die ersten Zellen dar, die mit Allergenen, Zigarettenrauch und anderen Luftverschmutzungen in Berührung kommen. Auch bilden sie die Targetzellen für pathogene Viren und Bakterien und stehen somit an erster Stelle in der Pathogenese der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung.

Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen in der Lage sind, eine Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen und Mediatoren zu produzieren und so aktiv am Entzündungsgeschehen teilzunehmen. Hierzu zählen chemotaktische Substanzen, wie IL-8, RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted) und MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) [27]. Von Letzterem ist bekannt, dass es die Migration von CD14+ Monocyten und CD3+ Lymphozyten durch Gefäßendothelen fördern kann [22] und so eine Rolle in der chronischen Entzündungsreaktion der COPD spielt.

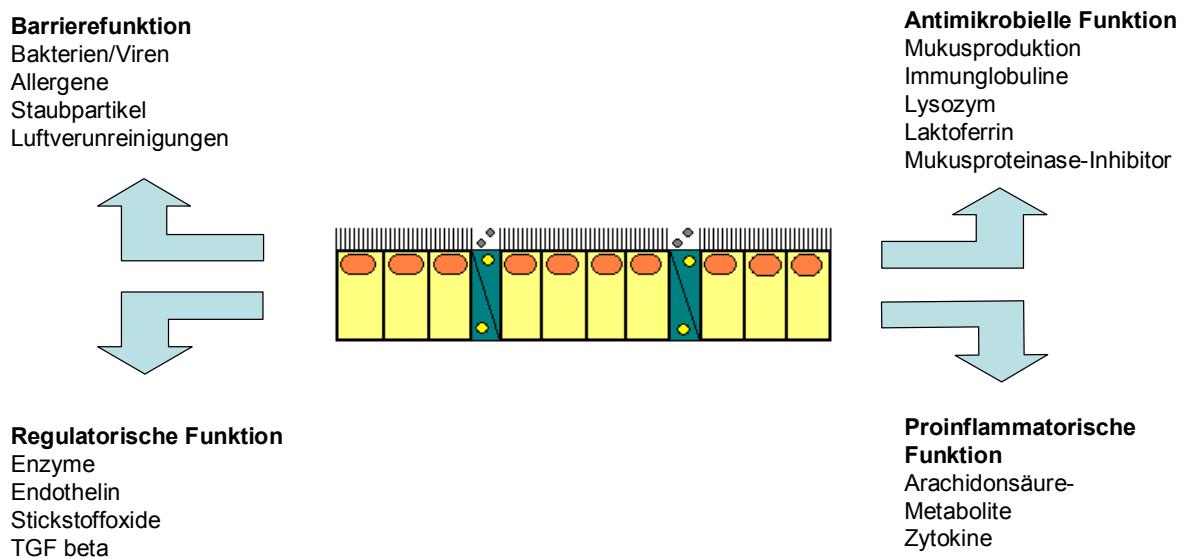
Auch dem IL-8 wird in der Pathogenese eine entscheidende Rolle zugesprochen, da es maßgeblich an der Migration von neutrophilen Granulozyten von der Peripherie in das Lungengewebe und an deren Aktivierung beteiligt ist [64].

Außerdem sind die Epithelzellen in der Lage verschiedene Wachstumsfaktoren zu produzieren. Hierzu gehören u.a. GM-CSF (granulocyte macrophage-colony-stimulating factor) und TGF- $\beta$ , das wie oben beschrieben an der Fibrosierung der kleinen Atemwege beteiligt sein dürfte [3].

Auch IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-11 und TNF- $\alpha$  als multifunktionelle Zytokine können freigesetzt werden. Vor allem TNF- $\alpha$  bewirkt eine Vielzahl von Effekten: Es erhöht die Gefäßpermeabilität und steigert so die Migration von Entzündungszellen.

Außerdem bewirkt es seinerseits die Freisetzung verschiedener Mediatoren, z.B. IL-6, IL-8 und GM-CSF, die dann durch ihre autokrine oder parakrine Wirkungsweise zu einer Triggerung des Entzündungsprozesses führen [64].

Abbildung 1 stellt eine kurze Zusammenfassung über die tatsächlichen Aufgaben des Atemwegsepithels dar.



**Abbildung 1:**

Die vielfältigen Aufgaben des Bronchialepithels (modifiziert nach [27])

## 1.5 Das non-neuronale cholinerge System und seine Beteiligung an der COPD

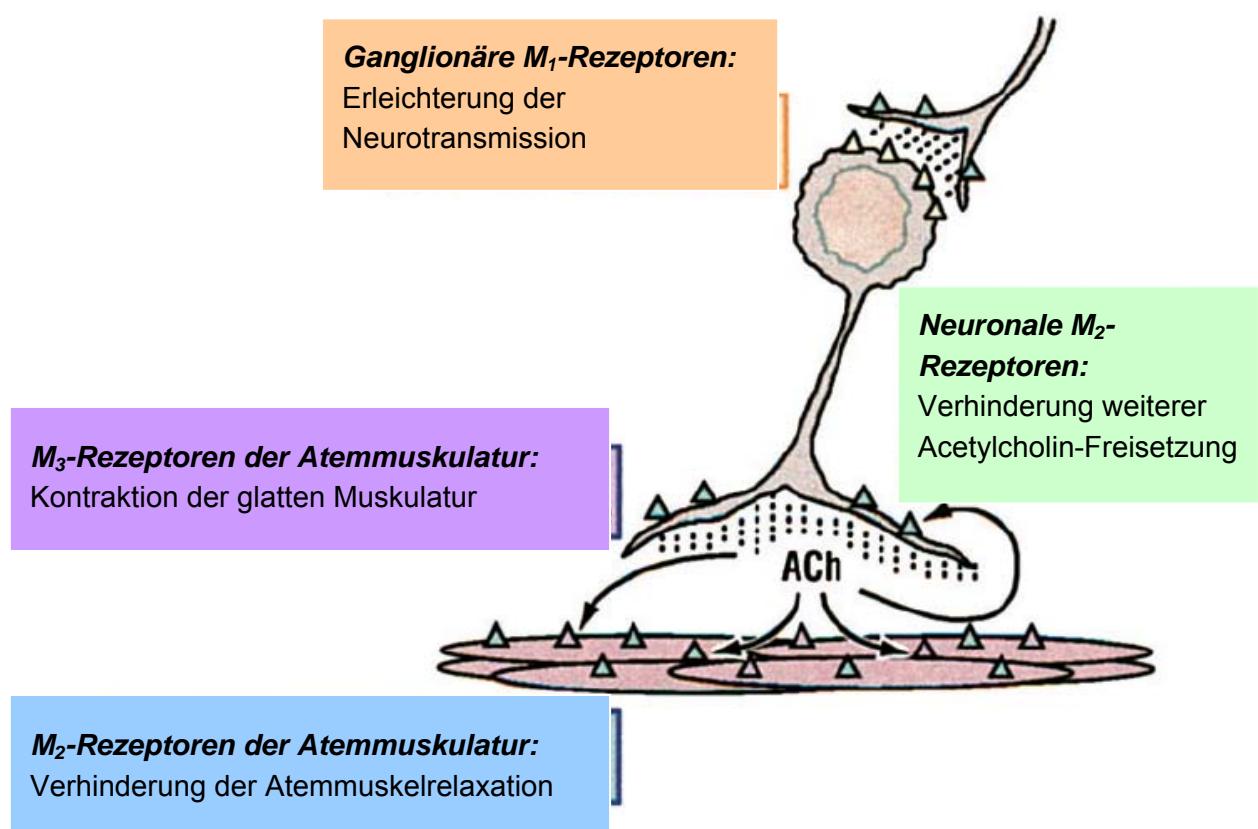
Die Lunge wird auf vielfältige Art und Weise vegetativ innerviert. Hierbei spielt vor allem der Parasympathikus eine wichtige Rolle. Dessen präganglionären Fasern werden in der Lunge in intramuralen cholinergen Neuronenplexus, die sich subepithelial in der Lamina propria und in der Submucosa befinden, umgeschaltet. Über die Freisetzung von Acetylcholin aus diesen postganglionären Nervenfasern werden verschiedene Effektorzellen innerviert [94].

Hierzu zählen u.a. die glatten Muskelzellen, die von den bisher bei Menschen bekannten muscarinernen Rezeptoren M<sub>1</sub>-M<sub>3</sub>, eine Mischung aus M<sub>2</sub>- und M<sub>3</sub>-Rezeptoren aufweisen und zwar im Verhältnis 4:1.

Durch Stimulation mit Acetylcholin wird an den G<sub>q11</sub>-gekoppelten M<sub>3</sub>-Rezeptoren die Phospholipase C stimuliert, wodurch es zu einem Anstieg von intrazellulären Calcium und damit zu einer Kontraktion der glatten Muskelzellen kommt (siehe Abbildung 2). Dagegen sind M<sub>2</sub>-Rezeptoren G<sub>i</sub> gekoppelt. Sie scheinen ebenfalls einen kontraktile Wirkung auf glatte Muskelzellen zu haben, wobei dieser Effekt auf der Verminderung der durch β<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelten Relaxierung durch Hemmung der Adenylatzyklase und kalziumabhängiger Kaliumkanäle zu beruhen scheint [6, 18]. Neuerdings konnte aber auch gezeigt werden, dass diese Rezeptoren einen direkteren Einfluss auf die Kontraktion glatter Muskelzellen nehmen als bisher angenommen. In Versuchen mit Knock-out Mäusen zeigte sich, dass bei Fehlen von M<sub>3</sub>-Rezeptoren die durch glatte Muskelzellen verursachte Obstruktion kleinerer Atemwege um ca. 60% verringert war, während bei M<sub>2</sub>/M<sub>3</sub>-Knock-out Mäusen überhaupt keine Obstruktion mehr beobachtet werden konnte [81].

Weiterhin wirkt der Parasympathikus an den Drüsen des Respirationstraktes. An submukösen Drüsen finden sich sowohl M<sub>1</sub>- als auch M<sub>3</sub>-Rezeptoren.

Obwohl die M<sub>1</sub>-Rezeptoren häufiger auftreten als die M<sub>3</sub>-Rezeptoren (Verhältnis 2:1) scheinen sie nur eine akzessorische Rolle in der Elektrolyt- und Wasserhomöostase zu spielen, während die Steigerung der Mukussekretion hauptsächlich durch muscarinerge Rezeptoren vom M<sub>3</sub>-Subtyp vermittelt wird [6].



**Abbildung 2:**

Vereinfachte Darstellung muscarinerger Rezeptoren auf parasympathische Nerven der Lunge und Muskelzellen der Atemwege (aus [6])

Neben den oben beschriebenen, über Nervenfasern vermittelten Effekten, gibt es aber auch das non-neuronale cholinerge System. Dieses System beschreibt das Vorkommen von Acetylcholin, des Enzyms Cholinacetyltransferase, das für die Bildung von Acetylcholin verantwortlich ist, sowie muscarinergen und nicotinergen Rezeptoren auch außerhalb von neuronalen Zellen. Tabelle 2 gibt eine Zusammenfassung über menschliches Gewebe, in dem non-neuronales Acetylcholin gefunden wurde.

So kann z.B. in menschlichen Bronchialepithelzellen die Cholinacetyltransferase immunhistochemisch und mittels Western Blot nachgewiesen werden. Die Funktionen sind nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Da sich dieses Enzym aber vor allem zwischen den freien Zilien und den Basalkörpern befindet, nimmt man an, dass Acetylcholin eine Rolle in der Modulation der Zilienfunktion spielt. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung bekräftigt, dass sich die Zilienmotilität in Biopsien von menschlichen Bronchialepithelzellen durch die Zugabe von geringen Mengen von Acetylcholin steigern lässt. Bei Erhöhung der zugegebenen Acetylcholinmenge konnte dieser Effekt wieder gehemmt und die Zilienmotilität sogar geblockt werden. Weiterhin nimmt man an, dass dieser Transmitter eine Rolle bei der Zellteilung spielt. Durch die Blockade der muscarinergen und nicotinergen Rezeptoren lässt sich nämlich das Wachstum von menschlichen Bronchialepithelzellen *in vitro* hemmen. Diesen Effekt findet man auch in Epithelzellen der Cornea und in Keratinozyten der Haut.

Eine weitere wichtige Aufgabe dürfte in dem Erhalt von Zell-Zell-Kontakten liegen. Blockiert man die Wirkung von Acetylcholin in Keratinozyten durch Atropin, kann man eine Erweiterung des Interzellularraumes beobachten. Inwieweit sich diese Beobachtung aber auf andere Epithelzellen übertragen lässt, ist noch nicht genau erklärt [94].

Acetylcholin und die Cholinacetyltransferase können auch in immunkompetenten Zellen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3), z.B. Lymphozyten, Alveolarmakrophagen, Mastzellen, Eosinophile und Neutrophile [44]. Auch verschiedene Typen von muscarinergen Rezeptoren finden sich auf diesen Zellen.

Diese Entdeckung macht klar, dass das non-neuronale cholinerge System auch an der Regulation von inflammatorischen Prozessen, wie sie in der Pathogenese der COPD von Bedeutung sind, eine Rolle spielen könnte. So zeigte sich, dass muscarinerge Rezeptoren und non-neuronales Acetylcholin zur Proliferation von Lymphozyten und zur Freisetzung von Zytokinen aus diesen Zellen beitragen [94]. Außerdem scheinen sie an der Regulation der Zytotoxizität von T-Lymphozyten beteiligt zu sein [80].

Interessanterweise findet man auf Makrophagen, die aus Sputum gewonnen werden, bei Patienten mit COPD eine gesteigerte Zahl von muscarinergen Rezeptoren vom Typ M<sub>3</sub> im Vergleich zu gesunden Personen und Rauchern, die an keiner Atemwegsobstruktion leiden [68], was ebenfalls an die Beteiligung von Acetylcholin an entzündlichen Prozessen bei der COPD denken lässt.

<b>Epitheliale Zellen</b>	Atemwege	Bronchialepithelzellen (z.B. Basalzellen, Zilienzellen)
	Verdauungstrakt	Orale Mukosa Ösophagus, Magen Jejunum, Ileum, Colon, Sigma Gallenblase
	Urogenitaltrakt	Nierenkelche, Ureter Harnblase
	Augen	Epithel der Kornea
	Haut	Keratinozyten
	Drüsengewebe	Azini von Drüsengewebe
<b>Mesotheliale Zellen</b>	Viszerale Pleura, Aortenklappe, Perikard	
<b>Endotheliale Zellen</b>	Lungengefäße	
<b>Parenchymatoses Gewebe</b>	Leber, Schilddrüse	
<b>Blutzellen</b>	Thrombozyten, mononukleäre Zellen	
<b>Immunzellen</b>	Mononukleäre Zellen, Alveolarmakrophagen	

**Tabelle 2:**

Vorkommen von non-neuronalem Acetylcholin in menschlichem Gewebe (modifiziert nach [94])

Zelltypen	Vorkommen von muscarinergen Rezeptoren, Cholinacetyltransferase (ChAT) u./o. Acetylcholin	Effekte von Acetylcholin
<b>Lymphozyten</b>	Muscarinrezeptoren (M <sub>1</sub> -M <sub>5</sub> ) ChAT Acetylcholin	steigert Zytotoxizität, Zytokinproduktion, Proliferation
<b>Mastzellen</b>	Muscarinrezeptoren (M <sub>1</sub> ) ChAT Acetylcholin	Inhibition der Histamin- freisetzung
<b>Neutrophile</b>	Muscarinrezeptoren (M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub> ) ChAT	Chemotaxis, Leukotrien B <sub>4</sub> -Produktion
<b>Eosinophile</b>	Muscarinrezeptoren (M <sub>1</sub> ) ChAT	unbekannt
<b>Makrophagen, Monozyten</b>	Muscarinrezeptoren (M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub> ) ChAT Acetylcholin	Leukotrien B <sub>4</sub> -Produktion
<b>bronchiale Epithel- zellen</b>	Muscarinrezeptoren (M <sub>1</sub> , M <sub>3</sub> ) ChAT Acetylcholin	Freisetzung von chemo- taktischen Substanzen für Eosinophile, Neutrophile und Monozyten
<b>glatte Muskelzellen der Atemwege</b>	Muscarinrezeptoren (M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub> ) ChAT	Expression proinflamma- torischer Gene

**Tabelle 3:**

*Vorkommen des non-neuronalen cholinergen Systems auf immunologischen Zellen,  
modifiziert nach [29]*

## 1.6 Fragestellung

In der folgenden Arbeit stehen bronchiale Epithelzellen, sowohl kultivierte immortalisierte Zellen, als auch primäre humane Bronchialepithezelnen und ihre Interaktion mit dem non-neuronalen cholinergen System im Mittelpunkt. Da es sich bei Epithelzellen um einen Zelltyp handelt, der auf verschiedene Art und Weise an den Entzündungsprozessen bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung beteiligt zu sein scheint, kann die Erforschung der Modulation und der Stimulation dieser inflammatorischen Effekte dazu beitragen, die Pathogenese der COPD weiter aufzudecken und möglicherweise neue Therapieansätze aufzutun.

Wir untersuchten, ob die Stimulation der primären humanen Bronchialepithezelnen und der immortalisierten Zelllinie BEAS 2 B mit Carbachol einen proinflammatorischen Effekt, zum einen durch die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-8, zum anderen über die Ausschüttung chemotaktisch wirkender Substanzen, nach sich zieht.

Wir folgten also folgenden Fragestellungen:

1. Führt die Stimulation von bronchialen Epithelzellen zu einer gesteigerten IL-8-Expression?
2. Kann durch Stimulation mit Carbachol eine dosisabhängige Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 beobachtet werden?
3. Kann durch TNF- $\alpha$ -Aktivierung respiratorischer Epithelzellen ein Carbacholeffekt demaskiert werden?
4. Wird durch Carbachol eine bronchialepitelial generierte Chemotaxis mit Wirkung auf neutrophile Granulozyten hervorgerufen?

5. Läßt sich die direkte Wirkung von Carbachol auf muscarinerge Rezeptoren mittels Calciumimaging sichtbar machen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Gewinnung der primären Bronchialepithelzellen

Die primären Bronchialepithelzellen wurden während einer Bronchoskopie mittels Bürstentechnik gewonnen. Insgesamt gewannen wir von 28 Personen (9 Frauen, 18 Männer) Zellproben. Alle Patienten erhielten vor dieser Bronchoskopie 7,5 -15 mg Dicodid s.c. [Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland], 0,75 mg Salbutamol als Tropfen [ratiopharm GmbH, Ulm/Donautal, Deutschland] und 3 ml 4 % Xylocainlösung inhalativ [AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland]. Die Bronchoskopie fand unter leichter Sedierung der Patienten mittels 2-8 mg Midazolam [ratiopharm GmbH, Ulm/Donautal, Deutschland] statt. Während des Eingriffes wurden zur örtlichen Schleimhautanästhesie mehrere Milliliter einer 2 % Xylocainlösung [AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland] in den zentralen Atemwegen verteilt.

Im Anschluss an die routinemäßige Untersuchung entnahm man unter direkter Sicht die Proben mittels einer sterilen Zytologiebürste [Olympus, Hamburg, Deutschland] und mehrfachen Bürstenabstrichen (20 bis 30 Mal) aus dem Bereich von Segment- und Subsegmentbronchien.

Bestand bei den Patienten der Verdacht auf ein malignes Geschehen, wurden die Bürstenabstriche auf der kontralateralen Seite entnommen, um eine Kontamination durch Malignomzellen zu vermeiden.

Nach der Entnahme gab man die Bürsten sofort in gekühltes Kulturmedium (Airway Epithelial Cell Growth Medium KIT, [PromoCell®, Heidelberg, Deutschland]) und vor- texte sie, um sie dann dem Labor zur weiteren Verarbeitung zu übergeben.

## 2.2 Zellbiologische Arbeitstechniken

### 2.2.1 Anlegen einer Primärzellkultur

Reagenzien:

- Airway Epithelial Cell Growth Medium KIT [*PromoCell®, Heidelberg, Deutschland*]
- Airway Epithelial Cell Basal Medium [*PromoCell®, Heidelberg, Deutschland*]
- SupplementPack [*PromoCell®, Heidelberg, Deutschland*]
  - Epidermal Growth Faktor 10 ng/ml
  - Insulin 5 µg/ml
  - Hydrocortison 0,5 µg/ml
  - Epinephrin 0,5 µg/ml
  - Trijodthyronin 6,7 ng/ml
  - Transferrin 10 µg/ml
  - Retinolsäure 0,1 ng/ml
  - BPE (bovine pituitary extract) 0,4 %
- Penicillin/Streptamycin 9,9 µl/ml [*Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*]
- Amphotericin B 0,25 µg/ml [*Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*]
- Dispase II [*Roche®, Mannheim, Deutschland*]
- Ery-Lyse-Puffer [*Qiagen®, Hilden, Deutschland*]
- Trypanblau 0,4 % [*Sigma®, München, Deutschland*]
- D-PBS (Dulbecco`s Phosphat-buffered saline) 1x [*PAA®, Cölbe, Deutschland*]

- Kaliumchlorid 0,2 g/l
  - Kaliumdihydrogenphosphat 0,2 g/l
  - Natriumchlorid 8 g/l
  - Dinatriumhydrogenphosphat 1,15 g/l
  - Kalziumchlorid 0,132 g/l
  - Magnesiumchlorid 0,1 g/l
- Accutase [*PAA®*, Cölbe, Deutschland]

#### Durchführung:

Die Bürsten wurden mit 2 ml Dispase II versetzt, um den Epithelzellverband aufzubrechen. Nun inkubierten wir die Zellen 1-2 Stunden bei 37 °C und vortexten die Proben während dieser Zeit in regelmäßigen Abständen. Dann wurden sie in ein neues, steriles Falcon® Tube (15 ml) gegeben und 5 min bei 1200 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert [*Megafuge 1.0 R*, Haereus®]. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Nährmedium, das zusätzlich die oben genannten Antibiotika und das Antimykotikum enthielt, resuspendiert.

Befanden sich viele Erythrocyten in der Suspension, entfernten wir diese aus den Proben, um sicherzustellen, dass sie das Wachstum der Epithelzellen nicht beeinflussen konnten. Dazu gaben wir 3 ml des Ery -Lyse -Puffers in das Tube und inkubierten die Zellen 3 min bei 4 °C. Anschließend musste die Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 1200 U/min, bei Raumtemperatur) [*Megafuge 1.0 R*, Haereus®] und das sich bildende Zellpellet in 1 ml Nährmedium resuspendiert werden.

Um die Zellzahl zu bestimmen, mischten wir 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl einer 0,4 % Trypanblaulösung [*Sigma®*, München, Deutschland] und zählten sie in einer Neubauer Kammer [*Neubauer Zählkammer*, Marienfeld®] unter dem Mikroskop [*Leitz®*

*DM IL*] aus. Dabei ergab sich im Durchschnitt eine Zellzahl von 403500 Zellen (Min: 50.000, Max: 1.000.000).

Die Proben wurden nun in eine sterile Zellkulturflasche [*PromoCell®, Heidelberg, Deutschland*] überführt und nach Zugabe von 10 ml sterilem, angewärmten Nährmedium zum Wachsen in den Brutschrank [*Hera Cell, Haereus®*] bei 37 °C, 100% relative Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> gegeben.

Nach ca. 3 Tagen waren alle Zellen adhärent und durchschnittlich nach weiteren 13 Tagen konfluent. Während dieser Zeit wurden die Zellen regelmäßig unter dem Mikroskop [*Leitz® DM IL*] betrachtet, um die Morphologie zu beurteilen und mögliches Wachstum von Pilzen oder Kontamination durch Bakterien zu erkennen.

Ca. alle 3 Tage entfernte man unter sterilen Bedingungen das Nährmedium, um es durch frisches, angewärmtes Medium zu ersetzen. Dies gewährleistete ein optimales Wachstum.

Sobald die Zellverbände konfluent waren, saugten wir das Nährmedium ab und gaben 5 ml PBS in die Zellkulturflaschen. Diese wurden vorsichtig geschwenkt, das PBS wurde abgesaugt und 1 ml Accutase hinzugegeben. Die Zellkulturflaschen inkubierte man nun 5- 10 min im Brutschrank [*Hera Cell, Haereus®*] bei 37 °C. Die Zellen lösten sich so aus dem Zellverband. Wir gaben nun 10 ml frisches Nährmedium hinzu und bestimmten die Zellzahl wie oben beschrieben. Danach konnten die Zellen für die weiteren Experimente erneut ausgesät und kultiviert werden.

## 2.2.2 Kultivierung von BEAS 2 B

Reagenzien:

- Nährmedium: RPMI 1640 mit L-Glutamin und 25 mmol HEPES  
*[Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland]*
- Trypsin *[Sigma®, München, Deutschland]*

Durchführung:

Die Nutzung von Zelllinien bietet den Vorteil, dass diese Zellen über viele Passagen hinweg konstante Eigenschaften aufweisen und somit eine einheitliche Zellpopulation bilden. Die Zelllinie BEAS 2 B, die wir verwendeten, stammt aus humanen Bronchial-epithelzellen, die trotz der Immortalisierung die typischen epithelialen Eigenschaften, z.B. die charakteristische Morphologie und die Expression von Zytokeratinen, nach wie vor aufweisen.

Diese Zellen wurden im Brutschrank *[Hera Cell, Haereus®]* bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Ca. alle 3 Tage wurde das Nährmedium durch frisches ersetzt. Dies geschah unter sterilen Bedingungen.

Waren die Zellen in den Kulturflaschen konfluent, wurde das alte Nährmedium abgesaugt und die Zellen analog zu den primären Bronchialepithelzellen gesplittet (s.u. 2.2.1). Statt Accutase verwendeten wir allerdings Trypsin, um die Zellen aus dem Zellverband zu lösen.

## 2.3 Immunologische Arbeitstechniken

### 2.3.1 Immunfluoreszensmikroskopie

Reagenzien:

- 0,01 % Tween [*Sigma®, München, Deutschland*]
- Para-Formaldehyd [*Sigma®, München, Deutschland*]
- Superblock [*Perbio Science, Bonn, Deutschland*]
- PBS [*Sigma®, München, Deutschland*]
- Primärantikörper: Anti-human M<sub>3</sub>-Antikörper (Kaninchen) [*Chemikon, Hofheim, Deutschland*]
- Sekundärantikörper: Anti-Kaninchen-Antikörper (Ziege) [*Dianova, Hamburg, Deutschland*]
- DAPI [*Merck®, Darmstadt, Deutschland*]
- Isotyp Kontroll-IgG aus Kaninchenserum [*Qiagen®, Hilden, Deutschland*]

Durchführung:

Für den Nachweis von M<sub>3</sub>-Rezeptoren auf den primären humanen Bronchialepithelzellen wählten wir das Verfahren der Fluoreszensmikroskopie. Dazu wurden ca. 10000 primäre Bronchialepithelzellen in die Kammern der CultureSlides [*BD, Heidelberg, Deutschland*] gegeben und anschließend in einer Cytospinzentrifuge [*Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA*] zentrifugiert (5 min, 800 U/min, bei Raumtemperatur). Nachdem die Objektträger gut getrocknet waren, konnten die Zellen fixiert werden. Dazu wurden 500 µl 4 %iges Para-Formaldehyd, das in 0,01 % Tween gelöst war, in

jede Kammer gegeben und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert.

Nach diesem Arbeitsschritt konnten die Objektträger nun einmal mit PBS gewaschen und 30 min lang mit 500 µl Superblock bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer geblockt werden, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen.

Nach erneutem Waschen mit PBS wurde der Primärantikörper zugegeben. Dazu mischten wir die Anti-M<sub>3</sub>-Antikörper im Verhältnis 1:100 mit PBS und 0,01 %igem Tween, gaben 500 µl dieser Lösung in die Kammern und ließen die Objektträger 1 bis 2 h bei 37°C in der Feuchtkammer inkubieren. Als Negativkontrolle diente Isotyp Kontroll-IgG aus Kaninchenserum. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Primärantikörper und die Negativkontrolle entfernt und die Objektträger 3 Mal über eine Dauer von 5 min mit PBS gewaschen.

Für den Sekundärantikörper wählten wir einen Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper, der im Verhältnis 1:500 (gelöst in PBS und 0,01 % Tween) eingesetzt wurde. Von dieser Antikörperlösung wurden je 500 µl in die Kammern gegeben und 1 h bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Anschließend konnten wir diese Lösung wieder entfernen und die Objektträger erneut 3 Mal 5 min mit PBS waschen.

Daraufhin gaben wir einen Tropfen DAPI auf die Zellen und deckten diese mit einem Deckglas ab. Dieses Reagenz ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der speziell die DNA der Zellkerne anfärbt. So präpariert konnten die Objektträger nun unter dem Immunfluoreszenzmikroskop [Axiovert 200M, Zeiss®, Göttingen, Deutschland] bei 20facher Vergrößerung betrachtet werden.

## 2.4 Molekularbiologische Arbeitstechniken

### 2.4.1 Stimulationen der primären Bronchialepithezelzellen auf 96-Well

#### Platten

Reagenzien:

- Collagen Typ I [*Sigma®, München, Deutschland*]
- 70 % Ethanol
- TNF- $\alpha$  [*Sigma®, München, Deutschland*]
- Carbachol [*Sigma®, München, Deutschland*]
- D-PBS 1x [*PAA®, Cölbe, Deutschland*]
  - Kaliumchlorid 0,2 g/l
  - Kaliumdihydrogenphosphat 0,2 g/l
  - Natriumchlorid 8 g/l
  - Dinatriumhydrogenphosphat 1,15 g/l
  - Kalziumchlorid 0,132 g/l
  - Magnesiumchlorid 0,1 g/l
- Airway Epithelial Cell Growth Medium KIT [*PromoCell®, Heidelberg, Deutschland*] mit Penicillin/ Streptamycin (9,9  $\mu$ l/ml) [*Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*] und Amphotericin B (0,25  $\mu$ g/ml) [*Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*]

Durchführung:

In diesem experimentellen Ansatz wurde mit den Zellen von 17 (10 Männer, 7 Frauen) der oben beschriebenen Patienten gearbeitet.

Die Zellen wurden für die Stimulation auf vorbereitete 96-Well Platten [*nunc™, Wiesbaden, Deutschland*] ausgesät. Diese waren vorher mit Kollagen-I beschichtet worden.

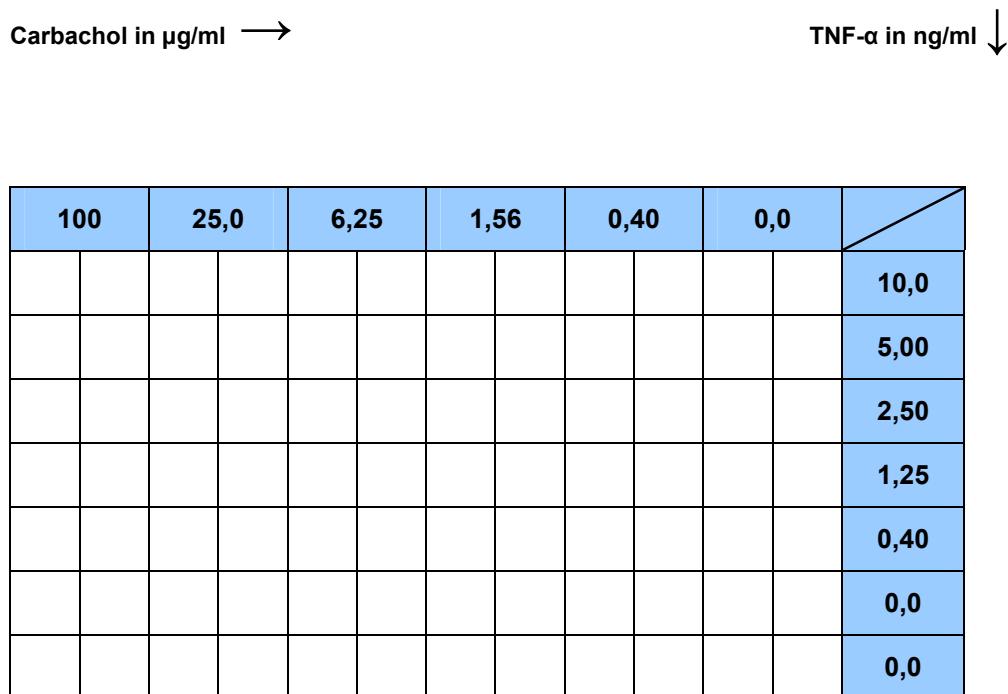
Dazu verdünnte man Kollagen Type I im Verhältnis 1:4 mit sterilem 70 %igen Ethanol, pipettierte 30 µl in jedes Well und ließ die Platten zum Trocknen über Nacht unter der Sterilbank stehen.

Es wurden ca. 8000 Zellen in jedes Well ausgesät und für weitere 3 Tage im Brutschrank [*Hera Cell, Haereus®*] aufbewahrt. So stellten wir sicher, dass alle Zellen für die Stimulationen adhärent waren.

Man entfernte im Weiteren das Medium durch Absaugen und wusch die Zellen mit sterilem D-PBS. Für die nun folgende Stimulation entschieden wir uns zu einer sog. Schachbretttitration (siehe Tabelle 4). Die Zellen wurden dabei reihenweise mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF-α (0 ng/ml, 0,625 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml) stimuliert.

Gleichzeitig waren sie in den verschiedenen Spalten auch mehreren Konzentrationen von Carbachol (0 µg/ml, 0,4 µg/ml, 1,56µg/ml, 6,25 µg/ml, 25 µg/ml, 100 µg/ml) ausgesetzt. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Strukturanalagon des Neurotransmitters Acetylcholin, also einem Parasympathomimetikum. Im Gegensatz zur Acetylgruppe von Acetylcholin liegt aber eine Carbonylgruppe vor, woraus eine höhere chemische Stabilität resultiert. Außerdem besitzt diese Substanz eine Präferenz für muscarinerge Rezeptoren, so dass eine alleinige muscarinerge Stimulation unserer Zellen gewährleistet war.

Nach Zugabe der Stimulationssubstanzen wurden die Zellplatten im Brutschrank [*Hera Cell, Haereus®*] bei 37 °C, 100 % rel. Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub> 16 h inkubiert. Anschließend überführte man die Zellüberstände in Eppendorf® Cups und lagerte sie bei –20 °C bis zur weiteren Verarbeitung.



**Tabelle 4:**

## *Darstellung der verwendeten Schachbrett titration*

#### 2.4.2 Vitalitätskontrolle

## Reagenzien:

- Airway Epithelial Cell Growth Medium KIT [PromoCell®, Heidelberg, Deutschland] mit Penicillin/Streptamycin (9,9 µl/ml) [Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland] und Amphotericin B (0,25 µg/ml) [Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland]
  - MTT [Sigma®, München, Deutschland]
  - SDS [Sigma®, München, Deutschland]
  - D-PBS 1x [PAA®, Cölbe, Deutschland]
    - Kaliumchlorid 0,2 g/l
    - Kaliumdihydrogenphosphat 0,2 g/l
    - Natriumchlorid 8 g/l

- Dinatriumhydrogenphosphat 1,15 g/l
- Kalziumchlorid 0,132 g/l
- Magnesiumchlorid 0,1 g/l

#### Durchführung:

Während der oben beschriebenen Stimulation wurden die Zellen regelmäßig auf ihre Morphologie hin unter dem Mikroskop [*Leitz® DM IL*] beurteilt. Da aber durch diese Maßnahme nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Zellen auch ohne morphologisch erkennbare Kriterien Schaden genommen hatten, entschlossen wir uns, einen Vitalitätstest durchzuführen. Dazu wurden die 96-Well Platten nach der Abnahme der Zellüberstände durch Zugabe von 100 µl PBS und unter vorsichtigem Schwenken gewaschen. Anschließend pipettierten wir 100 µl des angewärmten Nährmediums und 10 µl einer MTT-Lösung in jedes Well und inkubierten die Platten für 4 h im Brutschrank [*Hera Cell, Haereus®*]. In dieser Zeit reagierte das schwach gelbe MTT mit zellulären Dehydrogenasen der vitalen Epithelzellen. Es bildete sich das dunkelblaue Formazan, das durch Zugabe von 80 µl SDS aus den Zellen gelöst und im Photometer bei 540 nm vermessen wurde. Die so bestimmte Farbstoffbildung war proportional zur Aktivierung der Dehydrogenasen und zur Überlebensrate der Zellen. Anschließend normierten wir die Ergebnisse und bezogen den errechneten Faktor in die Auswertung des IL-8-ELISA mit ein. Damit wurde sichergestellt, dass unterschiedliche Mengen an produziertem IL-8 durch die verschiedenen Stimulationen zustande kamen und nicht etwa durch eine starke Abweichung der vitalen Zellen innerhalb der Wells.

### 2.4.3 Stimulation in T25 (25 cm<sup>2</sup>)-Flaschen

Reagenzien:

- D-PBS 1x [*PAA®, Cölbe, Deutschland*]
  - Kaliumchlorid 0,2 g/l
  - Kaliumdihydrogenphosphat 0,2 g/l
  - Natriumchlorid 8 g/l
  - Dinatriumhydrogenphosphat 1,15 g/l
  - Kalziumchlorid 0,132 g/l
  - Magnesiumchlorid 0,1 g/l
- TNF-α [*Sigma®, München, Deutschland*]
- Carbachol [*Sigma®, München, Deutschland*]
- Airway Epithelial Cell Growth Medium KIT [*PromoCell®, Heidelberg, Deutschland*] mit Penicillin/Streptamycin (9,9 µl/ml) [*Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*] und Amphotericin B (0,25 µg/ml) [*Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*]

Durchführung:

Um sicherzugehen, dass die Bedingungen der Kultivierung auf den 96-well Platten keinen Einfluss auf die Stimulationsergebnisse, z.B. über Anhäufung von sauren Zellmetaboliten, nahmen, wurden weitere Stimulationsexperimente in T25 (25 cm<sup>2</sup>)-Zellkulturflaschen vorgenommen. Hierfür verwendeten wir die Zellproben von 24 verschiedenen Patienten (17 Männer, 7 Frauen).

Wir säten ca. 30 000 Zellen in die Zellkulturflaschen unter Zugabe von 5 ml Nährmedium aus. Die Flaschen wurden dann im Brutschrank [*Hera Cell, Haereus®*] bei 37 °C, 100 % relative Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> für weiter 3 Tage kultiviert. Anschließend entfernten wir das Nährmedium und wuschen die Zellen mit sterilem D-PBS analog zu den 96-Well Platten. Nun konnten die Zellen mit 100 µg/ml Carbachol und TNF-α (10 ng/ml) stimuliert werden. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Proben. Für die Inkubation wählten wir erneut den Zeitraum von 16 h. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Überstände in sterile Falcon® Tubes gegeben und bei -20 °C im Kühl- schrank bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Aus den Zellen gewannen wir RNA-Proben für weitere Analysen (s.u. 2.4.5).

#### **2.4.4 Stimulationen der Zelllinie**

Die Zelllinie BEAS 2 B wurde auf dieselbe Art und Weise sowohl auf den 96-Well Platten als auch in den T25-Zellkulturflaschen stimuliert, wie die primären Bronchialepithelzellen, um untereinander vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Auch bei diesen Zellen führten wir die oben beschriebene Vitalitätskontrolle durch.

## 2.4.5 RNA-Isolierung

Reagenzien:

- peqGOLD TriFast<sup>TM</sup> [PeqLab®, Erlangen, Deutschland]
- Chloroform
- Isopropanol
- 75 %iges Ethanol
- DNase freies H<sub>2</sub>O

Durchführung:

Für diese Extraktion folgten wir dem Protokoll von PeqLab, Biotechnologie GmbH, Erlangen. Alle Arbeitsschritte erfolgten mit Handschuhen und unter dem Abzug. Aus den Zellkulturflaschen von 21 Patientenproben (14 männliche, 7 weibliche) wurde der Überstand durch vorsichtiges Absaugen entfernt. Das nun zugegebene peqGOLD TriFast<sup>TM</sup> (1 ml) und die Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur sorgten für eine Lyse der Zellen. Die Proben wurden dann in DNase-freie Eppendorf® Cups überführt. Anschließend gaben wir 0,2 ml Chloroform hinzu und schüttelten die Proben mindestens 15 s lang kräftig. Danach mussten sie 3 - 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen werden und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur bei 14000 U/min zentrifugiert werden [Centrifuge 5417 R, Eppendorf®]. Dadurch bildeten sich in den Cups drei Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere farblose wässrige Phase. Die RNA befand sich in der wässrigen Phase und wurde ohne Kontamination durch die anderen Phasen in ein neues Tube gegeben. Die anderen beiden Phasen enthielten DNA und Proteine und wurden anschließend verworfen.

Es folgte die Zugabe von je 300 µl Isopropanol. Die Proben wurden gevortext, um alle Bestandteile gut zu mischen, und für 5 - 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dadurch präzipitierte die RNA und konnte in der sich anschließenden Zentrifugation (10 min, 4 °C, 14000 U/min) [*Centrifuge 5417 R, Eppendorf®*] an der unteren Seite des Röhrchens gesammelt werden.

Wir entfernten den Isopropanolüberstand durch vorsichtiges Abziehen und wuschen das RNA-Pellet 2x mit je 1 ml 75 %igem Ethanol (vortexen, dann Zentrifugation: 10 min, 4 °C, 14000 U/min [*Centrifuge 5417 R, Eppendorf®*]).

Das Pellet musste nun kurz an der Luft getrocknet werden und konnte dann in 100 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen werden. Ein Erhitzen der RNA-Lösung im Heizblock (55 – 60 °C) verbesserte die Löslichkeit.

#### **2.4.6 Aufreinigen der RNA**

Reagenzien:

- RNeasy Mini Kit [*Qiagen®, Hilden, Deutschland*]
- RNase freies Wasser
- 96-100% iges Ethanol
- RNase-Free DNase Set [*Qiagen®, Hilden, Deutschland*]

Durchführung:

Für die Aufreinigung folgten wir dem Protokoll aus dem RNeasy Mini Kit von QIAGEN [*Qiagen®, Hilden, Deutschland*].

Zu den 100 µl RNA-Lösung gaben wir je 350 µl RLT-Puffer und vortexten die Proben. Dann wurden 250 µl des 96 – 100 % Ethanols hinzugegeben und durch Aufziehen mit der Pipette gemischt. Die Proben überführten wir nun in die RNeasy Mini-Säulen und zentrifugierten diese 15 s bei 12000 U/min und Raumtemperatur. Die enthaltene RNA konnte so an die Silikosemembran binden. Der Durchlauf wurde verworfen. Es folgte ein Waschschnitt mit 350 µl RW1-Puffer (Zentrifugation: 15 s, 12000 U/min, bei Raumtemperatur [*Centrifuge 5417 R, Eppendorf*], Durchlauf wurde verworfen).

Um sicherzugehen, dass die Proben nicht durch DNA-Reste verunreinigt waren, schlossen wir einen optionalen DNA-Verdau an. Dabei benutzten wir das Protokoll aus dem RNase-Free DNase Set von QIAGEN. Hierfür wurde je 10 µl DNase und 70 µl RDD Puffer auf die Silikosemembran pipettiert und die Proben anschließend auf dem Heizblock 30 min bei 25 °C inkubiert. Daraufhin folgten 3 Waschschnitte, um die RNA weiter aufzureinigen: 1 Mal mit 350 µl RW1-Puffer und 2 Mal mit je 500 µl RPE-Puffer. Zwischen diesen Waschschnitten erfolgte je eine Zentrifugation (15 s, 12000 U/min, bei Raumtemperatur [*Centrifuge 5417 R, Eppendorf®*]). Die Durchläufe wurden verworfen. Um die Säulen von jeden möglichen Resten der Waschpuffer zu befreien und die Säulen zu trocknen, zentrifugierten wir sie 2 min bei Raumtemperatur mit 12000 U/min [*Centrifuge 5417 R, Eppendorf®*]. Durch Zugabe von 30 - 50 µl DNase freiem H<sub>2</sub>O auf die Membran und anschließender Zentrifugation (1 min, 12000 U/min, Raumtemperatur [*Centrifuge 5417 R, Eppendorf®*]) lösten wir die RNA aus den Säulen.

Diese konnte nun im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen und so ihre genaue Konzentration bestimmt werden.

## 2.4.7 Herstellung von cDNA

Reagenzien:

- RNA-Proben
- Oligo dT [*Promega®, Mannheim, Deutschland*]
- steriles H<sub>2</sub>O
- Reverse Transkriptase [*Promega®, Mannheim, Deutschland*]
- RNAsin [*Promega®, Mannheim, Deutschland*]
- dNTP [*Promega®, Mannheim, Deutschland*]
- 5x Puffer [*Promega®, Mannheim, Deutschland*]

Durchführung:

Um die extrahierte RNA vor dem Abbau zu schützen, wurden alle nachfolgenden Pipettierschritte auf Eis durchgeführt.

In diesem Ansatz für die Gewinnung von cDNA wurde je 1 µg RNA eingesetzt. Das dafür benötigte Volumen ergab sich aus der davor im Photometer bestimmten Konzentration der RNA und wurde in ein steriles Eppendorf® Cup überführt. Anschließend gaben wir 1 µl Oligo dT hinzu und befüllten die Cups mit sterilem Wasser bis auf ein Endvolumen von 10 µl.

Die Proben mussten nun 3 min in einem Heizblock auf 70 °C erhitzt werden, so dass die RNA denaturierte.

Danach wurden 4 µl dNTP, 4 µl 5x Puffer, 1 µl RNAsin und 1 µl Reverse Transkriptase hinzugegeben und kurz gevortext, um sicherzugehen, dass alle Reagenzien gut miteinander gemischt waren. Die Proben wurden nun für 1 h bei 37 °C auf dem

Heizblock inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit stoppten wir die laufende Enzymreaktion durch ein 2- minütiges Erhitzen der Proben auf 95 ° C.

Anschließend gaben wir je 130 µl steriles Wasser hinzu, so dass sich ein Gesamtendvolumen von 150 µl ergab. Die Proben konnten nun bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C im Kühlschrank gelagert werden.

#### 2.4.8 Real-Time PCR

Reagenzien:

- cDNA
- LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I [*Roche® Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland*]
  - Taq DNA Polymerase
  - Taq Polymerase Puffer
  - SYBR Green I
  - dNTP Mix
  - MgCl<sub>2</sub> Stammlösung
  - zweifach destilliertes Wasser, PCR-grade

Durchführung:

Um zu überprüfen, ob die Stimulationsexperimente einen Einfluss auf die Expression der RNA von IL-8 und des M<sub>3</sub>-Rezeptors nahmen, wählten wir das Verfahren der Real-Time PCR. Dazu wurden folgende Primer benutzt:

M<sub>3</sub>:

fwd: 5`- GAC- CGT- AGA- GAT- TAT- GTC- ACT- G- 3`

rev: 5`- AAG- AAA- GCG- ATG- AAG- ACC- AC- 3`

IL-8:

fwd: 5`- CTG- CGC- CAA- CAC- AGA- AAT- TA- 3`

rev: 5`- GCC- CTC- TTC- AAA- AAC- TTC- TCC- 3`

Als Theromocycler wurde der LightCycler von Roche® [*Roche® Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland*] benutzt.

In die vorgesehenen Glaskapillaren pipettierten wir je 5 µl der hergestellten cDNA und gaben je 1 µl Primer Mix, 10 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl MgCl<sub>2</sub> und 2 µl Fast Start Mix hinzu. Bei jeder Amplification wurde eine Probe ohne cDNA eingesetzt, die als Negativkontrolle diente.

Wir folgten folgendem Amplifikationsstandardprogramm: 1 Zyklus mit 95 °C 15 min, 45 Zyklen mit 95 °C 30 s; 58 °C 30 s; 72 °C 30 s, 1 Zyklus mit 72 °C 5 s als Annealing Temperatur.

Durch die Erhitzung auf 95 °C wurde die Taq-Polymerase durch die Zerstörung ihrer hitzelabilen Seitenketten aktiviert, so dass nun die Elongation nach der spezifischen Bindung der Primer starten konnte. Nach jedem Zyklus wurde in den einzelnen Kapillaren automatisch die Fluoreszenz bei 530 nm gemessen. Diese stieg proportional zur steigenden Menge an synthetisierter ds-DNA an, da sich das doppelstrangspezifische SYBR Green I an die entstehenden PCR-Produkte anlagerte. Der Punkt, an dem die Proben die logarithmische Phase erreichten, konnte am Bildschirm beobachtet werden. Um die PCR-Produkte zu quantifizieren bestimmten wir parallel in jedem Lauf die Menge des Housekeepers Cyclophilin B. Dieses diente uns als Referenz für die gebildeten Produkte, die sich so nach folgender Formel berechnen ließen:

$$y=1/2^{(x-x[\text{Cyclophilin B}])} \times 100$$

Um sicherzugehen, dass die Amplifikation korrekt ablief und sich spezifische Produkte bildeten, wurden die Schmelzkurven der gebildeten PCR-Produkte durch Erhitzen auf 95 °C erstellt und überprüft.

#### 2.4.9 IL8-ELISA

Reagenzien:

- PBS:
  - 137 mM NaCl
  - 2,7 mM KCl
  - 2,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - pH 7,2 - 7,4
- Waschpuffer:
  - 0,05 % Tween® 20 in PBS
  - pH 7,2 - 7,4
- Blockpuffer:
  - 1 % BSA (bovines Serumalbumin) in PBS mit
  - 0,005 % NaN<sub>3</sub>
- Verdünnungsreagenz:
  - 0,1 % BSA
  - 0,005 % Tween® 20 in
  - Tris gepuffertem Salz (20 Mm Trizma Base, 150 mM NaCl)
  - pH 7,2 - 7,4

- Substratlösung:
  - TMB-Puffer (0,1 M Zitronensäure, 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O)
  - pro 10 ml TMB-Puffer: 1 Tablette Tetramethylbenzidinedihydrochlorid  
*[Sigma®, München, Deutschland]*
  - 3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Stopplösung: 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- DuoSet® ELISA *[R&D Systems®, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland]*
  - Capture Antikörper: Anti-human IL-8-Maus-Antikörper, in PBS zu einer Konzentration von 4,0 µg/ml verdünnt
  - Detektion Antikörper: Anti-human IL-8-Ziegen-Antikörper, in Verdünnungsreagenz zu einer Konzentration von 3,6 µg/ml gelöst
  - Streptavidin-HRP (Peroxidase-konjugiertes Streptavidin)
  - Standardlösung: rekombiniertes menschliches IL-8, Konzentration: 100 ng/ml

#### Vorbereitung der 96-Well Platten:

Zum Beladen der 96-Well Platten *[nunc™, Wiesbaden, Deutschland]* mit Antikörper pipettierten wir in jedes Well 100 µl des Capture Antikörpers, deckten die Platten ab und inkubierten sie über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend folgte dreimaliges Waschen der Platten mit Waschpuffer.

Nun wurden die Platten durch Zugabe von 300 µl Blockpuffer pro Well über einen Zeitraum von mindestens 1 h geblockt und erneut, wie oben beschrieben, gewaschen.

## Probenverarbeitung:

Um für die Auswertung eine Standardkurve zu erhalten, wurde von der Standardlösung eine Verdünnungsreihe in log 2- Schritten mit demselben Nährmedium hergestellt, in dem zuvor die Zellen kultiviert wurden [*Airway Epithelial Cell Growth Medium KIT* von *PromoCell®, Heidelberg, Deutschland* oder *RPMI 1640 mit L- Glutamin und 25 mmol HEPES* von *Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*]. Die verschiedenen Verdünnungsstufen wurden in Doppelbestimmung auf die Platte aufgetragen.

Außerdem wurden je 100 µl der Zellüberstände ebenfalls in Doppelbestimmungen auf die Platten gegeben. Um sicherzugehen, dass sich die IL-8-Konzentration der Proben innerhalb des Messbereiches befand, verdünnten wir diese zuvor 1:10 mit dem passenden Nährmedium [*Airway Epithelial Cell Growth Medium KIT,PromoCell®, Heidelberg, Deutschland oder RPMI 1640 mit L- Glutamin und 25 mmol HEPES von Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*].

Nun folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur, während der sich das in den Überständen gelöste IL-8 an den Capture Antikörper band.

Nach Ablauf dieser Zeit entfernten wir die Proben und wuschen die Platten erneut 3 Mal.

Nun wurde in jedes Well 100 µl des Detektion Antikörpers pipettiert und erneut für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte wieder ein dreimaliger Waschschritt.

Als nächstes gaben wir je 100 µl Streptavidin-HRP-Lösung hinzu und inkubierten die Platten für 20 min bei Raumtemperatur. Da die Streptavidin-HRP-Lösung lichtempfindlich ist, erfolgte die Inkubation im Dunkeln. Erneutes dreimaliges Waschen mit Waschpuffer schloss sich an.

Nach Zugabe von 100 µl Substratlösung und einer Inkubation von 20 min im Dunkeln, bildete sich proportional zu dem gebundenen IL-8 durch die an das Streptavidin gebundene Peroxidase und das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Substratlösung ein blauer Farbstoff. Die Reaktion wurde nun mit 50 µl Stopplösung pro Well beendet und anschließend die optische Dichte des Produktes mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und 540 nm gemessen. Durch anschließende Auswertung unter Verwendung der Standardkurve konnten die IL-8-Konzentrationen der Proben bestimmt werden.

#### 2.4.10 Chemotaxis-Assay

Reagenzien:

- Citrate-Dextrose Solution [*Sigma®, München, Deutschland*]
- Longasteril 70: Dextran 70 in 0,9 % NaCl [*Fresenius, Bad Homburg, Deutschland*]
- Ficoll-Paque™ Researche Grade [*Amersham Pharmacia Biotech AB®, Uppsala, Schweden*]
- 0,2 % NaCl- Lösung
- 1,6 % NaCl- Lösung
- Airway Epithelial Cell Growth Medium KIT [*PromoCell®, Heidelberg, Deutschland*]
- Hanks-- [*Seromed/Biochrome®, Berlin, Deutschland*] /0,1 % Chicken Egg Albumin [*Sigma®, München, Deutschland*]
- 0,4 % Trypanblau [*Sigma®, München, Deutschland*]
- Calcein AM [*MoBiTec®, Göttingen, Deutschland*]: 1 mg/ml in DMSO [*Sigma®, München, Deutschland*]

- Zymosan A [Sigma®, München, Deutschland]
- Pufferlösung: 50 % Nährmedium und 50 % HANKS –
- 0,5 g/l Chicken Egg Albumin [Sigma®, München, Deutschland]

Durchführung:

#### 2.4.10.1 Preparation der neutrophilen Granulozyten

Die für den Chemotaxis-Assay benötigten neutrophilen Granulozyten gewannen wir aus 20 ml frischen Vollblutes, das gesunden, freiwilligen Spendern abgenommen wurde. Dieses Blut wurde mit 2 ml Citrate-Dextrose Solution und 18 ml Longasteril gemischt und anschließend 1 h bei Raumtemperatur zur Sedimentation stehen gelassen. Das obere leukozytenreiche Plasma konnte nun mit einem Butterfly (BD Valu-Set™ von BD Infusion Therapy, Helsingborn, Schweden) in ein Falcon® Tube überführt und mit Ficoll im Verhältnis 1:1 unterschichtet werden.

Anschließend folgte eine Zentrifugation (21 °C, 2000 U/min, 20 min, ohne Bremse) [Megafuge 1.0 R, Haereus®]. Der sich bildende Überstand wurde vollständig abgesaugt und das Zellpellet vorsichtig agitiert.

Um noch etwaig vorhandene Erythrozyten zu lysieren, wurden zuerst 8 ml einer 0,2 % NaCl -Lösung für 15 - 20 s und anschließend 8 ml einer 1,6 % NaCl -Lösung ebenfalls für 15 - 20 s hinzugegeben. Die Lösung konnte nun mit Hanks--/0,1 % Albumin zu einem Endvolumen von 40 - 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert werden (1000 U/min, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde erneut abgesaugt, das Zellpellet agitiert und 5 ml der Hanks--/0,1 % Albumin-Lösung hinzugegeben.

Um die Zellzahl zu bestimmen mischten wir 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau 0,4 % [Sigma®, München, Deutschland], gaben sie in eine Neubauer Kammer

[Neubauer Zählkammer, Marienfeld®] und zählten sie unter dem Mikroskop [Leitz® DM IL] aus.

Nun wurden die gewonnenen Zellen gewaschen, indem man sie mit Hanks--/0,1 % Albumin auf ein Endvolumen von 40 ml auffüllte und zentrifugierte (1000 U/min, 5 min, bei 4 °C) [Megafuge 1.0 R, Haereus®]. Der Überstand wurde verworfen.

Zum Anfärben der neutrophilen Granulozyten gaben wir 2 ml Hanks--/0,1 % Albumin hinzu, resuspendierten die Lösung und fügten 12 µl Calcein AM hinzu. Die Lösungen wurden gut gemischt und in ein 2 ml Eppendorf® Cup überführt. Anschließend mussten sie 20 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert werden.

Nun konnten die Zellen in ein neues Falcon® Tube überführt und zweimal gewaschen werden. Dazu wurden je 28 ml Hanks--/0,1 % Albumin-Lösung zugegeben, die Zellen zentrifugiert (1200 U/min, 5 min, bei 4 °C) [Megafuge 1.0 R, Haereus®], der Überstand abgenommen und die Zellen agitiert.

Nach dem Waschen konnten wir die Zellzahl durch Zugabe von Nährmedium unter Verwendung der vorher bestimmten Zellmenge auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml einstellen. So wurde sichergestellt, dass in den verschiedenen Chemotaxis-Assays immer dieselbe Anzahl an neutrophilen Granulozyten eingesetzte wurde.

#### *2.4.10.2 Herstellung von ZAS (Zymosan aktiviertes Serum)*

Als Positivkontrolle in unseren Chemotaxisversuchen diente uns Zymosan aktiviertes Serum. Um dieses herzustellen benötigten wir das Vollblut von feiwilligen gesunden Spendern. Dieses konnte dann 5 min bei 20 °C und 3000 U/min zentrifugiert werden [Megafuge 1.0 R, Haereus®]. Anschließend pipettierten wir das so gewonnene Serum ab und gaben Zymosan A in einer Konzentration von 1 mg/ml hinzu. Dieses Reagenz

bewirkt eine Aktivierung der Komplementkaskade im Serum. Die sich so bildenden Spaltprodukte stellen einen starken Chemoattraktanten für neutrophile Granulozyten dar und kamen deshalb als Positivkontrolle in den folgenden Versuchen zum Einsatz. Um die Komplementkaskade zu aktivieren war eine Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C und 30 min bei 56 °C nötig.

Anschließend wurde die Mischung erneut zentrifugiert (10 min, bei 20 °C und 3000 U/min) [Megafuge 1.0 R, Haereus®] und der komplementreiche Überstand abpipettiert. Das so gewonnene Zymosan aktivierte Serum konnte nun aliquotiert und bei -20 °C max. für 6 Monate bis zur Verwendung gelagert werden.

#### *2.4.10.3 Beladen der Chemotaxis-Kammer:*

Die unteren Wells der Chemotaxis-Kammer [Neuroprobe™, Gaithersburg, USA] befüllten wir mit 29 µl unserer Zellüberstände von insgesamt 23 (16 männliche, 7 weibliche) verschiedenen Patienten, die wir bei den Stimulationsexperimenten der T25-Flaschen (unstimuliert, stimuliert mit 100 µg/ml Carbachol oder TNF-α in einer Konzentration von 10 ng/ml) gewonnen hatten. Diese dienten uns als Chemoattraktanten und wurden 1:10 vorverdünnt nach langsamem Auftauen eingesetzt. Die verschiedenen Proben wurden in 5facher Bestimmung untersucht, um Schwankungen zu minimieren. Als negative Kontrolle wurde die oben beschriebene Pufferlösung verwendet, als Positivkontrolle setzten wir ZAS (0,1 mg/ml) ein.

Über diese Proben wurden nun Filter [Neuroprobe™, Gaithersburg, USA] mit einer Porengröße von 3 µm im Durchmesser eingelegt. In die oberen Wells gaben wir je 25 µl unserer vorbereiteten Zellsuspension. Die Kammern wurden verschlossen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnten die unteren Kammern und der Filter in

dem Fluoreszenzreader gemessen werden. Die gemessene Extinktion war proportional zu den gewanderten neutrophilen Granulozyten.

#### 2.4.10.4 Checkerboard-Analyse:

Mit Hilfe der Checkerboard-Analyse wurde untersucht, ob die gemessene Wanderung der Granulozyten entlang eines Konzentrationsgradienten von chemotaktischen Substanzen stattfand (Chemotaxis) oder ein Effekt allgemein vermehrter Motilität der Zellen war.

Dafür wurden verschiedene Konzentrationen (0 %, 30 %, 60 %, 100 %) der Zellüberstände (stimuliert mit 100 µg/ml Carbachol) oberhalb und unterhalb des Filters in 5facher Bestimmung gegeben, die als Chemoattraktanten dienten (Tabelle 5). Dadurch ergaben sich verschiedene Konzentrationgefälle, die Einfluss auf das Wanderungsverhalten der Granulozyten nehmen sollten. Ansonsten wurde der Versuch wie oben beschrieben durchgeführt.

Oberes Well Unteres Well	0%	30%	60%	100%
0%				
30%				
60%				
100%				

**Tabelle 5:**

Dargestellt ist das Pipettierschema der Checkerboard-Analyse. Die farbigen Wells zeigen die Konzentrationskombinationen ohne Konzentrationsgefälle auf.

## 2.4.11 Calciumimaging

Reagenzien:

- Krebs-Ringer Lösung:
  - 0,12 mol/l NaCl
  - 5,0 mmol/l KCl
  - 1,0 mmol/l MgSO<sub>4</sub>
  - 1,0 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 3,0 mmol/l CaCl<sub>2</sub>
  - 0,02 mol/l NaHCO<sub>3</sub>
  - 6,0 mmol/l D-Glukose
  - 27 µmol/l EDTA
- 5 µM Fluo-4 [Sigma®, München, Deutschland] in DMSO [Sigma®, München, Deutschland]
- 0,1% Pluronic [Sigma®, München, Deutschland]
- Carbachol [Sigma®, München, Deutschland]
- ATP [Sigma®, München, Deutschland]
- primäre Bronchialepithelzellen auf 96-Well Platten

Durchführung:

Bei dem Calciumimaging handelt es sich um eine Methode, die es erlaubt, intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Signale sichtbar zu machen. Wir verwendeten hierzu wieder die primären humanen Bronchialepithelzellen, die wir wie unter 2.4.1 auf kollagenbeschichteten 96-Well Platten [nunc™, Wiesbaden, Deutschland] kultivierten und die Zelllinie BEAS 2 B (auf unbeschichteten 96-Well Platten [nunc™, Wiesbaden, Deutschland] kultiviert).

Nachdem die Zellen zu 80 - 90 % konfluent waren, wurden sie mit der Krebs-Ringer Lösung gewaschen. Anschließend pipettierten wir in jedes Well 100 µl Krebs-Ringer Lösung, 5 µl Fluo-4 in DMSO und 0,1 % Pluronic und inkubierten die Platten 1 h bei 37 °C.

Fluo-4 ist ein Farbstoff, der durch die Zellmembranen diffundieren kann. Intrazelluläre Esterasen spalten dann die in Fluo-4 enthaltene Esterbindung. Danach kann der Farbstoff die Zellen durch die Zellmembran nicht mehr verlassen. Nach Bindung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> ändert der Farbstoff seine optischen Eigenschaften und kann nach entsprechender Anregung fluoreszieren.

Das hinzugegebene Pluronic erhöht die Löslichkeit von Fluo-4, so dass mehr Farbstoff in die Zellen diffundiert.

Nach Ablauf dieser Zeit mussten die Zellen erneut mit der Krebs-Ringer Lösung gewaschen werden. Von dieser Lösung wurden dann erneut 100 µl in jedes Well gegeben. Nun konnten die Zellen durch Zugabe von Carbachol (100 µg/ml) stimuliert werden. Als Positivkontrolle diente uns 100 µM ATP. Unter dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M [*Zeiss, Göttingen, Deutschland*] konnte nun das Aufleuchten der Zellen beobachtet und dokumentiert werden.

## 2.5 Statistische Verfahren

Die Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz der gewonnenen Daten wurde unter Verwendung des t-Tests nach Student ermittelt. Bei der Darstellung dieser Ergebnisse verwendeten wir als Signifikanzniveau \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ . Zur besseren Übersicht wurden in einzelnen Fällen noch der Minimalwert und der Maximalwert angegeben. Auch die Darstellung mittels Box Plot unter Verwendung eines nicht-parametrischen Testverfahren (Mann-Whitney-Test) bei nicht normalverteilten Werten kam zum Einsatz.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patienten

Als Ausgangsmaterial für die Experimente dienten Bronchialepithelzellen von Patienten, die sich während ihres Klinikaufenthaltes aus diagnostischen Gründen einer Bronchoskopie unterzogen. Insgesamt waren 28 Patienten im Alter von 28 bis 77 Jahren (mittleres Alter  $57 \pm 14$  Jahre) bereit, als Spender für die Zellen zu fungieren.

Unter diesen befanden sich 9 Frauen und 19 Männer.

6 dieser Patienten waren aktive Raucher, 7 Nichtraucher und 9 Ex-Raucher. Von 6 Patienten war nichts über ihr Rauchverhalten bekannt.

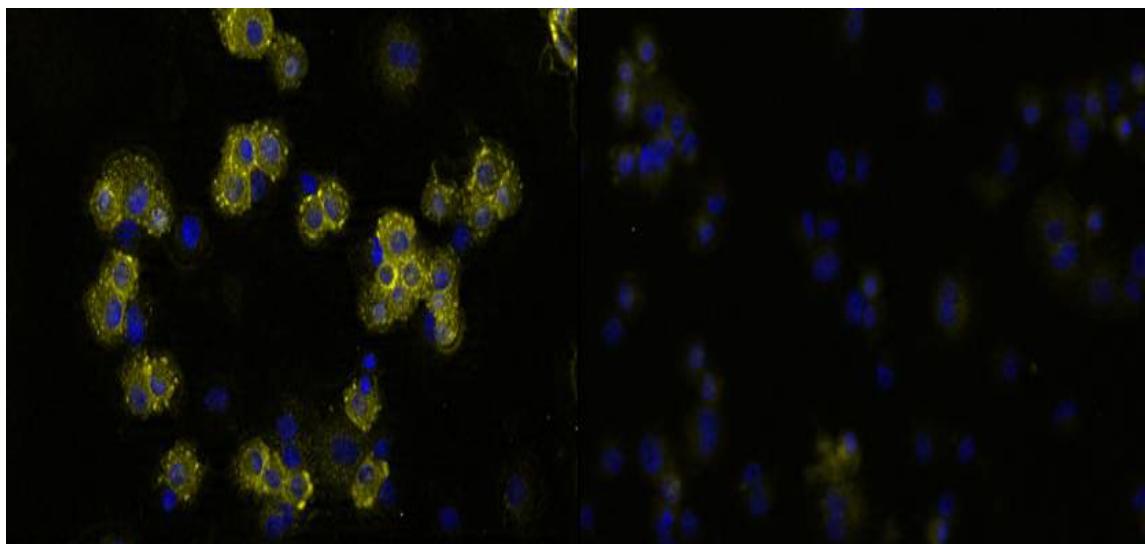
Die Spender befanden sich aus unterschiedlichen Gründen in unserem Klinikum: Bei 6 Patienten war eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung bekannt, bei 9 bestand der Verdacht auf ein tumoröses Geschehen in der Lunge, 10 litten an einer entzündlichen Erkrankung der Atemwege und 7 der Patienten waren zum Ausschluss einer interstitiellen Lungenerkrankung in unserem Haus. Wie man den Zahlen entnehmen kann, lagen bei 6 Patienten mehr als eine Diagnose vor. Vier Patienten hatten andere Erkrankungen, die sich nicht in die oberen Gruppen einordnen ließen.

### 3.2 Nachweis von M<sub>3</sub>-Rezeptoren auf primären humanen

#### Bronchialepithezelzellen

In der Literatur wird vorbeschrieben, dass humane Bronchialepithezelzellen muscarinerge Rezeptoren vom M<sub>3</sub>-Typ auf ihrer Oberfläche exprimieren [29]. Für die Stimulationsexperimente mit Carbachol war es von entscheidender Bedeutung, dass die primären humanen Bronchialepithezelzellen diese nach der Gewinnung mittels Bürstentechnik und nach Kultivierung über einige Tage im Kulturmedium auch weiterhin ausbildeten. Daher wiesen wir die Oberflächenrezeptoren vor Beginn der Stimulationsexperimente mittels Immunfluoreszensmikroskopie nach.

Wie sich zeigte, konnten wir diese Rezeptoren mittels spezifischer Antikörper anfärben. Im Gegensatz zu den mit IgG aus Kaninchenserum inkubierten Zellen, die bis auf den mit DAPI angefärbten Zellkern keine Signale zeigten und uns als Negativkontrolle dienten, detektierten wir bei den mit anti-M<sub>3</sub>-Antikörpern behandelten Zellen deutliche Fluoreszenz. Die Signale waren dabei im Bereich der gesamten Zelle zu sehen, was zu den Oberflächenrezeptoren passt. Damit konnten wir sichergehen, dass die primären humanen Bronchialepithezelzellen auch nach der Kultivierung die M<sub>3</sub>-Rezeptoren aufwiesen und so einer Stimulierung mit Carbachol zugänglich waren.



**Abbildung 3 a:**

*Immunzytochemischer Nachweis und Verteilung von muscarinergen Rezeptoren vom Typ  $M_3$  auf primären humanen Bronchialepithelzellen.*

*Die Abb. 3 a zeigt die Fluoreszenzantwort der Zellen nach Inkubation mit anti- $M_3$ -Antikörpern, während die Abb. 3 b die Negativkontrolle darstellt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte durch das Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M bei 20facher Vergrößerung.*

**Abbildung 3 b:**

### 3.3 IL-8-ELISA der PBEC auf 96-Well Platten

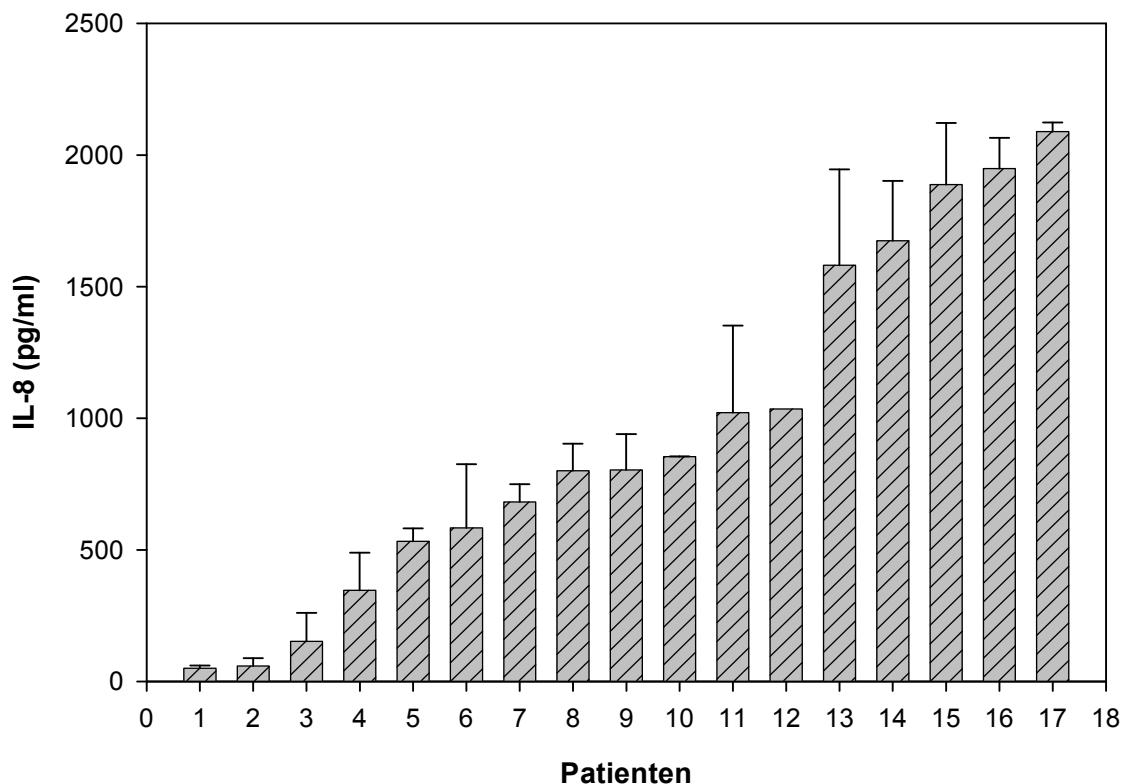
#### 3.3.1 Basale IL-8- Produktion

In der Auswertung des IL-8-ELISA der einzelnen Patienten zeigte sich, dass die verschiedenen Proben der primären Bronchialepithelzellen bei gleichen Kulturbedingungen basal, also ohne jegliche Stimulation, in der Lage waren, unterschiedliche Mengen an IL-8 innerhalb von 16 h zu produzieren.

Es ergab sich dabei ein Minimum, das bei 50,58 ( $\pm 10,0$ ) pg/ml an IL-8 lag, während maximal ein Wert von 2088,58 ( $\pm 34,28$ ) pg/ml in dem oben genannten Zeitraum er-

reicht wurde. Somit fand sich innerhalb der verschiedenen Zellproben eine basale IL-8-Produktion, die sich um das 40,96fache unterschied.

Die Abbildung 4 fasst diese Ergebnisse noch einmal zusammen.



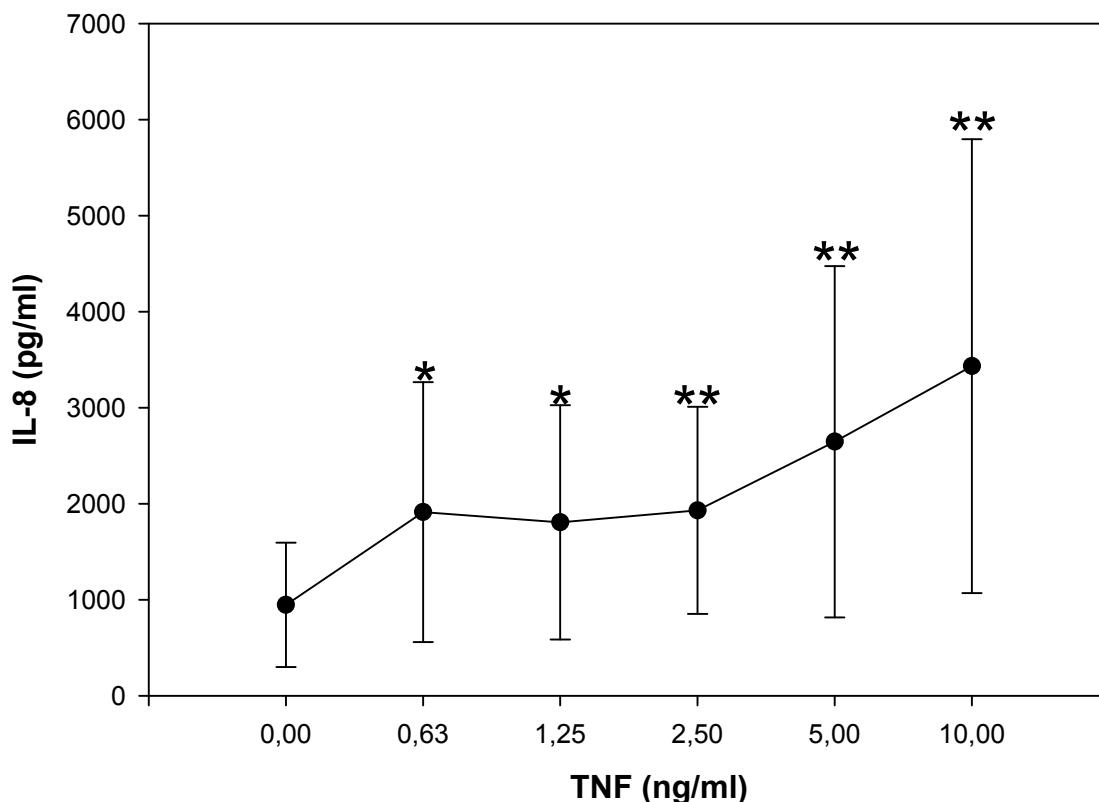
**Abbildung 4:**

Dargestellt ist die unterschiedliche basale IL-8-Produktion der 17 untersuchten Patientenproben innerhalb von 16 h Kultivierung geordnet nach Höhe der basalen IL-8-Produktion. Pro Patient wurden 4 Einzelmessungen in Doppelbestimmung durchgeführt. Dargestellt sind der Mittelwert und die dazugehörigen Standardabweichungen.

### 3.3.2 Wirkung von TNF- $\alpha$ auf die IL-8 Produktion

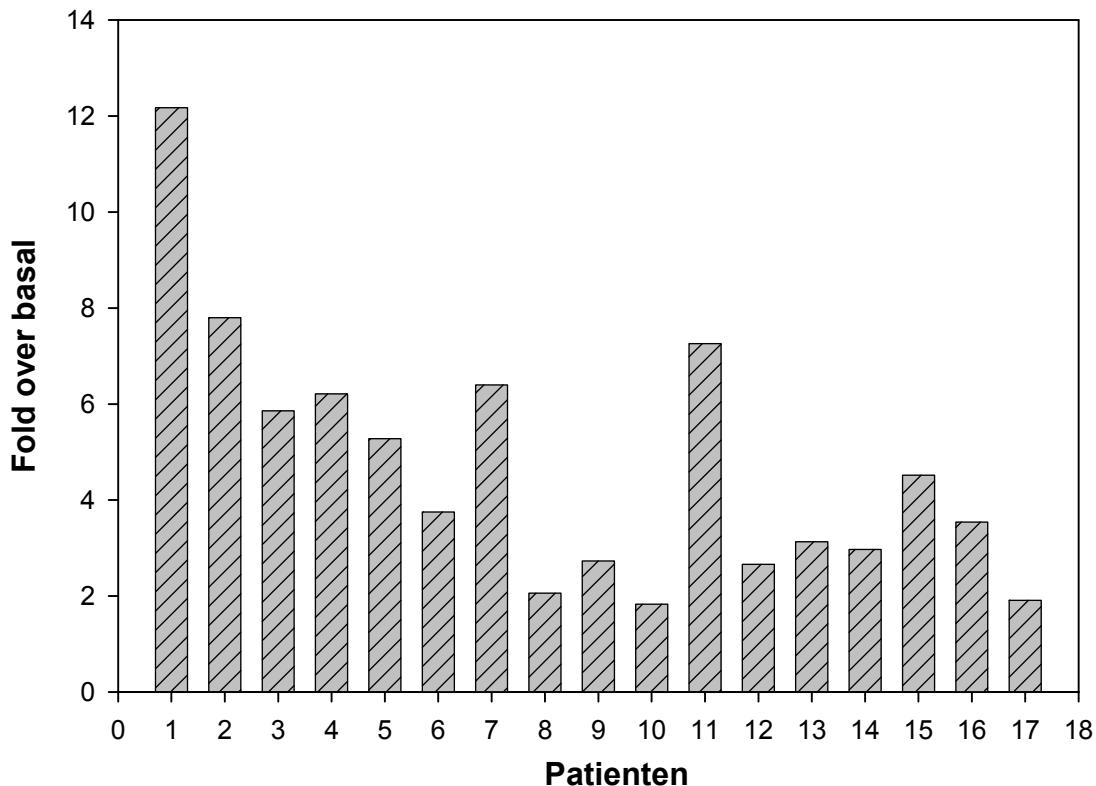
Es konnte gezeigt werden, dass in primären Bronchialepithelzellen TNF- $\alpha$  konzentrationsabhängig (0,0 ng/ml, 0,625 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5,0 ng/ml und 10 ng/ml) die IL-8-Produktion signifikant steigert ( $p<0,05$ ). Die Bildung von IL-8 war annähernd linear, wobei man bei der geringsten Menge an TNF- $\alpha$  (0,626 ng/ml) im Mittel 1912,75 ( $\pm$  1353,64) pg/ml an IL-8 fand, während sich maximal bei einer Konzentration von 10 ng/ml TNF- $\alpha$  3433,43 ( $\pm$  2364,09) pg/ml IL-8 nachweisen ließen. Die Ergebnisse werden in der Abbildung 5 noch einmal dargestellt.

Wie sich jedoch zeigte, kam es zu starken Schwankungen dieser Stimulationsergebnisse innerhalb der Patientenpopulation. Es fand sich eine Bandbreite der Produktion von IL-8, die zwischen dem 1,83-fachen bis zu dem 12,17-fachen über der basalen Produktion bei einer Konzentration von 10 ng/ml TNF- $\alpha$  lag (Abb. 6) Interessanterweise ließ sich der Trend erkennen, dass die Patientenproben, die basal wenig IL-8 bildeten, sich zu einer höheren Produktion stimulieren ließen, als dies bei Patientenproben der Fall war, die basal schon eine große Menge an IL-8 produzierten.



**Abbildung 5:**

Die Graphik zeigt die signifikant gesteigerte IL-8-Produktion der primären Bronchialepithelzellen durch verschiedene Konzentrationen von TNF- $\alpha$  (pro Patient wurden 4 Einzeltestungen in Doppelbestimmung durchgeführt, aufgetragen sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen). \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  gegenüber basal



**Abbildung 6:**

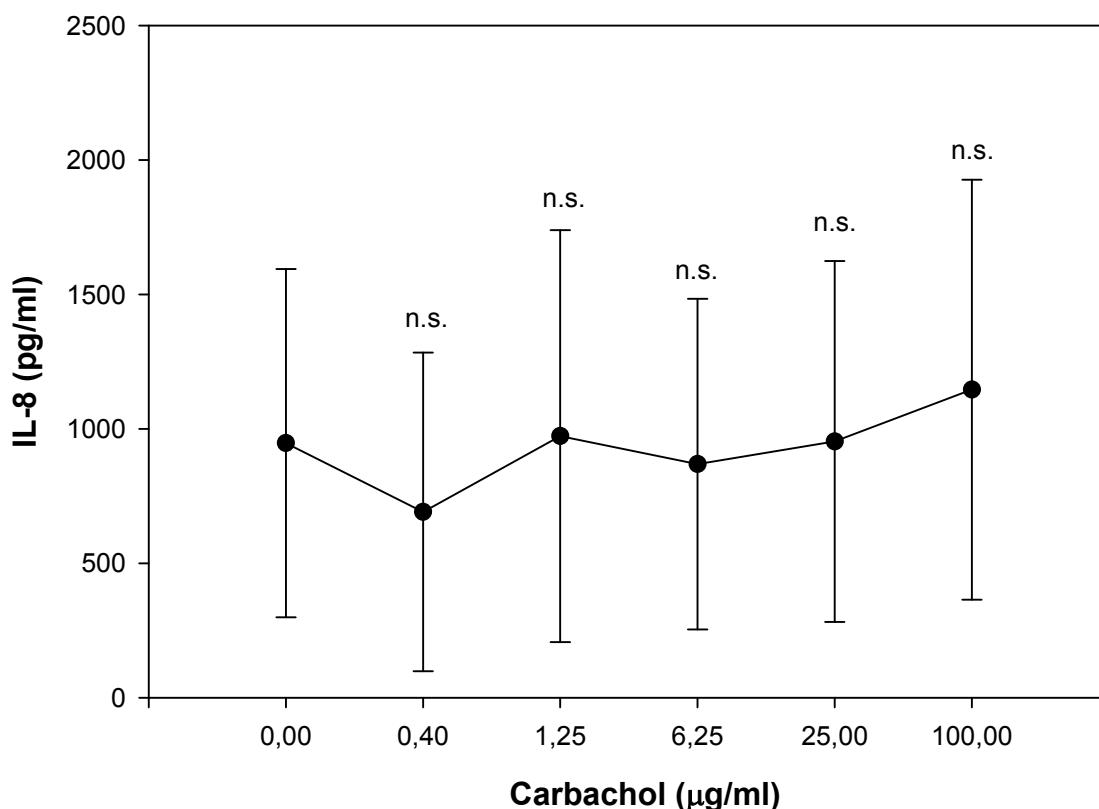
Dargestellt sind exemplarisch die Fold over basal (das Vielfache der basalen IL-8-Produktion) aus n=4 Experimenten der einzelnen Patienten bei einer Konzentration von 10 ng/ml TNF- $\alpha$ .

### 3.3.3 Wirkung von Carbachol auf die IL-8-Produktion

Wir untersuchten, ob Carbachol konzentrationsabhängig (0,0 µg/ml, 0,4 µg/ml, 1,25 µg/ml, 6,25 µg/ml, 25 µg/ml, 100 µg/ml) die bronchoepitheliale IL-8-Freisetzung zu steigern vermag.

Dabei konnten wir nicht belegen, dass Carbachol einen Einfluss auf die Bildung von IL-8 durch primäre humane Bronchialepithelzellen hat. Die basale IL-8-Produktion

ließ sich nach 16 h im Mittel bei keiner der gewählten Konzentrationen signifikant steigern ( $p>0,05$ ), sondern blieb annähernd konstant. Dies wird in Abbildung 7 noch einmal dargestellt.



**Abbildung 7:**

Die Graphik zeigt die Produktion von IL-8 durch die primären Bronchialepithelzellen nach der Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von Carbachol über 16 h. Aufgetragen sind die Mittelwerte der 17 Patientenproben und die dazugehörigen Standardabweichungen ( $n=4$ ).

### 3.4 IL-8 Produktion der primären Bronchialepithezelzellen in T25-Zellkulturflaschen

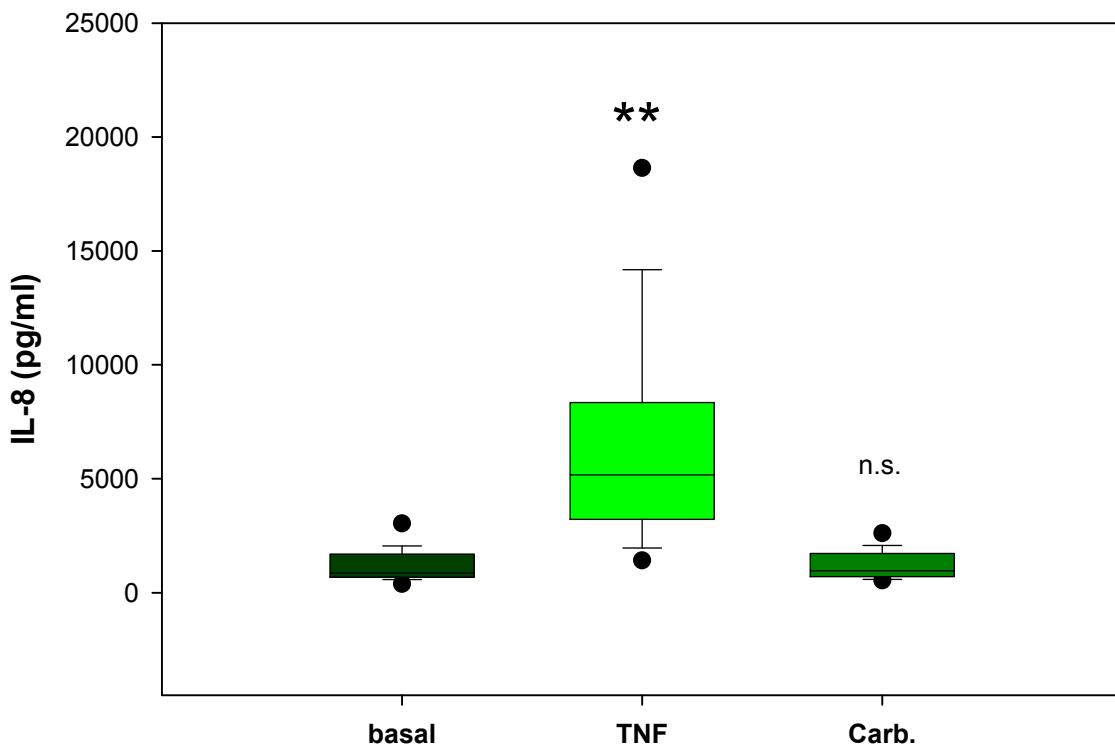
Die Stimulation der primären humanen Bronchialepithezelzellen erfolgte auch in T25 (=25 cm<sup>2</sup>) Zellkulturflaschen, um auszuschließen, dass die Kulturbedingungen der 96-Well Platten Einfluss auf die Ergebnisse, z.B. durch Anhäufung von sauren Zellmetaboliten, nahm. Die Experimente wurden mit einer Konzentrationskombination von TNF-α (10 ng/ml) und Carbachol (100 µg/ml) wiederholt. Für den Inkubationszeitraum wählten wir erneut 16h.

In der Auswertung des IL-8-ELISA konnten dabei die Ergebnisse der 96-Well Platten bestätigt werden. Die primären Bronchialepithezelzellen produzierten auch unter diesen Kulturbedingungen basal IL-8. Hierbei lag der Wert im Mittel bei 1223,17 pg/ml ( $\pm$  809,13 pg/ml).

Durch Stimulation mit TNF-α in einer Konzentration von 10 ng/ml ließ sich diese basale Produktion signifikant steigern ( $p<0,01$ ). Der Mittelwert lag hierbei bei 6781,33 pg/ml ( $\pm$  4870,80 pg/ml). Somit erreichte man eine um das 5,54-fache gesteigerte IL-8-Produktion.

Nach Inkubation der Zellen mit 100 µg/ml an Carbachol konnten wir keine gesteigerte Produktion von IL-8 nachweisen ( $p>0,05$ ). Die Menge an gebildetem IL-8 war mit 1248,38 µg/ml  $\pm$  743,88 µg/ml annähernd gleich zu der basal gebildeten Menge.

Die Abbildung 8 stellt die Ergebnisse noch einmal dar.



**Abbildung 8:**

Der Graph zeigt die Produktion von IL-8 durch humane primäre Bronchialepithelzellen unstimuliert, stimuliert mit TNF- $\alpha$  (10ng/ml) und Carbachol (100 $\mu$ g/ml) innerhalb von 16 h in T25 Zellkulturfälschen. Aufgetragen sind die Ergebnisse ( $n=4$ ) von 24 Patientenproben (17 männliche, 7 weibliche).

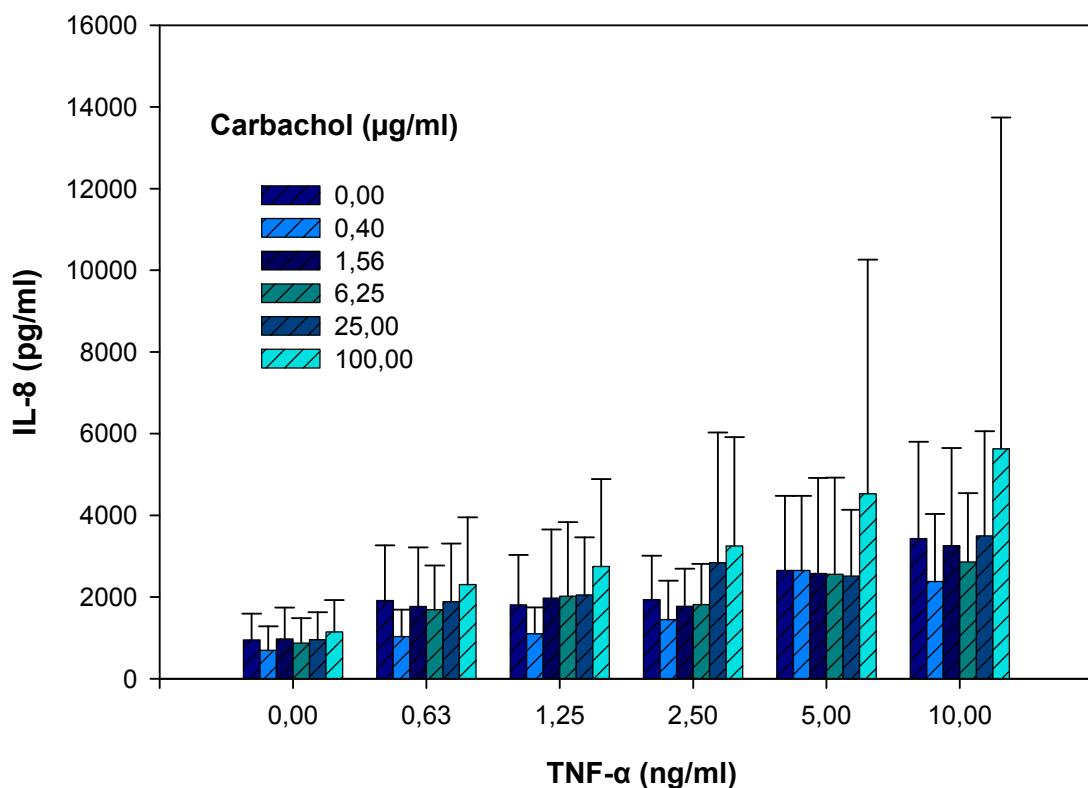
Dargestellt sind jeweils die 25. und 75. Perzentile als Begrenzung des Boxplot. Die Linie entspricht dem Median. Die Fehlerbalken repräsentieren die 5. und 95. Perzentile, während darüber hinaus gehende Einzelwerte als Punkte gesondert erkennbar sind. \*\* =  $p < 0,01$

### 3.5 Gleichzeitige Stimulation der PBEC mit Carbachol und TNF- $\alpha$ mittels Schachbretttitration

Im Verlauf der Experimente untersuchten wir, ob die primären Bronchialepithelzellen nach einer simultanen Stimulation mit TNF- $\alpha$  und Carbachol signifikant mehr IL-8 produzierten. Da es durch eine alleinige Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von Carbachol nicht zu einer gesteigerten IL-8-Bildung kam, gingen wir der Frage nach, ob hierfür eine Vorstimulation der Zellen mittels TNF- $\alpha$  nötig sei, also ein synergistischer Effekt zwischen beiden Stoffen bestand.

Durch die verwendete Schachbretttitration konnten wir die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von TNF- $\alpha$  (0,0 ng/ml, 0,63 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5,0 ng/ml, 10,0 ng/ml) zusammen mit verschiedenen Konzentrationen an Carbachol (0,0  $\mu$ g/ml, 0,4  $\mu$ g/ml, 1,25  $\mu$ g/ml, 6,25  $\mu$ g/ml, 25,0  $\mu$ g/ml, 100,0  $\mu$ g/ml) genauer bestimmen. Es ergaben sich damit 36 verschiedenen Konzentrationskombinationen beider Stoffe.

Wie sich herausstellte, bestand bei keiner dieser Kombinationen ein synergistischer Effekt innerhalb der gewählten 16 h Inkubationszeit. Zwar produzierten die Bronchialepithelzellen mit steigenden Konzentrationen von TNF- $\alpha$  auch signifikant ( $p<0,05$ ) vermehrt IL-8 (wie oben beschrieben), jedoch ließ sich diese Produktion durch keine Konzentration von Carbachol im Sinne eines synergistischen Effektes weiter steigern oder vermindern (Abb. 9)



**Abbildung 9:**

Die Graphik zeigt die Ergebnisse der Schachbrett titration der PBEC. Auf der x-Achse sind die verschiedenen Konzentrationen von TNF- $\alpha$  aufgetragen, während die unterschiedlichen Farben der Balken die verschiedenen Konzentrationen von Carbachol wiedergeben, so dass die 36 Konzentrationskombinationen dargestellt werden (aufgetragen wurden die Mittelwerte der 17 Patientenproben und die zugehörigen Standardabweichungen;  $n=4$ ).

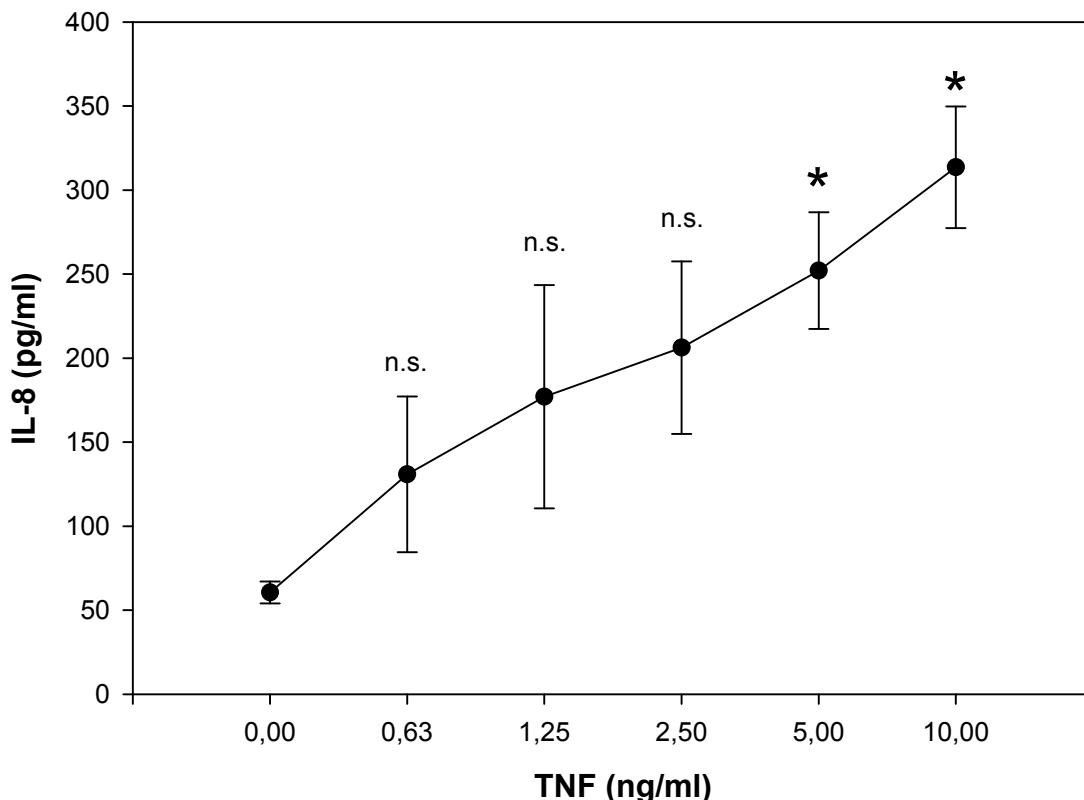
### 3.6 IL-8-Produktion der Zelllinie BEAS 2 B auf 96- Well Platten

#### 3.6.1 Basale IL-8-Produktion

Auch die Zelllinie BEAS 2 B produzierte ohne Stimulation IL-8 in einem Zeitraum von 16 h. Die produzierte Menge erreichte im Mittel einen Wert von  $60,53 (\pm 6,52)$  pg/ml und lag damit deutlich unter der Menge, die von primären humanen Bronchialepithelzellen basal gebildet wurde ( $947,0 \pm 648,0$  pg/ml).

#### 3.6.2 Wirkung von TNF- $\alpha$ auf die IL-8-Produktion

Die Analyse der Zellüberstände im IL-8-ELISA, die von der Zelllinie BEAS 2 B nach einer Stimulation mit unterschiedlichen Mengen von TNF- $\alpha$  (0,0 ng/ml, 0,625 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml) über 16 h gebildet wurden, zeigte, dass sich auch diese Zellen zu einer vermehrten Bildung von IL-8 stimulieren ließen. Die produzierte Menge lag dabei zwischen  $130,84 (\pm 46,34)$  pg/ml bei 0,625 ng/ml TNF- $\alpha$  und  $313,55 (\pm 36,27)$  pg/ml bei 100 ng/ml TNF- $\alpha$ . Allerdings war im Vergleich zur basalen Bildung die produzierte IL-8 Menge nur bei einer Konzentration von 5,0 ng/ml und 10 ng/ml TNF- $\alpha$  signifikant erhöht ( $p<0,05$ ). Bei geringeren Mengen von TNF- $\alpha$  konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden. Damit unterschied sich die Zelllinie von den primären humanen Bronchialepithelzellen, die schon nach Stimulation mit der geringsten Menge TNF- $\alpha$  (0,626 ng/ml) signifikant mehr IL-8 bildeten. Die Ergebnisse werden in folgender Abbildung (Abb. 10) noch einmal graphisch zusammengefasst.



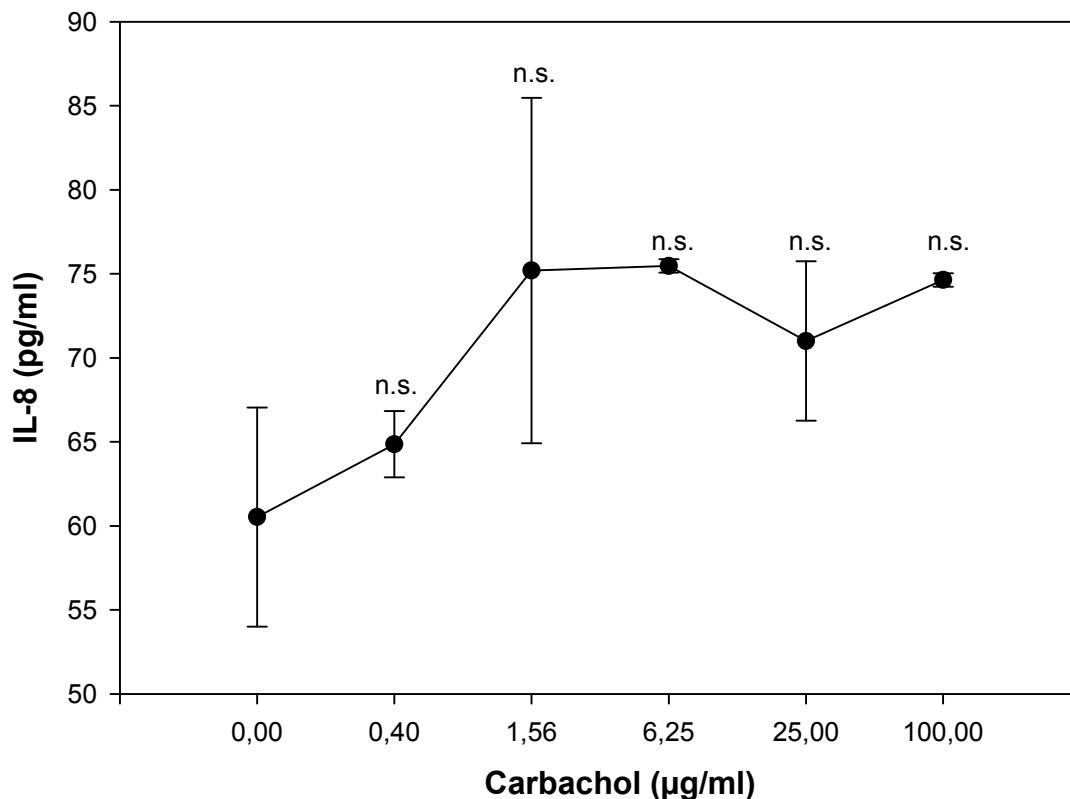
**Abbildung 10:**

Die Graphik zeigt die signifikant gesteigerte IL-8 Produktion der Zelllinie BEAS 2 B ab einer Konzentration von 5,0 ng/ml an TNF- $\alpha$  (aufgetragen sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen von n=2 Experimenten). \* = p<0,05

### 3.6.3 Wirkung von Carbachol auf die IL-8-Produktion

In Analogie zu den Experimenten an primären humanen Bronchialepithelzellen wurde untersucht, ob die Stimulation der BEAS 2 B-Zellen mit Carbachol zu einer vermehrten IL-8-Produktion über 16 h führte. Nach Auswertung des IL-8-ELISA zeigte sich, dass es im Vergleich zur basal produzierten Menge bei keiner der gewählten Konzentrationen von Carbachol (100 µg/ml, 25 µg/ml, 6,25 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,4 µg/ml) zu einer signifikant vermehrten IL-8-Bildung (p>0,05) kam.

Damit verhielt sich die Zelllinie BEAS 2 B genau wie die primären humanen Bronchialepithelzellen. Die Abbildung 11 zeigt die erhobenen Daten noch einmal.



**Abbildung 11:**

Die Graphik zeigt die Produktion von IL-8 durch die Zelllinie BEAS 2 B nach der Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von Carbachol über 16 h. Aufgetragen sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen von n=2 Experimenten.

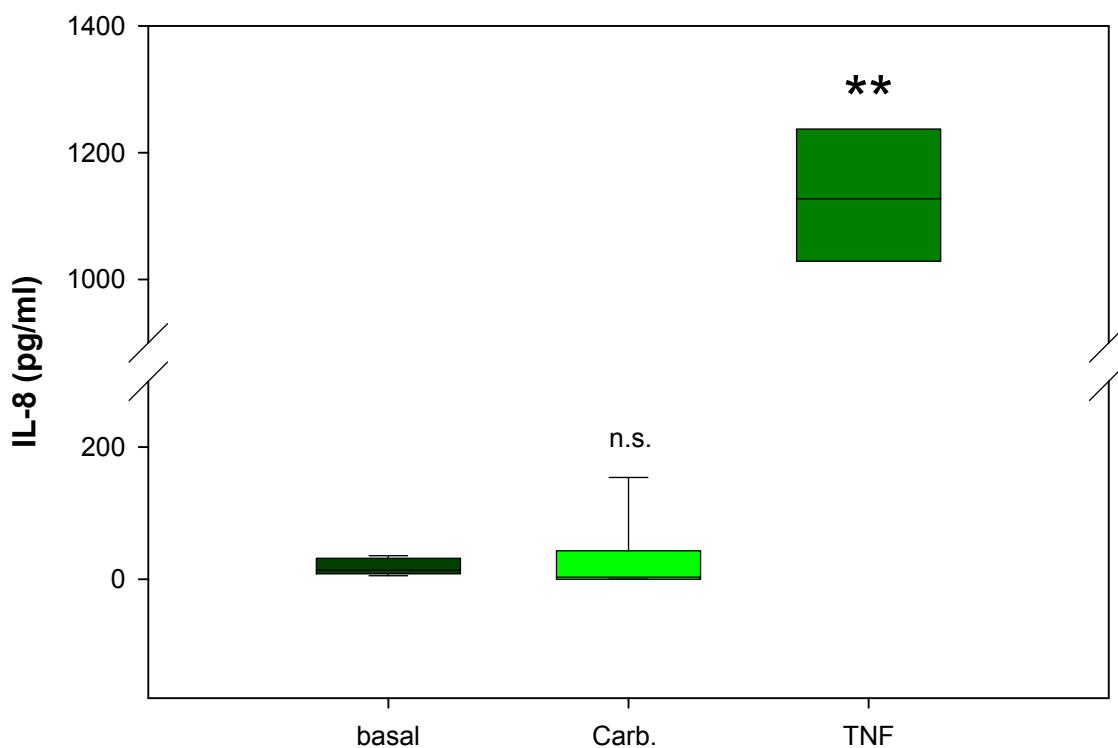
### 3.7 IL-8-Produktion der Zelllinie BEAS 2 B in T25-Zellkulturflaschen

Auch bei den BEAS 2 B-Zellen analysierten wir die Produktion von IL-8 ohne Stimulation und nach Inkubation der Zellen mit Carbachol in einer Konzentration von 100 µg/ml und TNF-α (10 ng/ml) über 16 h in T25-Zellkulturflaschen.

Dabei konnten die Ergebnisse aus der Schachbrettitration bestätigt werden. Die Zelllinie produzierte im Mittel 17,78 ( $\pm$  11,76) pg/ml an IL-8 ohne Stimulation. Nach Zugabe von 10 ng/ml TNF-α als Positivkontrolle ließ sich diese Produktion signifikant ( $p<0,01$ ) auf 1132,75 ( $\pm$  108,98) pg/ml steigern. Dies entspricht einer Steigerung um den Faktor 63,7.

Nach der Inkubation der Zellen mit Carbachol in einer Konzentration von 100 µg/ml fanden sich Werte um 32,61 ( $\pm$  60,83) pg/ml. Dabei konnte zwischen der basal produzierenden Menge und den Ergebnissen nach Zugabe von Carbachol mit  $p>0,05$  keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die BEAS 2 B-Zellen auch unter anderen Kulturbedingungen durch Carbachol nicht zu einer vermehrten Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 angeregt werden konnten.

Die Abbildung 12 stellt diese Ergebnisse noch einmal dar.



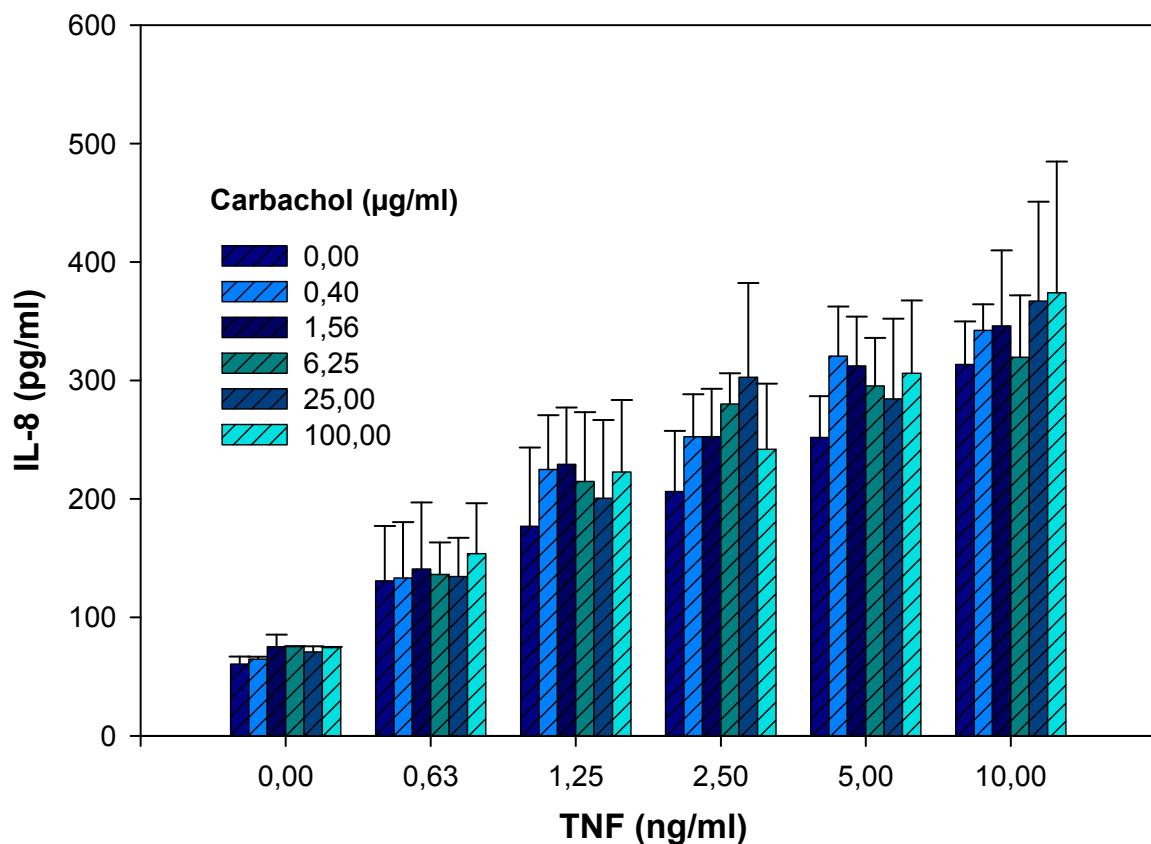
**Abbildung 12:**

Der Graph zeigt die Produktion von IL-8 durch die Zelllinie BEAS 2 B unstimuliert, stimuliert mit TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und Carbachol (100  $\mu$ g/ml) über einen Zeitraum von 16 h in T25- Zellkulturflaschen

Dargestellt sind jeweils die 25. und 75. Perzentile als Begrenzung des Boxplot. Die Linie entspricht dem Median. Die Fehlerbalken repräsentieren die 5. und 95. Perzentile. \*\* =  $p < 0,01$ . Dargestellt sind die Werte von  $n=4$  Einzelexperimenten.

### **3.8 Gleichzeitige Stimulation der BEAS 2 B Zellen mit Carbachol und TNF- $\alpha$ mittels Schachbretttitration**

Auch bei dieser Zelllinie untersuchten wir, ob nach einer Vorstimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  ein positiver Effekt von Carbachol auf die IL-8-Produktion demaskiert werden kann. Hierzu stimulierten wir die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- $\alpha$  (0,0 ng/ml, 0,625 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5,0 ng/ml und 10 ng/ml) und gleichzeitig mit mehreren Konzentrationen von Carbachol (100  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml, 6,25  $\mu$ g/ml, 1,56  $\mu$ g/ml, 0,4  $\mu$ g/ml) über einen Zeitraum von 16 h. Somit ergaben sich auch hier 36 verschiedene Konzentrationskombinationen. Es zeigte sich, dass zwar mit steigender Konzentration von TNF- $\alpha$  auch die IL-8-Menge zunahm, aber die Bildung dieses Stoffes unabhängig von der zugegebenen Menge an Carbachol war. Bei keiner der gewählten Konzentrationskombinationen konnte somit ein synergistischer Effekt zwischen beiden Stoffen aufgezeigt werden. Graphisch dargestellt werden die Ergebnisse in Abbildung 13.



**Abbildung 13:**

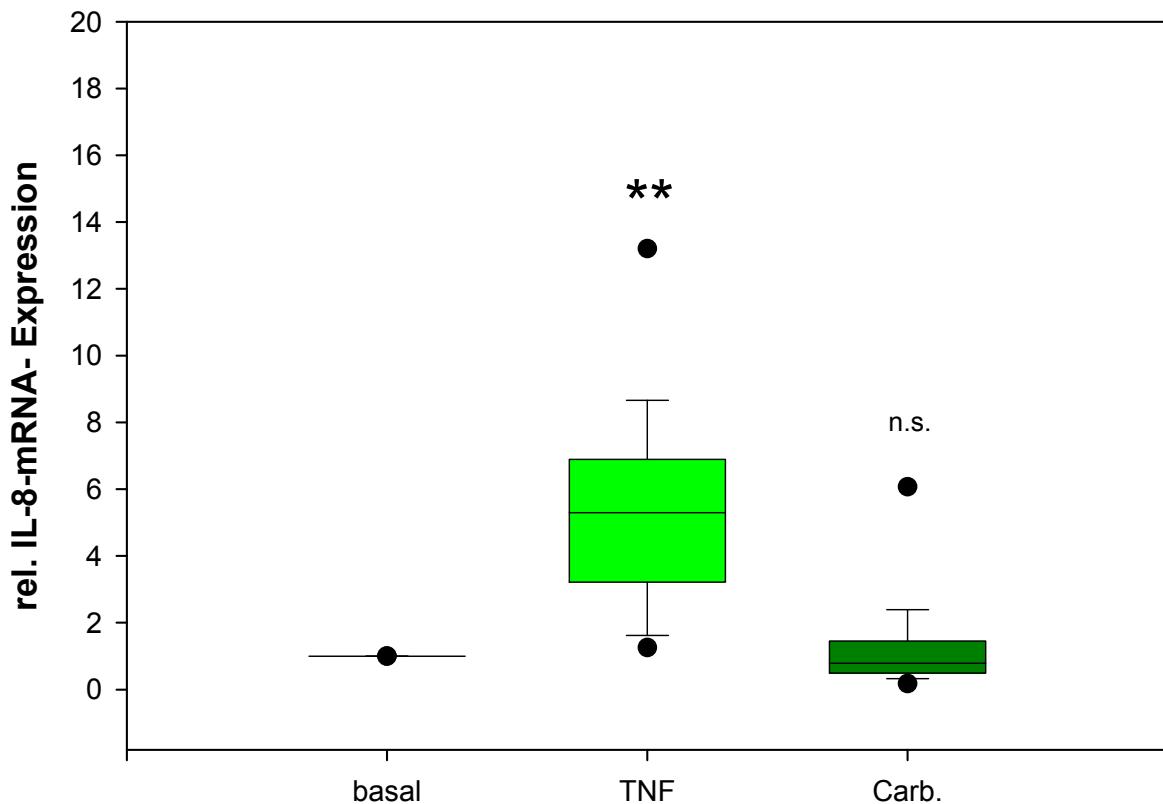
Die Graphik zeigt die Ergebnisse der Schachbrettitration. Auf der x-Achse sind die verschiedenen Konzentrationen von TNF- $\alpha$  aufgetragen, während die unterschiedlichen Farben der Balken die verschiedenen Konzentrationen von Carbachol wiedergeben, so dass die 36 Konzentrationskombinationen dargestellt werden (aufgetragen wurden die Mittelwerte der Zelllinie BEAS 2 B und die zugehörigen Standardabweichungen). Pro Kombinationsmöglichkeit wurden  $n=2$  Experimente in Doppelbestimmungen durchgeführt.

### 3.9 Light Cycler-Auswertung der PBEC

Im Folgenden gingen wir der Frage nach, ob es durch die Inkubation der Zellen mit Carbachol in einer Konzentration von 100 µg/ml und TNF-α in einer Konzentration von 10 ng/ml zu einer vermehrten Expression von IL-8- und M<sub>3</sub>-mRNA kam. Dazu verwendeten wir die RNA-Proben von 21 Patienten (14 männliche, 7 weibliche), die wir im Light Cycler quantifizierten.

Wie sich zeigte, ließen sich die Ergebnisse, die wir in der Auswertung des IL-8-ELISA erhielten, bestätigen. Nach der Inkubation der Zellen mit TNF-α über 16 h, stieg die IL-8-mRNA bezogen auf den basalen Wert signifikant ( $p<0,01$ ) an. Die IL-8-Expression konnte dabei um das 5,5-fache gesteigert werden.

Bei den mit Carbachol stimulierten Zellen konnte keine vermehrte Bildung dieser mRNA nachgewiesen werden. Es zeigte sich im Mittel eine Erhöhung der IL-8-mRNA um das 1,37-fache, was in der Auswertung keine statistische Signifikanz erreichte ( $p>0,05$ ). Dies wird in Abbildung 14 noch einmal dargestellt.



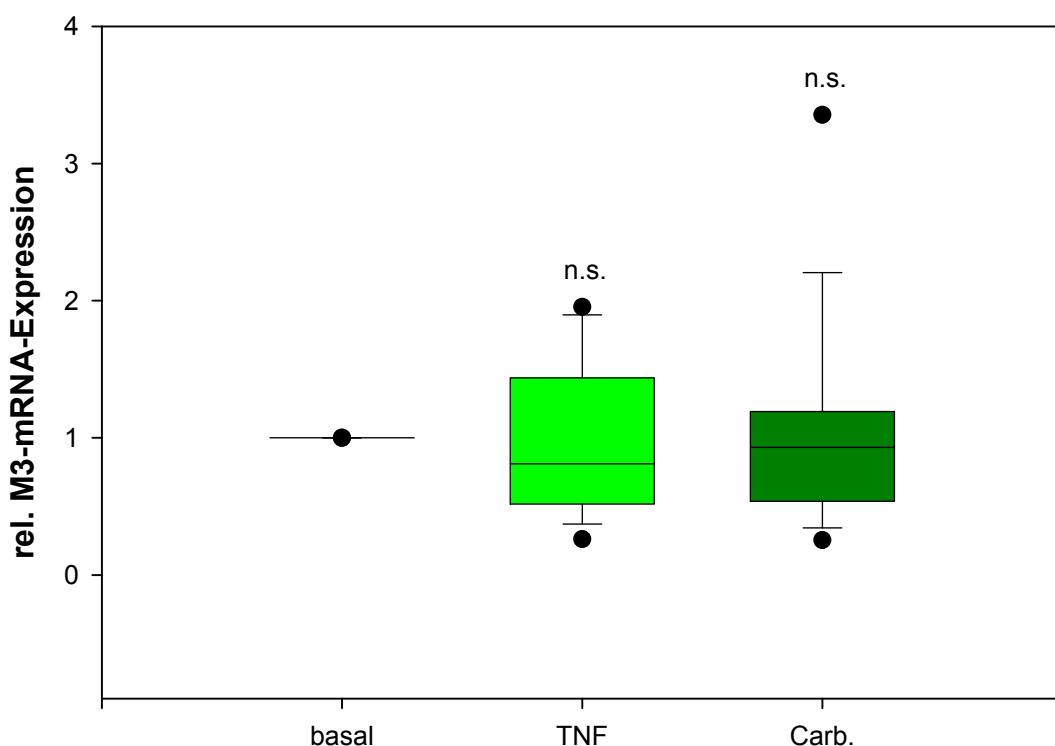
**Abbildung 14:**

RT-PCR Analyse der IL-8-mRNA-Expression von 21 Patientenproben nach Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und Carbachol (100  $\mu$ g/ml). Aufgetragen wurden die Werte bezogen auf den basalen IL-8-mRNA-Spiegel.

Dargestellt sind jeweils die 25. und 75. Perzentile als Begrenzung des Boxplot. Die Linie entspricht dem Median. Die Fehlerbalken repräsentieren die 5. und 95. Perzentile, während darüber hinaus gehende Einzelwerte als Punkte gesondert erkennbar sind. \*\* =  $p < 0,01$

Weiterhin wurde deutlich, dass die oben beschriebenen Inkubationen keinen Einfluss auf die Expression der mRNA der muscarinergen Rezeptoren vom Typ M<sub>3</sub> nahmen. Weder nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$ , noch nach der Stimulation mit Carbachol konnte eine vermehrte Expression dieser mRNA nachgewiesen werden. Nach Zugabe von TNF- $\alpha$  zeigte sich im Mittel ein Wert, der bezogen auf den basalen mRNA-

Spiegel bei 0,98 lag. Bei Carbachol lag dieser Wert bei 1,09, so dass es bei beiden zu keiner statistischen Signifikanz kam ( $p<0,05$ ). Die Abbildung 15 zeigt dies noch einmal auf.



**Abbildung 15:**

RT-PCR Analyse der  $M_3$ -mRNA-Expression von 21 Patienten nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und Carbachol (100  $\mu$ g/ml). Aufgetragen wurden die Werte bezogen auf den basalen  $M_3$ -mRNA-Spiegel.

Dargestellt sind jeweils die 25. und 75. Perzentile als Begrenzung des Boxplot. Die Linie entspricht dem Median. Die Fehlerbalken repräsentieren die 5. und 95. Perzentile, während darüber hinaus gehende Einzelwerte als Punkte gesondert erkennbar sind.

### 3.10 Light Cycler-Auswertung der BEAS 2 B

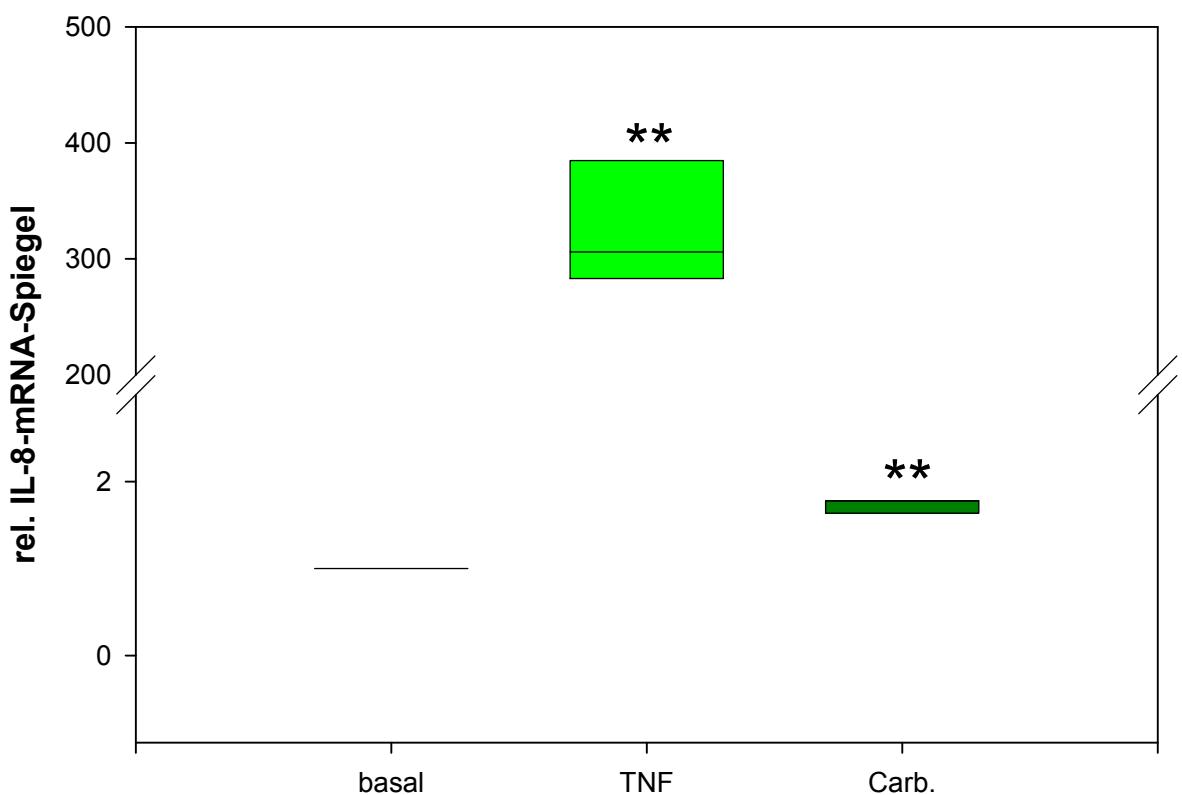
Genau wie bei den primären humanen Bronchialepithelzellen untersuchten wir bei den BEAS 2 B-Zellen die mRNA-Expression von IL-8 und der M<sub>3</sub>-Rezeptoren und seine Veränderungen nach der Stimulation mit Carbachol (100 µg/ml) und TNF-α (10 ng/ml).

Wir konnten zeigen, dass auch bei dieser Zelllinie durch die Inkubation mit TNF-α die Bildung von IL-8-mRNA induziert wird. Im Mittel erreichten wir eine Induktion, die um das 290,73-fache höher war als bei den unstimulierten Zellen. Dieses Ergebnis war signifikant ( $p<0,01$ ) und bestätigt damit die Daten aus dem IL-8-ELISA.

Gleichzeitig bewirkt die Stimulation der Zellen mit Carbachol ebenfalls eine Steigerung der mRNA-Expression von IL-8. Hier konnte zwar nur eine Steigerung des basalen mRNA-Spiegels um den Faktor 1,69 erreicht werden, jedoch erreichte dieses Ergebnis ebenfalls statistische Signifikanz ( $p<0,01$ ) (siehe Abb. 16). Somit verhält sich die Zelllinie BEAS 2 B bei der Expression von IL-8-mRNA anders als die primären Bronchialepithelzellen.

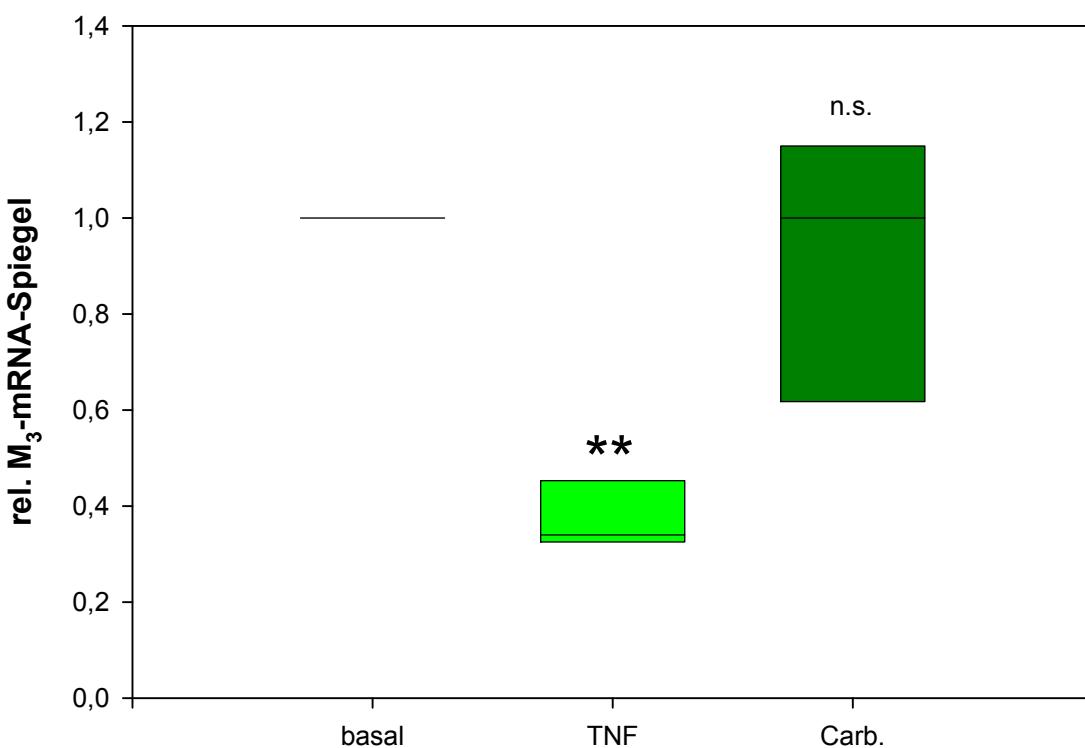
Weiterhin wurde die mRNA-Expression des muscarinergen M<sub>3</sub>-Rezeptors untersucht. Wie sich zeigte, kam es nach der Stimulation der BEAS 2 B-Zellen mit TNF-α nach 16 h zu einer Erniedrigung dieses Spiegels. Bezogen auf die unstimulierte rel. M<sub>3</sub>-mRNA-Expression zeigte sich eine Verringerung um den Faktor 0,39, so dass dies mit  $p<0,01$  als signifikant anzusehen ist.

Weiterhin ließen sich nach der Inkubation der Zellen mit Carbachol keine signifikanten Veränderungen der M<sub>3</sub>-mRNA-Expression aufzeigen. Die unstimulierte und durch Carbachol stimulierte Expression von M<sub>3</sub>-mRNA unterschieden sich nur gering, nämlich um den Faktor 0,9, so dass von keiner Veränderung der mRNA-Menge auszugehen ist. Die Abbildung 17 zeigt dies noch einmal auf.



**Abbildung 16:**

RT-PCR Analyse der IL8-mRNA-Expression der Zelllinie BEAS 2 B nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und Carbachol (100  $\mu$ g/ml) über einen Zeitraum von 16 h. Aufgetragen wurden die Werte bezogen auf den basalen IL-8-mRNA-Spiegel (n=3). Dargestellt sind jeweils die 25. und 75. Perzentile als Begrenzung des Boxplot. Die Linie entspricht dem Median. \*\* =  $p < 0,01$  gegenüber basal



**Abbildung 17:**

RT-PCR Analyse der  $M_3$ -mRNA-Expression der Zelllinie BEAS 2 B nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und Carbachol (100  $\mu$ g/ml) über einen Zeitraum von 16 h. Aufgetragen wurden die Ergebnisse bezogen auf den basalen mRNA-Spiegel ( $n=3$ ).

Dargestellt sind jeweils die 25. und 75. Perzentile als Begrenzung des Boxplot. Die Linie entspricht dem Median. \*\* =  $p < 0,01$  gegenüber basal.

### 3.11 Chemotaxis der PBEC

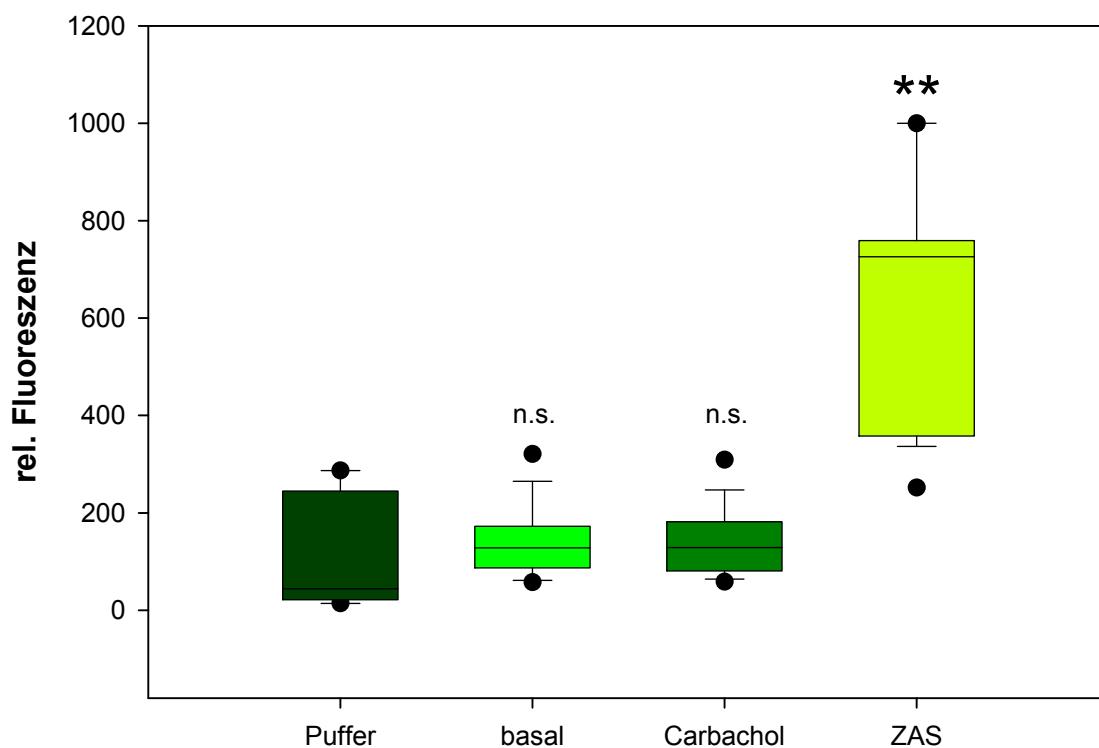
Mit Hilfe der Messung der Chemotaxis gingen wir der Frage nach, ob die primären humanen Bronchialepithelzellen Substanzen produzierten, die neutrophile Granulozyten gerichtet anlockten und damit zur Chemotaxis stimulierten. Wir verwendeten dazu die Überstände von 23 Patientenproben, wobei diese einmal unstimuliert und

einmal nach Inkubation der Zellen mit 100 µg/ml Carbachol über 16 Stunden gewonnen worden waren (siehe unter 2.4.3)

Als Positivkontrolle diente uns ZAS in einer Konzentration von 0,1 mg/ml. Hierbei konnten wir eine Fluoreszenz messen, die signifikant ( $p<0,01$ ) über der der Negativkontrolle lag. Damit wurde sichergestellt, dass die in unserem Versuchsansatz verwendeten neutrophilen Granulozyten in der Lage waren, auf chemotaktisch wirkende Substanzen mit einer gerichteten Wanderung zu reagieren.

Wie sich zeigte, konnten im Mittel bei beiden eingesetzten Überständen keine Chemotaxis nachgewiesen werden. Zwar wurde in beiden Fällen eine Fluoreszenz im unteren Well gemessen, diese lag aber im Bereich die auch bei der Negativkontrolle (Pufferlösung) auftrat und war somit nicht signifikant unterschiedlich ( $p>0,05$ ) (siehe Abb. 18). Dies kann als Zeichen einer ungerichteten Bewegung der neutrophilen Granulozyten gewertet werden.

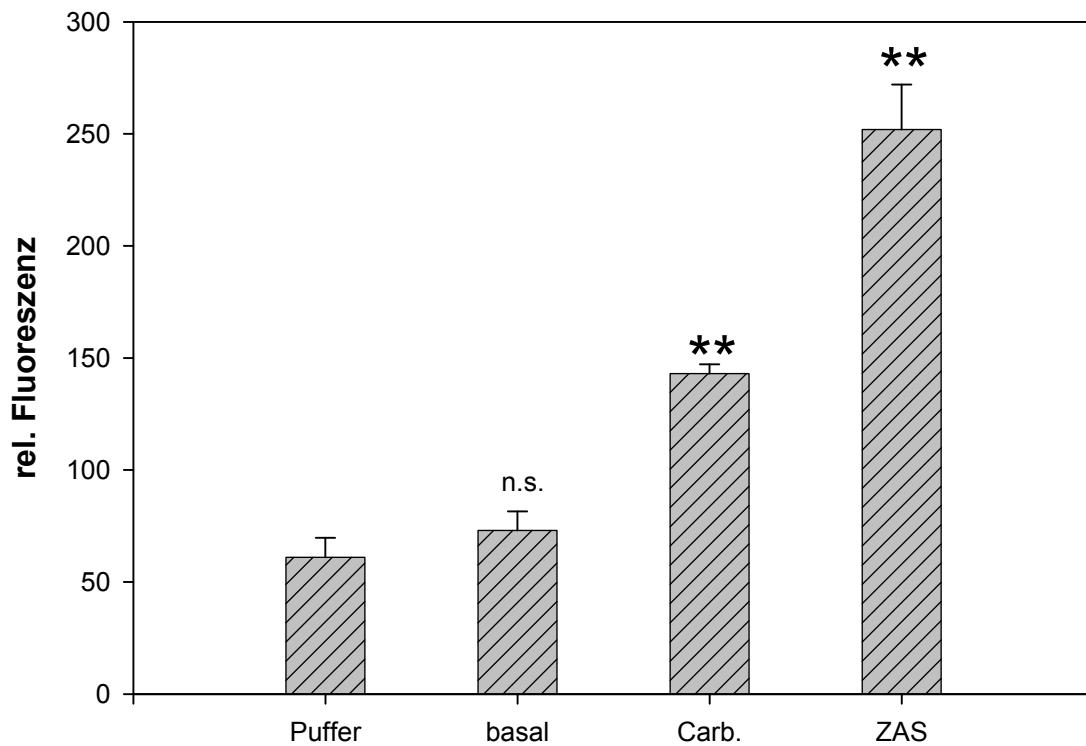
Bei der Verwendung einzelner Patientenproben zeigte sich aber eine deutlich erhöhte Fluoreszenz bei den mit Carbachol stimulierten Überständen. Dies war z.B. bei Patient Nr. 9 der Fall. Die Auswertung der Ergebnisse dieses Patienten zeigte, dass bei den unstimulierten Proben Fluoreszenzwerte erreicht wurden, die sich nicht signifikant von der Negativkontrolle unterschieden ( $p>0,05$ ). Bei Verwendung der zuvor mit Carbachol stimulierten Überständen traten aber Werte auf, die deutlich sowohl über der Negativkontrolle lagen ( $p<0,01$ ), als auch über den unstimulierten Überständen ( $p<0,01$ ). Auch die Positivkontrolle erreichte im Vergleich zur Negativkontrolle einen hoch signifikanten Wert ( $p<0,01$ ), so dass damit wiederum gezeigt werden konnte, dass die verwendeten neutrophilen Granulozyten zu einer gerichteten Bewegung fähig waren. Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse des Patienten 9 noch einmal.



**Abbildung 18:**

Die Graphik zeigt die gemessene Chemotaxis neutrophiler Granulozyten induziert durch die Überstände der primären Bronchialepithelzellen von 23 Patientenproben. Als Negativkontrolle diente die Pufferlösung, als Positivkontrolle ZAS (0,1 mg/ml). Es wurden unstimulierte (basale) und mit Carbachol (100 µg/ml) stimulierte Überstände verwendet.

Dargestellt sind jeweils die 25. und 75. Perzentile als Begrenzung des Boxplot. Die Linie entspricht dem Median. Die Fehlerbalken repräsentieren die 5. und 95. Perzentile, wobei darüber hinaus gehende Einzelwerte als Punkte gesondert erkennbar sind. \*\* = p<0,01 gegenüber Puffer



**Abbildung 19:**

Die Graphik zeigt die Chemotaxisergebnisse des Patienten Nr. 9. Aufgetragen sind die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenzen der Positivkontrolle (ZAS 0,1 mg/ml), der Negativkontrolle (Pufferlösung), unstimulierten (basalen) und mit Carbachol (100 µg/ml) stimulierten Überständen. Jede Säule stellt den Mittelwert aus 13 Einzelexperimenten dar. Die Fehlerbalken präsentieren die zugehörigen Standardabweichungen. \*\* =  $p < 0,01$

Aus diesem Grund führten wir bei Patient Nr. 9 eine Checkerboard-Analyse durch. Mit Hilfe dieser konnte überprüft werden, ob es sich um eine gerichtete Wanderung handelte, oder um Chemokinese, also eine vermehrte Wanderung, die durch ein erhöhtes Aktivierungsniveau der neutrophilen Granulozyten zustande kommt. Durch den Einsatz der Überstände in verschiedenen Konzentrationen in die oberen und die unteren Wells kamen verschiedene Konzentrationsgefälle zustande (siehe 2.4.10.4). Bei der Chemotaxis erwartet man bei Kombinationen, bei denen kein Konzentrationsgefälle herrscht, auch keine vermehrte Wanderung der neutrophilen Granulozy-

ten. Wie aber den Tabellen 6 und 7 entnommen werden kann, zeigte sich auch in diesen Wells eine vermehrte Fluoreszenz, so dass man auch bei diesem Patienten nicht von Chemotaxis, sondern von Chemokinese sprechen muss.

Oberes Well Unteres Well	0%	30%	60%	100%
0%	$25,25 \pm 2,86$	$35,75 \pm 8,53$	$33,25 \pm 3,49$	$31,0 \pm 10,05$
30%	$34,5 \pm 9,18$	$62,5 \pm 23,92$	$71,75 \pm 20,9$	$83,25 \pm 13,83$
60%	$66,75 \pm 20,25$	$74,25 \pm 5,49$	$75,25 \pm 8,35$	$62,0 \pm 18,28$
100%	$135,25 \pm 42,48$	$146,5 \pm 43,79$	$126,75 \pm 11,5$	$153,5 \pm 33,15$

**Tabelle 6:**

Die Tabelle beinhaltet die mittleren Fluoreszenzwerte aus 4 Einzelwerten und die zugehörigen Standardabweichungen des Pat. 9, die nach Einsatz der unstimulierten Proben erhoben worden sind. Die Fluoreszenz korreliert mit den gewanderten neutrophilen Granulozyten. Die farbig markierten Tabellenabschnitte zeigen die Konzentrationskombinationen auf, bei denen kein Konzentrationsgefälle der Überstände vorhanden ist, also auch nicht der darin evtl. gelösten chemotaktischen Substanzen.

Oberes Well Unteres Well	0%	30%	60%	100%
0%	$22,5 \pm 4,03$	$60,0 \pm 14,46$	$72,5 \pm 8,14$	$99,0 \pm 12,39$
30%	$270,5 \pm 31,89$	$164,5 \pm 7,7$	$128,5 \pm 22,48$	$203,5 \pm 32,62$
60%	$551,25 \pm 28,54$	$277,25 \pm 11,78$	$343,25 \pm 54,94$	$346,75 \pm 26,61$
100%	$541,75 \pm 69,74$	$413,75 \pm 62,25$	$502,75 \pm 35,07$	$537,25 \pm 28,13$

**Tabelle 7:**

Die Tabelle beinhaltet die mittleren Fluoreszenzwerte aus 4 Einzelwerten und die zugehörigen Standardabweichungen des Pat. 9, die nach Einsatz der mit Carbachol (100 µg/ml) vorstimulierten Proben erhoben worden sind. Die Fluoreszenz korreliert mit den gewanderten neutrophilen Granulozyten. Die farbig markierten Tabellenabschnitte zeigen die Konzentrationskombinationen auf, bei denen kein Konzentrationsgefälle der Überstände vorhanden ist, also auch nicht der darin evtl. gelösten chemotaktischen Substanzen.

### 3.12 Calciumimaging

Da sich in den anderen Methoden kein Hinweis darauf ergab, dass die primären humanen Bronchialepithelzellen und die Zelllinie BEAS 2 B auf die Stimulation mit Carbachol über die muscarinergen Rezeptoren vom M<sub>3</sub>-Typ reagierten, wählten wir das Verfahren des Calciumimaginings. Dieses stellt eine sehr sensitive Methode dar, um intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Signale sichtbar zu machen.

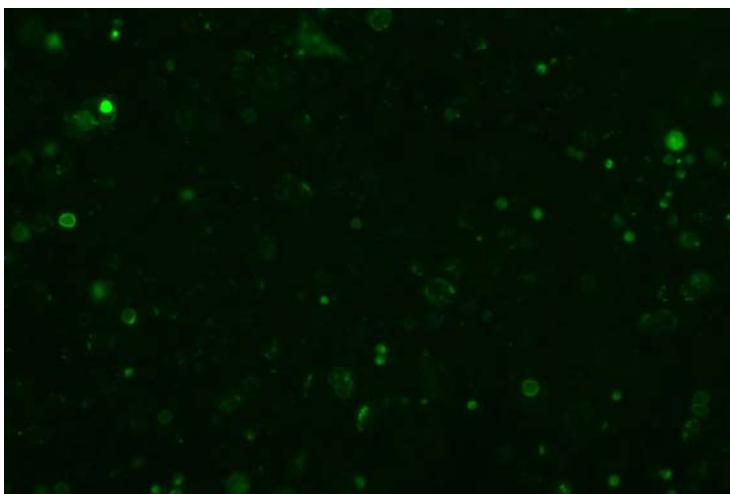
Wie in der Literatur beschrieben ist [6, 18], wird durch die Stimulation der M<sub>3</sub>-Rezeptoren die Phospholipase C aktiviert, woraus ein Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> resultiert. Unser Ziel war es, diesen Kalziumanstieg mittels Calciumimaging nach der Stimulation der Zellen mit 100 µg/ml Carbachol sichtbar zu machen.

### 3.12.1 Calciumimaging der PBEC

Wir konnten zeigen, dass die Zellen nach Zugabe von ATP, das uns als Positivkontrolle diente, mit einem Anstieg des intrazellulären Calciums reagierten. Dies manifestierte sich in einem deutlich sichtbaren Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Nach Zugabe von 100 µg/ml Carbachol kam es jedoch nicht zu einer Veränderung der Fluoreszenzsignale. Daraus lässt sich schließen, dass die sich auf der Oberfläche der primären humanen Bronchialepithelzellen befindenden muscarinergen Rezeptoren vom M<sub>3</sub>-Typ auf die Stimulation mit Carbachol nicht reagierten (siehe Abb. 20 bis 22).

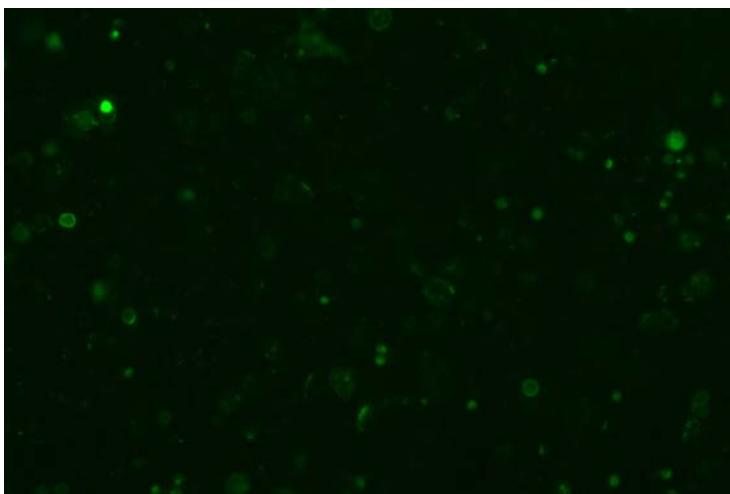
### 3.12.2 Calciumimaging der BEAS 2 B

Bei der Zelllinie BEAS 2 B zeigten sich dieselben Ergebnisse wie bei den primären humanen Bronchialepithelzellen. Auch hier konnte ein Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> nach Zugabe von 100 µM ATP sichtbar gemacht werden. Durch Carbachol in einer Konzentration von 100 µg/ml blieb jedoch diese Signalerhöhung aus, so dass es auch bei diesen Zellen nicht zu einer M<sub>3</sub>-rezeptorvermittelten Antwort kam (siehe Abb. 23 bis 25)



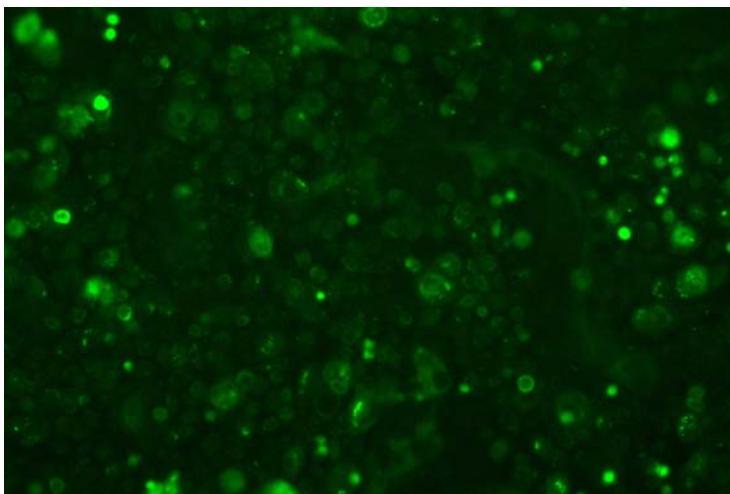
**Abbildung 20:**

Dargestellt sind die PBEC im Fluoreszenzmikroskop nach Inkubation der Zellen mit dem Farbstoff Fluo-4 ohne Zusatz stimulierender Substanzen. Vergr. 20fach.



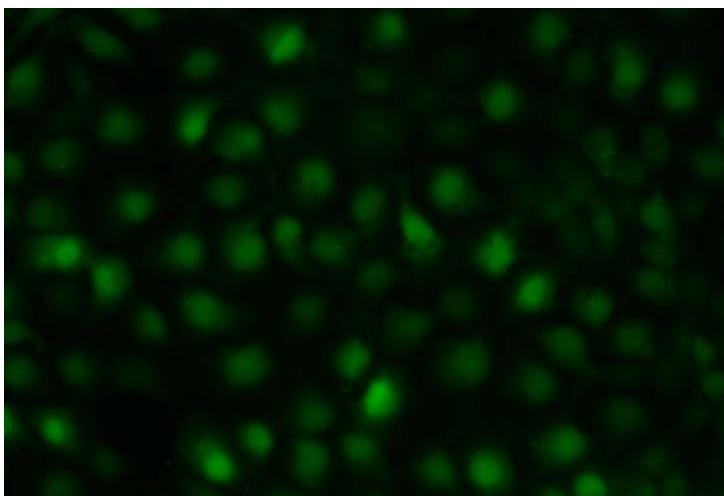
**Abbildung 21:**

Das Bild zeigt die PBEC nach Zugabe von Carbachol in einer Konzentration von 100 µg/ml. Es lässt sich keine Erhöhung der Fluoreszenzantwort belegen. Vergr. 20fach.



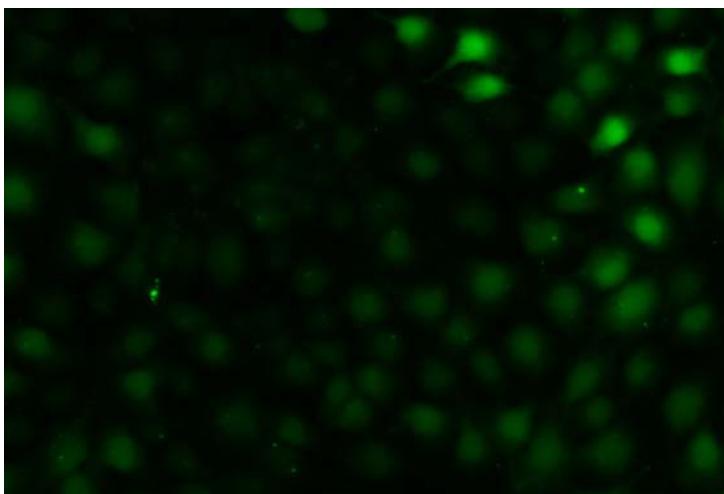
**Abbildung 22:**

Das Bild zeigt die Positivantwort der Zellen nach Zugabe von 100 µM ATP. Es kommt zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz, was mit einem Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  gleichzusetzen ist.  
Vergr. 20fach.



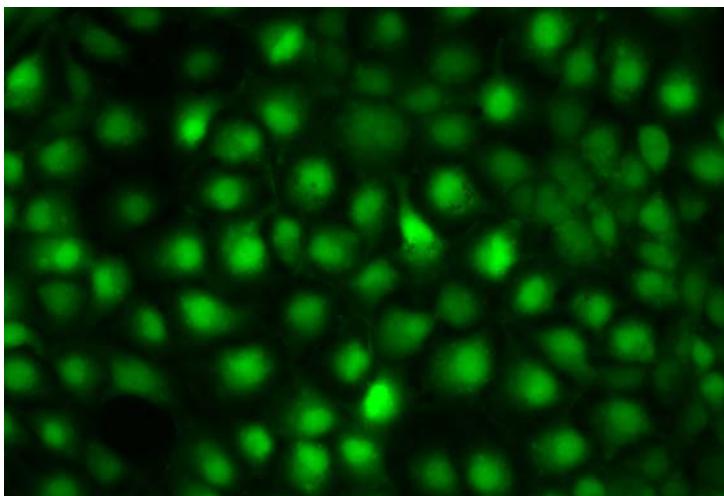
**Abbildung 23:**

Dargestellt ist die Zelllinie BEAS 2 B im Fluoreszenzmikroskop nach Inkubation der Zellen mit Fluo-4 ohne Zugabe stimulierender Substanzen.  
Vergr. 20fach.



**Abbildung 24:**

Das Bild zeigt die BEAS 2 B Zellen nach Zugabe von Carbachol in einer Konzentration von 100 µg/ml. Es lässt sich keine Erhöhung der Fluoreszenzantwort belegen.  
Vergr. 20fach.



**Abbildung 25:**

Das Bild zeigt die Positivantwort der Zellen nach Zugabe von 100 µM ATP. Es kommt zu einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz, was mit einem Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> gleichzusetzen ist.

Vergr. 20fach.

## 4 Diskussion

Die chronisch obstruktive Bronchitis nimmt aktuell den sechsten Platz der Todesursachenstatistik weltweit ein [59], wobei die Prävalenz und die Mortalität dieser Erkrankung in den nächsten Jahren noch weiter zunehmen werden. Dies liegt vor allem daran, dass die Pathogenese dieser komplexen Erkrankung noch nicht ausreichend verstanden wird, was dazu führt, dass die bisher vorhandenen pharmakologischen Ansätze den langzeitlichen Verlauf nicht ausreichend beeinflussen können.

In unserer Arbeit wählten wir humane Bronchialepithelzellen und die bronchiale Zelllinie BEAS 2 B als Untersuchungsmaterial, um in diesem *in vitro*-Model den Einfluss des non-neuronalen cholinergen Systems auf proinflammatorische Effekte in der Lunge zu untersuchen. Die primären humanen Bronchialepithelzellen wurden dabei mittels Bürstentechnik bei einer Bronchoskopie aus freiwilligen Spendern gewonnen und anschließend kultiviert. Bestand bei den Spendern der Verdacht auf ein malignes Geschehen der Lunge, wurden nur Proben der kontralateralen Seite verwendet, um die Kontamination mit Malignomzellen auszuschließen. Bei dieser angewandten Bürstentechnik konnte schon in früheren Arbeiten durch den immunhistochemischen Nachweis von verschiedenen Zytokeratinen die epitheliale Herkunft der Zellen und damit die Reinheit der Zellkulturen belegt werden [73]. Limitierend in diesem Versuchsansatz war allerdings die Tatsache, dass sich diese primären Zellen nicht beliebig lange in Kultur nehmen ließen und damit ihre Zahl und die Anzahl der verschiedenen Versuche beschränkt waren. Aus diesem Grund wurden die Versuche auch an der immortalisierten Zelllinie BEAS 2 B durchgeführt, bei der diese Einschränkung nicht existiert.

Bei der Behandlung der COPD stehen an erster Stelle die Brochodilatatoren, welche der obstruktiven Komponente dieser Erkrankung, die vor allem durch Hyperplasie

muköser Drüsen, Hypertrophie und Konstriktion glatter Muskelzellen der Atemwege und den Verlust von Lungenstruktur mit der Ausbildung eines Lungenemphysems entsteht, entgegenwirken sollen. Hierbei kommen meist  $\beta_2$ -Agonisten und anticholinerge Substanzen zum Einsatz [5]. In letzterer Gruppe zeigten sich vor allem positive Effekte für Tiotropiumbromid. Diese neuere, langwirksame Substanz zeichnet sich im Gegensatz zu Ipratropiumbromid, einem kurz-wirksamen anticholinergen Medikament, durch eine Selektivität für muscarinerge Rezeptoren vom Typ M<sub>3</sub> und M<sub>1</sub> aus.

Tiotropiumbromid und Ipratropiumbromid weisen zwar ähnliche Bindungskonstanten an M<sub>1</sub>-M<sub>3</sub>-Rezeptoren auf, in kinetischen Studien zeigte sich jedoch, dass Tiotropiumbromid 100fach langsamer vom M<sub>1</sub>-und M<sub>3</sub>-Rezeptor dissoziiert als Ipratropiumbromid (Tabelle 8). Im Gegensatz dazu ähnelte sich die Dissoziation beider Substanzen am M<sub>2</sub>-Rezeptor, so dass hieraus eine kinetische Selektivität des Tiotropiumbromid an M<sub>1</sub>-und M<sub>3</sub>-Rezeptoren resultiert [2].

In mehreren klinischen Studien konnte die Wirksamkeit dieser Substanz und der damit verbundene Benefit für die Patienten gezeigt werden. Dabei spielt zum einen die längere bronchodilatatorische Wirkung dieses Medikaments im Gegensatz zu Ipratropiumbromid eine Rolle. Littner et al. konnten belegen, dass nach Gabe von verschiedenen Dosen von Tiotropiumbromid (4.5 µg, 9 µg, 18 µg, 36 µg) eine Zunahme der FEV<sub>1</sub>-Werte über einen Zeitraum von 20 bis 24 Stunden erreicht werden konnte und somit die einmalige Gabe von Tiotropiumbromid am Tag möglich ist [52].

Zusätzlich zu der Zunahme des FEV<sub>1</sub>-Wertes profitieren die Patienten durch eine deutliche Abnahme der Atemnot und einen Anstieg der Lebensqualität. Letzterer dürfte auch vornehmlich durch den positiven Einfluss von Tiotropiumbromid auf die Exazerbationsrate zustande kommen. Eine Exazerbation wird als eine Zunahme der

klinischen Symptome (Husten, Dyspnoe, Menge und Purulenz des Sputums) der COPD definiert, welche akut auftritt und über die normalen Tagesschwankungen hinausgeht. Diese begründen eine Verschlechterung der Lungenfunktion und sind daher nicht nur maßgeblich an der Progredienz der Erkrankung beteiligt, sondern sie stellen auch eine wichtige Einflußgröße für die Lebensqualität der Patienten dar [39]. Wie sich zeigte, verlängert sich die Zeit bis zum Auftreten der ersten Exazerbation nach Behandlung mit Tiotropiumbromid, ebenso, wie die Zahl der Exazerbationen gesenkt werden konnte. Weiterhin verringerten sich nicht nur die Anzahl der Krankenhausaufenthalte, die auf dem Boden einer Exazerbation stattfanden, sondern auch die Hospitalisationsdauer. Diese Ergebnisse ließen sich nicht nur in plazebo-kontrollierten Studien nachweisen [12], sondern auch beim Vergleich der Anwendung von Tiotropiumbromid mit dem kurzwirksamen, anticholinerg wirkenden Ipratropiumbromid [92].

Rezeptor-subtypen	Dissoziationskonstante (nM)		Halbwertszeit (h)	
	Tiotropium-bromid	Ipratropium-bromid	Tiotropium-bromid	Ipratropium-bromid
M <sub>1</sub>	0,04	0,18	14,6	0,11
M <sub>2</sub>	0,02	0,20	3,6	0,0035
M <sub>3</sub>	0,01	0,20	34,7	0,26

**Tabelle 8:**

Bindung von Tiotropiumbromid und Ipratropiumbromid an muscarinergen Rezeptoren [2]

Die Mechanismen, mit denen Tiotropiumbromid in die Pathogenese von Exazerbationen eingreift, sind nach wie vor nicht genau geklärt, was wohl auch daran

liegen dürfte, dass die Genese der Exazerbationen selbst und die Pathomechanismen, die sich dabei in der Lunge abspielen noch unklar sind. Dies mag vor allem darin begründet sein, dass es in der akuten Phase einer Exazerbation durch den stark eingeschränkten gesundheitlichen Zustand der Patienten kaum möglich ist, grosse Mengen von Daten, wie Lungenfunktionsparameter, zu erheben oder aber Probenmaterial, z.B. mittels Bronchoskopie, zu gewinnen.

Bekannt ist allerdings, dass während einer Exazerbation vermehrt proinflammatorische Zytokine im induzierten Sputum betroffener Patienten gefunden werden können. Dabei ist vor allem IL-6, IL-8, Endothelin-1, Leukotrien B<sub>4</sub> zu nennen [28, 39], wobei die Höhe dieser Zytokine nichts über die Schwere und den Verlauf der Exazerbation aussagt [7]. Getriggert werden Exazerbationen durch Bakterien, Viren und Umweltbedingungen, wie kaltes Wetter und Luftverschmutzung, die die Entzündungsvorgänge der COPD in der Lunge zu verstärken scheinen [39]. Interessanterweise ist es aber bei etwa einem Drittel der Exazerbationen nicht möglich, eine genaue Ursache zu eruieren [28]. Bhowmik et al. konnten in einer Kohortenstudie belegen, dass Patienten, bei denen gehäuft Exazerbationen auftraten, auch in der stabilen Phase der COPD, also außerhalb der Exazerbation, vermehrte Mengen von IL-6 und -8 in Sputumproben aufwiesen [7]. Dies macht deutlich, dass das Auftreten einer Exazerbation nicht nur Einfluss auf die systemische Entzündungsreaktion der COPD und damit auf den Krankheitsverlauf nimmt, sondern dass im Umkehrschluss auch die Stärke der generalisierten entzündlichen Pathomechanismen für das Auftreten einer Exazerbation mitverantwortlich sein könnten.

Somit liegt auch die Vermutung nahe, dass die Wirkung des anticholinerg wirkenden Tiotropiumbromid über die alleinige Bronchodilatation hinaus geht und ein antiinflammatorischer Effekt als wahrscheinlich anzusehen ist [68].

Im Umkehrschluss stellt sich aber damit die Frage, ob durch die Aktivierung des cholinergen Systems in der Lunge proinflammatorische Effekte vermittelt werden, wobei wir in unserem experimentellen Ansatz die Bronchialepithelzelle und deren Stimulation mit Carbachol, einer cholingergen Substanz, die selektiv an M<sub>3</sub>-Rezeptoren wirkt, in den Mittelpunkt stellten.

Bronchiale Epithelzellen sind die ersten Zellen, die mit den verschiedensten Pathogenen wie Viren, Bakterien, Zigarettenrauch und Allergenen in Berührung kommen. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass dieser Zelltyp mehr darstellt als eine bloße Barriere mit Zilienfunktion zur Reinigung der Atemwege. Vielmehr nehmen diese Zellen aktiv auch an immunmodulatorischen Prozessen teil und können diese auch initiieren [87]. Dabei dürfte das non-neuronale cholinerge System, das auch in den Bronchialepithelzellen ausgebildet ist, eine bedeutende Rolle spielen. Man kann in diesem Zelltyp nicht nur Acetylcholin nachweisen, sondern auch das Enzym Cholinacetyltransferase, das für die Bildung von Acetylcholin verantwortlich ist und die Acetylcholinesterase, die den Abbau dieses Transmitters bewerkstelligt [46].

Weiterhin wird in der Literatur vorbeschrieben, dass die Epithelzellen an ihrer Oberfläche muscarinerge Rezeptoren vom Typ M<sub>3</sub> exprimieren. Gwilt et al. z.B. wiesen diesen Rezeptortyp auf der Alveolarzelllinie A549 und auf der Bronchialepithellzelllinie BEAS 2 B nach [31]. In unserem experimentellen Ansatz konnten wir diese Rezeptoren nicht nur auf der Oberfläche von primären humanen Bronchialepithelzellen anfärben, sondern auch mittels mRNA-Analysen nachweisen. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Epithelzellen diese auch nach einigen Tagen unter Kulturbedingungen nicht verlieren.

Die Funktion des non-neuronalen cholinergen Systems bei Bronchialepithelzellen ist vielfältig, wobei diese autokrin, parakrin oder über membrangebundene muscarinerge oder nicotinerge Rezeptoren vermittelt wird [94]. Es konnte gezeigt werden,

dass Acetylcholin einen positiven Einfluss auf die Proliferation der Epithelzellen hat [31]. Außerdem belegten Koyama et. al, dass es nach der Stimulation von bovinen Bronchialepithelzellen mit Acetylcholin zu einer Bildung und Ausschüttung von Substanzen kam, die chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkten [47]. Weiterhin lässt sich in humanen Bronchialepithelzellen durch Acetylcholin die Ausschüttung von GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) erreichen, welcher für die Differenzierung und Migration von eosinophilen Granulozyten mitverantwortlich ist. Dieser Effekt wird nachweislich über nikotinerge Rezeptoren vermittelt [45]. Daneben induziert Acetylcholin die Freisetzung von LTB<sub>4</sub> und PGE<sub>2</sub> aus Epithelzellen [31]. All diese Mechanismen könnten dazu beitragen, dass durch die Stimulation des non-neuronalen cholinergen Systems der Bronchialepithelzellen vermehrt Entzündungszellen aus dem peripheren Blut angelockt werden und somit einen entscheidenden modulierenden Einfluss auf Entzündungsprozesse der Lunge nehmen, was vor allem in der Pathogenese der COPD eine entscheidende Rolle spielen dürfte.

Hinweise hierfür ergaben sich auch aus der Beobachtung, dass sich bronchiale Epithelzellen durch Zigarettenrauch zur vermehrten Bildung von proinflammatorischen Zytokinen stimulieren ließen. Hierzu zählen u.a. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF und IL-8 [25, 34, 57]. Interessanterweise unterscheiden sich die Epithelzellen von COPD-Patienten von denen gesunder Raucher und Nichtraucher in Bezug auf die Zytokinproduktion. Schulz et. al. konnten belegen, dass die kultivierten primären Bronchialepithelzellen von Patienten mit COPD signifikant mehr IL-8 im Vergleich zu gesunden Rauchern und Nichtrauchern bildeten. Auch nach Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  blieb dieser signifikante Unterschied der IL-8-Menge zwischen den drei Gruppen bestehen [73], so dass auf eine aktive Rolle der Epithelzellen bei der Entwicklung und der Unterhaltung einer chronischen Entzündungsreaktion geschlossen wer-

den kann. Weiterhin scheint diese unterschiedliche Produktion von IL-8 in Zusammenhang mit klinischen Befunden von COPD-Patienten zu stehen. Yamamoto et al. untersuchten die IL-8-Menge in spontanem Sputum von COPD Patienten und verglichen diese mit Sputumproben von gesunden Probanden. Auch hier fanden sich signifikant erhöhte IL-8-Konzentrationen bei COPD-Patienten. Gleichzeitig bestand eine negative Korrelation zwischen der IL-8-Menge und Lungenfunktionsparametern (FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>/FVC), wodurch dieser Zusammenhang nochmals unterstrichen wird [98].

Diese unterschiedliche Zytokinproduktion, zu der die primären humanen Bronchialepithelzellen in der Lage sind, zeigte sich auch in unseren Ergebnissen. Nach Kultivierung konnten wir eine starke Variabilität der basalen IL-8-Produktion innerhalb der Patientenproben der primären humanen Bronchialepithelzellen feststellen. Interessanterweise ließen sich zwar alle Zellproben durch TNF-α zur vermehrten Produktion dieses Zytokins stimulieren, jedoch war diese Steigerung bei Zellproben mit basal hoher IL-8-Konzentration im Trend geringer. Dies könnte zum einen ein Hinweis auf einen unterschiedlichen Aktivierungsgrad der Epithelzellen verschiedener Patienten darstellen, zum anderen aber auch, wie Coraux et al. herausfanden, der Ausdruck einer hohen Proliferationsrate sein [16].

In unserer experimentellen Arbeit stellten wir die Hypothese auf, dass es durch die Aktivierung des non-neuronalen cholinergen Systems von Bronchialepithelzellen zu einem proinflammatorischen Effekt kommt, der sich in der Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-8 manifestierte. Dabei stimulierten wir selektiv die muscarinergen Rezeptoren vom Typ M<sub>3</sub> mit Carbachol, vor allem im Hinblick auf den wie oben beschrieben antiinflammatorischen Effekt des Medikamentes Tiotropiumbromid. Weder bei den primären humanen Bronchialepithelzellen, noch bei der Zelllinie BEAS 2 B konnte jedoch damit eine gesteigerte Freisetzung des proinflam-

matorischen Zytokins IL-8 erreicht werden. Auch nach Vorstimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  zur Erzielung eines gesteigerten Aktivierungsgrades änderten die Zellen ihre Stimulationsantwort auf Carbachol nicht. Diese Ergebnisse konnten wir für die primären Bronchialepithelzellen nicht nur im direkten Zytokinnachweis mittels ELISA, sondern auch durch quantitative PCR-Analyse der IL-8 Expression verifizieren. Auch unter Anwendung anderer Zellkulturbedingungen blieben diese Befunde konstant. Bei der Zelllinie BEAS 2 B zeigten sich signifikant gesteigerte Levels der mRNA von IL-8, wobei sich diese aber nicht, wie oben beschrieben, im direkten Zytokinnachweis widerspiegeln, so dass die biologische Funktion dieser gesteigerten mRNA-Menge nicht eindeutig geklärt werden konnte.

Wir untersuchten weiterhin, ob es nach Stimulation der Zellen mittels TNF- $\alpha$  und/oder Carbachol zu einer Veränderung der mRNA-Expression der muscarinergen Rezeptoren kam. Bei den primären humanen Brochialepithelzellen ließ sich diese mit beiden Substanzen nicht erkennen. Die Zelllinie BEAS 2 B reagierte auf die Stimulation mit TNF- $\alpha$  mit einer signifikanten Reduzierung der Expression der M<sub>3</sub>-mRNA, was bei diesem Zelltyp auf eine potentielle Downregulation des M<sub>3</sub>-Rezeptors bei hohen Konzentrationen von TNF- $\alpha$  schließen lässt. Nach der Stimulation der Zellen mit Carbachol ließ sich ein ähnlicher Effekt nicht belegen. Auf Proteinebene konnten wir die erhobenen IL-8-Daten nicht bestätigen, da die Western Blot-Analysen mehrere Banden ergaben (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies könnte zum einen an einer Unspezifität der verwendeten Antikörper liegen, zum anderen an einer posttranskriptionellen Modifikation des Transkriptionsproduktes.

Wie man weiß, spielen auch neutrophile Granulozyten eine bedeutende Rolle in den inflammatorischen Prozessen, die sich bei der chronisch obstruktiven Bronchitis abspielen. Die Zahl aktiverter neutrophiler Granulozyten ist bei COPD-Patienten im

Sputum und in der bronchoalveolären Lavage erhöht [43]. Außerdem korreliert nicht nur die Zahl der neutrophilen Granulozyten aus bronchialen Biopsien und induziertem Sputum mit der Schwere der Erkrankung, sondern auch die Zahl der zirkulierenden Zellen mit der Abnahme des FEV<sub>1</sub>-Wertes betroffener COPD-Patienten [21, 43, 78]. Neutrophile werden durch Chemoattraktanten wie IL-8, Leukotriene B<sub>4</sub>, Gro-α (growth-related oncoprotein) und ENA-78 (epithelial neutrophil activating protein of 78 kDa), die u.a. von Alveolarmakrophagen und Epithelzellen gebildet werden [4, 86, 89], aus dem peripheren Blut angelockt, wandern dann in das Lungengewebe ein und sezernieren dort Proteinase 3, Cathepsin G, MMP- (Metalloproteinase) 8 und -9. Durch die Freisetzung dieser Substanzen sind sie an der Alveolardestruktion und der Mukushyperproduktion beteiligt [77, 96]. In unsere Arbeit untersuchten wir, ob es nach der Inkubation der primären Bronchialepithezelnen mit Carbachol zur Ausschüttung von Substanzen kam, die chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkten. Dazu bedienten wir uns Chemotaxisassays, bei denen wir die Überstände der vorstimulierten Zellen und neutrophile Granulozyten gesunder Spender einsetzen. In diesen Chemotaxisversuchen konnten wir nicht belegen, dass dies der Fall ist. Zwar zeigten sich bei einigen Patienten in den mit Carbachol vorstimulierten Überständen signifikant erhöhte Werte der Chemotaxis, jedoch ergab die daraufhin durchgeführte Checkerboard-Analyse, dass es sich dabei nicht um Chemotaxis, sondern um eine ungerichtete Bewegung der Granulozyten handelte, die womöglich durch ein gesteigertes Aktivitätsniveau dieser Zellen zustande kam.

Da es in den durchgeföhrten Versuchen zwar zu einer adäquaten Reaktion auf die Positivkontrollen kam, jedoch kein proinflammatorischer Effekt von Carbachol nachgewiesen werden konnte, überprüften wir diese Ergebnisse mittels Calciumimaging, einer sehr sensitiven Methode zum Sichtbarmachen von intrazellulären Calciumsignalen. Wie sich zeigte, reagierten weder die Zelllinie BEAS 2 B, noch die primären

Bronchialepithelzellen mit einem Anstieg des intrazellulären Calciums nach Stimulation dieser Zellen mit Carbachol. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte darin begründet sein, dass wir für die Durchführung dieser Experimente nur eine Konzentration von Carbachol (100 µg/ml) wählten und diese Konzentration möglicherweise außerhalb des optimalen Wirkungsbereiches lag. Weiterhin ist es denkbar, dass noch andere Wirkmechanismen des Carbachols in Frage kommen, die nicht an intrazelluläres Calcium gebunden sind und somit mit dieser Methode nicht sichtbar gemacht werden können. So konnte zum Beispiel an glatten Muskelzellen muscarinerge Pathomechanismen aufgedeckt werden, die unabhängig von Calcium waren. Diese sog. RhoA/Rho-Kinase Kaskade wird durch M<sub>2</sub>- und M<sub>3</sub>-Rezeptoren vermittelt und führt über die Hemmung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase zu einer verstärkten Kontraktion glatter Muskelzellen [29]. Für die genauere Evaluierung dieser Möglichkeiten sind daher sicherlich noch weitere umfangreichere Experimente nötig. Weiterhin ist es möglich, dass es durch die Stimulation der Zellen mit Carbachol nicht zu einer Stimulationsantwort der Zellen kommt. Dies könnte einerseits an der Downregulation der Rezeptoren liegen, andererseits ist die möglicherweise proinflammatorische Wirkung des non-neuronalen cholinergen Systems auch über nikotinerge Rezeptoren vermittelt, die nicht bei der Inkubation mit Carbachol stimuliert werden.

Bühlig et al. zeigten, dass die Stimulation einer Monozytenzelllinie, der Alveolarzelllinie A549 und primären Alveolarmakrophagen mit Acetylcholin zu einer Freisetzung von Mediatoren führt, die chemotaktisch auf humane Granulozyten wirkte. Zwar wurde diese Freisetzung durch Inkubation der Zellen mit Tiotropiumbromid gehemmt, was auf den maßgeblichen Einfluss von muscarinergen Rezeptoren schließen lässt, allerdings konnte die Beteiligung von nikotinergen Rezeptoren an diesen Effekten nicht endgültig ausgeschlossen werden. Die Arbeitsgruppe bekräftigt unsere Ergebnisse, da es auch hier zu keiner Erhöhung der Sekretion von IL-8 nach

Stimulation der Zellen mit Acetylcholin kam. Interessanterweise ließ sich aber die induzierte Chemokinese durch einen Leukotrien B<sub>4</sub>-Antikörper erfolgreich blockieren, so dass davon auszugehen ist, dass die Chemotaxis der humanen Granulozyten in diesem Versuchsansatz durch Leukotrien B<sub>4</sub> vermittelt wurde [8].

Dies macht deutlich, dass für die proinflammatorische Wirkung des non-neuronalen cholinergen Systems eine Vielzahl von Zelltypen und Mediatoren und ihre Interaktionen verantwortlich sein könnten, worauf im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Alveolarmakrophagen spielen in der Pathogenese der COPD ebenfalls eine entscheidende Rolle, was sich u.a. darin widerspiegelt, dass diese Zellen vermehrt im Sputum, der BAL und dem Parenchym von COPD-Patienten zu finden sind. Außerdem fand sich in bronchialen Biopsien von Rauchern, die einen unterschiedlichen Schweregrad der Obstruktion nachwiesen, mittels immunhistochemischer Methoden eine positive Korrelation zwischen der Zahl der Makrophagen im Subepithelium und der Schwere der Erkrankung [3, 21].

Auch in diesen Zellen, die in der Lunge die vorherrschenden Immunzellen darstellen, lässt sich das non-neuronale cholinerge System nachweisen. Zum einen besitzen sie die Cholinacetyltransferase und sind damit in der Lage Acetylcholin zu produzieren, zum anderen lassen sich auf ihrer Oberfläche sowohl nikotinerge, als auch muscarinerge Rezeptoren vom Typ M<sub>2</sub> und M<sub>3</sub> nachweisen. Die Bedeutung des non-neuronalen cholinergen Systems ist dabei allerdings noch nicht endgültig geklärt.

Einerseits konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation der Alveolarmakrophagen durch Acetylcholin und Nicotin die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-6 und IL-12 inhibieren ließ [31]. Andererseits belegten Sato et al. dass es nach der Stimulation von bovinen Alveolarmakrophagen mit Acetylcholin zur Frei-

setzung von Substanzen kam, die chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, Monozyten und eosinophile Granulozyten wirkten. Diese chemotaktische Wirkung dürfte wohl durch Leukotrien B<sub>4</sub> vermittelt worden sein, da man zum einen einen deutlichen Anstieg dieses Zytokins feststellen konnte, zum anderen sich die Chemotaxis der oben genannten Zellen durch einen Leukotrien-B<sub>4</sub>-Antagonisten hemmen ließ. Als entscheidender Rezeptor konnte der M<sub>3</sub>-Rezeptor identifiziert werden [72].

Diese unterschiedlichen Ergebnisse bei Alveolarmakrophagen zeigen, dass es durch Acetylcholin zwar zu einer Reduktion der Entzündungsreaktion durch Inhibition der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kommen könnte, aber die Ausschüttung von Chemoattraktanten für Entzündungszellen zu einer Förderung der Inflammation führt. Auch Interaktionen mit dem Bronchialepithel wären denkbar. Die Untersuchung von Lungengewebe von Rauchern mit einer Obstruktion und Rauchern ohne Obstruktion zeigten, dass es in ersterer Gruppe zu einer Akkumulation von Makrophagen im Bronchialepithel kam [30], was möglicherweise auf die Freisetzung von Substanzen aus dem Bronchialepithel, die eine vermehrte Rekrutierung von Makrophagen aus dem peripheren Blut bewirken, zurückzuführen ist. Als eine dieser Substanzen konnte TGF-β<sub>1</sub> (transforming growth factor beta 1) identifiziert werden. Es ließ sich bei COPD-Patienten vermehrt in Epithelzellen nachweisen und induziert bekanntermaßen die Chemotaxis von Makrophagen. Außerdem zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Höhe des gefundenen TGF-β<sub>1</sub> und der Zahl der Alveolarmakrophagen innerhalb des Epithels [20].

Ein weiterer wichtiger Zelltyp dürften T-Lymphozyten darstellen. Ihre Zahl ist im Parenchym und den zentralen und peripheren Atemwegen bei COPD-Patienten erhöht. Genauere Untersuchungen dieser T-Lymphozyten zeigten, dass dabei die Zahl der CD8<sup>+</sup> Zellen deutlich über der der CD4<sup>+</sup> Zellen liegt [3]. Außerdem besteht eine posi-

tive Korrelation zwischen ihrer Zahl und der Schwere der Obstruktion und dem Ausmaß der Alveolardestruktion [17]. Auch auf diesen Zellen ist das non-neuronale cholinerge System zu finden. Es lassen sich nicht nur Acetylcholin, sondern auch die Acetylcholinesterase und die Cholinacetyltransferase nachweisen. Auch cholinerge Rezeptoren sind auf ihnen zu finden. Zum einen exprimieren sie nicotinerge Rezeptoren, zum anderen muscarinerge Rezeptoren vom Typ M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub>. Die genaue Bedeutung ist dabei aber noch unklar. Man weiß, dass die Lymphozyten durch Nicotin und damit durch Zigarettenrauch aktiviert werden. Von Acetylcholin werden sowohl fördernde, als auch inhibitorische Effekte auf die Proliferation dieser Zellen beschrieben, so dass die Ergebnisse weiterer Untersuchungen hierzu abzuwarten sind [31].

Wodurch es zu einer Akkumulation der T-Lymphozyten in der Lunge bei der COPD kommt, ist ebenfalls nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise ist sie Ausdruck der Gewebezerstörung, die einerseits durch Zigarettenrauch andererseits durch Proteasen entstehen könnte, und damit entstehender Autoantigene. Eine weitere Möglichkeit stellt die chronische Besiedelung des Respirationstraktes mit Bakterien dar, die daraufhin zu dieser Inflammationsreaktion führt. Auch könnte diese Akkumulation durch gezielte Chemotaxis verursacht sein. Hierbei kommt z.B. das Zytokin IP-10 (interferon-γ inducible protein -10) in Frage, das bei einer chronisch obstruktiven Bronchitis von Bronchialepithelzellen vermehr gebildet wird. Auf der anderen Seite weisen CD8<sup>+</sup> Zellen einer erhöhte Zahl von CXCR-3-Rezeptoren auf, welche auf IP-10 reagieren können [3]. Eghtesad et al. konnten zeigen, dass primäre humane Bronchialepithelzellen unter inflammatorischen Bedingungen Chemokine produzieren, die zu einer vermehrten Transmigration von T-Lymphozyten durch Endothelzellen führen. Eine genauere Klassifizierung dieser Chemokine fand nicht statt [22]. Dies macht deutlich, dass auch zwischen T-Lymphozyten und Bronchialepithelzellen

eine Vielzahl von möglichen Interaktionen besteht, deren genaue Untersuchung für das Verständnis der Pathogenese der COPD entscheidend sein könnte.

Auch den Fibroblasten wird eine Bedeutung bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung zugeschrieben. So konnten z.B. Ning et al. belegen, dass es durch Zigarettenrauch in humanen Lungenfibroblasten zu einer gesteigerten Expression von MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) kam, welches in der Lage ist, extrazelluläre Matrixkomponenten wie Kollagen I, Elastin, Laminin und Proteoglycane zu zerstören [62]. Die Funktion der Fibroblasten bei der COPD geht aber wohl über die Beteiligung an Remodeling-Prozessen noch hinaus. Es scheinen komplexe Interaktionen zwischen Bronchialepithelzellen und Lungenfibroblasten zu bestehen. So kam es nach der Stimulation von Fibroblasten aus COPD-Patienten mit den Überständen einer bronchialen Epithelzelllinie zur vermehrten Expression von ICAM-1, einem Adhäsionsmolekül, dem man die Beteiligung an der Antigenexpression und an proinflammatorischen Effekten über eine gesteigerte Leukozytenmigration zuschreibt [99]. Weiterhin kann die Matrixproduktion von Fibroblasten durch das epitheliale TGF- $\beta$  gefördert und durch PGE<sub>2</sub>, deren Quelle auch Epithelzellen darstellen, inhibiert werden [87].

Aber auch die Fibroblasten nehmen einen direkten Einfluss auf bronchiale Epithelzellen. So führt Zigarettenrauch zu einer vermehrten Synthese von PGE<sub>2</sub> aus Fibroblasten, das seinerseits einen proliferativen Effekt auf Epithelzellen hat und damit möglicherweise an der Entwicklung von Lungencarcinomen beteiligt ist. Die immunologische Funktion der Fibroblasten zeigt sich auch in ihrer Fähigkeit, verschiedene proinflammatorische Zytokine zu produzieren. Hierzu zählen neben dem oben bereits erwähnten PGE<sub>2</sub>, IL-8, einem Chemoattraktanten für neutrophile Granulozyten, IL-6 und MCP-1, das an der vermehrten Rekrutierung von Makrophagen beteiligt ist [55].

Auch die Fibroblasten exprimieren das non-neuronale cholinerge System. So sind auf ihnen muscarinerge Rezeptoren vom Typ M<sub>1</sub>-M<sub>3</sub> zu finden mit einer Prävalenz des M<sub>2</sub>-Rezeptors. Man weiß mittlerweile, dass die Stimulation dieser Rezeptoren mit Acetylcholin oder Carbachol zu einer gesteigerten Proliferation der Fibroblasten führt. Dieser Effekt lässt sich durch den muscarinergen Antagonisten Tiotropiumbromid vollständig hemmen [66]. Die Untersuchung mit verschiedenen spezifischen muscarinergen Antagonisten zeigte allerdings, dass diese Proliferation wohl über den M<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt wird und die Selektivität für den M<sub>3</sub>-Rezeptor, die das Tiotropiumbromid inne hat, unter diesen Versuchsbedingungen von geringerer Bedeutung ist [56].

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Vielzahl von Möglichkeiten besteht, wie das non-neuronale cholinerge System der verschiedenen Zelltypen und die Interaktion zwischen diesen Zellen Einfluss auf die Inflammation der chronisch obstruktiven Bronchitis nehmen könnten.

In Bezug auf die Fragestellung der Arbeit lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1. Nach Stimulation von primären humanen Bronchialepithelzellen und der Zelllinie BEAS 2 B mit dem muscarinergen Agonisten Carbachol wird auf RNA-Ebene mittels quantitativer PCR durch Light Cycler-Analysen keine Hochregulierung des proinflammatorischen Zytokins IL-8 beobachtet.
2. Die gefundenen Ergebnisse lassen sich auf Proteinebene mittels IL-8 ELISA verifizieren.
3. Auch nach Vorstimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  in verschiedenen Dosierungen und nachfolgender Stimulation mit Carbachol wird IL-8 nicht vermehrt ausgeschüttet.
4. Eine carbacholabhängige Produktion von neutrophilen Chemoattraktanten aus bronchiale Epithelzellen konnte nicht gezeigt werden.
5. Mittels Calciumimaging ließ sich die direkte Wirkung von Carbachol an den muscarinergen Rezeptoren vom Typ M<sub>3</sub> unter den gewählten Bedingungen nicht sichtbar machen, so dass hierzu noch weitere Experimente nötig sein werden, wodurch aber die Ergebnisse fehlender cholinriger Aktivierung bronchialer Epithelzellen unterstützt werden.

## 5 Zusammenfassung

Die chronisch obstruktive Bronchitis, eine Erkrankung, die die Betroffenen stark in ihrer Lebensqualität einschränkt, und erheblich zur weltweiten Morbidität und Mortalität beiträgt, ist in ihrer Pathogenese nur unvollständig verstanden und aus diesem Grund nur unzureichend therapierbar.

Etabliert in der Behandlung der COPD sind Anticholinergika, die zum einen bronchodilatatorisch wirken, zum anderen aber, wie sich in mehreren klinischen Studien angedeutet hat, potentiell antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen. In diesem Zusammenhang ist das non-neuronale cholinerge System, also das Vorkommen von Acetylcholin, nicotinergen und muscarinergen Rezeptoren und acetylcholinproduzierender Enzyme auch außerhalb von Neuronen, von Bedeutung. Dieses findet sich auf verschiedensten Zellen, u.a. bronchialen Epithelzellen und verschiedenen immunologischen Zellen, z.B. Makrophagen und neutrophile Granulozyten, so dass auch hier eine Vermittlung inflammatorischer Effekte, wie sie bei der COPD stattfindet, denkbar ist.

Wir wählten daher für unsere Arbeit das Zellkulturmodell humaner bronchialer Epithelzellen. Hierbei wurde einerseits die bronchoepitheliale Zelllinie BEAS 2 B, andererseits primäre bronchiale Epithelzellen verwandt. Unter Kulturbedingungen gelang auf den primären Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie der Nachweis muscariniger M<sub>3</sub>-Rezeptoren.

Beide Zelltypen wurden mit Carbachol stimuliert, einer Substanz die selektiv am M<sub>3</sub>-Rezeptor wirkt, und nachfolgend die Expression und Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-8 untersucht. Wie sich zeigte, konnte dabei weder im direkten Nachweis mittels IL-8-ELISA, noch auf mRNA-Ebene bei beiden Zelltypen eine Veränderung nach cholinriger Stimulation festgestellt werden.

Mittels Calciumimaging wurde im nächsten Schritt versucht, die intrazelluläre Wirkung nach muscarinriger Stimulation direkt sichtbar zu machen. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte eine Wirkung des Carbachols über einen Anstieg des intrazellulären Calciums allerdings nicht belegt werden.

Abschließend wurde untersucht, ob durch Carbachol eine Freisetzung von chemotaktisch aktiven Substanzen mit Stimulation neutrophiler Granulozyten erfolgt. Im Chemotaxis-Assay konnte kein Hinweis auf die Freisetzung chemotaktisch wirksamer Substanzen gefunden werden. Allerdings konnte eine erhöhte Chemokinese neutrophiler Granulozyten durch den Überstand cholinerg stimulierter bronchialer Epithelzellen erzielt werden.

In der Zusammenschau aller Ergebnisse lässt sich daher ein proinflammatorischer Effekt anhand der IL-8-Ergebnisse durch cholinerge Stimulation primärer humarer Bronchialepithezelnen und der Zelllinie BEAS 2 B nicht belegen. Die Befunde erhöhter Chemokinese neutrophiler Granulozyten nach Stimulation mit Überständen von Charbachol stimulierter bronchialer Epithelzellen deuten auf eine indirekte proinflammatorische Komponente hin, die jedoch noch weiterer Untersuchungen bedarf.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Aguayo S (1994) Determinants of susceptibility to cigarette smoke. Am J Respir Crit Care Med 149:1692-1698
2. Barnes PJ (2000) The pharmacological properties of tiotropium. Chest 117:63-66
3. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA (2003) Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. Eur Respir J 22:672-688
4. Bazzoni F, Cassatella M, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggolini M (1991) Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. J Exp Med 173:771–774
5. Beeh KM, Welte T, Buhl R (2002) Anticholinergics in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. Respiration 69:372-379
6. Belmonte K (2005) Cholinergic Pathways in the Lungs and Anticholinergic Therapy for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Proc Am Thorac Soc 2:297–304
7. Bhowmik A, Seemungal T, Sapsford RJ, Jadwiga A (2000) Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. Thorax 55:114-120
8. Buhling F, Lieder N, Kuhlmann UC, Waldburg N, Welte T (2007) Tiotropium suppresses acetylcholine-induced release of chemotactic mediators in vitro. Respir Med 101:2386-2394
9. Burrows B, Knudson RJ, Lebowitz MD (1977) The relationship of childhood respiratory illness to adult obstructive airway disease. Am Rev Respir Dis 115:751-760
10. Calderon-Garciduenas L, Mora-Tiscareno A, Fordham LA, Chung CJ, Valencia-Salazar G, Flores-Gomez S, Solt AC, Gomez-del Campo A, Jardon-Torres R, Henriquez-Roldan C, Hazucha MJ, Reed W (2006) Lung radiology and pulmonary function of children chronically exposed to air pollution. Environ Health Perspect 114:1432-1437
11. Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I (1999) Increased MCP-1 and MIP-1 beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitis. Eur Respir J 14:160-165
12. Casaburi R, Mahler DA, Jones PW, Wanner A, San PG, ZuWallack RL, Menjoge SS, Serby CW, Witek T, Jr. (2002) A long-term evaluation of once-daily inhaled tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J 19:217-224
13. Chen G, Grotendorst G, Eichholtz T, Khalil N (2003) GM-CSF increases airway smooth muscle cell connective tissue expression inducing by TGF-beta receptors Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284:548-556

14. Clement J, van de Woestijne K (1982) Rapidly decreasing forced expiratory volume in one second or vital capacity and development of chronic airflow obstruction. Am Rev Respir Dis 125: 553-558
15. Cook D, Strachan D (1999) Health effects of passive smoking-10: Summary of effects of parenteral smoking on the respiratory health of children and implications for research. Thorax 54:357-366
16. Coraux C, Martinella-Catusse C, Nawrocki-Raby B, Hajj R, Burlet H, Escotte S, Laplace V, Birembaut P, Puchelle E (2005) Differential expression of matrix metalloproteinases and interleukin-8 during regeneration of human airway epithelium in vivo. J Pathol 206:160-169
17. Cosio M, Majo M, Cosio M (2002) Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. Chest 121:160-165
18. Coulson F, Fryer A (2003) Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. Pharmacology & Therapeutics 98:59-69
19. Coxson H, Chan I, Mayo J, Hlynky J, Nakano Y, Birmingham C (2004) Early emphysema in patients with anorexia nervosa. Am J Respir Crit Care Med 170:748-752
20. de Boer WI, van Schadewijk A, Sont JK, Sharma HS, Stolk J, Hiemstra PS, van Krieken JH (1998) Transforming growth factor beta1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 158:1951-1957
21. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M (1998) Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. Am J Respir Crit Care Med 158:1277-1285
22. Eghesad M, Jackson HE, Cunningham AC (2001) Primary human alveolar epithelial cells can elicit the transendothelial migration of CD14+ monocytes and CD3+ lymphocytes. Immunology 102:157-164
23. Fichter J (1995) Chronische Bronchialobstruktion und Lungenemphysem. Urban and Schwarzenberg, München
24. Fletcher C, Peto R (1977; ) The natural history of chronic airflow obstruction. Br Med J 1:1645-1648
25. Floreani A, Wyatt T, Stoner J, Sanderson S, Thompson E, Allen-Gipson D, Heires A (2003) Smoke and C5a induce airway epithelial ICAM-1 and cell adhesion. Am J Respir Cell Mol Biol 29:472-482
26. Freeman D, Lee A, Price D (2007) Efficacy and safety of tiotropium in COPD patients in primary care--the SPiRiva Usual CarE (SPRUCE) study. Respir Res 8:45
27. Gillissen A (2003) Die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung. UNI-MED Verlag AG, Bremen

28. GOLD-Initiative (2006) Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. In: [www.goldcopd.com](http://www.goldcopd.com)
29. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ (2006) Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 7:73
30. Grashoff WF, Sont JK, Sterk PJ, Hiemstra PS, de Boer WI, Stolk J, Han J, van Krieken JM (1997) Chronic obstructive pulmonary disease: role of bronchiolar mast cells and macrophages. *Am J Pathol* 151:1785-1790
31. Gwilt C, Donnelly L, Rogers D (2007) The non-neuronal cholinergic system in the airways: An unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacology and therapeutics* 115:208-222
32. Hausen T (1993) Atemwegserkrankungen. Ullstein Mosby GmbH & Co, Berlin
33. Hayashi S, Hogg JC (2007) Adenovirus infections and lung disease. *Curr Opin Pharmacol* 7:237-243
34. Hellermann G, Nagy S, Kong X, Lockey R, Mohapatra S (2002) Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir Res* 3:22
35. Higenbottam T SM, Clark J, Rose G. (1980) Lung function and symptoms of cigarette smokers related to tar yield and number of cigarettes smoked. *Lancet* 1:409-411
36. Hill A, Campell E, Hill S, Bayley D, Stockley R (2000) Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med* 109:288-295
37. Holt P (1987) Immune and inflammatory function in cigarette smokers. *Thorax* 42:241-249
38. Ihn H (2002) Pathogenesis of fibrosis: role of TGF- $\beta$  and CTGF. *Curr Opin Rheumatol* 14:681-685
39. Jadwiga A, Wedzicha M, Gavin C, Donaldson P (2003) Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respir Care* 48:1204 –1213.
40. Janoff A (1985) Elastase in tissue injury. *Annu Rev Med* 36:207-216
41. Jeffery PK (1998) Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax* 53:129-136
42. Kaufmann F, Drouet D, Lelouch J, Brille D (1979) Twelve year spirometric changes among Paris area workers. *Int J Epidemiol* 8:201-212
43. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ (1996) Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153:530-534

44. Kirkpatrick C, Bittinger F, Nozadze K, Wessler I (2003) Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells. *Life Sciences* 72:2111–2116
45. Klapproth H, Racké K, Wessler I (1998) Acetylcholine and nicotine stimulate the release of granulocyte-macrophage colony stimulating factor from cultured human bronchial epithelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 357:472–475
46. Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Munch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ (1997) Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesised by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355:515–523
47. Koyama S, Sato E, Nomura H, Kubo K, Nagai S, Izumi T (1998) Acetylcholine and substance P stimulate bronchial epithelial cells to release eosinophil chemotactic activity. *J Appl Physiol* 84:1528–1534
48. Krull M, Bockstaller P, Wuppermann FN, Klucken AC, Muhling J, Schmeck B, Seybold J, Walter C, Maass M, Rousseau S, Hegemann JH, Suttorp N, Hippenstiel S (2006) Mechanisms of Chlamydophila pneumoniae-mediated GM-CSF release in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:375–382
49. Kurashima K, Kanauchi T, Takayanagi N, Sato N, Tokunaga D, Ubukata M, Yanagisawa T, Sugita Y, Kanazawa M (2005) Serum IgG and IgA antibodies to Chlamydia pneumoniae and severity of emphysema. *Respirology* 10:572–578
50. Laurent P, Janoff A, Kagan H (1983) Cigarette smoke blocks cross-linking of elastin in vitro. *Am Rev Respir Dis* 127:189–192
51. Li XY, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W (1997) In vivo and in vitro proinflammatory effects of particulate air pollution (PM10). *Environ Health Perspect* 105 Suppl 5:1279–1283
52. Littner MR, Ilowite JS, Tashkin DP, Friedman M, Serby CW, Menjoge SS, Witek TJ, Jr. (2000) Long-acting bronchodilation with once-daily dosing of tiotropium (Spiriva) in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1136–1142
53. Majo J, Ghezzo H, Cosio M (2001) Lymphocyte population and apoptosis in the lungs and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 17:946–953
54. Mannino D, Homa D, Akinbami L, Ford E, Redd S (2002) Chronic obstructive pulmonary disease surveillance - United States, 1997-2000. *MMWR Surveill Summ* 51:1–16
55. Martey CA, Pollock SJ, Turner CK, O'Reilly KM, Baglolle CJ, Phipps RP, Sime PJ (2004) Cigarette smoke induces cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E2 synthase in human lung fibroblasts: implications for lung inflammation and cancer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L981–991

56. Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, Haag S, Fuhrmann M, Stichnote C, Juergens U, Racke K (2006) Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:621–627
57. Mio T, Romberger D, Thompson A, Robbins R, Heires A, Rennard S (1997) Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 155:1770-1776
58. Morgan W (1998) Maternal smoking and infant lung function. Further evidence for an in utero effect. *Am J Respir Crit Care Med* 158:689-690
59. Murray C, Lopez A (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1498-1504
60. NHLBI (1998) Morbidity and mortality chartbook.
61. NHLBI (2004) Morbidity and Mortality: 2004 Chart Book on cardiovascular, lung, and blood diseases.58-64
62. Ning W, Dong Y, Sun J, Li C, Matthay MA, Feghali-Bostwick CA, Choi AM (2007) Cigarette smoke stimulates matrix metalloproteinase-2 activity via EGR-1 in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:480-490
63. O`Shaughnessy T, Ansari T, Barnes N, Jeffery P (1997) Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8 positive T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med* 155:852-857
64. Pettersen CA, Adler KB (2002) Airways inflammation and COPD: epithelial-neutrophil interactions. *Chest* 121:142-150
65. Pforte A (2002) COPD-chronisch obstruktive Lungenerkrankung und Komplikationen. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
66. Pieper MP, Chaudhary NI, Park JE (2007) Acetylcholine-induced proliferation of fibroblasts and myofibroblasts in vitro is inhibited by tiotropium bromide. *Life Sci* 80:2270-2273
67. Prescott E, Lange P, Vestbo J (1999) Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results for the Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J* 13:1109-1114
68. Profita M, Giorgi RD, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, Gjomarkaj M, Bonsignore G, Bousquet J, Vignola AM (2005) Muscarinic receptors, Leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy Proc* 60:1361-1369
69. Saetta M, Baraldo S, Corbino L (1999) CD8 positive cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 160:711-717
70. Sahebjami H, Vassallo C (1980) Influence of starvation on enzyme-induced emphysema. *J Appl Physiol* 46:284-288

71. Samet JM, Tager IB, Speizer FE (1983) The relationship between respiratory illness in childhood and chronic air-flow obstruction in adulthood. *Am Rev Respir Dis* 127:508-523
72. Sato E, Koyama S, Okubo Y, Kubo K, Sekiguchi M (1998) Acetylcholine stimulates alveolar macrophages to release inflammatory cell chemotactic activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274:970-979
73. Schulz C, Wolf K, Harth M, Kratzel K, Kunz-Schughart L, Pfeifer M (2003) Expression and release of interleukin-8 by human bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease, smokers, and never-smokers. *Respiration* 70:254-261
74. Shibuya K, Mathers C, Lopez A (2001) Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Consistent Estimates Of Incidence, Prevalence and Mortality by WHO Region.
75. Siafakas N, Vermeire P, Pride N, Paoletti P, Gibson J, Howard P (1996) Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease Am J Respir Crit Care Med 163: 1256-1276
76. Silverman E, Weiss S, Drazen J, Chapman H, Carey V, Campell E (2000) Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 2152-2158
77. Sommerhoff C, Nadel J, Basbaum C, Caughey G (1990) Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovin airway gland serous cells. *J Clin Invest* 85:682-689
78. Sparrow D, Glynn R, Cohen M, Weiss S (1984) The relationship of the peripheral leukocyte count and cigarette smoking to pulmonary function among adult men. *Chest* 86:383–386
79. Stanescu D, Sanna A, Veriter C (1996) Airways obstruction, chronic expectoration and rapid decline in FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* 51:267-271
80. Strom TB, Deisseroth A, Morganroth J, Carpenter CB, Merrill JP (1972) Alteration of the cytotoxic action of sensitized lymphocytes by cholinergic agents and activators of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2995-2999
81. Struckmann N, Schwering S, Wiegand S, Gschnell A, Yamada M, Kummer W, Wess J, v. Haberberger R (2003) Role of Muscarinic Receptor Subtypes in the Constriction of Peripheral Airways: Studies on Receptor-Deficient Mice. *Mol Pharmacol* 64:1444-1451
82. Sunyer J, Jarvis D, Gotschi T, Garcia-Estebe R, Jacquemin B, Aguilera I, Ackerman U, de Marco R, Forsberg B, Gislason T, Heinrich J, Norback D, Villani S, Kunzli N (2006) Chronic bronchitis and urban air pollution in an international study. *Occup Environ Med* 63:836-843

83. Tabona M, Chan-Yeung M, Enarson D, Mac Lean L, Dorken E, Schulzer M (1984) Host factors affecting longitudinal decline in lung spirometry among grain elevator workers. *Chest* 85:782-786
84. Tager I, Ngo L, Hanrahan I (1995) Maternal smoking during pregnancy. Effects on lung function during the first 18 months of life. *Am J Respir Crit Care Med* 152:977-983
85. Takizawa H, Tanaka M, Takami K (2001) Increased expression of transforming growth factor beta 1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstruktive pulmonary disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med* 163:1476-1483
86. Tanino M, Betsuyaku T, Takeyabu K (2002) Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax* 57:405–411
87. Thompson AB, Robbins RA, Romberger DJ, Sisson JH, Spurzem JR, Teschler H, Rennard SI (1995) Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 8:127-149
88. Tomita K, Caramori G, Lim S (2002) Increased p21CIP/WAF1 and B cell lymphoma leukemia-xL expression and reduced apoptosis in alveolar macrophages from smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 166:724-731
89. Traves S, Culpitt S, Russell R, Barnes P, Donnelly L (2002) Elevated levels of the chemokines GRO-a and MCP-1 in sputum samples from COPD patients. *Thorax* 57:590–595
90. Turato G, Zuin R, Saetta M (2001) Pathogenesis and pathology of COPD. *Respiration* 68:117-128
91. Viegi G, Maio S, Pistelli F, Baldacci S, Carrozzi L (2006) Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: health effects of air pollution. *Respirology* 11:523-532
92. Vincken W, van Noord JA, Greefhorst AP, Bantje TA, Kesten S, Korducki L, Cornelissen PJ (2002) Improved health outcomes in patients with COPD during 1 yr's treatment with tiotropium. *Eur Respir J* 19:209-216
93. Weiss S (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320:365-376
94. Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ (2003) The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology. *Life Sciences* 72:2055-2061
95. WHO (1961) Definition and diagnosis of pulmonary disease with spezific references to chronic bronchitis and emphysema In, pp 14-19
96. Witko-Sarsat V, Halbwachs-Mecarelli L, Schuster A (1999) Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:729–736

97. Xu X, Weiss S, Rijcken B, Schouten J (1994) Smoking, changes in smoking habits, and rate of decline in FEV1: new insights into gender differences Eur Respir J 7:1056-1061
98. Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, Narita N (1997) Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. Chest 112:505-510
99. Zandvoort A, van der Geld YM, Jonker MR, Noordhoek JA, Vos JT, Wesseling J, Kauffman HF, Timens W, Postma DS (2006) High ICAM-1 gene expression in pulmonary fibroblasts of COPD patients: a reflection of an enhanced immunological function. Eur Respir J 28:113-122

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchioalveolare Lavage
BPE	Bovine pituitary extract
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	Zirka
Carb.	Carbachol
ChAT	Cholinacetyltransferase
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CTGF	Connective tissue growth factor
CXCR-3	Chemokin Rezeptor 3
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
D-PBS	Dulbecco's Phosphat-buffered saline
ds-DNA	Doppelstrangdesoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylene diamintetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ENA-78	Epithelial neutrophil activating protein of 78 kDa
evtl.	Eventuell
FEV1	Forced exspiratory volume in one second

---

FITC	Fluorescein-Isothiocyan
FVC	Forced vital capacity
fwd.	Forward
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GOLD	Global initiative for chronic obstructive lung disease
Gro- $\alpha$	Growth-related oncprotein alpha
HEPES	4-[2-Hydroxyethyl]-1-piperazin-[2-ethansulfonsäure]
HBSS	Hank's balanced salt solution
h	Stunde
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	Interferon- $\gamma$ inducible protein -10
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B4
M <sub>1</sub>	Muscarinerge Rezeptoren vom Typ M <sub>1</sub>
M <sub>2</sub>	Muscarinerge Rezeptoren vom Typ M <sub>2</sub>
M <sub>3</sub>	Muscarinerge Rezeptoren vom Typ M <sub>3</sub>
max.	Maximal
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger ribonucleinacid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium-bromid
nM	Nanomol

---

NO <sub>x</sub>	Nitrogenoxide
PBEC	Primäre Bronchialepithelzellen
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
rev.	Reverse
RNA	Ribonucleinacid
s.c.	Subcutan
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SO <sub>2</sub>	Schwefeldioxid
sog.	Sogenannte
s.u.	Siehe unter
TGF-β	Transforming growth factor-β
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
U	Umdrehungen
u.a.	Unter anderem
u.v.m.	Und viele mehr
Vergr.	Vergrößerung
WHO	Word Health Organisation
ZAS	Zymosan aktiviertes Serum
z.B.	Zum Beispiel

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Monika Wacker
Geburtstag	26. Oktober 1982
Geburtsort	Regensburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

Oktober 1988 - Juli 1993	Grundschule Sinzing
Oktober 1993 - Juli 2002	Von-Müller-Gymnasium in Regensburg <i>Allgemeine Hochschulreife</i>

### Studium

Oktober 2002 - Oktober 2004	Vorklinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Universität Regensburg
August 2004	<i>Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung</i>
Oktober 2004 - November 2008	Klinischer Abschnitt des Medizinstudiums an der Universität Regensburg
Dezember 2008	<i>Erlangung der Approbation</i>

### Berufsweg

Seit Januar 2009	Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II (Kardiologie, Nephrologie, Pneumologie und Internistische Intensivmedizin) des Universitätsklinikums Regensburg
------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Ch. Schulz für die Auswahl und Bereitstellung des Themas, die Gewinnung der primären Bronchialepithelzellen, wertvolle konstruktive Kritik sowie Diskussionen und nicht zuletzt für seine langwährende Geduld.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. B. Stölcker für die regen Diskussionen, seine fachliche Kompetenz und den Austausch zahlreicher Ideen.

Frau B. Ruhland schulde ich ganz besonderen Dank für die fachliche Unterstützung bei der Arbeit im Labor, ihre aufmunternde Art und ihre netten Worte.

Mein Dank gilt auch den übrigen Mitgliedern im Forschungstrakt H2 für die freundschaftliche Unterstützung und vor allem das angenehme Arbeitsklima.

Danken möchte ich auch von ganzem Herzen meinen Eltern, ohne deren Unterstützung, Fürsorge und Hilfe diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

Meinem Freund M. Greindl möchte ich für seine Geduld, seine unterstützenden und aufmunternden Worte während der Entstehung der Arbeit an dieser Stelle auch noch einmal danken.

## **10      Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Untersuchungen zur proinflammatorischen Wirkung cholinriger Stimulation am humanen Bronchialepithel“

in der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Regensburg ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Regensburg, den 01.11.2010