

**Die hyperosmotische Induktion von
Entzündungsreaktionen in humanen
Bronchialepithelzellen –
Ein Modell für die Cystische Fibrose**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Stefan Marcel Loitsch
aus Wiesbaden

Frankfurt am Main 2006

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber
Prof. Dr. Joachim Bargon
Prof. Dr. Theodor Dingermann

Datum der Disputation: 11.12.07

Meiner Familie gewidmet

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die cystische Fibrose	1
1.2	Geschichte der cystischen Fibrose	1
1.3	Struktur und Expression des CFTR-Gens	3
1.4	Genetik und Physiologie der Mutationen des CFTR-Gens	5
1.5	Der Heterozygotenvorteil - Ursachen für das häufige Auftreten der CFTR-Mutationen	6
1.6	Die Funktion des CFTR-Proteins	7
1.6.1	CFTR ist ein Chloridkanal	7
1.6.2	Regulation des CFTR-Chloridkanals	10
1.7	CFTR als multifunktionelles Protein: ein Chloridkanal und Regulator anderer Kanäle und Transporter	11
1.7.1	CFTR reguliert den <i>epithelial sodium channel</i> ENaC	11
1.7.2	CFTR reguliert den outwardly rectifying chloride channel ORCC	12
1.7.3	CFTR reguliert den renal outer medullary potassium channel ROMK	13
1.7.4	CFTR reguliert epitheliale Kanäle für Wasser, die Aquaporine	14
1.7.5	CFTR beeinflusst den Transport von HCO_3^-	15
1.8	Die Rolle von CFTR in der Lungenerkrankung	17
1.8.1	Die klinische Manifestationen der Lungenerkrankung	17
1.8.2	Infektion oder Inflammation – was beginnt zuerst?	18
1.8.3	Die Entstehung der Lungenerkrankung bei CF	19
1.8.3.1	Abwehrmechanismen der Lunge	19
1.8.3.2	Die mukoziliäre Clearance	20
1.8.3.3	Die Bedeutung der Atemwegsflüssigkeit bei CF: Die Hochsalzhypothese	22
1.8.3.4	Die Bedeutung der Atemwegsflüssigkeit bei CF: Die Niedrigvolumenhypothese	24
1.8.4	Die Regulation des Wasser- und Ionenhaushalts ist in CF-Zellen gestört	25
1.9	Experimentelles Modell und Fragestellung	29

2	MATERIAL UND METHODEN	30
2.1	Material	30
2.1.1	Allgemeine technische Geräte	30
2.1.2	Geräte und Materialien für die Zellkultur	30
2.1.3	Geräte und Materialien für die Molekularbiologie und Biochemie	30
2.1.4	Chemikalien	31
2.1.5	Enzyme	33
2.1.6	Kits und Reagenzien	33
2.1.7	Bakterienstämme	34
2.1.8	DNA-Vektoren	34
2.1.9	Antikörper	34
2.1.10	Oligonukleotide	34
2.2	Methoden	35
2.2.1	Arbeiten mit Bakterien	35
2.2.1.1	Anzucht von Bakterien	35
2.2.1.2	Anlegen von Glycerinkulturen	35
2.2.1.3	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien: Alkalische Lyse („Mini-prep“)	36
2.2.1.4	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien mit Hilfe von Ionenaustauschersäulen	37
2.2.2	Arbeiten mit humanen Zellen	40
2.2.2.1	Zelllinien	40
2.2.2.2	Subkultivierung eukaryotischer Zellen	40
2.2.2.3	Einfrieren humaner Zelllinien	41
2.2.2.4	Auftauen humaner Zelllinien	42
2.2.2.5	Präparation bronchialer und nasaler Epithelzellen für die Isolation von mRNA	42
2.2.2.6	Differentialzytologie der Zellen aus bronchialen und nasalen Bürstungen	43
2.2.2.7	Präparation bronchialer Epithelzellen für die primäre Zellkultur	44
2.2.2.8	Kultivierung primärer bronchialer Epithelzellen an der Luft-Medium-Grenzfläche („Air-Liquid Interface“; ALI)	46
2.2.3	Quantifizierung der mRNA-Expression	46
2.2.3.1	RNA-Isolierung	46
2.2.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	47
2.2.3.3	Reverse Transkription	48

2.2.4	RT-kompetitive Multiplex PCR	49
2.2.4.1	Erstellung interner Standards für eine kompetitive PCR	49
2.2.4.2	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	51
2.2.4.3	Reinigung von PCR-Produkten	52
2.2.4.4	Klonierung von PCR-Fragmenten mit dem TOPO TA Cloning TM -Kit	53
2.2.4.5	Hitzeschock-Transformation von E. coli	54
2.2.4.6	Klonierung, Transformation und blau-weiß Selektion	54
2.2.4.7	RT-kompetitive Multiplex-PCR	55
2.2.4.8	Densitometrische Quantifizierung	57
2.2.5	IL-6 und L-8 ELISA	58
2.2.6	Proteinanalysen	60
2.2.6.1	Proteinisolierung	60
2.2.6.2	Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine	60
2.2.6.3	Western Blotting	62
2.2.7	Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellgröße	63
3	ERGEBNISSE	66
3.1	Kultivierung primärer humaner Bronchialepithelzellen	66
3.1.1	Die Gewinnung und Kultur primärer humaner Bronchialepithelzellen	66
3.1.2	Die Charakterisierung der Kultur primärer humaner Epithelzellen	68
3.2	Etablierung eines RNA-Quantifizierungsverfahrens für geringe Probenmengen	71
3.2.1	Kompetitive PCR	71
3.2.2	Amplifikationskinetik der Kompetitoren	73
3.2.3	RT-Kompetitive Multiplex PCR	74
3.2.4	Bestimmung der mRNA Expression über das Verhältnis von Kompetitor und Zielsequenz.	75
3.2.5	Die RT-Kompetitive Multiplex PCR korrigiert Schwankungen der eingesetzten RNA-Menge.	76
3.2.6	Semiquantitative Bestimmung der CFTR mRNA-Expression in Bronchial- und Nasalbürstungen	78
3.3	Bronchialepithelzellen reagieren auf osmotische Belastungen mit einer Regulation der Expression der mRNA der Osmolyttransporter BGT-1, TAUT und SMT	80

3.4	Hyperosmotischer Stress induziert die Expression und Sekretion von IL-8	83
3.4.1	Die hyperosmotische Induktion der Expression und Sekretion von IL-8 ist dosisabhängig	83
3.4.2	Die hyperosmotische Induktion der Expression und Sekretion von IL-8 ist zeitabhängig	85
3.4.3	Die hyperosmotisch induzierte IL-8 mRNA-Expression wird durch p38 MAP-Kinase vermittelt	87
3.5	Reaktive Sauerstoffspezies als Signalvermittler der hyperosmotischen Induktion von IL-8	89
3.5.1	Antioxidantien supprimieren die Induktion der IL-8-Sekretion durch hyperosmotischen Stress	89
3.5.2	Antioxidantien supprimieren die Induktion der IL-8-mRNA-Expression durch hyperosmotischen Stress	91
3.5.3	Antioxidantien supprimieren die Aktivierung von p38 MAP-Kinase durch hyperosmotischen Stress	93
3.6	Veränderungen des Zellvolumens sind verantwortlich für die hyperosmotisch induzierte Inflammation	94
3.6.1	Die hyperosmotische Induktion der Sekretion von IL-6 und IL-8 ist abhängig vom Zellvolumen	94
3.6.2	Hyperosmotische Belastungen mit Mannitol und NaCl, nicht jedoch Harnstoff, führen zu einer Abnahme des Zellvolumens	96
3.6.3	Die hyperosmotische Aktivierung von p38 MAP-Kinase in Bronchialepithelzellen ist abhängig vom Zellvolumen	97
4	DISKUSSION	100
4.1	Die Kultivierung primärer humaner Bronchialepithelzellen	100
4.1.1	Die Adhärenzoptimierung	100
4.1.2	Propagierung und Differenzierung primärer humaner Bronchialepithelzellen	101
4.1.3	Die Kultivierung an der Luft-Medium-Grenzfläche	104
4.2	Grundlagen quantitativer PCR-Verfahren	105
4.2.1	Der Einsatz von Standards in der quantitativen PCR	107
4.2.2	Die Quantitative PCR mit internen Standards	107
4.2.3	Die kompetitive PCR	110
4.2.4	Die RT-Kompetitive Multiplex-PCR (RCMP)	111
4.2.4.1	Die RCMP kontrolliert die initiale RNA-Menge	111

4.2.4.2	Die Verwendung Einsatz von cDNA-Kompetitoren	112
4.2.4.3	Die RCMP vereinfacht die densitometrische Quantifizierung der PCR-Produkte	113
4.4	Induktion der Expression und Sekretion von IL-8 durch hyperosmotischen Stress: Inflammation ohne Infektion	117
4.5	p38 MAP-Kinase wird durch hyperosmotische Belastungen aktiviert und ist an der Induktion der Interleukin-8 mRNA-Expression beteiligt.	119
4.6	Reaktive Sauerstoffspezies als Signalvermittler der hyperosmotischen Induktion von IL-8	121
4.7	Veränderungen des Zellvolumens sind verantwortlich für die hyperosmotisch induzierte Inflammation	122
5	ZUSAMMENFASSUNG	126
6	ABKÜRZUNGEN	128
7	LITERATUR	129
8	ANHANG	148
8.1	Veröffentlichungen aus dieser Arbeit	148
8.2	Sonstige Veröffentlichungen	148
8.3	Förderung und Danksagung	151
8.4	Lebenslauf	152

1 Einleitung

1.1 Die cystische Fibrose

Die Mukoviszidose oder cystische Fibrose (Cystic Fibrosis, CF) ist eine Erkrankung, die durch eine Fehlfunktion des sekretorischen Epithels aller exkretorischen Drüsen charakterisiert ist. Sie wird autosomal rezessiv vererbt und ist die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung in der westlichen Welt. Ausgelöst wird sie durch Mutationen im Gen des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR). In der europäischen Bevölkerung ist etwa jeder 25. Erwachsene ein klinisch asymptomatischer Träger des defekten Gens (Heterozygotie-Frequenz). Folglich kommt auf 2000-3000 Neugeborene ein Kind mit cystischer Fibrose (Homozygotie-Frequenz) (Boat et al., 1989).

Folge des genetischen Defekts ist eine Störung des Elektrolyttransports. Ein für die zelluläre Chloridpermeabilität verantwortliches Membranprotein wird nicht oder nur funktionsuntüchtig gebildet. Die exokrinen Drüsen sezernieren ein wasserarmes, meist hochvisköses Sekret. Dieser Defekt betrifft vor allem die Epithelzellen des Respirationstrakts, einschliesslich der submukösen Drüsenzellen, die Zellen des Pankreasgangsystems und die Zellen des Darmepithels. Es handelt sich somit um eine Multiorganerkrankung mit den Leitsymptomen einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung, einer exokrinen Pankreasinsuffizienz und einem deutlich erhöhten Salzgehalt im Schweiß. Während vor 1945 die Mehrzahl der Patienten noch im ersten Lebensjahr starb, ist ihre mittlere Lebenserwartung inzwischen auf fast 30 Jahre gestiegen.

1.2 Geschichte der cystischen Fibrose

Mutationsfrequenzanalysen lassen vermuten, dass die häufigsten zur cystischen Fibrose führenden Mutationen erstmals vor ca. 50 000 Jahren aufgetreten sind (Bertranpetit und Catafelli, 1996). Ihr Ursprung liegt im arabisch-vorderasiatischen Raum (Morral et al., 1994), wobei mit ziemlicher

Sicherheit die ethnische Gruppe der Belutschen als Ursprungspopulation in Frage kommt (Dawson und Frossard, 2000). Die Belutschen lebten zu der in Frage kommenden Zeit auf dem persischen Hochplateau inmitten eines Völkerwanderungswegs. Von dort aus konnte sich die cystische Fibrose sehr schnell durch Wanderjäger nach Europa ausbreiten, wo erste Mutationen wohl vor 30-40 000 Jahren im Jungpaläolithikum auftauchen.

Anekdotische Schilderungen aus dem Mittelalter lassen vermuten, dass zumindest einige der charakteristischen Symptome der cystischen Fibrose schon früh erkannt und mit der Mortalität der Krankheit in Verbindung gebracht wurden. So beschreibt eine alemannische Folklore:

Wehe dem Kinde, dessen Stirn salzig schmeckt, wenn du sie küßt. Es ist verhext und wird bald sterben.

Die ersten wissenschaftlichen Schilderungen gehen auf das späte 16. Jahrhundert zurück. 1595 beschreibt Pieter Pauw, ein Professor für Anatomie und Botanik aus Leiden (Niederlande) erstmals die Läsionen der Bauchspeicheldrüse bei einem „verhexten“ Kind (Busch, 1990). Sein Autopsiebericht schildert ein 11-jähriges Mädchen als mager, mit geschwellenem, verhärtetem und weisslich schimmernden Pankreas. 1606 beschreibt Alonso y de los Ruyzes de Fonteca, ein Professor der Medizin aus Henares (Spanien), den salzigen Geschmack eines Fingers, mit dem man die Stirn eines „verhexten“ Kindes berührt hat. Tatsächlich ist diese frühe Beobachtung auch in der heutigen Zeit ein wesentliches Diagnosemerkmal der cystischen Fibrose - die Bestimmung des Elektrolytgehalts des Schweißes.

Im 19. und im frühen 20. Jahrhundert werden andere typische krankhafte Veränderung beschrieben, wie der Mekoniumileus, eine Verlegung der Darmpassage (Ileus) im Endteil des Dünndarmes durch festes eingedicktes Kindspech (Mekonium) und die Steatorrhea, eine Anreicherung von Fetten im Stuhl, die auf die gestörte Funktion des Pankreas zurückgeht (Rokitansky et al. 1842; Landsteiner, 1905; Garrod and Hurlley, 1912).

Die Symptome der Lungenerkrankung wurden 1936 von Fanconi et al. beschrieben und als "cystische Fibromatose mit Bronchiektasen" bezeichnet. Als separates Krankheitsbild beschrieb 1938 Dorothy Andersen die pathologischen Veränderungen am Pankreas als „cystische Fibrose des Pankreas“. Es dauerte noch einige Jahre, bis man zu der Erkenntnis kam, dass die unterschiedlichen Erscheinungsformen an Darm, Pankreas und Lunge auf eine einzige Krankheit zurückzuführen sind, bei der weitgehend alle exokrinen Drüsen mit mukoider Sekretion betroffen sind. Diese Krankheit bezeichnete man als Mukoviszidose; ein Name der nur noch im deutschsprachigen Raum verwendet wird, während sich international der Begriff „cystic fibrosis“ durchgesetzt hat.

Di Sant`Agnese (1953) wies nach, dass Natrium und Chlor im Schweiß der Patienten konstant erhöht sind. Diese Ergebnisse erwiesen sich als richtungweisend für die nächsten Jahrzehnte, bis Paul Quinton 1983 die Erkrankung auf einen Defekt der Chloridsekretion zurückführte. Diese Vermutung wurde später bestätigt, als es gelang, das Gen zu klonieren, das bei der cystischen Fibrose defekt ist.

1.3 Struktur und Expression des CFTR-Gens

Die autosomal rezessive Vererbung der cystischen Fibrose, wurde erstmals 1946 beschrieben (Anderson und Hodges, 1946). 1985 wurde das CF-Gen mit Hilfe von Kopplungsanalysen mit polymorphen DNS-Markern in der Bande 7q31.2 auf dem langen Arm von Chromosom 7 lokalisiert (Tsui et al., 1985). Ein Meilenstein der so genannten reversen Genetik war 1989 die Isolation des Gens durch die Arbeitsgruppen von Tsui, Riordan und Collins (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989). Es erstreckt sich über 250 kb DNA und besteht aus 27 Exons, die eine mRNA von 6,5 kb kodieren. Der offene Leserahmen ergibt ein Protein von 1480 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 167 kDa.

Die Analyse des vorhergesagten Translationsprodukts führte zu der Erkenntnis, dass das Gen für ein Transmembranprotein kodiert. Aufgrund der Verbindung des genetischen Locus mit Störungen des Salztransports wurde es cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) genannt. Das CFTR tatsächlich an den Störungen im Transport von Chlorid beteiligt war, zeigten Transfektionsversuche, bei denen die Transfektion mit Wildtyp-CFTR die Chloridtransportstörungen von CF-Zellen korrigierte oder komplementierte (Drumm et al., 1990; Rich et al., 1990). Kurze Zeit später zeigte sich, das CFTR selbst ein cAMP-regulierter Chlorid-Kanal ist (Anderson et al., 1991a; Bear et al., 1992).

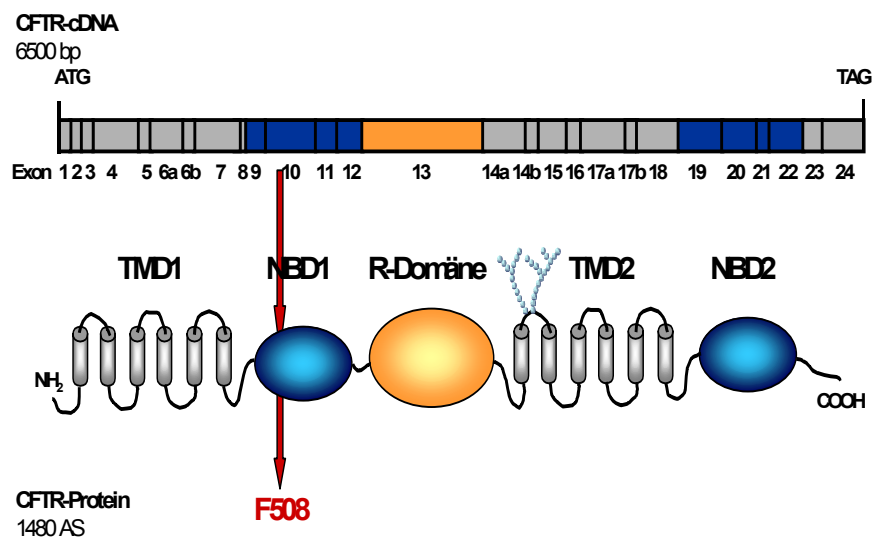


Abb. 1: Topologie von CFTR: Das CFTR-Gen erstreckt sich über 250 kbp DNA und besteht aus 27 Exons, die eine mRNA von 6,5 kb kodieren. Der offene Leserahmen ergibt ein Protein mit 1480 Aminosäuren. Das Protein besteht aus fünf Domänen: den membranüberspannenden Transmembrandomänen TMD1 und TMD2, den Nukleotidbindedomänen NBD1 und NBD2, sowie der regulatorischen oder R-Domäne. Im Bereich der Aminosäuren Asparagin 894 und Asparagin 900 zu Beginn der TMD2 finden sich Konsensussequenzen für eine N-Glykosylierung, deren Umfang das Molekulargewicht zwischen 135 und 200 kDa schwanken lässt. Die häufigste Mutation bei cystischer Fibrose ist eine Deletion von drei Basenpaaren in Exon 10. Dies führt zu einer Deletion von Phenylalanin an Position 508 der Aminosäuresequenz. Diese Deletion betrifft die Nukleotidbindedomäne 1 des Proteins.

1.4 Genetik und Physiologie der Mutationen des CFTR-Gens

Die Entdeckung des CFTR-Gens durch die Arbeitsgruppen um F. Collins, L.-C. Tsui und J. Riordan beruhte unter anderem auf der Entdeckung einer Deletion von drei Basenpaaren bei etwa 70% der damals untersuchten CF-Patienten, die so genannte $\Delta F508$ -Mutation. Inzwischen sind etwa 1450 pathogene Sequenzvarianten des CFTR-Gens bei dem *Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium* (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>) gemeldet.

Die pathogenetisch wichtigste CFTR-Mutante, die weltweit für mehr als die Hälfte aller Mukoviszidosefälle verantwortlich ist, ist $\Delta F508$ -CFTR. Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Inframe-Deletion von 3 Basenpaaren im Exon 10 des CFTR-Gens. Dies führt zu einer Deletion von Phenylalanin in der NBD1 an Position 508 des CFTR-Proteins (**Abb. 1**).

Die $\Delta F508$ -Mutation ist eine so genannte Klasse-II-Mutation. Diese Klasse beinhaltet Proteine, bei denen der Reifungsprozess gestört ist. Im Falle von $\Delta F508$ -CFTR ist die Prozessierung des Proteins fehlerhaft, so dass es nicht seinen Bestimmungsort, die Apikalmembran erreicht. Die heterologe Expression von $\Delta F508$ -CFTR zeigte bereits 1990, dass ein Defekt in der Prozessierung und des intrazellulären Transports vorliegt (Cheng et al. 1990; Gregory et al., 1991). $\Delta F508$ -CFTR wird nach der Translation und N-Glykosylierung mit mannosereichem Oligosaccharid am endoplasmatischen Retikulum (ER) nicht weiter prozessiert (Lukacs et al., 1994), sondern polyubiquitinyliert und unter Beteiligung des Proteasomenkomplexes vollständig abgebaut (Jensen et al., 1995; Ward et al., 1995).

Entscheidend für die Qualitätskontrolle sind dabei sowohl ER-ständige als auch zytosolische Proteine. Von der zytosolischen Seite tritt das neu synthetisierte CFTR in Kontakt mit Hsp70, einem Chaperon, das bei der Faltung zytosolischer Proteine assistiert (Yang et al., 1993), sowie mit den HSP40-Proteinen Hdj-1, Hdj-2 und CHIP als Ko-Chaperonen. Die Interaktion mit Hdj-2 hat ihren Höhepunkt mit der Translation von NBD-1 und nimmt nach Synthese der R-Domäne deutlich ab (Meacham et al., 1999 und 2001). Ebenfalls an der Faltung von CFTR beteiligt ist das cytosolische Chaperon HSP90 (Loo et al., 1998).

HSP90 scheint dabei dem Abbau entgegenzuwirken, während Hsc70 und seine Ko-Chaperone den Abbau favorisieren.

Im endoplasmatischen Retikulum interagiert CFTR mit Calnexin, einem Kalzium bindenden Membranprotein mit Kontakt zur luminalen Seite des ER (Pind et al., 1994). Calnexin ist Teil der Qualitätskontrolle der Zelle und bewirkt, dass nur richtig gefaltete Proteine das ER verlassen (Ou et al., 1993). Es erkennt als Lectin die zunächst basale Glykosylierung von Proteinen. Nach Deglykosylierung durch Glucosidase I und Glucosidase II löst sich die Bindung mit Calnexin. Falsch gefaltete Proteine werden anschließend wieder monoglykosyliert und erneut von Calnexin gebunden (zur Übersicht: Parodi, 2000). So zeigt sich auch eine wesentlich stärkere Interaktion von Calnexin mit $\Delta F508$ -CFTR gegenüber Wildtyp-CFTR (Pind et al., 1994). Nur unvollständig glykosyliertes und inzwischen ubiquitinyliertes CFTR wird dann unter Beteiligung von Sec61, einer wesentlichen Komponente des Proteintranslokationssystems dem zytosolischen Proteasom und somit dem Abbau zugeführt (Bebok et al., 1998).

Unter bestimmten Bedingungen gelingt es jedoch auch $\Delta F508$ -CFTR die Qualitätskontrolle der Zelle zu überwinden und vollständig glykosyliert in die Apikalmembran ausgeliefert zu werden. Dies geschieht bei $\Delta F508$ -CFTR exprimierenden Zellen durch Erniedrigung der Temperatur auf unter 30 °C (Denning et al., 1992), oder durch eine Behandlung der Zellen mit Butyrat (Cheng et al., 1995) oder Glycerol (Sato et al., 1996).

1.5 Der Heterozygotenvorteil - Ursachen für das häufige Auftreten der CFTR-Mutationen

Das häufige Auftreten der cystischen Fibrose in der kaukasischen Bevölkerung beschäftigt die Genetiker schon seit geraumer Zeit. Die weltweit am häufigsten auftretenden Mutationen $\Delta F508$ (66,0%), G542X (2,4%), G551D (1,6%) und N1303K (1,3%) können nur durch Einwirken einer positiven Selektion erhalten werden. Die populationsgenetischen Daten sprechen für eine Heterosis, einen

Heterozygotenvorteil, als Ursache für die hohe Frequenz der CF-Mutationen und einen Founder-Effekt für die Verteilung zumindest der drei häufigsten Mutationen (Morrall et al., 1993; Morrall et al., 1994; Rendine et al., 1997). Ein Founder-Effekt beschreibt die Ausbreitung einer Mutation ausgehend von einer Person.

Worin der Heterozygotenvorteil besteht, ist zurzeit noch ungewiss. Am wahrscheinlichsten ist die Hypothese, dass Heterozygote eine verminderte Chloridsekretion als Antwort auf bestimmte bakterielle Toxine zeigen. Dies bedingt eine verbesserte Resistenz und Überlebenswahrscheinlichkeit bei besonders im Kindesalter auftretenden intestinalen Infektionen. So konnte man zeigen, dass ein thermostabiles Enterotoxin von *Escherichia coli* in CF-Zellen keine Chloridsekretion induziert (Chao et al., 1994). Diese Chloridsekretion ist bei Gesunden für das Auftreten von Diarrhoen verantwortlich. Unterstützt werden diese Befunde durch die Tatsache, dass Mäuse mit CF-Mutationen eine vermehrte Resistenz gegenüber dem Cholera toxin aufweisen (Gabriel, et al., 1994).

Weitere Hypothesen besagen, dass CFTR einen Rezeptor darstellt, der für die Erkennung, endosomale Internalisierung und Degradation von *Pseudomonas aeruginosa* in Atemwegsepithelzellen (Pier et al. 1997) und *Salmonella typhi* in Darmepithelzellen verantwortlich ist (Pier et al., 1998).

Die Unsicherheiten über den Heterozygotenvorteil bei mutiertem CFTR sind letztendlich ein Spiegel für das momentane Unvermögen, eine festumrissene Bedeutung und Funktion von CFTR zu bestimmen.

1.6 Die Funktion des CFTR-Proteins

1.6.1 CFTR ist ein Chloridkanal

Welche Funktion CFTR besonders im Atemwegsepithel hat, wird zum Teil durch die Analyse des Proteins deutlich (**Abb. 2**). Als Membranprotein wird CFTR am endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Nach der Umwandlung in eine transportkompetente Form wird es zum Golgi-Apparat und anschließend

zur Apikalmembran transloziert. Dort bildet CFTR einen Anionenkanal mit einer niedrigen Leitfähigkeit von 10 pS und einer Ionenselektivität für Bromid > Chlorid > Iodid > Fluorid (Bear et al., 1991). Seine Aktivität wird über Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, Phosphorylierung und Dephosphorylierung gesteuert. Die bereits erwähnte Stimulierung über cAMP ist dabei von besonderer Bedeutung, da CFTR der einzige apikale Chloridkanal ist, der cAMP-stimulierbar ist.

Homologievergleiche der Primärstruktur von CFTR erlaubten die Vorhersage einer symmetrischen Struktur, die sich aus 5 Domänen zusammensetzt (Riordan et al., 1989). Das CFTR-Protein besteht aus zwei hydrophoben transmembranen Domänen (TMD1 und TMD2), die aus jeweils sechs Segmenten bestehen, die die Plasmamembran durchdringen. Den beiden Transmembrandomänen folgt jeweils eine hydrophilere Domäne, die Nukleotidbindedomänen NBD1 und NBD2. Zwischen den TMD-NBD Motiven befindet sich eine große Domäne, die durch Exon 13 kodiert wird und regulatorische oder R-Domäne genannt wird. Sie enthält neun der zehn Konsensussequenzen für eine Proteinkinase A-Phosphorylierung und 7 mögliche Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen.

Aufgrund der Struktur der TMD-NBD Motive wird CFTR in die Superfamilie der ABC-Transporter eingeteilt (Anderson und Welsh, 1992;). Diese ABC-Transporter wurden nach einer stark konservierten *ATP-binding cassette* benannt, die sich auch in den Nukleotidbindedomänen 1 und 2 befindet. Lediglich die R-Domäne stellt unter den bekannten ABC-Transportern eine Ausnahme dar.

Die Nukleotidbindedomänen NBD1 und NBD2 binden und hydrolysieren ATP (Hwang et al., 1994). Die Hydrolyse von ATP wird durch eine Phosphorylierung von CFTR eingeleitet und findet an zwei hochkonservierten Walker A- und Walker B-Motiven statt. Die Hydrolyse von ATP an der NBD1 initiiert die Öffnung des Kanals, während die Hydrolyse an der NBD2 den Kanal schließt (Carson et al., 1995).

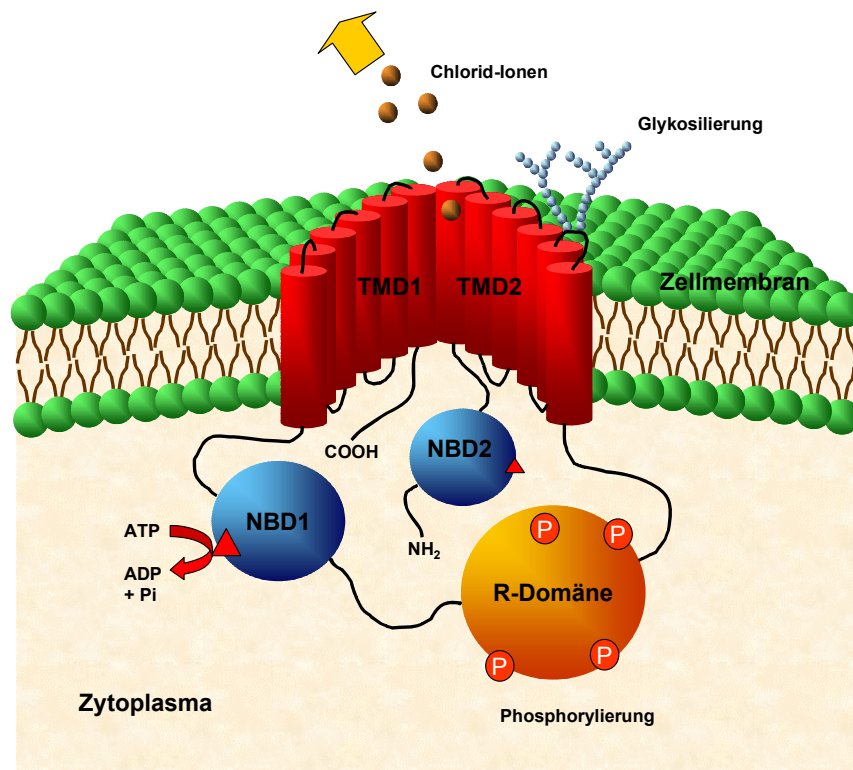


Abb. 2: Modell des CFTR in der Membran. CFTR ist in der Apikalmembran lokalisiert. Die hydrophoben Transmembrandomänen TMD1 und TMD2 bilden die Kanalpore. Die zytosolischen Domänen NBD1, NBD2 und R-Domäne dienen der Regulation des Kanals. Die Nukleotidbindedomänen NBD1 und NBD2 binden und hydrolysieren ATP und GTP und regulieren damit die Öffnung (über NBD1) oder Schließung des Kanals (über NBD2). Voraussetzung für die Hydrolyse von ATP oder GTP ist die Phosphorylierung der R-Domäne. Der Phosphorylierungsstatus bestimmt die Aktivität des Chloridkanals über Änderungen der Öffnungswahrscheinlichkeit, der Öffnungsrate und der Affinität für ATP.

Die beiden Transmembrandomänen TMD1 und TMD2 besitzen jeweils 6 Transmembransegmente und bilden den Ionenkanal. Aminosäuren der Transmembransegmente 6 und 12 haben Kontakt mit der Ionenpore (McDonough et al., 1994; Cheung & Akabas, 1996). Die Ionenselektivität wird dabei von Aminosäuren am zytosolischen Rand des 6. Transmembransegments kontrolliert (Anderson et al., 1991b).

1.6.2 Regulation des CFTR-Chloridkanals

Wie bereits erwähnt, erfordert die Öffnung des CFTR-Chloridkanals zunächst eine Phosphorylierung und anschließend die zytoplasmatische Verfügbarkeit von hydrolysierbarem ATP. Dephosphoryliertes CFTR ist inaktiv, während die Aktivität der CFTR-Chloridkanäle von verschiedenen Phosphorylierungsgraden abhängt.

Aktiviert werden CFTR-Cl⁻-Kanäle durch die Erhöhung intrazellulären cAMPs und eine nachfolgende Phosphorylierung durch Proteinkinasen wie der Proteinkinase A (Anderson et al., 1991c), der Proteinkinase C (Bargon et al., 1992), der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CAMK) der cGMP-abhängigen Proteinkinasen Typ I und II (Picciotto et al., 1992; French et al., 1995), sowie der Tyrosinkinase p60c-src (Fischer et al., 1996). Andererseits unterliegt CFTR einer Kontrolle durch Proteinphosphatasen, die den Kanal dephosphorylieren und dadurch deaktivieren. Dazu gehören die Proteinphosphatasen 1 (PP1), 2A (PP2A), 2B (PP2B) und 2C (PP2C) (Tabcharani et al., 1991; Berger et al., 1993; Hwang et al., 1993; Travis et al., 1997; Luo et al., 1998;).

Die entscheidende Rolle bei der Regulation von CFTR spielt die Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A. Sie bewirkt eine deutliche Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit und Öffnungsrate des Kanals (Mathews et al., 1998), sowie der Affinität für ATP (Ramjeesingh et al., 1997). Neun der zehn PKA-Phosphorylierungstellen von CFTR liegen innerhalb der R-Domäne. Eine vorausgehende Phosphorylierung durch die Ca²⁺-abhängige Proteinkinase C führt zu einer substantiellen Verstärkung der Aktivierbarkeit durch die Proteinkinase A (Tabcharani et al., 1991). Dies erklärt die zu beobachtende Stimulation der Chlorid-Sekretion nach einem Anstieg der zytosolischen freien Ca²⁺-Konzentration und weist auf eine wichtige modulierende Rolle der PKC bei der Aktivierung von CFTR hin. Es gibt darüber hinaus Befunde, die eine PKC-Phosphorylierung sogar als Voraussetzung für die Aktivierbarkeit durch PKA nahe legen (Jia et al., 1997). Im Fokus der aktuellen Forschung ist auch die Rolle der cGMP-abhängigen Proteinkinase II.

Dieser membranständigen Isoform der PKG wird eine Rolle bei der Aktivierung von CFTR in Enterocyten zugeschrieben (Vaandrager et al., 1998), was auch die Stimulation des CFTR-Chloridflusses nach einer Einwirkung von bakteriellem Enterotoxin erklären könnte (Guba et al., 1996).

Die wichtigste CFTR regulierende Phosphatase für das Atemwegsepithel (Travis et al., 1997) und das Pankreasgangepithel (Becq et al., 1993) ist die Proteinphosphatase 2C. Im Herzmuskelgewebe (Hwang et al., 1993) und in Schweißdrüsengängen (Reddy und Quinton, 1996) ist jedoch die Proteinphosphatase 2A von vorherrschender Bedeutung.

1.7 CFTR als multifunktionelles Protein: ein Chloridkanal und Regulator anderer Kanäle und Transporter

Neben seiner Funktion als cAMP-abhängiger Chlorid-Kanal, ist CFTR ein multifunktionelles Protein, das an der Regulation einer ganzen Reihe anderer Ionenkanäle und Transporter beteiligt ist. Dies führt bei einem Ausfall des Proteins zu sekundären Effekten, die vielleicht sogar wichtiger für die Entstehung der Lungenerkrankung sind als die Einschränkung des Chloridtransports.

1.7.1 CFTR reguliert den *epithelial sodium channel* ENaC

Von besonderer Bedeutung ist dabei die Regulation des Natrium-Transports, auf die auch später noch pathophysiologisch eingegangen wird. Der epitheliale Natrium-Kanal (*epithelial sodium channel*; ENaC) ist verantwortlich für die Absorption von Natrium in epithelialen Zellen. Dieser Kanal kolokalisiert mit CFTR in der Apikalmembran vieler polarisierter Epithelzellen, so z.B. in den Epithelien der Atemwege, des Gastrointestinaltrakts und der Niere (Schwiebert et al., 1999). Studien zur Pathogenese der cystischen Fibrose an frisch isolierten Atemwegsepithelien ergaben eine Hyperaktivierung von ENaC in Abwesenheit von CFTR (Kunzelmann et al., 1995; Mall et al., 1998). Die

Vermutung, dass CFTR ENaC inhibiert, konnte mit Hilfe von Koexpressionsstudien in Fibroblasten (Stutts et al., 1995) und *Xenopus*-Oocyten (Kunzelmann et al., 1997; Hopf et al., 1999) bestätigt werden.

CFTR interagiert direkt mit ENaC, was anhand von Untersuchungen mit Hilfe von Koimmunopräzipitationen (Ji et al., 2000) und dem Hefe-Zweihybrid-System (Kunzelmann et al., 1997) gezeigt wurde (siehe Abb.3). Einschränkend muss gesagt werden, dass diese Interaktion vermutlich über das Zytoskelett zustande kommt (Ismailov et al., 1997). Das vereinfachte Bild einer direkten Protein-Protein Interaktion wird zusätzlich durch die Tatsache erschwert, dass die Modulation anderer Ionenkanäle durch CFTR sowohl cAMP-abhängige als auch cAMP-unabhängige Komponenten in sich birgt (Wei et al., 1999; Ji et al., 2000).

Alternativ oder ergänzend wird ein indirekter autokriner Mechanismus postuliert, bei dem cAMP zu einer Aktivierung der CFTR-abhängigen Ausschüttung von ATP führt (**Abb. 3**). Extrazelluläres ATP führt dann zu einer Hemmung von ENaC. Ob nun die direkte Wechselwirkung oder der Transport eines regulativen Moleküls im Vordergrund der Hemmung von ENaC steht, wird zurzeit diskutiert. Letztendlich unterstützen beide Mechanismen die frühe Beobachtung, dass im Atemwegsepithel von CF-Patienten eine erhöhte Na⁺-Leitfähigkeit gegenüber Gesunden zu finden ist

1.7.2 CFTR reguliert den outwardly rectifying chloride channel ORCC

Zu einer weiterführenden Einschränkung des Chlorid-Transports gehört eine Störung der Regulation der *outwardly rectifying chloride channels* (ORCC), die eine eigene Klasse von Chlorid-Kanälen bilden. ORCCs werden unter anderem im respiratorischen Epithel, dem Kolonepithel, den Pankreasgangzellen und Schweißdrüsen exprimiert. Sie sind gekennzeichnet durch eine nicht-lineare Strom-Spannungscharakteristik mit zunehmender Leitfähigkeit bei einem vom Zellinneren nach außen gerichteten Stromfluss.

Bei einer Störung der Funktion von CFTR lassen sich die ORCCs nicht mehr durch cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) induzieren (Schoumacher et al., 1987; Li et al., 1988; Hwang et al., 1989; siehe **Abb. 3**). Dies führt bei CF zu einer Abnahme der Chloridsekretion. Korrigiert man CF-Epithelzellen durch Transfektion mit Wildtyp-CFTR, normalisiert sich die Chloridsekretion dieser Zellen und die Aktivierbarkeit durch PKA wird wiederhergestellt (Egan et al., 1992). Umgekehrt lassen sich ORCCs nicht mehr durch PKA aktivieren, wenn man Epithelzellen von Gesunden mit Glibenclamid, einem spezifischen CFTR-Kanalblocker behandelt (Schwiebert et al., 1995). Wie diese Regulation erfolgt, ist umstritten. Eine zurzeit diskutierte Hypothese beruht wie auch bei ENaC auf einem autokrinen Mechanismus. Während extrazelluläres ATP zu einer Inhibierung von ENaC führt, wird ORCC dadurch aktiviert (Schwiebert et al., 1995). Diese Aktivierung geschieht wahrscheinlich über die Bindung von ATP an einen Purin-Rezeptor der Plasmamembran, der ORCC dann über eine direkte Interaktion oder über eine G-Protein-vermittelte Signaltransduktion öffnet. Die dazu benötigte Sekretion von ATP in den Extrazellulärraum ist abhängig von CFTR, wobei momentan unklar ist, ob CFTR nicht sogar selbst ATP transportieren kann. Zusammen mit ORCC ist CFTR für den Hauptanteil des epithelialen Chloridtransports verantwortlich.

1.7.3 CFTR reguliert den renal outer medullary potassium channel ROMK

In diversen Studien kam man zu dem Ergebnis, dass die Expression von CFTR Kaliumströme in verschiedenen Zelltypen beeinflusst (Loussouarn et al., 1996; McNicholas et al., 1996). Viele ins Zellinnere gerichtete Kaliumströme sind basolateral lokalisiert, scheinen jedoch bei CF keine Abnormalitäten aufzuweisen. Ähnliche Kanäle wurden jedoch kürzlich auch in der Apikalmembran des sekretorischen Nierenepithels und des Kolon entdeckt (Loussarn et al., 1996). Besonderes Interesse erregten dabei einige Mitglieder der ROMK-Familie. Diese Familie besteht aus ATP-sensitiven Kaliumkanälen, die zumindest in der Niere eine wichtige Rolle für die Kalium-Homöostase

spielen. Ein Mitglied dieser Familie ROMK1 (Kir1.1) konnte auch in der Lunge identifiziert werden (Ho et al., 1993; Zhou et al., 1994). Kir 1.1a und CFTR scheinen als Komplex einen Kaliumkanal zu bilden, der die Leitfähigkeit von Kir1.1 und die ATP-Abhängigkeit von CFTR aufweist und sich von dem CFTR-Kanalblocker Glibenclamid hemmen lässt (Ruknudin et al., 1998). Werden ROMK2 und CFTR in *Xenopus laevis*-Oocyten koexprimiert, lassen sich die ROMK2-Kaliumströme durch Glibenclamid hemmen. Für diese Hemmung ist eine funktionell aktive NBD1-Domäne notwendig (McNicholas et al., 1996; McNicholas et al., 1997). Auch bei der Regulation von ROMK wird ein autokriner Regulationsmechanismus postuliert (**Abb. 3**).

1.7.4 CFTR reguliert epitheliale Kanäle für Wasser, die Aquaporine

Wasser ist das bei weitem am häufigsten auftretende Molekül in der Biologie und für den reibungslosen Ablauf biologischer Prozesse von zentraler Bedeutung. Bis vor einigen Jahren wurde angenommen, dass Wasser vorwiegend über passive osmotische Vorgänge die Lipidphase der Membran überquert. Studien die sich mit Aktivierungsenergien und Transportraten beschäftigten, wie auch der Einsatz von Inhibitoren, wiesen auf einen eher aktiven proteingetriebenen Prozess hin. Inzwischen wurden die dafür zuständigen Proteine charakterisiert, die Familie der Aquaporine AQP0-AQP9. Zumindest AQP3 wird von CFTR reguliert (Schreiber et al., 1999). AQP3 ist basolateral lokalisiert, was eine direkte Wechselwirkung mit CFTR ausschliesst. Es zeigte sich jedoch eine funktionelle Kopplung des Chlorid-Transports mit dem Transport von Wasser (Schreiber et al., 2000), der auf die NBD1 von CFTR zurückzuführen ist (**Abb. 3**). Auf diese Weise scheint CFTR für den Wasserhaushalt der Zelle verantwortlich zu sein und damit auch für die Entstehung des Flüssigkeitsfilms auf der Oberfläche des Atemwegsepithels.

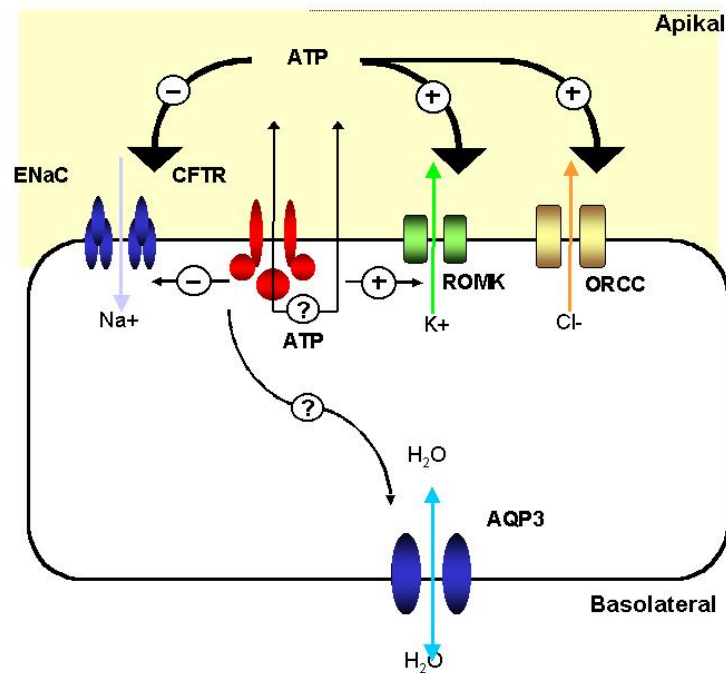


Abb. 3: CFTR als multifunktionelles Protein. Regulation der Leitfähigkeit anderer Membrankanäle: ORCC: outwardly rectifying chloride channel
ENaC: epithelial Na⁺ channel
ROMK: renal outer medullary potassium channel
AQP3: Aquaporin 3

CFTR reguliert verschiedene Ionenkanäle und Wassertransporter. Diese Regulation geschieht zum Teil über direkte Wechselwirkungen, so z.B. mit ENaC und ROMK, aber auch über eine autokrine Regulation, die auf der CFTR-abhängigen Sekretion von ATP basiert. Es ist umstritten, ob CFTR selbst ein ATP-Transporter ist, oder die Regulation eines anderen Transporters übernimmt.

1.7.5 CFTR beeinflusst den Transport von HCO₃⁻

Es zeigte sich bereits 1968, dass die Sekretion von HCO₃⁻ in den Pankreassekreten von CF-Patienten praktisch nicht zu detektieren war (Hadorn et al., 1968). Ca. 85% der CF-Patienten entwickeln eine Pankreasinsuffizienz. Aber auch bei Patienten, die keine Pankreasinsuffizienz aufwiesen, zeigte sich eine abnorm geringe Ausschüttung von Pankreasenzymen, die auf eine

Störung der HCO_3^- -abhängigen Flüssigkeitssekretion zurückführen war (Kopelmann et al., 1985). Der Pankreas ist ein Organ, das sehr viel HCO_3^- sezerniert, während die Cl^- -Sekretion vergleichsweise gering ist. So ist anzunehmen, dass eine Dysfunktion des HCO_3^- Transports von wichtiger, wenn nicht zentraler Bedeutung für den Krankheitsverlauf ist. Diese Annahme wird durch eine Arbeit von Choi et al (2001) unterstützt, bei der Nierenzellen mit 17 verschiedenen CF-assoziierten CFTR-Mutanten transfiziert wurden. Mutanten die mit der Pankreasinsuffizienz (PI) assoziiert sind, verursachten eine Reduktion des HCO_3^- Transports auf weniger als 14% des Niveaus der Kontrollzellen. Mutanten die mit der Pankreassuffizienz (PS) assoziiert sind, hatten eine mehr als doppelt so hohe HCO_3^- Transportsrate. Von besonderer Bedeutung war jedoch, dass 7 der 9 PI-Mutanten keine Beeinträchtigung der Cl^- -Leitfähigkeit aufwiesen. CFTR ist nicht nur für den Transport von Chlorid von Bedeutung, sondern auch für den Transport von HCO_3^- . Verschiedene Mutationen können die separaten Funktionen des Chlorid- oder HCO_3^- -Transports unabhängig voneinander beeinflussen. Paul Quinton, der die Chloridsekretionsstörung 1983 als erster beschrieb, äußerte daraufhin die Vermutung: "...we may have been focusing on the wrong ion." (Quinton, 2001). Die HCO_3^- -Sekretion ist ein zweistufiger Prozess. Er beinhaltet die basolaterale Aufnahme über einen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter (NBC) und die eigentliche Sekretion, an der Natrium-unabhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (*anion exchanger*, AEs), Natrium-abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (NCBEs) beteiligt sind. Die Bedeutung von CFTR mag hier durch die Tatsache unterstrichen werden, dass die apikale Sekretion von HCO_3^- vorwiegend mit einem Austausch gegen Chlorid vonstatten geht. Zum anderen ist CFTR an der Regulation von NBC1 beteiligt (Shumaker et al., 1999). Da eine direkte Interaktion zwischen dem apikal lokalisierten CFTR und dem basolateralen NBC1 auszuschliessen ist, nimmt man folgenden Mechanismus an. Die treibende Kraft für den HCO_3^- -Transport ist eine cAMP-vermittelte Stimulation von CFTR. Der anschließende Austritt von Chlorid führt zu einer Depolarisation des Membranpotentials, was seinerseits zur Stimulation des elektrogen angetriebenen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporters NBC1 führt (Soleimani et al., 2001).

HCO_3^- ist der wohl wichtigste Puffer in intrazellulären und extrazellulären Flüssigkeiten, unter denen sich auch die epithelialen Sekrete der Lunge befinden. Veränderungen der HCO_3^- - Konzentration in diesen Sekreten führen zu pH-Veränderungen, die wesentliche Abwehrfunktionen beeinträchtigen können. So werden z.B. die viskoelastischen Eigenschaften von Mucinen vom pH beeinflusst (Holma und Hegg, 1989).

1.8 Die Rolle von CFTR in der Lungenerkrankung

1.8.1 Die klinische Manifestationen der Lungenerkrankung

Die pulmonale Manifestation der zystischen Fibrose ist gegenwärtig für 90% der krankheitsspezifischen Mortalität verantwortlich. Die Lungenerkrankung äußert sich typischerweise durch chronischen produktiven Husten, bronchiale Obstruktion, und rezidivierende Pneumonien. Während im Kindesalter vorwiegend *Staphylococcus aureus* nachgewiesen wird, stellt mit Erreichen des Erwachsenenalters *Pseudomonas aeruginosa* den häufigsten Erreger dar. Mit fortschreitendem Verlauf kommen krampfartiger Husten, Thoraxdeformationen und Belastungshypoxie hinzu. Dies führt zu Gewichtsverlusten und mangelnder Belastbarkeit.

Im Spätstadium kommen eine Ruhehypoxie, Tachykardie, Zyanose und Ruhedyspnoe hinzu. Zunehmend kann es zu einem Pneumothorax, Atelektasen und Bronchiektasen kommen. Die chronische Besiedelung der Lunge mit *P. aeruginosa* führt immer häufiger zu Infektexazerbationen.

Die zystische Fibrose kennzeichnet sich durch eine chronische Entzündungsreaktion mit stark erhöhtem Gehalt proinflammatorischer Zytokine wie IL-8, IL-1 β und TNF α (Khan et al., 1995; Balough et al., 1995). Von besonderer Bedeutung ist IL-8, das verantwortlich ist für den massiven Einstrom neutrophiler Granulozyten in die Lunge. Die neutrophilen Granulozyten sind Teil der unspezifischen Immunabwehr. Sie eliminieren

eingedrungene Erreger vorwiegend durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Proteasen (Elastase, Cathepsin G etc.). Bei der zystischen Fibrose gelingt es den neutrophilen Granulozyten jedoch nicht, die eingedrungenen Erreger zu eliminieren.

Zu den für das Bronchialepithel schädlichen Auswirkungen bakterieller Toxine kommt dann die Belastung durch die granulozytären Abwehrstoffe hinzu, da Proteasen und ROS das Bronchialepithel schädigen. Einige Autoren vermuten sogar, dass die Zerstörung des Bronchialepithels vorwiegend auf die neutrophilen Granulozyten zurückzuführen ist und nicht auf die eingedrungenen Erreger (Venaille et al., 1998).

1.8.2 Infektion oder Inflammation – was beginnt zuerst?

Es besteht eine allgemeine Übereinkunft, dass vorwiegend die recht früh eintretenden Infektionen den Verlauf der Krankheit durch eine Zerstörung der Lunge bestimmen (Ratjen und Döring, 2003). Dennoch existieren unterschiedliche Vorstellungen über den Beginn der chronischen Lungenentzündung. Es bestehen keine Zweifel darüber, dass eine Infektion der CF-Lunge mit einer starken Inflammation einhergeht. Es existieren jedoch unterschiedliche Ansichten zu der Frage, ob eine Inflammation nicht schon vor der eigentlichen Infektion stattfindet.

Für diese Ansicht gibt es zahlreiche Hinweise. In einer viel zitierten Arbeit zeigten Khan et al. (1995) das vermehrte Auftreten von Neutrophilen und erhöhte Werte für IL-8 in der bronchoalveolären Lavage in 7 von 16 Kleinkindern mit CF, ohne dass ein bakterieller Infekt nachgewiesen werden konnte. Inzwischen gibt es weitere Hinweise in diese Richtung, aber auch Ergebnisse, die diesen widersprechen. Grundsätzlich wurde zu bedenken gegeben, dass ein Nachweis von Bakterien auch falsch-negative Ergebnisse aufweisen kann, so dass eine tatsächliche Besiedlung oder Infektion der Lunge übersehen wird. Diese Bedenken konnten bislang nicht ausgeräumt werden. Tirouvanziam et al. (2002) konnten jedoch an Explantaten fetaler CF-Lungen,

die in immundefiziente SCID-Mäuse implantiert wurden, eindeutig zeigen, dass ein massiver Einstrom von Neutrophilen nur in Lungenexplantaten von CF-Patienten stattfindet, wobei eine Infektion ausgeschlossen wurde. Die initialen inflammatorischen Vorgänge in der CF-Lunge scheinen somit nicht von einer Infektion abzuhängen und sind auf die eingeschränkte Funktion von CFTR zurückzuführen.

Versuche *in vitro* zeigten, dass in Bronchialepithelzellen von Gesunden das antiinflammatorische Zytokin IL-10 zu finden ist, nicht aber die proinflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-8 (Bonfield et al., 1995). CF-Epithelien hingegen sezernierten IL-6 und IL-8, aber kein IL-10. IL-10 kann im Tiermodell eine durch *P. aeruginosa* ausgelöste Entzündungsreaktion verringern (Chmiel et al., 1999), während es bei IL-10-*knockout*-Mäusen zu einer verstärkten Entzündung bei einer Infektion mit *P. aeruginosa* kommt (Chmiel et al., 2002).

Da es auch hier Arbeiten gibt, die keine Unterschiede zwischen Gesund und CF beobachten, kann die Hypothese einer intrinsischen Entzündung noch nicht definitiv bestätigt werden, obwohl die allgemeine Übereinkunft dazu tendiert. Dies ist auch damit zu erklären, dass die Bedeutung einiger Cytokine, wie z. B. IL-10, für die Entstehung der Lungenerkrankung bei CF sehr kontrovers diskutiert wird.

1.8.3 Die Entstehung der Lungenerkrankung bei CF

1.8.3.1 Abwehrmechanismen der Lunge

Für die Entstehung der Lungenerkrankung bei CF ist es zunächst erforderlich, die Abwehrmechanismen der Atemwege zu kennen. Die Atemwege stellen eine Grenze zwischen Umwelt und Organismus dar. Ein erwachsener Mensch inhaliert täglich etwa 17 kg Luft mit den darin enthaltenen Mikroorganismen, Antigenen und partikulären Substanzen. Trotzdem sind die Atemwege bei Gesunden ab den Bronchien 2. Ordnung praktisch keimfrei. Um dies

gewährleisten zu können, verfügt die Lunge über ein äußerst komplexes Abwehrsystem (**Abb. 4**). Zu diesem Abwehrsystem gehören:

die Filterfunktion der Nase und der oberen Atemwege,
 die Hustenclearance,
 die mukoziliäre Clearance,
 das nichtadaptive Immunsystem und
 das adaptive Immunsystem

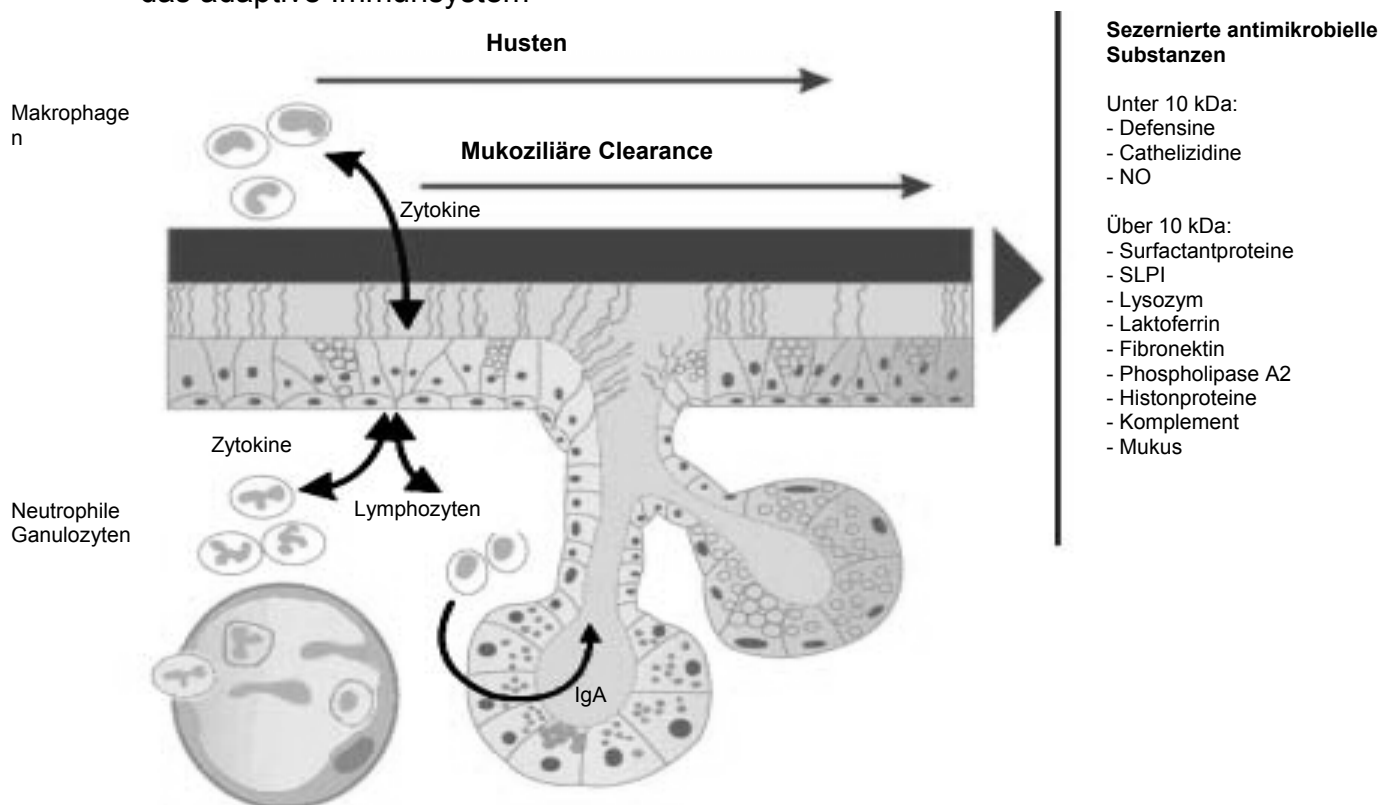


Abb. 4: Schematische Darstellung des Abwehrsystems des Respirationstrakts nach Bals et al., 1999.

1.8.3.2 Die mukoziliäre Clearance

Die mukoziliäre Clearance stellt den Hauptteil des mechanischen Abwehrsystems der Lunge dar (Sade et al., 1970). Sie arbeitet parallel mit der Filterfunktion der oberen Atemwege und der Hustenclearance. Die Atemwege werden von zilienbesetzten, sowie sekretorischen Epithelzellen ausgekleidet.

Dieses Epithel wird von einem ca. 25 μM dicken Flüssigkeitsfilm bedeckt (**Abb. 5**), der aus einem periziliären Sol und einem mukösen Gel besteht (Lukas und Douglas, 1994). Dieser Flüssigkeitsfilm wird im englischen Sprachraum als *airway surface liquid* (ASL) oder *epithelial lining fluid* (ELF) bezeichnet. Im Folgenden wird der Flüssigkeitsfilm als ASL bezeichnet. In die ASL ragen die Zilien der Epithelzellen. Das muköse Gel stellt eine Barriere für Pathogene dar. Pathogene können sich jedoch an das Gel anheften, das durch eine koordinierte Zilienbewegung aus den Atemwegen heraustransportiert wird. Das periziliäre Sol ist vergleichsweise statisch und unterliegt einem nur geringen Nettotransport. Seine Funktion dient der Unterstützung des Transports des mukösen Gels. Es ist flüssiger als das Gel. Man nimmt an, dass die Spitzen der Zilien bei einem Vorwärtsschlag in Kontakt mit dem Gel treten und sich gefaltet im Sol zurückziehen, um den Schlagzyklus zu beenden (Vishwanath and Ramphal, 1985).

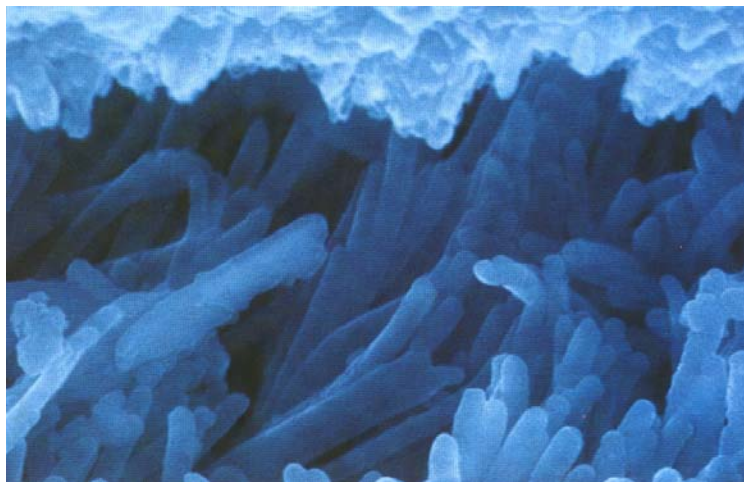


Abb. 5: Zilien des Bronchialepithels. Im oberen Bildrand erkennt man das muköse Gel. Unten sieht man den Zilienapparat der von dem flüssigeren Sol der Atemwegsflüssigkeit umgeben wird (Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme; Vergrößerung 12 000 x; aus: Konrad Morgenroth: Das Surfactantsystem der Lunge. S39; Verlag Walter de Gruyter).

Die Viskosität des periziliären Sols, als auch seine Schichtdicke sind dabei von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Funktion der mukoziliären Clearance. Ist die Schichtdicke des periziliären Sols zu hoch,

erreichen die Zilien das Gel nicht mehr und der Nettotransport des Gels nimmt ab. Umgekehrt beeinflusst eine zu geringe Schichtdicke des Sols die Rückwärtsbewegung der Zilien, die dadurch im Gel verbleiben. Es kommt zu einer Vorwärts- und einer Rückwärtsbewegung des Gels während eines Schlagzyklus und der Nettotransport nimmt ebenfalls ab. Aber auch die Hydratation des mukösen Gels ist für die Effektivität der Clearance von Bedeutung, denn das Gel darf weder zu viskos noch zu flüssig sein.

Die Bildung und Zusammensetzung der Atemwegsflüssigkeit wird im Wesentlichen durch die absorptive oder sekretorische Aktivität des Atemwegsepithels gesteuert (Boucher, 1994a und b). Die Transporteigenschaften für Wasser und Ionen sind dabei von entscheidender Bedeutung.

Trotz der Bedeutung der Atemwegsflüssigkeit für die Abwehr der Lunge und ihren Einfluss auf die Pathogenese von CF und anderen Lungenerkrankungen, existiert momentan keine allgemein akzeptierte Vorstellung ihrer Zusammensetzung oder Entstehung. Dies ist im wesentlichen auf zwei Schwierigkeiten zurückzuführen: zum einen bereitet es Probleme einen nur 25 μM dicken Flüssigkeitsfilm *in vivo* zu untersuchen, zum anderen ist es bis heute nicht gelungen, ein Modell zu etablieren, an dem sich der Flüssigkeitsfilm *in vitro* untersuchen lässt.

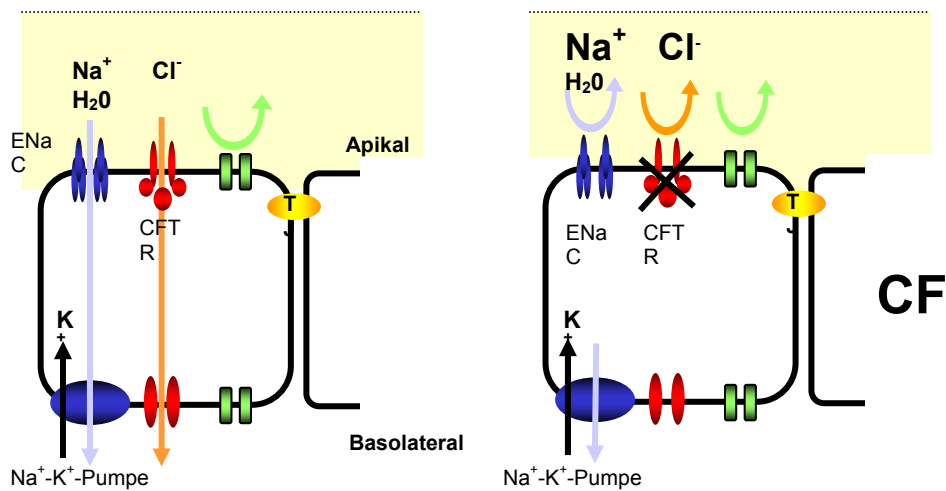
Dennoch haben sich zwei Hypothesen entwickelt, die die Physiologie des Atemwegsflüssigkeitsfilms vorwiegend über die pathophysiologischen Veränderungen bei CF zu erklären versuchen: Die Hochsalz-Hypothese der Gruppe um Michael J. Welsh und die Niedrigvolumen-Hypothese der Gruppe um Richard C. Boucher.

1.8.3.3 Die Bedeutung der Atemwegsflüssigkeit bei CF: Die Hochsalzhypothese

Die Hochsalzhypothese von M.J. Welsh geht davon aus, dass das Epithel der oberen Atemwege eher die Ionenkonzentration als das Volumen der Atemwegsflüssigkeit reguliert (Quinton, 1994; Zabner et al., 1998) und stellt die

Funktion von CFTR als Anionenkanal heraus (Smith et al., 1996; Zabner et al., 1998). Ein fehlendes oder defektes CFTR bedingt eine verminderte transepitheliale Leitfähigkeit und Reabsorption von Chlorid-Ionen, wie z. B. in Schweißdrüsen (Quinton 1993 und 1996). Dies führt zu einem Anstieg der

A) Hochsalz-Hypothese



B) Niedrigvolumen-Hypothese

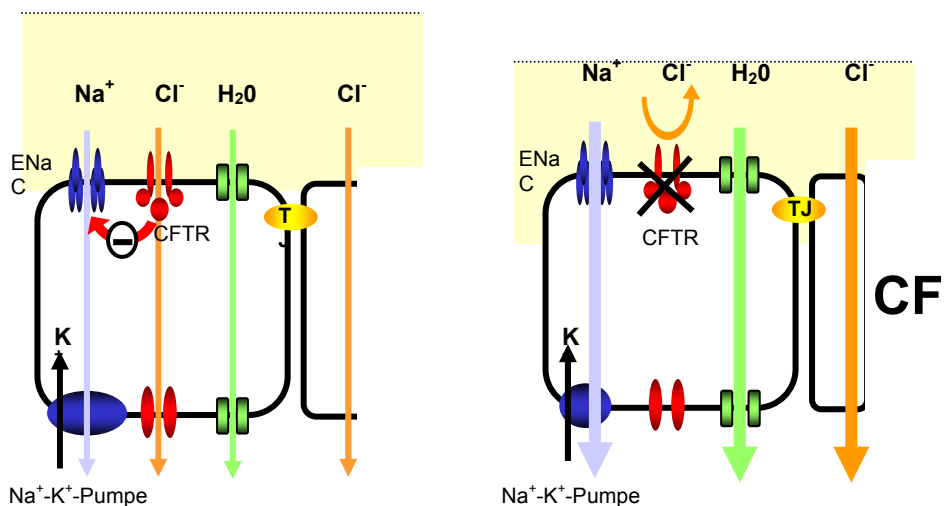


Abb. 6: Die Hochsalzhypothese (A) von m. Welsh geht von einer höheren Salzkonzentration in der Atemwegsflüssigkeit von CF-Patienten aus, während die Niedrigvolumenhypothese (B) von R. Boucher eine Volumenreduktion der Atemwegsflüssigkeit bei vergleichbarer Tonizität postuliert.

Salzkonzentration in der ASL (**Abb. 6 A**). Die Hypertonizität der ASL beeinträchtigt dann die Funktion körpereigener, antibiotischer Wirkstoffe, wie z.B. die antibiotische Wirksamkeit von Defensinen (Goldman et al., 1997), Lysozym und Lactoferrin (Travis et al., 1999). Mehrere neue Untersuchungen stehen jedoch im Widerspruch zu dieser Hypothese. Unter Verwendung einer neuen nicht-invasiven *in vivo* - Fluoreszenzmessung zeigte sich kein Unterschied zwischen der ASL von Gesunden und der von CF-Patienten in Bezug auf ihre Salzkonzentration (Jayaraman et al., 2001b). Zum anderen konnte eine wesentliche Grundlage der Hochsalzhypothese widerlegt werden, indem gezeigt wurde, dass die ASL nicht über osmotischen Druck, Oberflächenspannung oder Kapillarkräfte ausgebildet wird, sondern durch aktiven Ionentransport (Tarran et al., 2001).

1.8.3.4 Die Bedeutung der Atemwegsflüssigkeit bei CF: Die Niedrigvolumenhypothese

Die Niedrigvolumen-Hypothese von R.C. Boucher basiert auf der Funktion von CFTR bei der Sekretion von Cl^- , sowie auf dem Einfluss von CFTR auf andere Ionenkanäle. Wie bereits beschrieben (siehe **1.7.1**), ist CFTR ein negativer Regulator des Amilorid-sensitiven epithelialen Na^+ -Kanals (ENaC) (Grubb et al., 1994; Stutts et al., 1997). Ein fehlendes oder defektes CFTR führt zu einer Hyperabsorption von Na^+ , wobei Cl^- über alternative Kanäle folgt. Damit steigt in der Zelle die Elektrolytkonzentration an, was im Weiteren zu einem Einstrom von Wasser führt. Das Wasser stammt im Wesentlichen aus der ASL und wird entweder transzellulär oder aber über die kürzlich entdeckten apikalen Aquaporine (siehe **1.7.4**) in die Zelle eindringen. Das dadurch reduzierte Volumen der gegenüber der basolateralen Flüssigkeit isotonen ASL führt zu einer geringeren Beweglichkeit des Mucus (Matsui et al., 1998) und zu Mucusplaques, die vermutlich bevorzugte Anheftungspunkte für Erreger wie *P. aeruginosa* darstellen (**Abb. 6 B**).

Es erscheint einleuchtend, dass die Höhe der Sol-Phase der ASL in engen Grenzen reguliert werden muss, um die mukoziliäre Clearance gewährleisten

zu können. Das entscheidende Kriterium ist dabei die Länge der Zilien. Sie müssen bei jedem Schlag in das Gel eindringen und es weitertransportieren. Danach vollenden sie den Schlagzyklus, indem sie sich unabhängig vom Gel in der Solphase zurückziehen. Ist das Volumen der ASL bei einem CF-Patienten erniedrigt, so ist es den Zilien nicht mehr möglich, sich nach dem Schlag in das Sol zurückziehen. Sie bleiben weiterhin mit dem Gel in Kontakt, so dass das Gel bei jedem Schlagzyklus hin und her transportiert wird. Es kommt zu keinem Nettotransport der Gelphase mehr und der Mucus verbleibt in der Lunge.

Unterstützt wird die Niedrigvolumenhypothese durch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die an primären Zellkulturen die Isotonizität der ASL bestätigen konnten (Jayaraman et al., 2001a; Jayaraman et al., 2001b). Auch in Tierversuchen an *cfr-knockout*-Mäusen konnte eine Isotonizität der ASL sowie eine Reduktion des Volumens der ASL nachgewiesen werden (Tarran et al., 2001). Als Kritik an der Niedrigvolumenhypothese wird angeführt, dass sie keine ausreichende Erklärung für die Anfälligkeit der CF-Lunge für eine Infektion mit *P. aeruginosa* bietet.

1.8.4 Die Regulation des Wasser- und Ionenhaushalts ist in CF-Zellen gestört

Als Grundlage sowohl der Niedrigvolumen-Hypothese als auch der Hochsalz-Hypothese wird trotz aller Gegensätze eine Störung der Regulation des Wasser- und Ionenhaushalts der Epithelzellen angesehen, die in einer abnormal veränderten Zusammensetzung der Atemwegsflüssigkeit resultiert.

Die Störung des Wasser- und Ionenhaushalts führt nicht nur zu Einschränkungen der Produktion der Atemwegsflüssigkeit, sondern beeinträchtigt auch die Regulation des Wasser- und Ionenhaushalts der Zelle an sich. So konnte an verschiedenen CF-Modellen gezeigt werden, dass die Regulation des Zellvolumens bei CF infolge osmotischer Belastungen gestört ist (Valverde et al., 1995, Valverde et al., 2000; Seidler et al., 2001; Vazquez et al., 2001; Cho et al., 2004; Davies et al., 2005). Wenn äußere Bedingungen zu Schwankungen der Osmolarität der Atemwegsflüssigkeit führen, müssen

Epithelzellen diesen Veränderungen entgegenwirken. Im Falle des Bronchialepithels muss ein fortwährender Verlust von Wasser kompensiert werden, der alleine über die proximalen Atemwege bis zu 700 ml pro Tag betragen kann. Osmotische Belastungen sind für das Bronchialepithel von daher eher die Regel als Ausnahme. Den Bronchialepithelzellen kommt dabei nicht nur die Regulation der Atemwegsflüssigkeit zu, sondern auch der Regulation ihres eigenen Wasser- und Ionenhaushalts.

Epithelien regulieren ihr intrazelluläres osmotisches Milieu über einen vektoriellen Ionentransport, der auf das externe basolaterale Reservoir zugreift. Dieser einwärts gerichtete Ionentransport wird maßgeblich von der intrazellulären Chlorid-Konzentration bestimmt (Dowd und Forbush, 2003), die im Falle des Defektes eines Chlorid-Transporters wie CFTR beeinträchtigt ist. Hierbei kommt zum einen der Ausfall von CFTR als Chloridkanal zum tragen, zum anderen aber auch die durch den Ausfall von CFTR bedingte Fehlregulation des Chloridkanals ORCC (siehe **1.7.2**). Osmotische Belastungen regulieren sowohl CFTR selbst (Baudoin-Legros et al., 2000) als auch ORCC, wobei ORCC an der Volumenregulation in Erythrocyten beteiligt ist (Egee et al., 2000).

An der Volumenregulation sind neben dem Chlorid vor allem Wasser, Natrium und Kalium beteiligt. Unterliegt eine Zelle einer osmotischen Belastung, darf die Funktion von CFTR als Regulator von Wasser- und Ionenkanälen nicht unterschätzt werden. So ist CFTR ein Regulator des Aquaporins AQP3 (siehe **1.7.4**), das ebenfalls durch hyperosmotische Belastungen aktiviert wird (Herrlich et al., 2004) und eine bedeutende Funktion in der Kontrolle epidermaler Wasserverluste übernimmt (Ma et al., 2002). Auch ENaC wird von CFTR reguliert (siehe **1.7.1**) und durch osmotische Belastungen aktiviert (Ji et al., 1998). Die Beteiligung von CFTR an der Volumenkontrolle der Zelle kann demnach sowohl über seine Funktion als Chlorid-Kanal, als auch über seine Funktion als Regulator anderer Ionenkanäle erklärt werden.

Die für die Volumenkontrolle der Zelle so bedeutenden Ionen Chlorid, Natrium und Kalium bilden die Gruppe der so genannten anorganischen Osmolyte. In hoher Konzentration können die anorganischen Osmolyte zu einer

Deaktivierung und Destabilisierung von Proteinen führen. Die organischen Osmolyte stellen Substanzen dar, die zwar osmotisch wirksam sind, jedoch auch in hohen Konzentrationen keine nachteilige Wirkung auf die zellulären Proteinfunktionen ausüben (Burg et al., 1994). Organische Osmolyte werden von daher auch als „kompatible“ Osmolyte bezeichnet. Zu ihnen gehören Betain, Taurin und *Myo*-Inositol (Burg et al., 1994). Sie werden zum einen mit der Nahrung aufgenommen, können aber auch vom Körper selbst synthetisiert werden. In Folge einer hyperosmotischen Belastung, werden sie durch ihre jeweiligen Transporter von der Zelle aufgenommen. Dazu gehören der Na⁺-*Myo*-Inositol-Kotransporter SMIT (Kwon et al., 1992), der ebenfalls Na⁺-abhängige Betain-Transporter BGT-1 (Yamauchi, et al., 1992), und der Na⁺-Taurin-Kotransporter TAUT (Uchida et al., 1993). Sie gewährleisten über die Aufnahme der entsprechenden Osmolyte durch die Zelle, eine Anpassung ohne die biochemischen Funktionen einzuschränken. Die Osmolyttransporter sind in verschiedenen Geweben beschrieben worden, bislang jedoch noch nicht in der Lunge. Generell ist die Perzeption und Abwehr osmotischer Belastungen in Bronchialepithelzellen nicht geklärt. Das Verständnis dieser Vorgänge ist jedoch notwendig, um erklären zu können, wie die Zusammensetzung und Dicke der Atemwegsflüssigkeit durch das Atemwegsepithel gesteuert wird.

Darüber hinaus könnten auch inflammatorische Vorgänge in der CF-Lunge mit den Störungen des Wasser- und Ionenhaushalts bei CF erklärt werden. Während die molekularen Grundlagen der cystischen Fibrose, sowie der spätere pathophysiologische Verlauf der Lungenerkrankung recht gut untersucht sind, wird der Beginn der Lungenerkrankung kontrovers diskutiert. Es gibt zurzeit kein zufrieden stellendes Modell, das zu erklären vermag, wie der molekulare Defekt des CFTR-Proteins zu der chronischen Inflammation mit episodischen Infektexazerbationen übergeht. Neben Änderungen des Zellvolumens können Veränderungen des Ionenhaushalts jedoch auch inflammatorische Vorgänge auslösen (Shapiro und Dinarello, 1995 und 1997; Hashimoto et al., 1999). Beide Arbeitsgruppen beschrieben dabei eine hyperosmotische Induktion von IL-8, das in der CF-Lunge in hoher Konzentration vorliegt und als Chemoattraktor von neutrophilen Granulozyten

für die Entstehung der Lungenerkrankung bei CF von zentraler Bedeutung ist (siehe **1.8.1**).

Wenn Störungen des Ionenhaushalts auch in Bronchialepithelzellen eine inflammatorische Antwort auslösen, könnte dies eine Erklärung dafür bieten, wie der Ausfall eines Ionentransporters zu einer chronischen Inflammation führen kann. Des Weiteren würde es eine mögliche Erklärung für das Auftreten einer Inflammation ohne zugrunde liegende Infektion bieten.

1.9 Experimentelles Modell und Fragestellung

Neben den Arbeiten mit immortalisierten Bronchialepithel-Zelllinien, sollte die primäre Kultur humaner Bronchialepithelzellen etabliert werden. Das Material sollte aus Resektaten gewonnen werden, die im Rahmen von Lungen-Teilresektionen als Restmaterial zur Verfügung standen. Neben der Erstellung der Kulturen, war es erforderlich deren bronchoepithelialen Charakter zu demonstrieren.

Aufgrund der limitierten Mengen an primärem Untersuchungsmaterial, musste eine Optimierung der herkömmlichen PCR-Verfahren vorgenommen werden. Dazu wurde ein so genanntes kompetitives PCR-Verfahren weiterentwickelt.

An den Kulturen primärer Bronchialepithelzellen sollte überprüft werden, ob die bislang nur in anderen Geweben nachgewiesenen Osmolyttransporter BGT-1, TAUT und SMIT auch in der Lunge exprimiert werden. Zur Charakterisierung der Osmoregulation in Bronchialepithelzellen sollte die Expression der Osmolyttransporter infolge hyper- und hypoosmotischer Belastungen bestimmt werden.

Eine mögliche Erklärung für die inflammatorischen Vorgänge in der CF-Lunge, könnte der bereits erwähnten Störung des Ionen- und Wasserhaushalts der CF-Zellen liegen. An immortalisierten Zelllinien und primären humanen Bronchialepithelzellen sollte überprüft werden, ob eine hyperosmotische Belastung zu einer inflammatorischen Antwort ohne zugrunde liegende Infektion führt. Als Parameter dient dabei die Expression und Sekretion von IL-8, dem bei der Entstehung der Lungenerkrankung bei CF eine herausgehobene Bedeutung beigemessen wird.

Des Weiteren sollte geklärt werden, welche Mechanismen an einer Inflammation infolge osmotischer Belastungen beteiligt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine technische Geräte

Autoklav	Modell 2540ELV, Systec Wettenberg
pH-Meter	Calimatic 761, Knick, Berlin
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R, Kendro, Langenselbold Biofuge 13, Kendro Langenselbold
Magnetheizrührer	Ikamag Ret, Ika Labortechnik, Staufen
Schüttler	KL2, Bühler, Tübingen
Wasserbad	Modell F3, Haake, Karlsruhe
Waage	PT1200, Sartorius, Göttingen

2.1.2 Geräte und Materialien für die Zellkultur

Lichtmikroskop	Axiovert 25, Hund, Wetzlar
Inkubationsschränke	Nunc Cellstar, Nunc, Wiesbaden
Sterilwerkbank	LaminAir HB2448, Kendro, Langenselbold
Durchflusszytometer	FacsCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg
Zytozentrifuge	Cytospin TM 3-Zentrifuge Shandon Southern Products Ltd., Astmoor, Cheshire, England
Neubauer-Zählkammer	Fein Optik, Blankenburg
Plastikmaterialien	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturmembraneinsätze	Transwell-COL, Corning Costar, Wiesbaden
Stickstofftanks	

2.1.3 Geräte und Materialien für die Molekularbiologie und Biochemie

Autoradiographiekassette	Amersham, Braunschweig
Blotting-Apparatur	Mini Trans-Blot Transfer Cell, Bio-Rad, München

Geldokumentationssystem	DocuGel V, Scanalytics Inc., Fairfax, USA
Geldokumentationssoftware	Zero-D-Scan, Scanalytics Inc., Fairfax, USA One-D-Scan, Scanalytics Inc., Fairfax, USA
Gelkammer für SDS-Page	Minigel-System, Aladin, San Fransisco, USA
Horizontal-Gelkammer	Model A2 Gator, Owl, Portsmouth, USA
Filme	Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg
Mikrowellengerät	Bosch, Stuttgart
Photometer	Genequant II, Pharmacia, Freiburg
Spannungsgerät	Power Pack P25, Biometra Göttingen
Thermocycler	Trio-Thermoblock, Biometra, Göttingen
ELISA-Reader	Tecan Sunrise, Tecan, München
ELISA-Auswertungsoftware	Magellan, Tecan Software GmbH, Heidelberg

2.1.4 Chemikalien

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (40%; 29:1)	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Serum Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Amphotericin B	Biochrom AG, Berlin
Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Choleratoxin	Sigma, München
Collagen Typ I	Sigma, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethylen-diamin-tetra-acetat)	Roth, Karlsruhe
EGF (<i>epidermal growth factor</i>)	Pan-Biotech, Aidenbach
Epinephrin	Promocell, Heidelberg
Essigsäure konz.	Roth, Karlsruhe

Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Gelatin –Hydrolysat	Roche, Mannheim
Giemsa-Lösung	Merck Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Sigma, München
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
HEPES	Promocell, Heidelberg
HGF (<i>hepatocyte growth factor</i>)	Pan-Biotech, Aidenbach
Hydrocortison	Promocell, Heidelberg
Interleukin 8, rekombinant	R&D Systems, Wiesbaden
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Riedel de Haen, Seelze
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
KGF (<i>keratinocyte growth factor</i>)	Pan-Biotech, Aidenbach
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mannitol	Sigma, München
May-Grünwald-Lösung	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Methanol	Riedel de Haen, Seelze
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
NP40	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt

Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Retinolsäure	Sigma, München
Rinderhypophysenextrakt	Promocell, Heidelberg
Schwefelsäure, konzentriert	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Transferrin	Promocell, Heidelberg
Tris	Merck, Darmstadt
Triiodothyronin	Promocell, Heidelberg
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Tween-20	Merck, Darmstadt

2.1.5 Enzyme

Taq Polymerase rekombinant	Invitrogen, Karlsruhe
Topoisomerase	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Rnase A	Promega, Mannheim

2.1.6 Kits und Reagenzien

QIAGEN Midi Plasmid Purification Kit	QIAGEN, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
PCR Purification Kit	Qiagen Hilden
Streptavidin-HRP-Konjugat	Roche, Mannheim
TMB-Substratlösung	Dako, Hamburg
ECL Western Blotting Detection Reagent	Amersham, Braunschweig

RNAzol B

WaK-Chemie,
Bad Homburg

2.1.7 Bakterienstämme

Es wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

TOP10 (TOPO TA Cloning, Invitrogen) – F- *mcrA* D(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) F80*lacZDM15 DlacX74 recA1 deoR araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*, chemisch kompetent

TOP10F' (TOPO TA Cloning, Invitrogen) – F' {*lacI_q Tn10 (Tet^R)*} *mcrA* D(*mrrhsdRMS- mcrBC*) F80*lacZDM15 DlacX74 recA1 deoR araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*, chemisch kompetent

2.1.8 DNA-Vektoren

Es wurden folgende DNA-Vektoren verwendet:

pCR2.1-TOPO

Invitrogen, Karlsruhe

pCRII-TOPO

Invitrogen, Karlsruhe

2.1.9 Antikörper

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

Maus anti-human IL-8-Antikörper

R&D Systems, Wiesbaden

Maus anti-human IL-8-Antikörper, biotinyliert

R&D Systems, Wiesbaden

Maus anti-human IL-6Antikörper

R&D Systems, Wiesbaden

Maus anti-human IL-6-Antikörper, biotinyliert

R&D Systems, Wiesbaden

Anti-Phospho-p38 MAP-Kinase (Thr180/Tyr182)

CST, Frankfurt

Peroxidase gekoppelter Anti-Rabbit IgG

Amersham, Freiburg

2.1.10 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Invitrogen bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Bakterien

2.2.1.1 Anzucht von Bakterien

Für die Kultur von Bakterien wurde in der Regel Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verwendet. Dieses wurde nach seiner Herstellung autoklaviert, um eine Infektion mit anderen Mikroorganismen zu vermeiden. Nach dem Abkühlen wurde der Flüssigkeit ein Selektionsmarker in Form eines Antibiotikums zugesetzt. Sollten LB-Platten hergestellt werden, wurde wie oben beschrieben verfahren, nur wurden dem Medium vor dem Sterilisieren 15 g/l Agar-Agar zugegeben, das nach dem Abkühlen die Verfestigung des Mediums sicherstellte. Für eine erforderliche Blau-Weiß-Selektion wurden eine halbe Stunde vor dem Ausplattieren der Bakterien 40 µl einer 40 mg/ml X-Gal-Lösung und 40 µl einer 100 mM IPTG-Lösung pro Platte ausgestrichen. Für die Anzucht der Bakterien wurden generell mehrere Reinkulturen einzelner Kolonien angelegt.

Verwendete Lösungen:

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

10 g/l Bactotrypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

in A. bidest lösen, pH 7,0 einstellen.

2.2.1.2 Anlegen von Glycerinkulturen

Um rekombinante Bakterien für längere Zeit zu lagern, ist eine Aufbewahrung in 10% Glycerin bei -70°C erforderlich. Dafür wurden 100 µl 100%iges Glycerin in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und 900 µl frische Bakterienkultur zugegeben. Mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz) wurde die

Suspension gut durchmischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend konnte die Glycerinkultur bei -70°C aufbewahrt werden.

2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien: Alkalische Lyse („Mini-prep“)

1,5 ml einer stationären Bakterienkultur wurden 30 Sekunden bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Die weiteren Zentrifugationen erfolgten ebenfalls bei 13.000 rpm und Raumtemperatur. Das Medium wurde anschließend abgesaugt und das Sediment in 100 μl Lösung I gelöst, so dass die Zellwände aufgebrochen wurden. Die Zugabe von 200 μl frisch angesetzter Lösung II bewirkte eine Erhöhung des pH-Wertes, wodurch die chromosomale DNA denaturiert. Das in der Lösung II enthaltene SDS ermöglichte zusätzlich das Ablösen DNA-assoziiierter Proteine. Danach wurde die Probe gevortext und 10 Minuten auf Eis gelagert. Mit 150 μl Lösung III wurden chromosomale DNA und Proteine gefällt. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch wurden letzte in Lösung befindliche Proteine extrahiert. Nach Zugabe von 500 μl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1; v:v:v) wurde vorsichtig invertiert. Nach 2-minütigem Zentrifugieren wurde die obere (wässrige) Phase in ein neues Gefäß überführt. Dabei wurden maximal 350 μl pipettiert, um eine Mitnahme der Interphase zu vermeiden. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden zu dieser Lösung 700 μl 100%iger Ethanol gegeben und vorsichtig invertiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation wurde das erhaltene DNA-Pellet mit 500 μl eiskalten 70%igen Ethanol gewaschen. Nachdem der Alkohol komplett abgesaugt war, wurde das Pellet getrocknet. Die DNA wurde in 50 μl TE + RNase A (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Promega, Mannheim) aufgenommen.

Verwendete Lösungen:**Lösung I**

25 mM Tris-HCl

50 mM Glucose

10 mM EDTA

0,4 mg/ml Lysozym

Substanzen in A. bidest lösen und pH 8,0 einstellen.

Lösung II

0,2 N NaOH

1 % (w/v) SDS

Lösung III

3 M Kaliumacetat

11,5 % (v/v) Eisessig

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

Substanzen in A. bidest lösen und pH 7,5 einstellen.

2.2.1.4 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien mit Hilfe von Ionenaustauschersäulen

Für die Präparation hochreiner Plasmid-DNA oder von Plasmiden mit geringer Kopienzahl wurden Kits der Firmen QIAGEN benutzt. Diese Kits verwenden anstelle der Phenol-Chloroform-Ausschüttelung Ionen-Austauschersäulen für die Aufreinigung der Plasmid-DNA, basieren aber ebenfalls auf einer alkalischen Lyse. Durch die Herstellung optimaler Salzkonzentrationen und pH-Werte wird die Plasmid-DNA in einer equilibrierten Ionenaustauscher-Säule gebunden, gereinigt und anschließend von ihr eluiert. Auf diese Weise können

degradierte RNA, zelluläre und Nukleinsäure-assoziiierende Proteine von der Plasmid-DNA entfernt werden. Die Fällung erfolgt mit Alkohol (Isopropanol).

Nachfolgend wird die Plasmid-Präparation mit Hilfe des Kits der Firma QIAGEN beschrieben. Es werden Ionenaustauschersäulen unterschiedlicher Größe angeboten, deren Einsatz sich nach dem Kulturvolumen und der Kopienzahl der Plasmide richtet. Im Weiteren beziehen sich die Angaben auf eine QIAGEN-Midi Präparation (QIAGENSäule 100), die Angaben in Klammern beziehen sich auf eine QIAGEN-Maxi Präparation (QIAGEN-Säule 500).

Es wurde eine Vorkultur ca. 8 Stunden in LB-Medium mit Zusatz eines für die Selektion notwendigen Antibiotikums angezogen. Nach dieser Zeit wurde sie in 25 ml Medium für Plasmide mit hoher Kopienzahl bzw. in 100 ml für Plasmide mit geringer Kopienzahl (100 ml bzw. 500 ml) überimpft und über Nacht bei 37°C und 225 U/min geschüttelt.

Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation mit 3.000 x g für 15 Minuten bei 4°C sedimentiert. Das entstandene Sediment wurde in 4 ml (10 ml) P1-Puffer resuspendiert und anschließend mit 4 ml (10 ml) P2-Puffer versetzt. Dann wurde 4-6-mal invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml (10 ml) gekühltem P3-Puffer wurde die Probe ebenfalls invertiert und 15 Minuten auf Eis gelagert. Während dieser Zeit wurde wiederholt invertiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 20.000x g und 4°C für 30 Minuten. Der Überstand wurde durch einen angefeuchteten Faltenfilter filtriert.

Die QIAGEN-Säule wurde mit 4 ml (10 ml) Puffer QBT equilibriert. Daraufhin wurde die Probe auf die Säule gegeben und 2-mal mit 10 ml (30 ml) QC-Puffer gewaschen. Eluiert wurde die DNA mit 5 ml (15 ml) QF-Puffer. Mit 0,7 Vol. Isopropanol wurde die DNA gefällt und 30 Minuten bei 15.000x g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 2 ml (5 ml) 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die DNA wurde je nach Sedimentgröße in ca. 100 µl TE oder A bidest aufgenommen.

Verwendete Lösungen:

P1-Puffer:

50	mM	Tris-HCl
10	mM	EDTA
100	µg/ml	RNase A

in A bidest lösen und pH 8,0 einstellen.

P2-Puffer:

0,2	N	NaOH
1	% (w/v)	SDS

P3-Puffer:

3	M	Kaliumacetat
---	---	--------------

in A. bidest lösen und pH 5,5 einstellen.

QBT-Puffer:

750	mM	NaCl
50	mM	MOPS
15	% (v/v)	Isopropanol
0,15	% (w/v)	Triton X-100

in A. bidest lösen und pH 7,0 einstellen.

QC-Puffer:

1	M	NaCl
50	mM	MOPS
15	% (v/v)	Isopropanol

in A. bidest lösen und pH 7,0 einstellen.

QF-Puffer:

1,25	M	NaCl
50	mM	Tris-HCl
15	% (v/v)	Isopropanol

in A. bidest lösen und pH 8,5 einstellen

TE-Puffer

10	mM	Tris-HCl
1	mM	EDTA

in A. bidest lösen und pH 8,0 einstellen.

2.2.2 Arbeiten mit humanen Zellen

2.2.2.1 Zelllinien

Die *in vitro*-Versuche wurden vorwiegend an einer Epithelzelllinie bronchialen Ursprungs vorgenommen. Die humane Zelllinie 16HBE14o- (Dr. D.C. Gruenert, University of California San Francisco) repräsentiert eine SV40-transformierte Zelllinie, die das Bronchialepithel sehr gut reflektiert. Im Gegensatz zu den meisten anderen Zelllinien bronchialen Ursprungs dedifferenzieren und depolarisieren diese Zellen nicht mit steigender Passagenzahl. Dies ist ein wichtiges Kriterium für Untersuchungen an apikal exprimierten Ionenkanälen, wie im vorliegenden Fall bei CFTR.

Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Medien und Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt. Die Zellen wurden in DMEM/Ham's F12-Medium kultiviert, welches mit 25 mM HEPES (Fa. Gibco, Eggenstein), 10% fötales Kälberserum (GIBCO, Eggenstein), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert war.

2.2.2.2 Subkultivierung eukaryotischer Zellen

Die Passagierung der Zellen erfolgte routinemäßig nach Erreichen der Konfluenz. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS-def-Lösung gespült, um inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Trypsinaktivität zu verhindern. Nach Absaugen der PBS-def-Lösung wurden die Zellen ca. 5 min mit Trypsin/EDTA bei 37°C bis zur Abrundung der Zellen (mikroskopische Kontrolle) inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe

von serumhaltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit der Pipette vereinzelt und die Zellzahl pro Milliliter mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden bei 500 g zentrifugiert, in Medium aufgenommen und auf Zellkulturflaschen verteilt.

Verwendete Lösungen:

PBS-def-Lösung (ohne Calcium und Magnesium)

130	mM	NaCl
7	mM	Na ₂ HPO ₄
3	mM	KH ₂ PO ₄

in A. bidest lösen und pH7,4 einstellen.

Trypsin-EDTA-Lösung:

0,05	% (w/v)	Trypsin
0,02	% (w/v)	EDTA

Lösen in PBS-def-Lösung.

2.2.2.3 Einfrieren humaner Zelllinien

Zellen in exponentieller Wachstumsphase (gegebenenfalls trypsiniert) wurden bei 500 x g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und das Zellsediment in gekühltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen werden bei einer Zelldichte von 5-10 x 10⁶ Zellen/ml in Aliquots zu 1 ml langsam auf -80°C gekühlt. Die längerfristige Lagerung erfolgt bei -196°C über flüssigem Stickstoff.

Einfriermedium:

70	% (v/v)	Medium (DMEM/Ham's F12)
20	% (v/v)	FCS
10	% (v/v)	DMSO (Dimethylsulfoxid)

2.2.2.4 Auftauen humaner Zelllinien

Die gefrorene Kryokultur wird bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 20 ml vorgewärmtem Wachstumsmedium werden die Zellen mit 500 x g (10 min) abzentrifugiert, in insgesamt 20 ml frischem Medium aufgenommen und bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

2.2.2.5 Präparation bronchialer und nasaler Epithelzellen für die Isolation von mRNA

Die Präparation nasaler Epithelzellen wurde mit Hilfe von sterilisierten Curaprox LS Interdentalbürsten (Curaden AG, Teningen) vorgenommen. Die Bürsten wurden vor dem Einsatz mit gekühltem DMEM/Ham's F12 Medium mit 10% FCS benetzt. Die Nasenspitze wurde danach etwas nach oben geschoben, so dass man unter optischer Kontrolle in die untere Nasenmuschel eindringen konnte. Dort befinden sich die ersten Zilien-besetzten Epithelzellen. Anschließend wurde die Bürste mit sanftem Druck 5-6-mal hin- und herbewegt, herausgezogen und in eiskaltem Medium ausgeschwenkt. Auf diese Weise wurde jeder Nasenflügel 1-3-mal gebürstet. Danach wurden die Zellen bei 500 g für 10 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10 ml eisgekühltem DMEM/Ham's F12-Medium aufgenommen. 1 ml wurde für eine Zellzahlbestimmung mit anschließender Differentialzytologie (siehe **2.2.2.6**) abgenommen. Die Zellen in den verbleibenden 9 ml wurden 10 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert und standen nun für eine RNA-Isolierung (siehe **2.2.3.1**) zur Verfügung. Die Probanden wurden vorher aufgeklärt. Eine entsprechende Genehmigung der Ethikkommission liegt vor.

Die Präparation bronchialer Epithelzellen wurde im Rahmen fiberoptischer Routinebronchoskopien durchgeführt. Die Bürstung erfolgte mit Hilfe eines durch das Bronchoskop vorgeschobenen Standardkatheters, der an der Spitze

mit 2 mm langen Nylonborsten versehen war. Unter optischer Kontrolle wurden so mehrere Bronchien 2. Ordnung gebürstet. Die Bürsten wurden dabei mehrmals in eiskaltem DMEM/Ham's F12-Medium ausgeschwenkt. Nach einer Zentrifugation bei 500 g für 10 min wurden die Zellen in 10 ml eisgekühltem DMEM/Ham's F12-Medium aufgenommen. Auch hier wurde 1 ml für eine Zellzahlbestimmung mit anschließender Differentialzytologie (siehe **2.2.2.6**) abgenommen. Die Zellen in den verbleibenden 9 ml wurden 10 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert und standen nun für eine RNA-Isolierung (siehe **2.2.3.1**) zur Verfügung. Auch für diese Untersuchungen liegt eine Genehmigung der Ethikkommission vor.

2.2.2.6 Differentialzytologie der Zellen aus bronchialen und nasalen Bürstungen

Für die Differentialzytologie der nasalen und bronchialen Bürstungen wurden die Zellen eingefärbt und nach Zelltypen getrennt lichtmikroskopisch quantifiziert. Dazu wurde zunächst das Probenvolumen bestimmt, um die Gesamtzellzahl ermitteln zu können. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Zu diesem Zweck wurden 10 µl der Probe mit 10 µl einer 0,5%igen Trypanblau Lösung versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen unter Berücksichtigung der Zellvitalität ausgezählt. Lebende Zellen erscheinen hyalin, während tote und nekrotische Zellen eine dunkelblaue Färbung aufweisen (Gassen und Schrimpf, 1999). Für die Differentialzytologie wurden 50 000 Zellen in einer CytospinTM 3-Zentrifuge (Shandon Southern Products Ltd., Astmoor, Cheshire, England) bei 100 g für 5 min punktuell auf einen Objektträger zentrifugiert.

Nach einer Trocknungszeit von 10 min erfolgte eine 5-minütige Fixierung mit Methanol/Aceton (1:1; v/v). Im Anschluss wurden die Präparate für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Färbung erfolgte mittels einer kombinierten Giemsa/May-Grünwald-Färbung. Zu diesem Zweck wurden die Objektträger für 5 min in einer 5% Giemsa-Lösung (5 ml Giemsa/95 ml 1 x PBS-Puffer) inkubiert

und für weitere 10 min in einer unverdünnten May-Grünwald-Lösung (Fa. Merck) gefärbt. Nach jedem Färbeschritt wurden die Präparate mit 1 x PBSdef-Puffer gewaschen und 5 min getrocknet.

Die Auswertung der Präparate erfolgte nach Standardkriterien (Heckner und Freund, 2001) an mindestens 500 Zellen unter dem Mikroskop in 1200-facher Vergrößerung (Ölimmersion). Zur Auswertung gelangten Epithelzellen, Makrophagen, T-Lymphozyten, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Die Ergebnisse von jeweils zwei Präparaten pro Fraktion wurden gemittelt. Für die weiteren Versuche wurden nur Proben verwendet, die zu mehr als 90% aus Epithelzellen bestanden. Der sehr hohe Anteil an Epithelzellen resultiert aus mehreren Spülungen, die vor den Bürstungen durchgeführt wurden.

2.2.2.7 Präparation bronchialer Epithelzellen für die primäre Zellkultur

Die Isolierung primärer Zellen erfolgte aus Resektaten die im Rahmen von Lungen-Teilresektionen anfielen. Das Material wurde von Hr. PD Dr. med. M. Zegemann und Hr. Dr. med. A. Doermer (Klinikum Nordwest, Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Die Proben, in der Regel Mittel- oder Unterlappen, wurden frisch im Operationssaal übernommen und standen nach den Untersuchungen der Pathologie als Restmaterial zur Verfügung.

Primäre Bronchialepithelzellen wurden mit den bereits bei der Nasalbürstung verwendeten Curaprox LSTM Interdentalebürsten gewonnen. Die Zellen wurden zunächst in Zellkulturflaschen kultiviert, die mit Collagen Typ I beschichtet wurden. Dazu wurde eine 0,01%ige Collagen I-Lösung mit 10 mM Essigsäure in A. bidest verwendet. Die Zellkulturgefäße wurden mit 100 µl dieser Lösung pro Quadratzentimeter Oberfläche versetzt, d.h. mit 10 µg Collagen I/cm². Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C, wurden die Zellkulturgefäße zweimal mit Medium gewaschen und waren dann bereit für die Kultur. Die Zellen wurden in Bronchial Epithelial Cell Growth MediumTM (BECG-Medium; Promocell, Heidelberg) kultiviert, einem modifizierten LHC 8-Medium (Lechner & Laveck,

1985). Da die Zellausbeuten mit diesem Medium gering blieben, wurde die Medienzusammensetzung modifiziert.

Die Strategie bei der Kultur primärer Zellen sollte zunächst eine Vervielfältigung des Materials sein. Dies erreicht man mit einer Steigerung der Proliferationsrate. Für die eigentlichen Versuche sollten idealerweise differenzierte Zellen verwendet werden, weil sie die natürlichen Bedingungen am besten reflektieren. Diese beiden Anforderungen können von einem einzigen Medium nicht optimal erfüllt werden. Aus diesem Grund wurden ein Expansionsmedium und ein Differenzierungsmedium erstellt (siehe **Tab. 2.1**).

Für das Expansionsmedium wurden zusätzliche Supplemente benutzt, die einen positiven Einfluss auf die Proliferation von Atemwegsepithelzellen besitzen. Dazu gehörten der „keratinocyte growth factor“ (KGF; Housley et al., 1994), „hepatocyte growth factor“ (HGF; Singh-Kaw et al., 1995) sowie der „epidermal growth factor“, der im BECG-Medium bereits enthalten war, dessen Menge jedoch erhöht wurde.

Für das Differenzierungsmedium wurde die Menge dieser Wachstumsfaktoren reduziert. Dafür wurden Retinolsäure und Choleratoxin zugegeben. Die Medienzusätze sind im Einzelnen:

	Promocell BECG-Medium	Expansions-Medium	Differenzierungs-Medium
Reagenz	Menge	Menge	Menge
HEPES	28 mM	unverändert	unverändert
EGF	0,5 ng/ml	5 ng/ml	0,5 ng/ml
KGF	-	10 ng/ml	0,5 ng/ml
HGF	-	5 ng/ml	0,5 ng/ml
Insulin	5 µg/ml	unverändert	unverändert
Hydrocortison	0,5 µg/ml	unverändert	unverändert
Epinephrin	0,5 µg/ml	unverändert	unverändert
Rinder Hypophysenextrakt	0,4 µg Protein/ml	unverändert	unverändert
Triiodothyronin	6,5 ng/ml	unverändert	unverändert
Transferrin	10 µg/ml	unverändert	unverändert
Retinolsäure	-	-	100 pg/ml
Choleratoxin	-	-	10 ng/ml
Penicillin	50 U/ml	unverändert	unverändert
Streptomycin	50 µg/ml	unverändert	unverändert
Amphotericin B	0,5 µg/ml	unverändert	unverändert

Tab. 2.1: Zusammensetzung der verwendeten Medien für die Kultur primärer humaner Bronchialepithelzellen. Das Promocell BECG-Medium wurde zur Optimierung der Anzucht modifiziert. Zur Verwendung kam zunächst ein Expansionsmedium zur Propagation. Später wurde ein Differenzierungsmedium eingesetzt

2.2.2.8 Kultivierung primärer bronchialer Epithelzellen an der Luft-Medium-Grenzfläche („Air-Liquid Interface“; ALI)

Für die weiteren Studien wurden die primären Bronchialepithelzellen auf Collagen Typ I-beschichtete Transwell Clear-Membraneinsätze (Corning Costar) ausgesät und bei 37°C mit 5% CO₂ kultiviert. Die Membraneinsätze sind charakterisiert durch eine permeable Polytetrafluorethylen-Membran mit einer Porengröße von 0,4 µm und einer Wachstumsfläche von 1,1 cm². Sie befinden sich als Membraneinsätze in normalen 12-Well-Zellkulturschalen. Durch die Membran, auf der die Zellen ausgesät werden, wird die Kammer in einen oberen (apikalen) und einen unteren (basolateralen) Bereich aufgeteilt. Nach dem Aussäen der Zellen wurden die Zellen für die nächsten 24 h sowohl apikal auch basal mit Proliferations-Medium versorgt („submerged culture“). Nach 24 h wurde das Medium auf der apikalen Seite entfernt, und das basale Medium auf 400 µl reduziert. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung an der Luft-Medium-Grenzfläche kultiviert (die so genannte „air-liquid-interphase“; ALI). Der Mediumwechsel wurde alle zwei Tage vorgenommen. Nach Erreichen der Konfluenz wurde anstelle des Proliferations-Mediums das Differenzierungsmedium verwendet.

2.2.3 Quantifizierung der mRNA-Expression

2.2.3.1 RNA-Isolierung

Sämtliche Gewebeproben wurden unmittelbar nach ihrer Entnahme oder in ihren Zellkulturgefäßen zweimalig mit eiskaltem PBS gewaschen. Die RNA der verwendeten Zellen wurde mit Hilfe von RNAzolTM B (WAK-Chemie, Bad Homburg) nach Herstellerangaben isoliert. Diese Extraktionsmethode basiert im Wesentlichen auf der Methode von Chomczynski et al. (1987).

Primäres Zellmaterial aus Bronchial- und Nasalbürstungen (bis zu 2 X 10⁶ Zellen) wurde in 300 µl RNAzolTM B aufgenommen. Bei Verwendung von

Zellkulturen wurden 5×10^6 Zellen mit 500 μl RNAzol™ B versetzt. Das Material wurde dann mittelfristig bei -80°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet. Zur Entfernung von Proteinen wurden 1/10 Volumenanteil Chloroform zugegeben, für 15 min bei 4°C inkubiert und bei 14.000 rpm in einer Mikrozentrifuge für 15 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase der Phenol/Chloroform-Extraktion wurde mit einem Volumenanteil eines Gemischs aus Phenol (H_2O -gesättigt, pH 4,5-5), Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) vermischt. Danach wurden die Proben gevortext, 15 min bei 4°C inkubiert und bei 14.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Um die RNA auszufällen, wurde der Überstand mit einem Volumenanteil Isopropanol versetzt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit der RNA mit 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen. Nach einer Zentrifugation mit 8000 rpm für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Sediment für 5 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen A. bidest gelöst.

2.2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung RNA nach Maniatis et al. (1982) wurde die UV-Absorption der Nukleinsäurelösung bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt. Die Messung erfolgte gegen das jeweilige Lösungsmittel mit Hilfe des GeneQuant® II DNA/RNA Calculators und einer Mikrovolumen-Küvette der Fa. Pharmacia. Die Messergebnisse wurden lösungsmittelkorrigiert und gaben Aufschluss über die Konzentration und die Reinheit der Nukleinsäurelösung. Die Reinheit der isolierten RNA lässt sich aus dem Quotienten der gemessenen Absorptionen $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ermitteln und sollte zwischen 1,6 und 2 liegen. Proben, die dieses Kriterium nicht erfüllten wurden verworfen.

2.2.3.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription nutzt man die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase, aus einer RNA-Vorlage eine komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren. Die Reverse Transkriptase benötigt für ihre in 5'-3'-Richtung verlaufende cDNASynthese ein kurzes DNA-Oligonukleotid als Startermolekül, einen so genannten Primer, der ein freies 3'-OH-Ende besitzt und komplementär zur RNA sein muss. Die verwendeten Primer waren 500 ng randomisierte Hexamere (random hexamers, Fa. Promega). Als Enzym wurde die 'Superscript™ II Reverse Transcriptase' (Invitrogen; Karlsruhe) verwendet. Pro Ansatz wurden auf Eis zusammengegeben:

1-5	µg	Gesamt-RNA
1	µl	<i>random</i> Hexamere(500 ng/µl)

mit A. bidest wurde auf 12 µl aufgefüllt

Dieser Ansatz wurde für 10 min auf 70° C erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt.

Hinzugefügt wurden:

4	µl	5×Reverse Transkriptase Puffer
2	µl	0,1 M DTT
1	µl	dNTPs (10mM)
1	µl	Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Die Reverse Transkription wurde für 60 min bei 42°C durchgeführt. Danach wurde für 10 min auf 70° C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt. Die Ansätze wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4 RT-kompetitive Multiplex PCR

2.2.4.1 Erstellung interner Standards für eine kompetitive PCR

Für die Amplifikation der cDNA von GAPDH, CFTR, IL-6, IL-8 und den Osmolyt-Transportern BGT-1, SMIT und TAUT wurden 1-4 μ l eines RT-Ansatzes in 50 μ l-PCR-Ansätzen eingesetzt. Zur Kontrolle dienten weitere Ansätze mit 0,2 μ g nicht-transkribierter RNA und 0,2 μ g DNA aus humanem Vollblut, die freundlicherweise von Dr. Horst Donner aus der Abteilung Endokrinologie der Universitätsklinik Frankfurt zur Verfügung gestellt wurden. Zur weiteren Verwendung kamen nur Primerkombinationen, die keine Amplifikate von DNA oder nicht-translatierter RNA ergaben.

Nach initialem Denaturieren der cDNA bei 94°C für 4 min schließen sich 35 Zyklen an mit 94°C für 45 s, 58°C für 30 s und 72°C für 1 min. Die Ansätze enthielten 1,5 U EURO-Taq-Polymerase und 1x Eurotaq-Puffer (Fa. Eurogentec), 0,2 mM/dNTP und 50 pmol/Primer, wobei entweder ein Primerpaar der Konstellation A/B oder ein Primerpaar der Konstellation A/CB verwendeten wurde. Ein Primerpaar A/CB wird eingesetzt, um einen internen Standard (Kompetitor) entsprechend der Methode nach Celi et al. (1993) zu erstellen (**Abb. 2.1**). Das Primerkonstrukt CB ist am 5'-Ende identisch mit Primer B. Das 3'-Ende, das den eigentlichen Primer darstellt, erkennt eine Sequenz, die in festgelegtem Abstand stromabwärts der Zielsequenz für Primer B liegt. Dadurch ergibt sich praktisch eine Deletion der dazwischenliegenden Basen. Sowohl die Wildtyp-cDNA als auch der Kompetitor, lassen sich mit den Primern A und B amplifizieren, sind jedoch durch ihre unterschiedliche Größe voneinander unterscheidbar.

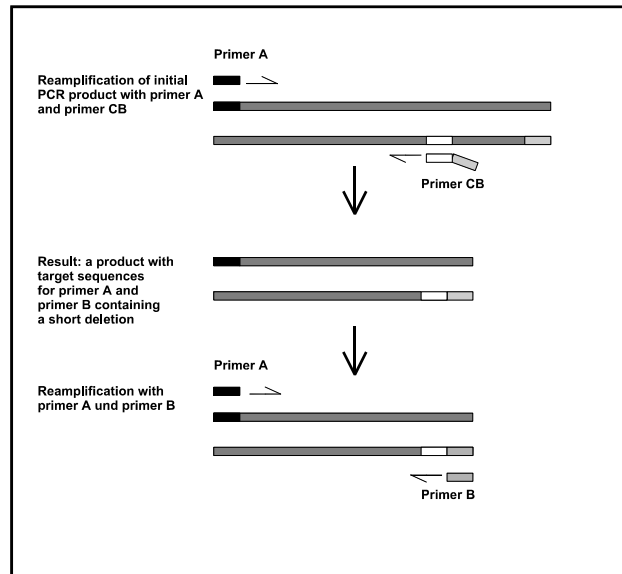


Abb. 2.1.: Erstellung interner Standards nach einer Methode nach Celi et al., 1993. Ein zu modifizierendes PCR-Produkt wird mit einem Primerpaar A und CB reamplifiziert. Das Primerkonstrukt CB ist am 5'-Ende identisch mit Primer B. Das 3'-Ende, das den eigentlichen Primer darstellt, erkennt eine Sequenz, die in festgelegtem Abstand stromabwärts der Zielsequenz für Primer B liegt, die Basen zwischen C und B werden dadurch deletiert.

Die für die Erstellung der internen Standards, oder Kompetitoren verwendeten Primer waren:

GAPDH GenBank: M33197	
GAP-286 (A)	ATC TTC CAG GAG CGA GAT CC
GAP-788 (B)	ACC ACT GAC ACG TTG GCA GT
GAPIST (CB)	ACC ACT GAC ACG TTG GCA GTA GTA GAG GCA GGG ATG ATG T
CFTR GenBank: M28668	
CFTR-1543 (A)	ATT ATG GGA GAA CTG CAG CCT
CFTR-1899 (B)	GCC ATC AGT TTA CAG ACA CAG
CFTR-IST265 (CB)	GCC ATC AGT TAA CAG ACA CAG GAC CTC CAC TCA GTG TGA TTC
BGT-1 GenBank: L42300	
BGT1-1462 (A)	GAA GTG GTC TGC ATA AGC TGG
BGT1-1722 (B)	GAC GAA GAG TGG GAC ACA GAC
BGT1-IST259 (CB)	GAC GAA GAG TGG GAG ACA GAC TAC ACA TAG ACG TTG TTG TA
SMIT GenBank: L38500	
SMIT-1215 (A)	GGA GTT AAT GAT TGT GGG GA
SMIT-1829 (B)	TCT GCA GGT TAC CAA CAG AT
SMIT-IST565 (CB)	TCT GCA GGT TAC CAA CAG ATG GAA TGA TGT GGT TGA TGG T

TAUT	
GenBank: U09220	
taurtrans-1507 (A)	TGG ATG AAG TAC AGC TGG GCT
taurtrans-1860 (B)	CAT CAT GGT CTC CAC AAT GA
tautr-IST340 (CB)	CAT CAT GGT CTC CAC AAT GAA GAG TTG TAA GGT GTG GCT C
<hr/>	
Interleukin 6	
GenBank: M38669M28130	
IL-6-301(A)	CAC TGG CAG AAA ACA ACC TG
IL-6-662-(B)	GGA CTG CAG GAA CTC CTT AA
IL-6-IST-319 (CB)	GGA CTG CAG GAA CTC CTT AAG GTT CTG TGC CTG CAG GTT C
<hr/>	
Interleukin 8	
GenBank: M28130	
IL-8-1532 (A)	ACA AGA GCC AGG AAG AAA CC
IL-8-2895 (B)	CTC TCT TCC ATC AGA AAG CT
IL-8-IST238 (CB)	CTC TCT TCC ATC AGA AAG CTC ACT CTC AAT CAC TCT CAC T

Für die resultierenden PCR-Produkte ergaben sich folgende Fragmentlängen:

	Wildtyp in bp	Kompetitor in bp
CFTR	377	265
GAPDH	502	427
SMIT	614	565
TAUT	353	293
BGT-1	260	211
IL-6	361	319
IL-8	277	238

Die Kompetitoren wurden anschließend in T-Vektoren kloniert (TOPO TA-Cloning Kit, Invitrogen) und in kompetente Bakterienstämme transformiert und vervielfältigt. Die Plasmide wurden nach Bestimmung der Konzentration sequenziert (Fa. Sequiserve, Vaterstetten, Deutschland). und standen dann für die RT-kompetitive Multiplex PCR zur Verfügung.

2.2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

In der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente werden unterschiedliche Agarose-Konzentrationen für das Gel benötigt: Für die in der

vorliegenden Arbeit verwendeten PCR-Produkte von ca. 200-700 bp Länge wurden 2%ige Agarose-Gele verwendet.

Die entsprechende Menge von Agarose wurde in TBE-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurden 0,5 µl Ethidiumbromid (Stammmlösung: 2 mg/ml) pro 50 ml Gellösung zugesetzt und das Gel in einer horizontalen Gelkammer (Model A2 Gator, Owl, Portsmouth, USA) mit einem Probenauftragskamm gegossen. Nach dem Gelieren wurde das Gel mit TBE-Puffer als Laufpuffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 6:1 mit Auftragspuffer-Puffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V, bis der Farbstoff des Auftrags-Puffers die Mitte der Laufstrecke erreicht hatte. Die DNA-Banden waren unter UV-Licht durch den inzwischen die Doppelstränge der DNA interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid sichtbar. Sie wurden mit dem DocuGel V-System der Fa. Scanalytics digitalisiert und konnten anschliessend mit dem Programm Zero-D-ScanTM (Fa. Scanalytics) densitometrisch ausgewertet werden.

1 x TBE-Puffer:

- 90 mM Tris-HCl
- 90 mM Borsäure
- 2 mM EDTA

in A. bidest lösen und pH 8,0 einstellen. TBE-Puffer wird als 10-fache Stammlösung angesetzt und bei RT gelagert.

Auftragspuffer-Puffer:

- 50 % (v/v) Glycerin
- 0,5 % (w/v) Bromphenolblau

2.2.4.3 Reinigung von PCR-Produkten

Im Anschluß an die PCR wurden die PCR-Produkte für eine nachfolgende Ligation aufgereinigt, indem Primer, Nukleotide, Taq-Polymerase und Salze mit Hilfe des PCR Purification KitsTM der Fa. Qiagen entfernt wurden.

Die DNA wurde an eine QIAquick-Säule gebunden, nachdem ein Volumenanteil des PCR-Reaktionsansatzes mit fünf Volumenanteilen Puffer PB gemischt und auf die Säule appliziert wurde. Die Säule wurde auf ein 2 ml Zentrifugationsgefäß gesteckt und 30-60 s zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und nochmals 60 s zentrifugiert. Dieser Durchlauf wurde ebenfalls verworfen und die Säule erneut mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Zentrifugationsgefäß überführt und die aufgereinigte DNA mit 20-30 µl H₂O eluiert. Alle Puffer wurden ohne nähere Konzentrationsangaben des Herstellers geliefert.

2.2.4.4 Klonierung von PCR-Fragmenten mit dem TOPO TA CloningTM - Kit

Für das Klonieren von PCR-Produkten wurde das TOPO-Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Hierbei wird die terminale Transferaseaktivität der Taq-Polymerase genutzt, welche unabhängig von der DNA-Matrize ein Desoxyadenosin an das 3'-Ende des Amplikons anhängt. Der linearisierte TOPO-Vektor besitzt entsprechend Desoxythymidinüberhänge, so dass eine Ligation über „klebrige Enden“ erfolgen kann. Zusätzlich wird bei dieser Methode der Klonierung die gewöhnliche T4 DNA-Ligase durch eine DNA-Topoisomerase ersetzt. Diese ist an den Enden des Vektors kovalent gebunden und kann die Ligationszeit erheblich verkürzen. Für den Ansatz wurden folgende Komponenten verwendet:

2-4 µl	PCR Produkt
1 µl	Salz Lösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl ₂)
1 µl	TOPO Vektor

Die TOPO-Reaktion wurde mit Wasser auf 6 µl aufgefüllt und für 5-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.4.5 Hitzeschock-Transformation von E. coli

2 µl des Ligations-Ansatzes wurden zu 50 µl auf Eis aufgetauten chemisch kompetenten Zellen gegeben. Chemisch kompetente E. coli Stämme sind Bestandteile des TOPO-TA-Cloning Kits der Firma Invitrogen. (siehe **2.2.4.4**) Es wurden hierbei die Stämme TOP10 und TOP10F' verwendet. Sie wurden nach den Angaben des Herstellers behandelt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte der eigentliche Transformationschritt über einen 30 Sekunden dauernden Hitzeschock bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit 250 µl vorgewärmten SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 230 upm inkubiert. 50-150 µl der Suspension wurden auf vorgewärmte LB-Amp-Platten mit X-Gal und IPTG ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.4.6 Klonierung, Transformation und blau-weiß Selektion

Die Durchführung der Klonierung wurde gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur Detektion der Transformanten wurde ein blau-weiß Screening durchgeführt.

Die Insertionsstelle des PCR-Fragments liegt innerhalb des lacZ α -Gens, das auf dem pCRTM 2.1-TOPO Vektor codiert ist. Bei Religanden des Vektors ist das lacZ α -Gen vollständig und die α -Untereinheit der β -Galactosidase wird exprimiert. Dieses Enzym spaltet X-Gal, das in die Zelle aufgenommen wird. Als Resultat der Spaltung entsteht ein blauer Farbstoff, der die gesamte Kolonie einfärbt. Bei erfolgreicher Insertion des PCR-Fragmentes in den Vektor kann die β -Galactosidase nicht exprimiert werden und die Kolonien dieser Zellen bleiben weiß. Diese weißen Kolonien werden für weitere Versuche gepickt und in Antibiotika-haltigem Medium kultiviert bzw. konserviert.

2.2.4.7 RT-kompetitive Multiplex-PCR

Die PCR-Bedingungen wurden für jedes Experiment mit Hilfe von "mastermixes" standardisiert. Dazu wurden ein Standard-Mastermix und ein PCR-Mastermix erstellt. Der Standardmastermix enthielt die jeweils erforderlichen Kompetitoren (siehe unten). Aus der initialen Verdünnung wurden serielle 1:3-Verdünnungen erstellt, so dass 5-6 Reaktionsgefäße mit abnehmender Kompetitorkonzentration vorlagen. Der PCR-Mastermix enthielt 50 mM KCl, 10

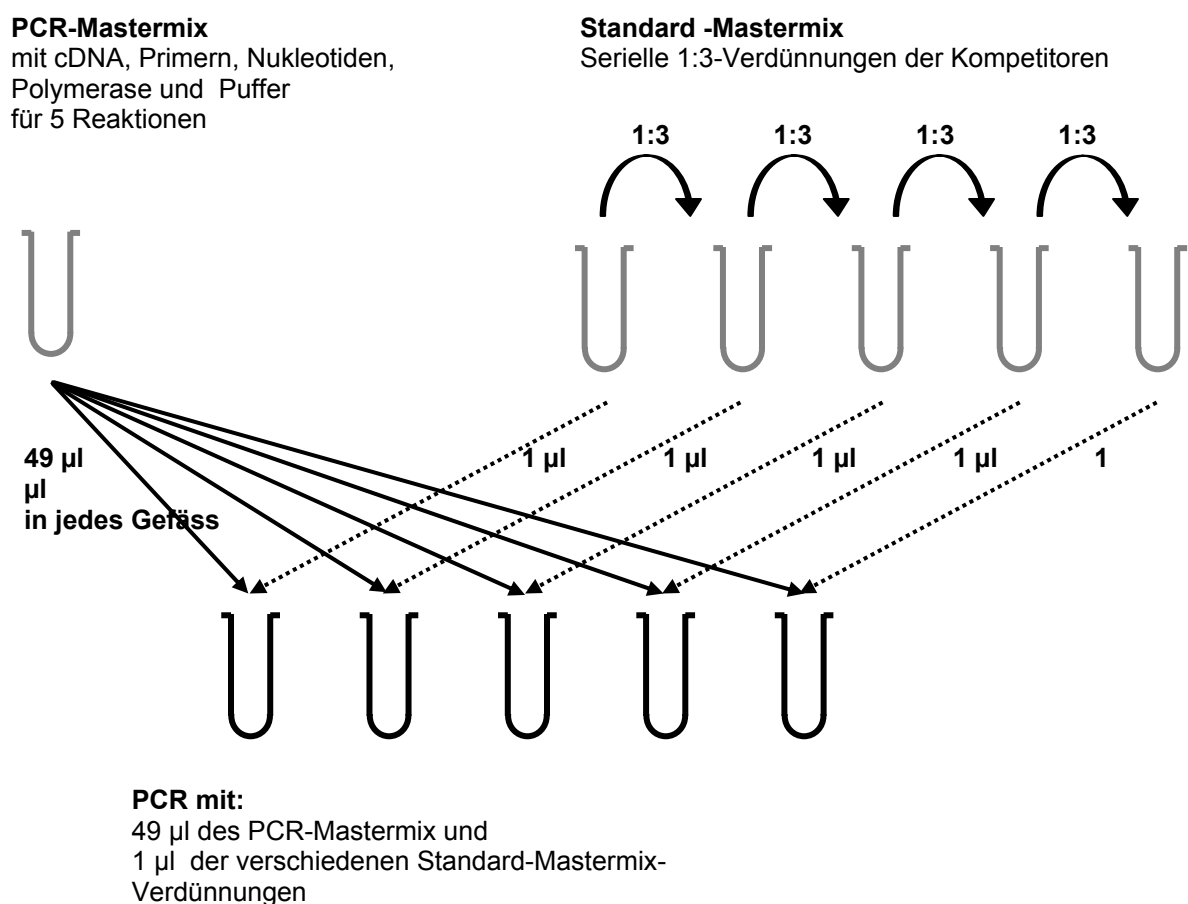


Abb. 2.2: Pipettierschema der RT-kompetitiven Multiplex-PCR. Angelegt werden serielle 1:3 Verdünnungen einer Mixtur verschiedener interner Standards (Kompetitoren). Von diesen wird auf jeweils ein Probenröhrchen 1 µl pipettiert. Für die PCR-Reaktion setzt man einen Mastermix an der dann auf die verschiedenen Röhrchen mit den Kompetitoren verteilt wird. Somit kompetieren identische Mengen cDNA mit abnehmenden Mengen an Standard.

mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, und 0,5 mmol/L dNTPs und die erforderlichen Mengen an Primern (siehe unten) in einem Gesamtvolumen von 50 µL/PCR-Ansatz. In einen Ansatz von 250 µL für 5 PCR Reaktionen wurden 2,5-10 µl cDNA und 20 Taq-Polymerase gegeben. Diese wurden verteilt auf 5 Reaktionsgefäße in denen jeweils 1 µl der 5 verschiedenen 1:3-Verdünnungen des Kompetitor-Mastermix vorgelegt waren (siehe **Abb. 2.2**). Somit ist die Menge an cDNA in jedem Reaktionsgefäß konstant, während die Standardkonzentrationen durch die serielle Verdünnung variiert.

Für semiquantitative Bestimmungen werden nur Proben verglichen, die mit demselben Standard-Mastermix gemessen wurden. Die verwendeten Standard-Mastermixe waren:

CFTR-Standard-Mastermix:

GAPDH-Kompetitor	4 x 10 ⁵ Kopien/µl
CFTR-Kompetitor	2 x 10 ³ Kopien/µl

Osmolyttransporter-Standard-Mastermix:

GAPDH-Kompetitor	10 ⁶ Kopien/µl
SMIT-Kompetitor	2 x 10 ⁴ Kopien/µl
TAUT-Kompetitor	0,6 x 10 ⁴ Kopien/µl
BGT-1-Kompetitor	0,6 x 10 ⁴ Kopien/µl

IL-8-Standard-Mastermix:

GAPDH-Kompetitor	4 x 10 ⁵ Kopien/µl
IL-8-Kompetitor	2 x 10 ⁵ Kopien/µl

IL-6/IL-8-Standard-Mastermix:

GAPDH-Kompetitor	2 x 10 ⁶ Kopien/µl
IL-6 Kompetitor	2 x 10 ⁵ Kopien/µl
IL-8-Kompetitor	6 x 10 ⁴ Kopien/µl

Die verwendeten Primerkonzentrationen für die RT-Kompetitive Multiplex PCR waren:

Primerkonzentrationen des CFTR-PCR-Mastermix:

GAPDH-Primer: 6 pmol / 50 μ l Reaktionsansatz je Primer
CFTR-Primer: 20 pmol / 50 μ l Reaktionsansatz je Primer

Primerkonzentrationen des Osmolyttransporter-PCR-Mastermix:

GAPDH-Primer: 6 pmol / 50 μ l Reaktionsansatz je Primer
TAUT-Primer: 25 pmol / 50 μ l Reaktionsansatz je Primer
SMIT-Primer: 15 pmol / 50 μ l Reaktionsansatz je Primer
BGT-1-Primer: 15 pmol / 50 μ l Reaktionsansatz je Primer

Primerkonzentrationen des IL-8-PCR-Mastermix:

GAPDH-Primer: 6 pmol / 50 μ l Reaktionsansatz je Primer
IL-8-Primer: 30 pmol / 50 μ l Reaktionsansatz je Primer

Primerkonzentrationen des IL-6/IL-8-PCR-Mastermix:

GAPDH-Primer: 5 pmol / 50 μ l Reaktionsansatz je Primer
IL-6-Primer: 30 pmol / 50 μ l Reaktionsansatz je Primer
IL-8-Primer: 12 pmol / 50 μ l Reaktionsansatz je Primer

Nach der Amplifikation wurden 10 μ l jedes Ansatzes mit DNA-Auftragspuffer versetzt, gelektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und einer densitometrischen Quantifizierung unterzogen. Als Molekulargewichtsmarker diente die 100 bp ladder der Fa. Invitrogen (Karlsruhe).

2.2.4.8 Densitometrische Quantifizierung

Die Gele wurden für 15 min mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend für 15 min entfärbt. Die gefärbten Banden wurden mit dem DocuGel V-System der Fa.

Scanalytics digitalisiert und konnten anschließend mit dem Programm Zero-D-Scan™ (Fa. Scanalytics) densitometrisch ausgewertet werden. Mit Hilfe der ermittelten Werte wurde das Verhältnis der Signalstärke der Banden von Kompetitor zu Templat bestimmt und gegen die Kompetitor-Konzentration geplottet. Ist das Verhältnis Kompetitor/Wildtyp gleich 1, liegen Kompetitor und Wildtyp-mRNA in äquivalenter Menge vor. Die Konzentrationen der einzelnen mRNAs wurden über eine lineare Regression ermittelt und gegen GAPDH standardisiert.

2.2.5 IL-6 und L-8 ELISA

Mit Hilfe eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wurde die IL-6- und IL-8-Sekretion im Zellkulturüberstand der Bronchialepithelzellen quantitativ erfasst. Hierfür wurde eine 96-well-Mikrotiterplatte mit 100 µl/well Beschichtungspuffer, dem 2 µg/ml Maus-anti-IL-8 oder anti-Maus-IL-6 Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden) zugesetzt waren, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die noch unbesetzten freien Bindungsstellen mit 300 µl/well Blockierungspuffer 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach dreimaligem Spülen der Platte mit Waschpuffer wurden 100 µl/well des Zellkulturüberstandes sowie der Standardverdünnungsreihe (rekombinantes humanes IL-8, oder rekombinantes humanes IL-6; beide R&D Systems, Wiesbaden) in die Vertiefungen pipettiert. Die Platte wurde 2 Stunden bei RT inkubiert, dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 100 µl/well des in Waschpuffer verdünnten Sekundärantikörpers (100 ng/ml rekombinantes Maus-anti-Human IL-8 biotinyliert oder 150 ng rekombinantes Maus anti-Human IL-6 biotinyliert; beide R&D Systems, Wiesbaden) auf die Mikrotiterplatte gegeben. Nach weiteren 2 Stunden Inkubation bei RT wurde die ELISA-Platte wiederum dreimal gewaschen, bevor 100 µl/well Streptavidin-HRP-Konjugat (500U/ml; Roche, Mannheim) für 20 min zupipettiert wurden. Nach erneutem Waschen wurden je 100 µl TMB Substratlösung (Dako-TMB; DakoCytomation, Hamburg) zugegeben und die ELISA-Platte bei 37 °C für 15-30 min bis zur gewünschten Intensität inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl *stop solution* abgebrochen.

Entstandene Farbkomplexe wurden anschließend an einem Tecan Sunrise ELISA-Reader (Tecan, München) bei 450 nm vermessen. Die Auswertungen der Messungen wurden mit der Software Magellan (Tecan Software GmbH, Hannover) durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

Beschichtungspuffer für IL-6 ELISA

50	mM	NaHCO ₃
2	µg/ml	monoklonaler Maus-ant-IL-6-Antikörper

in A. bidest gelöst und pH-Wert von 9,6 eingestellt

Beschichtungspuffer für IL-8 ELISA

50	mM	NaHCO ₃
2	µg/ml	monoklonaler Maus-ant-IL-8-Antikörper

in A. bidest gelöst und pH-Wert von 9,6 eingestellt

PBS-Puffer

137	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
10	mM	Na ₂ HPO ₄
2	mM	KH ₂ PO ₄

in A bidest gelöst und pH 7,4 eingestellt.

Waschpuffer für ELISA

0,05	% (v/v)	Tween 20
------	---------	----------

in PBS gelöst.

Blockierungspuffer

2	% (v/v)	Gelatine-Hydrolysat
---	---------	---------------------

in PBS gelöst.

Stoplösung

3	N	H ₂ SO ₄
---	---	--------------------------------

2.2.6 Proteinanalysen

2.2.6.1 Proteinisolierung

Etwa 300.000 Zellen wurden in jedes Well einer 6-Well-Platte gegeben und über Nacht in DMEM/Ham's F12-Medium mit 0,5% fetalem Kälberserum inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 1 X PBS-def-Puffer gewaschen. Zur Proteinisolation wurden die Zellen mit 100 μ l kombinierten SDS-Lysis-/Auftrags-Puffer in den Schalen lysiert. Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert.

Verwendete Lösung:

Kombinierter SDS-Lysis- und Sample-Buffer:

1,5 M Tris-HCl

2 % (w/v) SDS

10 % (v/v) Glycerol

50 mM DTT

0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Tris-HCl wurde in A. bidest gelöst. Anschließend wurde ein pH-Wert von 6,8 eingestellt und die übrigen Substanzen gelöst.

2.2.6.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine

Zur Analyse von Proteingemischen wurden die Proteine in einer SDS-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in denaturierenden 10% SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Das Trenngel enthielt 5 ml der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 3,75 ml 4 x Tris/HCl/SDS pH 8,8, 6,25 ml Wasser und 50 μ l einer 10%igen (w/v) Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS). Für die Polymerisation wurden 10 μ l TEMED zugegeben.

Zur Verbesserung der Bandenschärfe wurde das Trenngel mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol durch mehrmaliges Waschen mit Wasser entfernt. Danach erfolgte die Zugabe des Sammelgels. Das Sammelgel enthielt 0,65 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 1,25 ml 4 x Tris/HCl/SDS pH 6,8, 3,05 ml Wasser und 25 µl 10 %ige APS-Lösung. Zum Auspolymerisieren wurden 7,5µl TEMED zugegeben. Nach der vollständigen Auspolymerisation des Gels wurde die Gelvorrichtung in eine Elektrophoresekammer mit 1 x Elektrophorese-Puffer nach Laemmli gegeben. Zur Probenvorbereitung wurden die Proteinproben im kombinierten SDS-Lysis/Auftrags-Puffer für 10 min bei 90°C denaturiert. Nach dem Auftragen der Proben in die Taschen des Gels erfolgte die Elektrophorese mit zunächst 120 V. Nachdem die Laufmittelfront das Trenngel erreicht hatte wurde auf 160 V erhöht. Als Proteinstandard diente der Kaleidoscope Prestained Standard (Biorad, München).

Verwendete Lösungen:

30	%	Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid
30	% (w/v)	Acrylamid
0,8	% (w/v)	Bisacrylamid

4 x Tris/HCl/SDS pH 6,8

0,5	M	Tris
0,4	% (w/v)	SDS

Tris und SDS wurden in A. bidest gelöst. Anschließend wurde mit HCl ein pH-Wert von 6,8 eingestellt.

4 x Tris/HCl/SDS pH 8,8

1,5	M	Tris
2	% (w/v)	SDS

Tris und SDS wurden in A. bidest gelöst. Anschließend wurde mit HCl ein pH-Wert von 8,8 eingestellt.

Elektrophorese-Puffer nach Laemmli

25	mM	Tris
250	mM	Glycin
0,5	% (w/v)	SDS

in A. bidest gelöst. Anschließend wurde mit HCl ein pH-Wert von 8,8 eingestellt.

2.2.6.3 Western Blotting

Der Transfer der Proteine vom Gel auf eine Membran wurde nach etablierten Standardverfahren durchgeführt. Die Gele wurden für 15 min in Blotting-Puffer inkubiert. Die Transfer-Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) wurde 5 s in Methanol gegeben und dann ebenfalls für 5 min Blotting-Puffer geschwenkt. Anschließend wurden die Proteine aus dem Gel mit Hilfe eines Nassblot-Verfahrens auf die PVDF-Membran übertragen (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad, München). Der Transfer erfolgte in eisgekühltem Blotting-Puffer bei 80 V für 45 min.

Anschließend wurde die Membran für 10 min in TBS-T-Puffer gewaschen und 1 h mit 5% Milchpulver in TBS-T-Puffer geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T Puffer erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C mit einer 1:1500 Verdünnung des primären Antikörpers (Anti-Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182), Cell Signalling Technologies, Frankfurt) in TBS-T-Puffer mit 5% BSA (Serum Albumin Fraktion V, Roth, Karlsruhe). Nach dreimaligem Waschen in TBS-T-Puffer wurde nun für 1 h mit einer 1:2000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (Peroxidase gekoppelter Anti-Rabbit IgG, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in TBS-T-Puffer inkubiert. Danach folgten vier 5-minütige Waschschrte in TBS-T.

Für die Detektion wurden die ECL Western blotting detection reagents 1 und 2 (Amersham, Freiburg) in gleichem Verhältnis gemischt und eine Minute mit der Membran inkubiert. Nach dem Absaugen der Flüssigkeit wurde die Membran mit einem Film belegt (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg) und dann entwickelt.

Verwendete Lösungen:

Blotting Puffer nach Towbin

25	mM	Tris-HCl
192	mM	Glycin
10	% (v/v)	Methanol

Die Substanzen wurden in A. bidest gelöst. Anschließend wurde ein pH-Wert von 8,3 eingestellt.

TBS-T – Puffer (Tris buffered saline + Tween 20)

20	mM	Tris-HCl
137	mM	NaCl
0,2	% (v/v)	Tween 20

Die Substanzen wurden in A. bidest gelöst. Anschließend wurde ein pH-Wert von 7,6 eingestellt.

2.2.7 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellgröße

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde ein FACSCalibur™-Durchflusszytometer der Fa. Becton Dickinson verwendet. Es erlaubt eine zuverlässige Charakterisierung von Zellen aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften.

Das Durchflusszytometer besteht aus mehreren Komponenten. Dazu gehören ein Flüssigkeitssystem, ein optisches System, Signaldetektoren und Konverter, sowie ein Computer mit der Software für die entsprechenden Auswertungen.

Das Flüssigkeitssystem führt die Zellen über Kapillare einzeln durch ein Lasersystem. Dies geschieht mit Hilfe einer hydrodynamischen Fokussierung. Nachdem die Zellen aus dem Probenröhrchen mit Druckluft in die Probeneinspritznadel gelangen, der so genannte Probenstrom, werden sie von einem Hüllstrom umgeben, der aus einer entgasten Lösung besteht (FACSFlow™). Proben- und Hüllstrom werden dann in die Flusskammer

überführt. Durch die Form der Flusskammer und den vorherrschenden Druck passieren Proben- und Hüllstrom die Flusskammer in Form einer laminaren Strömung, ohne sich miteinander zu vermischen. Gleichzeitig werden die Zellen innerhalb des laminaren Stroms nacheinander aufgereiht und können quasi einzeln dem Laserlicht des optischen Systems ausgesetzt werden.

Das optische System des verwendeten Durchflusszytometers besteht aus einem Argon-Ionen- und einem Helium-Neon-Laser und mehreren Detektoren. Mit den an zwei verschiedenen Stellen angebrachten Detektoren können zwei Kategorien optischer Eigenschaften des Probenmaterials erfasst werden: das Streulicht und die Fluoreszenz. Bei dem Streulicht unterscheidet man eine Lichtbrechung in Richtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreuung; forward light scatter, FSC), und eine Lichtbrechung, die orthogonal zur Richtung des Laserstrahls und des Flüssigkeitsstroms ist (Seitwärtsstreuung; side scatter, SSC). Das Seitwärtsstreulicht gibt dabei Auskunft über die Granularität und Komplexität der Zellen. Das Vorwärtsstreulicht hingegen hängt von der Größe der Zellen ab und erlaubt damit eine Bestimmung der Zellgröße.

Das Streulicht unmarkierter Zellen basiert auf einer so genannten Autofluoreszenz der Zellen. Bei Anregung der Zellen mit dem Laserlicht werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Wenn sie auf ihr ursprüngliches Niveau zurückfallen, wird Energie in Form von Photonen frei und als emittierte Photonenkonzentration von Photodetektoren gemessen. Die in den jeweiligen Fluoreszenzkanälen detektierte Fluoreszenzintensität stellt ein relatives Mass für die Zahl der emittierten Signale dar.

Aufgrund der unterschiedlichen Lichtwellenlängen der Laser (Wellenlänge des Argon-Ionen-Lasers: 488 nm; Wellenlänge des Helium-Neon Lasers: 633 nm) bzw. der Auswahl verschiedener Fluorochrome mit unterschiedlichen Emissionsspektren, können Grün- (FL1), Orange (FL2) und unterschiedliche Rotfluoreszenzintensitäten (FL3, FL4) über die Photodetektoren erfasst werden. Die gesammelten Signale werden digitalisiert und an einen Computer übertragen. Die Bearbeitung der Rohdaten erfolgte mit dem Analyseprogramm Cell-Quest.

Die Messung des Zellvolumens erfolgte nach einer Modifikation der Methode nach Feranchak et al. (2001). Dazu wurden subkonfluente Zellen zunächst trypsinisiert und zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in isotones Zellkulturmedium aufgenommen, so dass eine Konzentration von 10^7 Zellen/ml erreicht wurde. In diesem Medium wurden die Zellen für 45 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden je 10^6 Zellen in Röhrchen überführt, die 10 ml isotones oder hypertones Medium enthielten. Nach einer Inkubation von 90 min bei 37°C auf einem Schüttler wurden die Zellen direkt für die Messungen am FACS eingesetzt. Für jede Messung wurden 20 000 Zellen verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierung primärer humaner Bronchialepithelzellen

3.1.1 Die Gewinnung und Kultur primärer humaner Bronchialepithelzellen

Die Gewinnung humaner Bronchialepithelzellen wurde an Lungen-Teilresektaten vorgenommen, die von Patienten stammten, die sich einem thoraxchirurgischen Eingriff im Klinikum Nordwest in Frankfurt unterzogen haben. Nach den erforderlichen klinischen Untersuchungen, standen die Resektate als Restmaterial zur Verfügung.

Die Gewinnung der Bronchialepithelzellen erfolgte durch eine cytologische Bürstung mit Curaprox LS™ Interdentalebürsten. Die gewonnenen Zellen wurden zunächst in einem kommerziell erhältlichen Medium kultiviert, dem Bronchial Epithelial Cell Growth Medium™ der Fa. Promocell. Dieses Medium wurde zur Verbesserung der Zellausbeuten modifiziert.

Zunächst wurde ein Expansionsmedium erstellt, das sich von dem Originalmedium hinsichtlich seiner Supplementierung unterschied. Hierbei wurde ein Schwerpunkt auf proliferationsfördernde Supplemente gelegt, die im Bronchialepithel während einer Reepithelisierung nach Läsionen gebildet werden. So wurden zusätzlich zu der Originalformulierung 10 ng/ml KGF und 5 ng/ml HGF zugesetzt. Die Menge an EGF wurde von 0,5 ng/ml auf 5 ng/ml erhöht.

Um das Wachstum primärer Bronchialepithelzellen in beiden Medien vergleichen zu können, wurden frisch isolierte Zellen in beiden Medien ausgesät (n=4). Nach jeweils 24, 48, 72 und 96 h wurden die Zellen trypsiniert und mittels einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Zellen wiesen keinerlei morphologische Unterschiede auf und zeigten bei der Verwendung beider Formulierungen das typische kopfsteinplasterartige („cobblestone“) Erscheinungsbild von Bronchialepithelzellen (**Abb. 3.1**). Die Zellzahlen ergaben

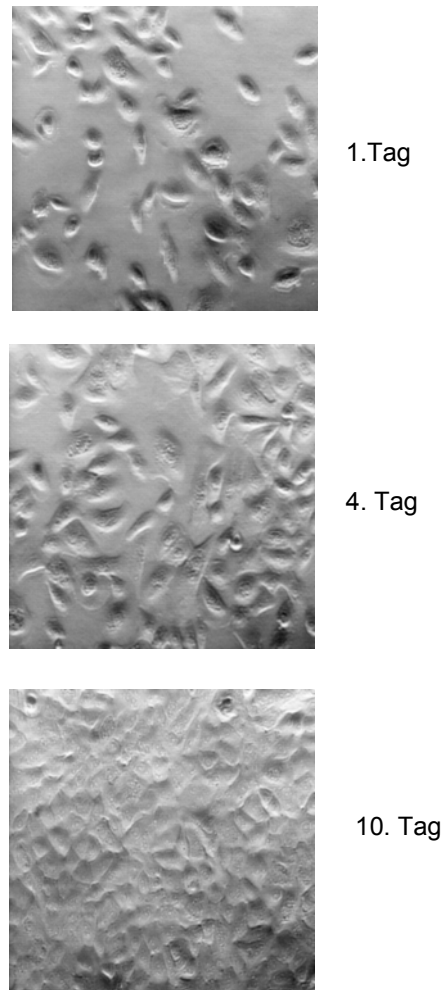


Abb. 3.1: Wachstum eines Monolayers primärer humaner Bronchialepithelzellen mit einem modifizierten BECG-Medium Proliferationsmedium in Verlauf von 10 Tagen. Die Zellen zeigen das typische kopfsteinplasterartige Erscheinungsbild (cobblestone shape).

nahezu eine Verdopplung der Zellausbeute nach 96 h durch das modifizierte Expansionsmedium gegenüber dem Promocell BECG-Medium (**Abb. 3.2**). Die Supplementierung mit proliferationsfördernden Wachstumsfaktoren, die *in vivo* vom Bronchialepithel selbst gebildet werden, führt somit zu einer signifikanten Verbesserung der Proliferationsrate der Bronchialepithelzellen.

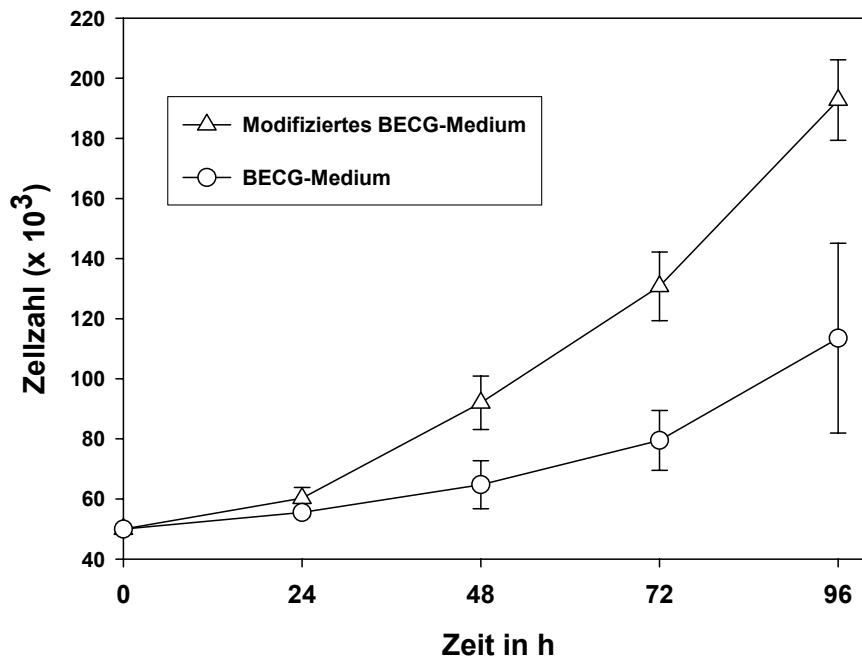


Abb. 3.2: Vergleich des Wachstums primärer humaner Bronchialepithelzellen in Promocell BECG-Medium gegenüber dem modifizierten BECG-Medium (Proliferationsmedium) (n=4). Die Verwendung des modifizierten BECG-Mediums führt zu einer signifikanten Steigerung der Zellausbeuten. Die Supplementierung des modifizierten BECG-Mediums wurde hinsichtlich proliferationsfördernder Eigenschaften erfolgreich verändert.

Nach der Expansion sollten die Zellen differenziert werden. Dazu wurde ein Differenzierungsmedium verwendet. In diesem wurde der Anteil proliferationsfördernder Supplemente auf ein erforderliches Mass reduziert. Die Menge an EGF, HGF und KGF wurde auf jeweils 0,5 ng/ml reduziert. Zusätzlich wurde das Medium mit 100 pg/ml Retinolsäure und 10 ng/ml Cholera toxin supplementiert. Retinolsäure und Cholera toxin dienen der zusätzlichen Unterstützung der Differenzierung der Bronchialepithelzellen.

3.1.2 Die Charakterisierung der Kultur primärer humaner Epithelzellen

An der Organbildung der Lunge sind unterschiedliche Keimblätter beteiligt. Die Epithelzellen, die im Rahmen der Bürstung eines Bronchus oder einer Bronchiole gewonnen werden, können deshalb in unterschiedlichem Maß mit

anderen Zellpopulationen verunreinigt sein. Dies sind im besonderen Fibroblasten, Muskelzellen oder Zellen mesodermalen Ursprungs. Obwohl die Kulturbedingungen präferentiell das Wachstum von Bronchialepithelzellen begünstigen, muss eine Verunreinigung mit diesen Zellen ausgeschlossen werden.

Eine Verunreinigung mit Fibroblasten ist lichtmikroskopisch überprüfbar. Eventuell auftretende Fibroblasten wurden in der vorliegenden Arbeit durch eine kurzzeitige Trypsinierung erfolgreich entfernt. Fibroblasten lösen sich in einer 0,25%igen Trypsinlösung bereits nach 3-5 Minuten von ihrem Substrat ab. Humane Bronchialepithelzellen sind nach dieser Zeit noch adhärent. Die Trypsinlösung mit den Fibroblasten wurde dann entfernt. Die Bronchialepithelzellen im Kulturgefäß wurden zweimal mit Medium gespült und dann wieder mit Medium weiterkultiviert.

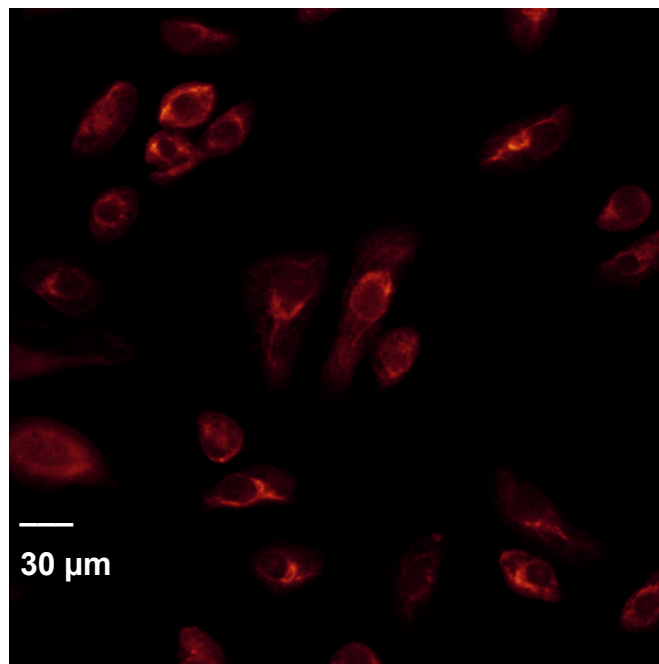


Abb. 3.3: Expression von Cytokeratin 18 in Kulturen primärer Bronchialepithelzellen. Darstellung mittels konfokalen Lasermikroskops.

Der epitheliale Charakter der Zellen sowie eventuelle Verunreinigungen mit Muskelzellen oder Zellen mesodermalen Ursprungs wurden

immunhistochemisch überprüft. Diese Untersuchungen wurden von Dr. med. Christian von Mallinckrodt und Prof. Dr. Andreas Zimmer mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops durchgeführt.

Für die Charakterisierung des epithelialen Ursprungs der Zellen wurde ein Antikörper gegen Cytokeratin 18 verwendet. Cytokeratin 18 gehört zu den Intermediärfilamenten und bildet einen Bestandteil des Cytoskeletts von Säugerzellen. Die Cytokeratine sind charakteristisch für epitheliale Zellen. Cytokeratin 18 wird nur in der apikalen Zellschicht des Bronchialepithels gebildet. Zur Untersuchung gelangten Zellen, die für mindestens zwei Wochen in Differenzierungsmedium kultiviert worden waren. **Abb. 3.3** zeigt exemplarisch die flächenhaft positive Detektion von Cytokeratin 18 in den kultivierten Zellen. Es handelt sich folglich um humane Bronchialepithelzellen. Weitere immunhistochemische Untersuchungen bestätigten die epitheliale Zuordnung der Zellen. Antikörper gegen Vimentin wurden verwendet, um eine Verunreinigung mit mesodermalen Zellen detektieren zu können (ohne Abb.). Für die Charakterisierung von Muskelzellen wurden Antikörper gegen Desmin verwendet (ohne Abb.). In beiden Fällen ergab sich kein positiver Befund, so dass von einer reinen Kultur epithelialer Bronchialepithelzellen ausgegangen werden kann.

3.2 Etablierung eines RNA-Quantifizierungsverfahrens für geringe Probenmengen

3.2.1 Kompetitive PCR

In der vorliegenden Arbeit soll die Expression verschiedener Gene in Zelllinien und Primärkulturen von humanem Bronchialepithel, als auch in frischen Gewebebürstungen des Bronchial- und Nasenepithels bestimmt werden. Da bei Primärkulturen und Gewebebürstungen die Ausgangsmenge an Zellmaterial sehr beschränkt ist, konnten Verfahren wie das Northern Blotting oder ein Ribonuklease Protection Assay (RPA) nicht angewendet werden. Zudem wird zumindest eines der zu detektierenden Gene in nur geringer Kopienzahl exprimiert. Aus diesem Grund wurde eine Quantifizierung mit Hilfe der PCR gewählt. Das dabei zunächst verwendete Verfahren basierte auf einer kompetitiven PCR, die gegenüber der herkömmlichen PCR deutlich präziser ist (Zimmermann und Mannhalter, 1996).

Bei der kompetitiven PCR wird das zu bestimmende Target mit einer bekannten Menge eines exogen zugesetzten Standards (Kompetitor) in einem Reaktionsansatz amplifiziert. Aus dem Verhältnis der Signale der Target- und Standard-abgeleiteten PCR-Produkte kann dann die initiale Target-Menge berechnet werden.

Die Standards in der vorliegenden Arbeit sind Deletionsmutanten der Targetsequenz, die mit denselben Primern wie das Target amplifiziert werden können. Target- und Standard-abgeleitete PCR-Produkte sind nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch ihre Grösse voneinander unterscheidbar. Die Standards wurden nach einem Verfahren von Celi et al., (1993) erstellt, in TA-Vektoren ligiert und in Bakterien vervielfältigt. Bekannte Mengen dieser Standard-Plasmide wurden in serieller Verdünnung auf 5 Reaktionsgefässe verteilt. Die Zugabe von gleichen Teilen der Mastermischung mit PCR-Puffer, Nukleotiden, Taq-Polymerase und Target-cDNA sorgt für standardisiert unterschiedliche Verhältnisse von Standard und Target.

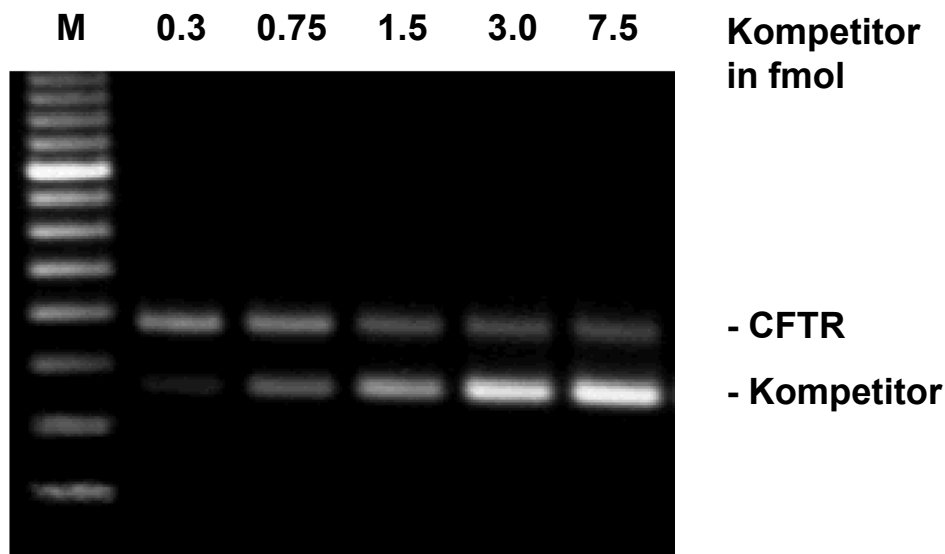


Abb. 3.4: Ethidiumbromidgefärbte Gelelektrophorese der Produkte einer kompetitiven PCR für CFTR. 3 µg RNA von unbehandelten 16HBE14o--Zellen wurden in 20 µl RT-Ansatz revers transkribiert. In den PCR-Ansätzen wurden jeweils 1 µl der RT-Reaktion und aufsteigende Mengen an Standard-Plasmid pCFIST (Kompetitor) eingesetzt. Mit zunehmender Menge an Kompetitor nimmt die Produktmenge von CFTR ab.

Ein Beispiel für eine kompetitive PCR von CFTR zeigt **Abb. 3.4**. Der Vergleich der Target- und Standard-abgeleiteten PCR-Produkte ergibt verschiedene Verhältnisse, da unterschiedliche Mengen an Standard eingesetzt wurden, aber konstante Mengen an cDNA.

Mit zunehmender Konzentration des Standards bzw. Kompetitors nimmt die Produktmenge des zu bestimmenden Targets, in diesem Falle CFTR, ab. Die Konzentration, bei der die Produktmengen von CFTR und Kompetitor identisch sind, wird Äquivalenzpunkt genannt. Am Äquivalenzpunkt kann die initiale Menge an Targetmolekülen abgelesen werden, da die Konzentrationen des Kompetitors bekannt sind.

Für die korrekte Bestimmung des Äquivalenzpunkts muss dabei jedoch gewährleistet sein, dass Standard und Target mit vergleichbarer Effizienz amplifiziert werden. Aus diesem Grund ist es erforderlich, die Amplifikationskinetik der beiden Produkte zu bestimmen.

3.2.2 Amplifikationskinetik der Kompetitoren

Trotz der Verwendung identischer Primer, können kürzere PCR-Produkte gegenüber längeren mit einer höheren Syntheseeffizienz amplifiziert werden (Chelly et al. 1990; McCulloch et al. 1995). Bei der Verwendung verkürzter Kompetitoren, wie im Falle der vorliegenden kompetitiven PCR, kann dies zu Fehleinschätzungen bei der Quantifizierung führen.

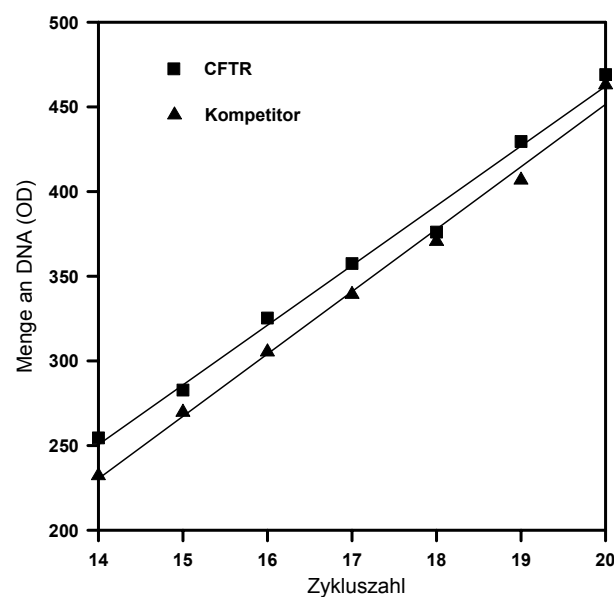


Abb. 3.5: Zyklusabhängigkeit einer Koamplifikation des 377 bp langen Wildtyp-CFTR mit dem 265 bp langen, korrespondierenden Kompetitor pCFIST. Beide Produkte weisen eine identische Amplifikationskinetik auf. Die Abbildung ist exemplarisch für 4 unabhängige Versuche.

Zur Bestimmung der Amplifikationskinetik von Kompetitor und Zielsequenz wurde der jeweilige Kompetitor mit der Zielsequenz koamplifiziert. Zwischen Zyklus 14 und 40 der Amplifikation wurde alle 2 Zyklen eine Probe entnommen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und quantifiziert. **Abbildung 3.5** zeigt exemplarisch, die Amplifikationskinetiken von CFTR und dem Kompetitor pCFIST. Sind die Amplifikationskinetiken identisch, verlaufen die Geraden parallel. Sind sie nicht identisch laufen sie auseinander oder kreuzen sich. Im

Fälle von CFTR und seinem Kompetitor sind die Amplifikationskinetiken identisch. Diese Versuche wurden für alle in dieser Arbeit verwendeten Kompetitoren durchgeführt. Zur Verwendung kamen nur Kompetitoren, die mit derselben Kinetik wie die Zielsequenz amplifiziert wurden.

3.2.3 RT-Kompetitive Multiplex PCR

Ein Problem konventioneller PCR-Quantifizierungsmethoden ist die Tatsache, dass die Menge an initial eingesetzter RNA oder cDNA nicht kontrolliert werden kann (Dostal et al. 1994; Auboef und Vidal 1997). Dies gilt auch für die kompetitive PCR. Theoretisch sollte dieses Problem durch die Koamplifikation mit einer internen Referenz gelöst werden können, da das Verhältnis zwischen dem zu bestimmenden Produkt und dem Referenzprodukt unabhängig von der initialen RNA-Menge sein sollte.

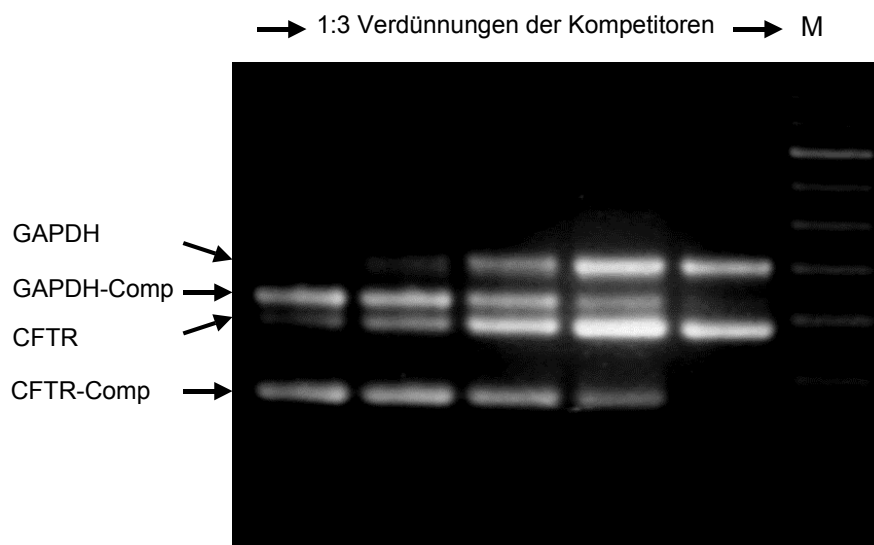


Abb. 3.6: Ethidiumbromidgefärbte Gelelektrophorese der Produkte einer RT-kompetitiven Multiplex PCR für CFTR und GAPDH. Serielle 1:3 Verdünnungen der Standardmixturen wurden mit identischen Mengen revers transkribierter RNA von 16HBE14o-Zellen koamplifiziert.

Aus dieser Überlegung heraus wurde die RT-kompetitive Multiplex PCR entwickelt (Loitsch et al., 1999). Dieses Verfahren basiert auf einer

herkömmlichen kompetitiven PCR mit dem Unterschied, dass in einem Reaktionsansatz die Expression mehrerer Gene gleichzeitig bestimmt werden kann. Abb. 3.6 zeigt ein Beispiel der Kombination eines kompetitiven Systems für CFTR und eines kompetitiven Systems für GAPDH.

3.2.4 Bestimmung der mRNA Expression über das Verhältnis von Kompetitor und Zielsequenz.

Ein kritischer Punkt der kompetitiven PCR ist die densitometrische Auswertung der Ethidiumbromid-gefärbten Amplifikationsprodukte nach der gelelektrophoretischen Auftrennung. Längere Amplifikationsfragmente sind entsprechend intensiver gefärbt als kürzere Fragmente (Apostolakos et al. 1993). Aus diesem Grund sollten bei einer kompetitiven PCR die densitometrischen Ergebnisse für Zielsequenz und Kompetitor um einen Faktor korrigiert werden, der die Längenunterschiede berücksichtigt. Dieser Faktor ist für jede Kombination von Target und Kompetitor identisch. Er beeinflusst jedoch den Äquivalenzpunkt.

Im Rahmen einer RT-kompetitiven Multiplex PCR werden zwei solcher Kombinationen miteinander verglichen. Dies ist exemplarisch dargestellt für GAPDH und CFTR in **Abb. 3.7**. Da ein Verhältnis zwischen GAPDH und CFTR ermittelt wird, sind Vergleiche zwischen verschiedenen Proben unabhängig von diesem Verrechnungsfaktor. Dies gilt jedoch nur für eine RT-kompetitive Multiplex PCR, die für semiquantitative Bestimmungen herangezogen wird.

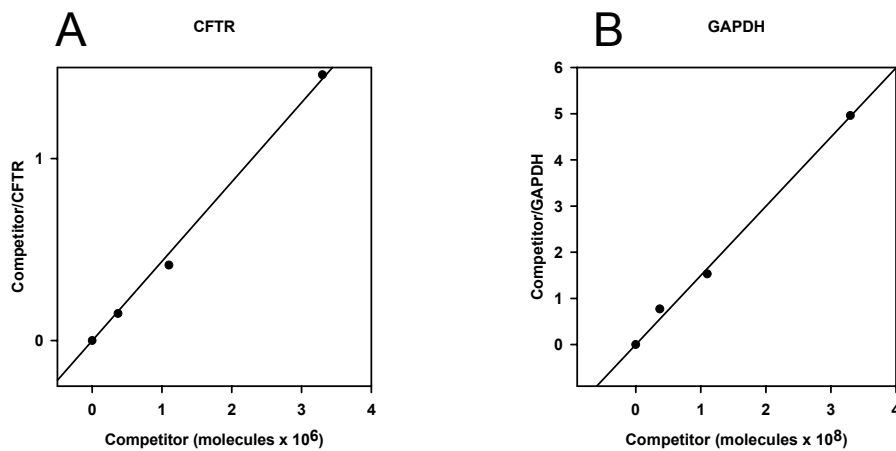


Abb. 3.7: Auswertung der Ethidiumbromid-gefärbten Amplifikationsprodukte einer RT-kompetitiven Multiplex PCR. Das errechnete Verhältnis der Bandenintensität von Kompetitor zu Zielsequenz wird gegen die Konzentration von zugegebenem Kompetitor aufgetragen. Exemplarisch für CFTR und den Kompetitor pCFIST (A) und GAPDH gegen den Kompetitor pGAPIST (B). Ist das Verhältnis Kompetitor/Zielsequenz gleich 1, liegen beide in äquivalenter Menge vor. Die Konzentration der mRNA kann dann auf der Ordinate abgelesen werden.

3.2.5 Die RT-Kompetitive Multiplex PCR korrigiert Schwankungen der eingesetzten RNA-Menge.

Wie bereits erwähnt, besteht ein Problem konventioneller PCR-Quantifizierungsmethoden darin, dass die Menge an initial eingesetzter RNA oder cDNA nicht kontrolliert werden kann (Dostal et al. 1994; Auboef und Vidal 1997). Ob dieses Problem durch die Koamplifikation mit einer internen Referenz gelöst werden kann, wurde im folgenden Versuch überprüft.

Theoretisch sollte das Verhältnis zwischen dem zu bestimmenden Produkt und dem Referenzprodukt unabhängig von der initialen RNA-Menge sein. Dies bedeutet, dass unterschiedliche Mengen an revers transkribierter RNA bei der

RT-Kompetitiven Multiplex PCR zu konstanten Verhältnissen von GAPDH zu CFTR führen sollten.

Aus diesem Grund wurden jeweils 6 reverse Transkriptionen mit 1, 2 oder 4 μg RNA aus 16HBE14o-Zellen angesetzt. Danach erfolgte eine RT-kompetitive Multiplex PCR, bei der CFTR mit einem so genannten *housekeeping* Gen, in diesem Fall GAPDH, koamplifiziert wurde. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 3.1** zusammengefasst. Sie bestätigen die Vermutung, dass mit Hilfe der RT-kompetitiven Multiplex PCR Schwankungen der initialen RNA-Menge ausgeglichen werden können, da das Verhältnis von GAPDH zu CFTR unabhängig von der eingesetzten RNA-Menge war. Die Ergebnisse zeichneten sich weiterhin durch eine hohe Reproduzierbarkeit aus. Die Variationskoeffizienten der 6 Bestimmungen für eine RNA-Menge betragen maximal 7,4%.

Initiale RNA-Menge	Verhältnis GAPDH/CFTR						Mittelwert	SD	VK in %
	I	II	III	IV	V	VI			
1 μg	28,8	30,9	30,9	31,5	31,2	25,8	29,9	2,2	7,4
2 μg	28,5	29,7	29,7	31,2	28,7	26,7	29,1	1,5	5,2
4 μg	26,7	30,9	30,2	30,6	26,4	29,7	29,1	2,0	6,7

Tabelle 3.1: Die mit Hilfe der RT-kompetitiven Multiplex PCR ermittelten Ergebnisse sind unabhängig von der eingesetzten Menge an RNA. Die Koamplifikation des zu bestimmenden Gens mit einem so genannten *housekeeping* Gen als interner Referenz korrigiert Schwankungen der initialen Beladung mit RNA oder cDNA. (**SD**: Standardfehler; **VK**: Variationskoeffizient)

3.2.6 Semiquantitative Bestimmung der CFTR mRNA-Expression in Bronchial- und Nasalbürstungen

Die Ausbeute an Zellen aus Nasalbürstungen betrug zwischen 0,5 und 5 Millionen Zellen. Trypanblaufärbungen ergaben einen Anteil von 44-68% lebender Zellen. Proben, die mit Blut verunreinigt waren, wurden nicht verwendet. Die Ausbeute an Zellen aus den Bronchialbürstungen lag zwischen 0,5 und 3,4 Millionen Zellen. Der Anteil lebender Zellen lag bei 53-72%. Nach der Differentialzytologie wurden nur solche Proben verwendet, bei denen der Anteil an Epithelzellen mehr als 92% ausmachte, wobei die kernlosen Erythrozyten in der Auszählung nicht berücksichtigt wurden. Nach der Isolation der mRNA ergaben sich Ausbeuten zwischen 0 (in einer Probe) und 3 µg Gesamt-RNA. Um die Menge an isolierter Gesamt-RNA bestimmen zu können, wird ein großer Teil der Probe verbraucht. Teilweise war es erforderlich, dass gesamte Material einzusetzen, wobei dann keine Gesamt-RNA mehr für die RT-kompetitive Multiplex PCR übrig war.

Hier zeigt sich ein Vorteil der RT-kompetitiven Multiplex PCR. Da das Verhältnis von GAPDH zu CFTR auch bei unterschiedlicher initialer Beladung mit RNA konstant bleibt (siehe **Tab. 3.1**), ist eine Bestimmung der initialen RNA-Menge nicht immer erforderlich. Proben die ein geringes RNA-Pellet (>1 mm) aufwiesen, wurden nicht quantifiziert, sondern komplett für die reverse Transkription verwendet. Proben mit größerem RNA-Pellet wurden quantifiziert, da in der verwendeten reversen Transkription höchstens 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt werden dürfen. Erst die Kombination intern endogener und intern exogener Standards ermöglicht eine kompetitive PCR ohne exakte Bestimmung der initialen RNA-Menge, bei gleichbleibender Exaktheit.

	Verhältnis CFTR/GAPDH
Bronchialbürstung	
1	53
2	80
3	192
4	100
5	36
6	24
7	97
8	143
Nasalbürstung	
1	77
2	193
3	105
4	50
5	64

Tabelle 3.2: Die Expression von CFTR-mRNA in Epithelien, die mit Nasal- und Bronchialbürstungen gewonnen wurden. Die RT-kompetitive Multiplex PCR eignet sich auch bei beschränkten Mengen an Probenmaterial, das mit herkömmlichen Quantifizierungsmethoden nicht bestimmbar ist.

Die RT-kompetitive Multiplex PCR wurde mit einer Standardmischung aus pCFIST und pGAPIST durchgeführt. Der Mastermix mit der Probe wurde auf 5-7 Reaktionsgefäße mit seriellen 1:3 Verdünnungen der Standardmischung gegeben. Die Ergebnisse (**Tab. 3.2**) zeigen, dass sich die RT-kompetitive Multiplex PCR auch bei beschränkter Menge an Probenmaterial eignet. Bei allen dargestellten Bronchialbürstungen war die Menge an Gesamt-RNA so gering, dass sie nicht bestimmt werden konnte. Dennoch ließen sich GAPDH und CFTR gut amplifizieren. Insgesamt scheint die Expression von CFTR in den Bronchien zweiter Ordnung und der unteren Nasenmuschel in derselben Größenordnung zu liegen. Dies wurde im Allgemeinen erwartet, da das Epithel der unteren Nasenmuschel und das Bronchialepithel als weitgehend identisch angesehen werden. Dennoch ist die Expression von CFTR innerhalb dieser Größenordnung recht variabel.

3.3 Bronchialepithelzellen reagieren auf osmotische Belastungen mit einer Regulation der Expression der mRNA der Osmolyttransporter BGT-1, TAUT und SMIT

Zellen, die einer hyperosmotischen Belastung ausgesetzt sind, unterliegen in der Regel einer Abnahme des Zellvolumens. Dabei geht Wasser verloren und es kommt in Folge zu einer Zunahme der intrazellulären Ionenkonzentration. Diese Zunahme der intrazellulären Osmolarität führt zu strukturellen Veränderungen der Zelle aber auch zu substantiellen Einschränkungen biochemischer Prozesse. Humane Zellen reagieren darauf mit der Aufnahme oder intrazellulären Synthese osmotisch wirksamer Substanzen, die chemisch inert sind. Somit wird ein osmotisches Gleichgewicht geschaffen, ohne das dadurch eine mit der Regulation von Transportern der organischen Osmolyte Betain (Betain-GABA Transporter; BGT-1), Taurin (Taurin Transporter; TAUT; TTR) und myo-Inositol (Sodium Myo-Inositol-Transporter; SMIT). Durch die Aufnahme dieser Osmolyte bei hypertonem Stress ermöglichen Zellen ihr Überleben, indem sie ihr Volumen regulieren, ohne dass biochemische Prozesse oder die strukturelle Integrität durch etwa hohe intrazelluläre Salzkonzentration beeinträchtigt werden. Ob die Osmolyttransporter in Bronchialepithelzellen exprimiert werden und dort auch reguliert werden, war bislang nicht bekannt und sollte geklärt werden.

Primäre Bronchialepithelzellen wurden zunächst, wie unter **2.2.2.7** beschrieben, kultiviert. Nach 3 Wochen Kultivierung an der Luft-Medium-Grenzfläche wurden die Zellen mit DMEM-NaCl unterschiedlicher Osmolarität behandelt. Bei dem verwendeten DMEM-NaCl handelte es sich um eine spezielle Formulierung, die bei der PAN Biotech GmbH in Auftrag gegeben wurde. Dieses Medium wurde ohne NaCl angefertigt, so dass die gewünschte Osmolarität durch die Zugabe von NaCl eingestellt werden konnte. Bei der Herstellung hypoosmotischer Medien ist diese Vorgehensweise gegenüber einfachen Verdünnungen des Mediums mit Aqua bidest vorzuziehen. Die Konzentration von NaCl in DMEM

beträgt normalerweise 109 mM. Die hyperosmotische Behandlung erfolgte mit 218 mM, die hypoosmotischen mit 55 und 83 mM NaCl.

Bei dem verwendeten DMEM-NaCl für die primären Bronchialepithelzellen wurde auf fetales Kälberserum verzichtet. Es wurde mit Wachstumsfaktoren supplementiert wie unter **2.2.2.7** für das Differenzierungsmedium beschrieben. Für die Behandlungen der auf Zellkultureinsätzen wachsenden Zellen wurde das basale Primärkulturmedium durch isotones, serumfreies und supplementiertes DMEM ersetzt. Die Medien unterschiedlicher Osmolarität wurden apikal appliziert. Diese Bedingungen sollten den Verhältnissen *in vivo* weitgehend entsprechen, da osmotische Belastungen am Bronchialepithel theoretisch nur auf der apikalen Seite auftreten, während die osmotischen Bedingungen basolateral als weitgehend stabil anzusehen sind.

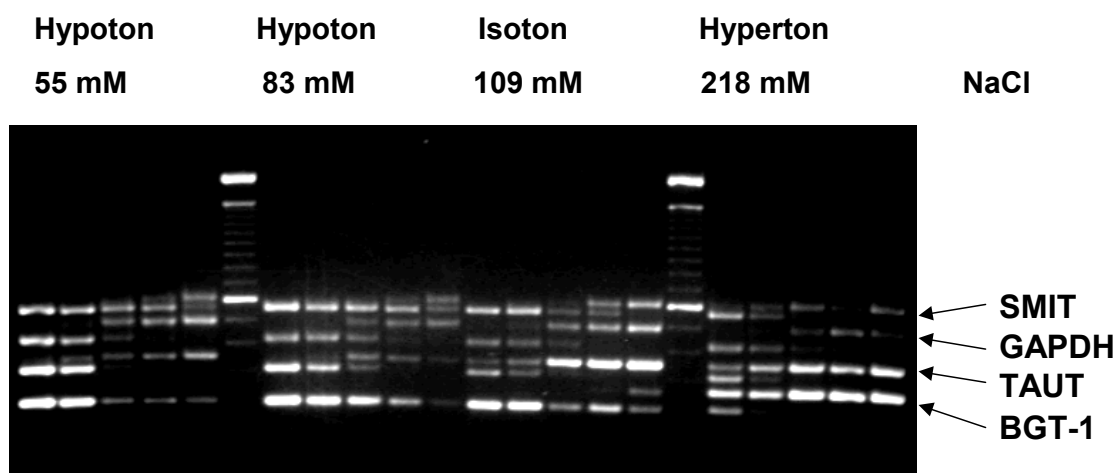


Abb. 3.8: Primäre Bronchialepithelzellen reagieren auf osmotischen Stress mit der Regulation der Expression der mRNA der Osmolyttransporter SMIT, TAUT, und BGT-1. Die Zellen wurden auf Membraneinsätzen kultiviert. Zur Behandlung wurde basal ein isotones Medium verwendet und apikal ein Medium, dessen Tonizität über die NaCl-Konzentration eingestellt wurde. Nach 6 h Behandlung wurde die mRNA-Expression der verschiedenen Osmolyttransporter mit Hilfe der RT-kompetitiven Multiplex PCR bestimmt.

Nach einer Inkubation von 6 h zeigte sich eine deutliche Zunahme der mRNA-Expression aller drei Osmolyttransporter durch eine hypertone Belastung (**Abb. 3.8**). Die Transkriptmenge von BGT-1 stieg dabei auf das 81-fache der isotonen

Kontrolle (**Abb. 3.9**). Bei hypotonen Belastungen war BGT-1 nicht mehr detektierbar. Die Reaktion von SMIT und TAUT auf osmotische Belastungen sind demgegenüber geringer, aber immer noch hochsignifikant. Hypotone Belastung führt bei beiden Transporten zu einer Reduktion der Transkriptmenge auf etwa 50% des isotonen Kontrollwerts. Die hypertone Belastung führt zu einer Verdopplung der Transkriptmenge von TAUT, während die Transkriptmenge von SMIT um das 9-fache zunahm.

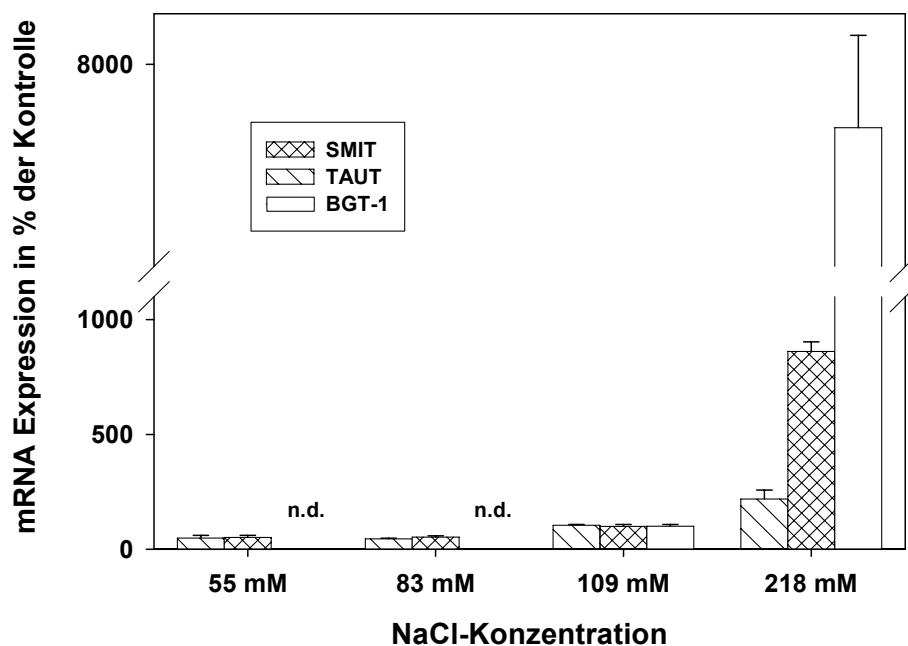


Abb. 3.9.: Expression der Osmolyttransporter BGT-1, TAUT (TTR) und SMIT in primären humanen Bronchialepithelzellen in Abhängigkeit der extrazellulären Osmolarität. Die Zellen wurden für 6 h mit hypotonem (55 mM und 83 mM NaCl), isotonem (109 mM NaCl) oder hypertonem (218 mM NaCl) Medium inkubiert. Die steady-state Expression der IL-8 mRNA wurde mit Hilfe der RT-kompetitiven Multiplex PCR nach gelelektrophoretischer Auftrennung (**C**) quantifiziert. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler (je $n=3$). Signifikanz gegenüber den Kontrollen: unter $P < 0,05$.

Mit Hilfe einer Sequenzierung wurden die PCR-Produkte für die entsprechenden Osmolyttransporter identifiziert und verifiziert und damit erstmals in Bronchialepithelzellen charakterisiert. Bronchialepithelzellen scheinen damit derselben osmotischen Strategie zu folgen, die auch für andere Zellen beschrieben wurde. Antikörper gegen die Osmolyttransporter stehen für

eine weitergehende Charakterisierung zurzeit nicht zur Verfügung. Aufgrund der Expressionsdaten liegt die Vermutung nahe, dass Betain das Hauptosmolyt im Bronchialepithel darstellt.

3.4 Hyperosmotischer Stress induziert die Expression und Sekretion von IL-8

Für diese Versuche wurden 16HBE14o- Zellen und primäre Bronchialepithelzellen verwendet. 16HBE14o- Zellen entstammen dem humanen Bronchialepithel. Sie wurden durch eine Transfektion mit dem SV40 T-Antigen immortalisiert und besitzen wesentliche morphologische und funktionelle Eigenschaften primärer Zellen (Cozens et al., 1994). Die Kulturen weisen das für Bronchialepithelzellen typische kopsteinpflasterartige Erscheinungsbild auf, differenzieren, polarisieren und bilden dabei *tight junctions* und Zilien aus. Sie entwickeln nach der Differenzierung einen transepithelialen Widerstand, der sie für Ionentransportstudien besonders geeignet erscheinen lässt.

Diese Eigenschaften sind eine wichtige Grundlage für die Untersuchung osmotischer Belastungen, da die Verschiebungen im Ionenhaushalt der Zelle im Wesentlichen von dem Vorkommen und der Aktivität von Ionenkanälen bestimmt wird.

3.4.1 Die hyperosmotische Induktion der Expression und Sekretion von IL-8 ist dosisabhängig

Eine von neutrophilen Granulozyten dominierte Inflammation der Atemwege ist die wesentliche Komponente der Lungenerkrankung bei cystischer Fibrose. In der bronchoalveolären Lavage von CF-Patienten finden sich signifikant erhöhte Mengen proinflammatorischer Zytokine, von denen Interleukin-8 als Chemoattraktor für Neutrophile von besonderer Bedeutung ist. Überprüft

werden soll nun, ob Störungen des Ionenhaushalts prinzipiell für die inflammatorischen Vorgänge verantwortlich sein können.

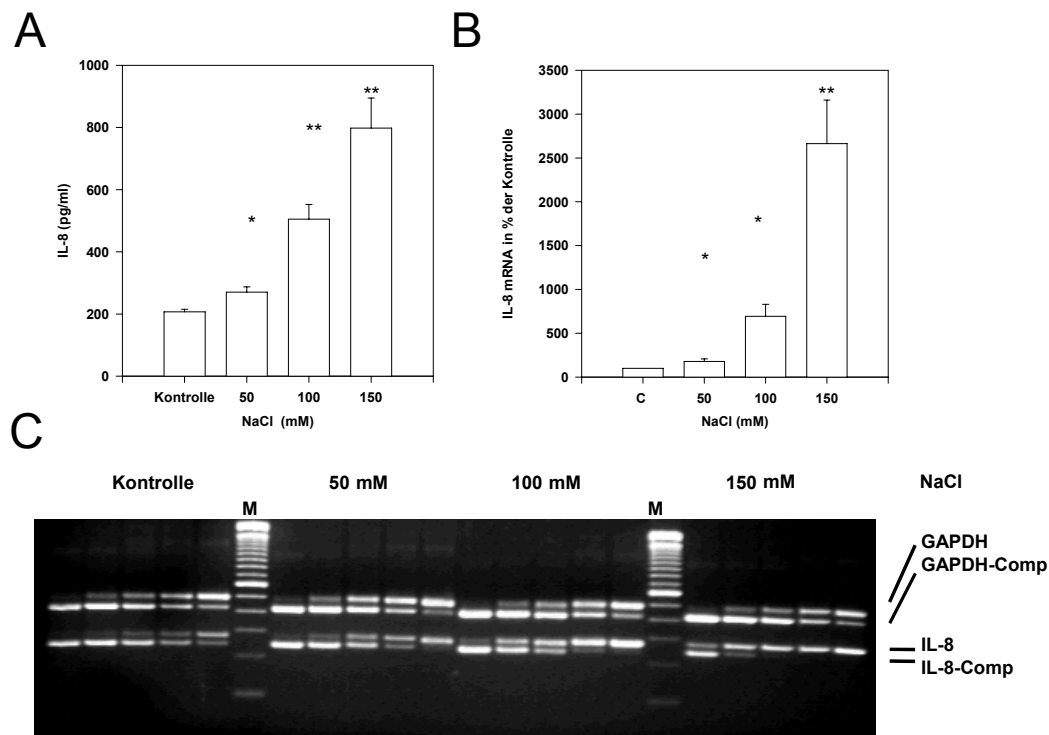


Abb. 3.10: Hyperosmotischer Stress induziert eine dosisabhängige Sekretion und mRNA-Expression von IL-8 in 16HBE14o- Zellen. **A:** Die Zellen wurden für 24 h mit isotonem oder hypertonem Medium (Zugabe von zusätzlich 50-150 mM NaCl) inkubiert. IL-8 wurde in den Zellkulturüberständen mit Hilfe eines ELISA gemessen. **B:** Die Zellen wurden für 6 h mit isotonem oder hypertonem Medium inkubiert. Die steady-state Expression der IL-8 mRNA wurde mit Hilfe der RT-kompetitiven Multiplex PCR nach gelelektrophoretischer Auftrennung (**C**) quantifiziert. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler (je $n=3$). Signifikanz gegenüber den Kontrollen: * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die Sekretion und Expression von Interleukin-8 in Bronchialepithelzellen untersucht, die einem osmotischen Stress ausgesetzt wurden. Dazu wurden 16HBE14o-Zellen in DMEM/Ham's F12 mit 10% fetalem Kälberserum kultiviert. 14 Tage nach Erreichen der Konfluenz wurde dem Zellkulturmedium NaCl in aufsteigender Konzentration (Kontrolle, 50, 100 und 150 mM) zugegeben. Nach 8 h Inkubation wurde mit Hilfe eines ELISA immunoreaktives IL-8 in den Zellkulturüberständen bestimmt. **Abbildung 3.10 A** zeigt, dass hyperosmotischer Stress eine signifikante Zunahme der IL-8-

Konzentration in den Überständen verursacht. Die Zunahme der IL-8-Konzentration ist linear abhängig von der zugegebenen Konzentration an NaCl. Nun sollte geklärt werden, ob auch die Expression der IL-8 mRNA durch einen hyperosmotischen Stress induziert wird. Nach einer Zugabe von 50 bis 150 mM NaCl zu dem Zellkulturmedium wurden die Zellen 6 h inkubiert. Die *steady-state* Menge an IL-8 mRNA wurde anschließend mit der RT-kompetitiven Multiplex PCR bestimmt (**Abb. 3.10 C**). Es zeigte sich eine signifikante, dosis-abhängige Zunahme der Expression von Interleukin-8 durch eine hyperosmotische Belastung (**Abb 3.10 B**), mit einem mehr als 25-fachen Anstieg gegenüber den Kontrollwerten bei 150 mM NaCl ($p < 0,001$).

3.4.2 Die hyperosmotische Induktion der Expression und Sekretion von IL-8 ist zeitabhängig

In ähnlicher Weise wurde auch die Zeitabhängigkeit der Induktion von IL-8 durch hyperosmotischen Stress untersucht. 16HBE14o-Zellen wurden mit isotonem (Kontrolle) oder hypertonem Medium (Zugabe von 100 mM NaCl) behandelt. Hyperosmotischer Stress verursachte einen zeitabhängigen Anstieg von IL-8 in den Zellkulturüberständen (**Abb. 3.11 A**). Die Ausschüttung von IL-8 war bereits nach 2 h erhöht und stieg linear an bis zu der 7-fachen Menge des Kontrollwerts nach 12 h.

Die Behandlung der Zellen für die Bestimmung der Expression der IL-8-mRNA war identisch. Bereits nach 2 h war die Expression der IL-8 mRNA um das ca. 5-fache des Kontrollwerts erhöht und stieg an auf einen Maximalwert nach 6 h, der gegenüber der Kontrolle 17-fach höher war (**Abb. 3.11 B und C**). Danach reduzierte sich die Induktion der IL-8 mRNA-Expression wieder, blieb aber weiterhin signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen. Nach 24 h betrug die hyperosmotisch induzierte IL-8 mRNA Expression immer noch das 5-fache des Kontrollwerts.

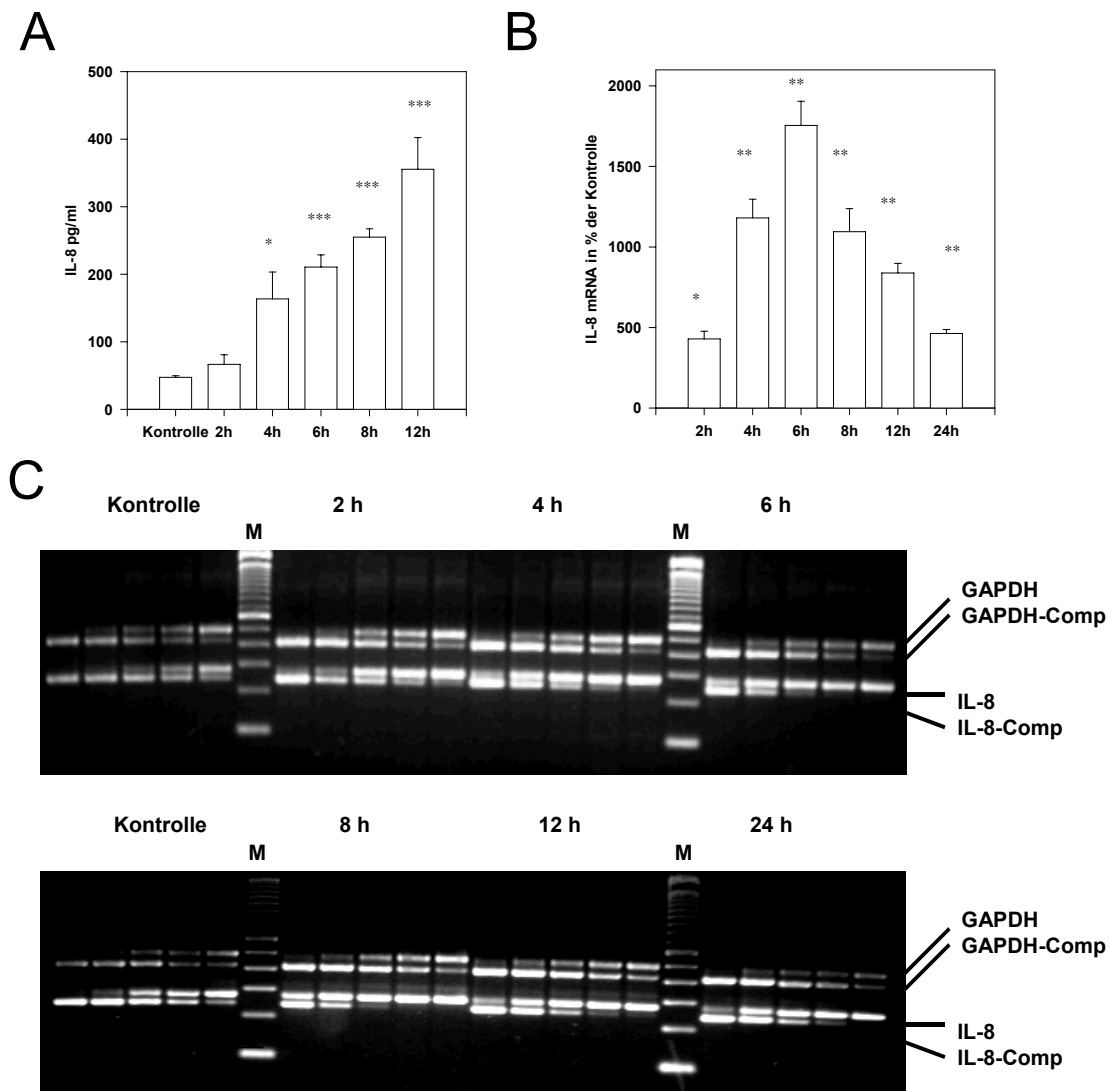


Abb. 3.11: Hyperosmotischer Stress induziert eine zeitabhängige Sekretion und mRNA-Expression von IL-8 in 16 HBE14o-Zellen. Die Zellen wurden in Medium mit oder ohne Zugabe von 100 mM NaCl inkubiert. A: IL-8 wurde in den Zellkulturüberständen mit Hilfe eines ELISA gemessen. B: Die steady-state Expression der IL-8 mRNA wurde mit Hilfe der RT-kompetitiven Multiplex PCR nach gelelektrophoretischer Auftrennung (C) quantifiziert. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler (je $n=3$). Signifikanz gegenüber den Kontrollen: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3.4.3 Die hyperosmotisch induzierte IL-8 mRNA-Expression wird durch p38 MAP-Kinase vermittelt

Nachdem sich gezeigt hatte, dass hyperosmotischer Stress eine Induktion der mRNA-Expression und Sekretion von IL-8 verursacht, wurde untersucht, welche Faktoren an der Signalübermittlung beteiligt sind.

Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen durch Protein-Kinasen bzw. Phosphatasen spielen bei der Signaltransduktion von der Zellmembran in den Zellkern eine entscheidende Rolle. Zu diesen Kinasen gehört die Familie der MAP-Kinasen. Die Aktivierung der MAP-Kinasen durch extrazelluläre Hypertonizität wurde bereits für verschiedene Zelllinien aufgezeigt (Han et al. 1994; Itoh et al. 1994; Matsuda et al. 1995). Um die Rolle der MAP-Kinasen in der Regulation von IL-8 durch hyperosmotischen Stress zu klären, wurde der Einfluss verschiedener spezifischer Inhibitoren auf die IL-8-mRNA-Expression untersucht.

Benutzt wurde dazu SB-203580, ein spezifischer Inhibitor der p38 MAP-Kinase und PD-98059, ein spezifischer Inhibitor von MEK1, der die Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 inhibiert. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Inhibitoren für 1 h vorinkubiert. Da beide Inhibitoren in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurden, wurden sowohl die Kontrollen, als auch die Proben auf eine einheitliche Konzentration von 0,1% DMSO eingestellt. Nach der Vorinkubation erfolgte eine Stimulation mit oder ohne hyperosmotisches Medium (Zugabe von 150 mM NaCl) für 6 h in Anwesenheit ansteigender Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren.

Es zeigt sich eine deutlich signifikante, dosisabhängige Inhibierung der hyperosmotisch induzierten IL-8 mRNA-Expression durch 5, 10 oder 25 μ M des p38 MAP-Kinase Inhibitors SB203580 (**Abb. 3.12**). 5 μ M SB-203580 führten zu einer etwa 50%igen Reduktion der IL-8 mRNA-Expression gegenüber der hyperosmotischen Behandlung, 25 μ M SB-203580 reduzierte die IL-8 mRNA-Expression sogar um etwa 75%. Dies lässt auf eine Beteiligung der p38 MAP-Kinase an der Signaltransduktion von hyperosmotischem Stress schließen.

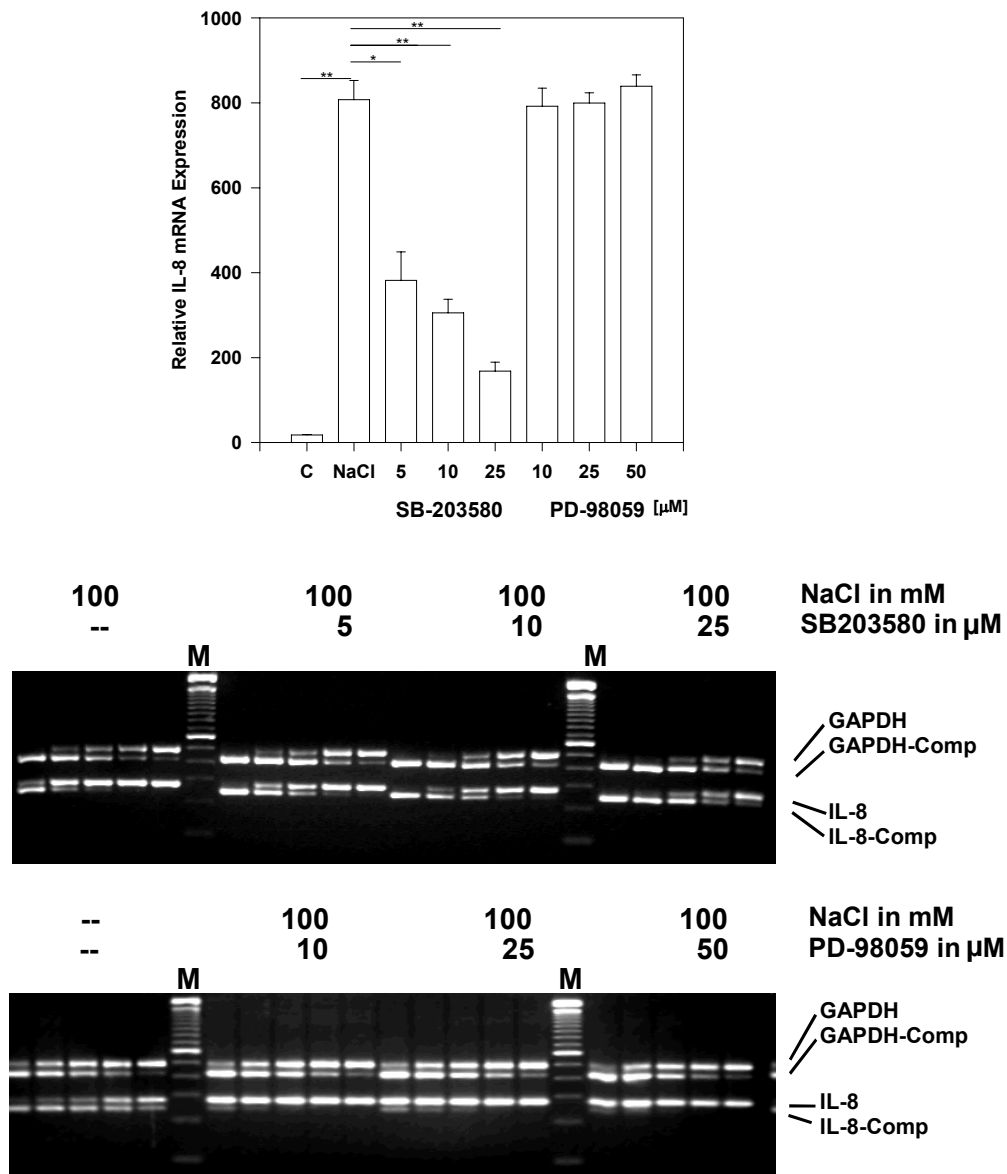


Abb. 3.12: Effekt von MAP-Kinase-Inhibitoren auf die Induktion der IL-8-mRNA-Expression durch hyperosmotischen Stress in primären humanen Bronchialepithelzellen. **A:** Die Zellen wurden 1 h vorinkubiert mit SB-203580, einem Inhibitor der p38 MAP, oder PD-98059, einem Inhibitor von ERK1/2. Bis auf die Kontrollen wurden 150 mM NaCl zugegeben. Die IL-8-mRNA-Expression wurde mit Hilfe der RT-kompetitiven Multiplex PCR nach gelelektrophoretischer Auftrennung (**B**) quantifiziert. Signifikanz gegenüber den Kontrollen: * $P < 0,001$; ** $P < 0,0005$.

Demgegenüber konnte keine Reduktion der IL-8-mRNA-Expression durch den MEK1-Inhibitor PD-98059 beobachtet werden. Eine Beteiligung von ERK1/2 an der Induktion von IL-8 durch hyperosmotischen Stress scheint folglich ausgeschlossen werden zu können, obwohl ERK1/2 durch hyperosmotischen Stress aktiviert werden kann (Ragette et al. 1997) und an der Regulation der IL-

8 mRNA-Expression durch andere Stressfaktoren beteiligt ist (Chen et al. 1999; Marie et al. 1999).

3.5 Reaktive Sauerstoffspezies als Signalvermittler der hyperosmotischen Induktion von IL-8

3.5.1 Antioxidantien supprimieren die Induktion der IL-8-Sekretion durch hyperosmotischen Stress

Um zu überprüfen, ob Sauerstoffradikale an der Signaltransduktion beteiligt sind, wurde der Einfluss von Antioxidantien auf die hyperosmotische Induktion der mRNA-Expression und der Sekretion von IL-8 untersucht. Dazu wurden 16HBE14o-Zellen für 1 h mit oder ohne Antioxidantien präinkubiert. Verwendet wurden Antioxidantien verschiedener Substanzklassen. Dies waren im Folgenden: 20 mM DMTU (1,3-dimethyl-2-thiourea), 0,5 % DMSO (Dimethylsulfoxid), 500 μ M DTT (Dithiothreitol) und 500 μ M β -Mercaptoethanol.

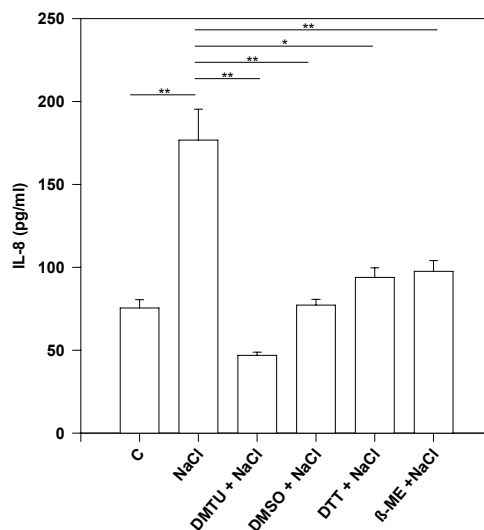


Abb. 3.13: Wirkung von Antioxidantien auf die Induktion der IL-8-Sekretion durch hyperosmotischen Stress in der Zelllinie 16HBE14o-. Die Zellen wurden 1 h mit verschiedenen Antioxidantien (20 mM Dimethylthiourea (DMTU); 0,5% Dimethylsulfoxid (DMSO), 500 μ M Dithiothreitol (DTT) oder 500 μ M β -Mercaptoethanol (β -ME) vorbehandelt. Bis auf die Kontrollen wurden dem Medium anschließend 75 mM NaCl zugegeben. Nach 6 h Inkubation wurde IL-8 in den Zellkulturüberständen mit Hilfe eines ELISA bestimmt (n=4). Signifikanz gegenüber den Kontrollen: * $P < 0,01$; ** $P < 0,005$.

Nach der Präinkubation wurden die Zellen für 6 h mit 75 mM NaCl mit oder ohne die Antioxidantien inkubiert. IL-8 wurde in den Zellkulturüberständen mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.13** als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (n=4). Es zeigte sich, dass alle Antioxidantien zu einer signifikanten Reduktion der hyperosmotisch induzierten IL-8 Sekretion führen. Es ist zu vermuten, dass reaktive Sauerstoffspezies im Rahmen einer osmotischen Belastung auftreten und an der Induktion der IL-8-Sekretion beteiligt sind.

Um den dosisabhängigen Einfluss der Antioxidantien auf die Sekretion von IL-8 zu überprüfen, wurde mit primären humanen Bronchialzellen gearbeitet, die 2 Wochen postkonfluent an der Luft-Medium Grenzfläche inkubiert wurden. Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein bekannter Hydroxylradikalfänger ($\cdot\text{OH}$), der sich durch seine hohe Membrangängigkeit auszeichnet (Trice und Pinals, 1985). Die primären Bronchialepithelzellen wurden für 1 h mit DMSO in aufsteigender Konzentration (0,2-1% (v/v)) vorbehandelt. Anschließend folgte eine Inkubation von 24 h mit oder ohne Zusatz von NaCl (100 mM). Die Messung von IL-8 in den Zellkulturüberständen mit Hilfe eines ELISA zeigte eine signifikante dosisabhängige Reduktion der hyperosmotisch bedingten IL-8-Produktion durch DMSO (**Abb. 3.14 A**). DMSO in einer Konzentration von 1% führte zu einem fast vollständigen Rückgang der hyperosmotisch-bedingten IL-8-Sekretion ($P < 0,0001$), hatte jedoch keinen Einfluss auf die basale Ausschüttung von IL-8. Dies ist ein indirekter Hinweis auf die Beteiligung von Sauerstoffradikalen an der Signaltransduktionskaskade bei osmotischem Stress.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde ein weiteres Antioxidans eingesetzt, das einer anderen Stoffklasse entstammt. 1,3-Dimethyl-2-Thiourea (DMTU) ist ebenfalls ein bekannter für Hydroxylradikalfänger. Auch DMTU (2,5-25 mM) führte zu einer signifikanten dosisabhängigen Reduktion der IL-8-Sekretion (**Abb. 3.14 B**). 25 mM DMTU führten zu einer geringeren Reduktion der hyperosmotisch bedingten IL-8-Sekretion als 1% DMSO, führten jedoch zu einer Reduktion der basalen Ausschüttung von IL-8.

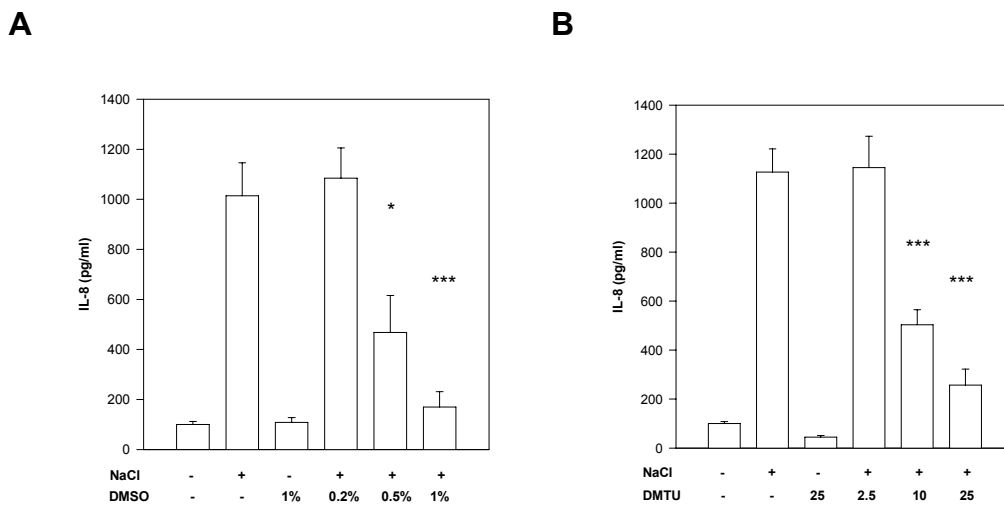


Abb. 3.14: Der Effekt von Antioxidantien auf die Induktion der IL-8-Sekretion durch hyperosmotischen Stress in primären humanen Bronchialzellen. Die Zellen wurden 1 h mit 0,2-1% DMSO (A) oder 2,5-25 mM DMTU (B) vorinkubiert. Bis auf die Kontrollen wurden dem Medium anschließend 100 mM NaCl zugegeben. Nach 12 h Inkubation wurde IL-8 in den Zellkulturüberständen mit Hilfe eines ELISA bestimmt (n=3). Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler (je n=3). Signifikanz gegenüber den Kontrollen: * $P < 0,005$; ** $P < 0,001$; *** $P < 0,0001$.

3.5.2 Antioxidantien supprimieren die Induktion der IL-8-mRNA-Expression durch hyperosmotischen Stress

Hier wurde untersucht, ob Antioxidantien nicht nur die hyperosmotisch induzierte Sekretion von IL-8 induzieren, sondern bereits die IL-8 mRNA-Expression beeinflussen. Die primären humanen Bronchialepithelzellen wurden wie bereits erwähnt, für 1 h mit DMSO und DMTU in aufsteigender Konzentration vorbehandelt. Anschließend folgte eine Inkubation von 4 h mit oder ohne Zusatz von NaCl (100 mM). Die Messung der IL-8-mRNA-Expression erfolgte mit der RT-kompetitiven Multiplex-PCR (**Abb. 3.15 C**).

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der hyperosmotisch induzierten IL-8-mRNA-Expression durch die Antioxidantien DMSO und DMTU (**Abb. 3.15 A** und **B**). Auch hier hatten 25 mM DMTU einen geringeren Effekt auf die

hyperosmotisch-induzierte IL-8 mRNA-Expression als 1% DMSO, reduzierten aber im Gegensatz zu DMSO die basale Expression von IL-8 (**Abb. 3.15 B**).

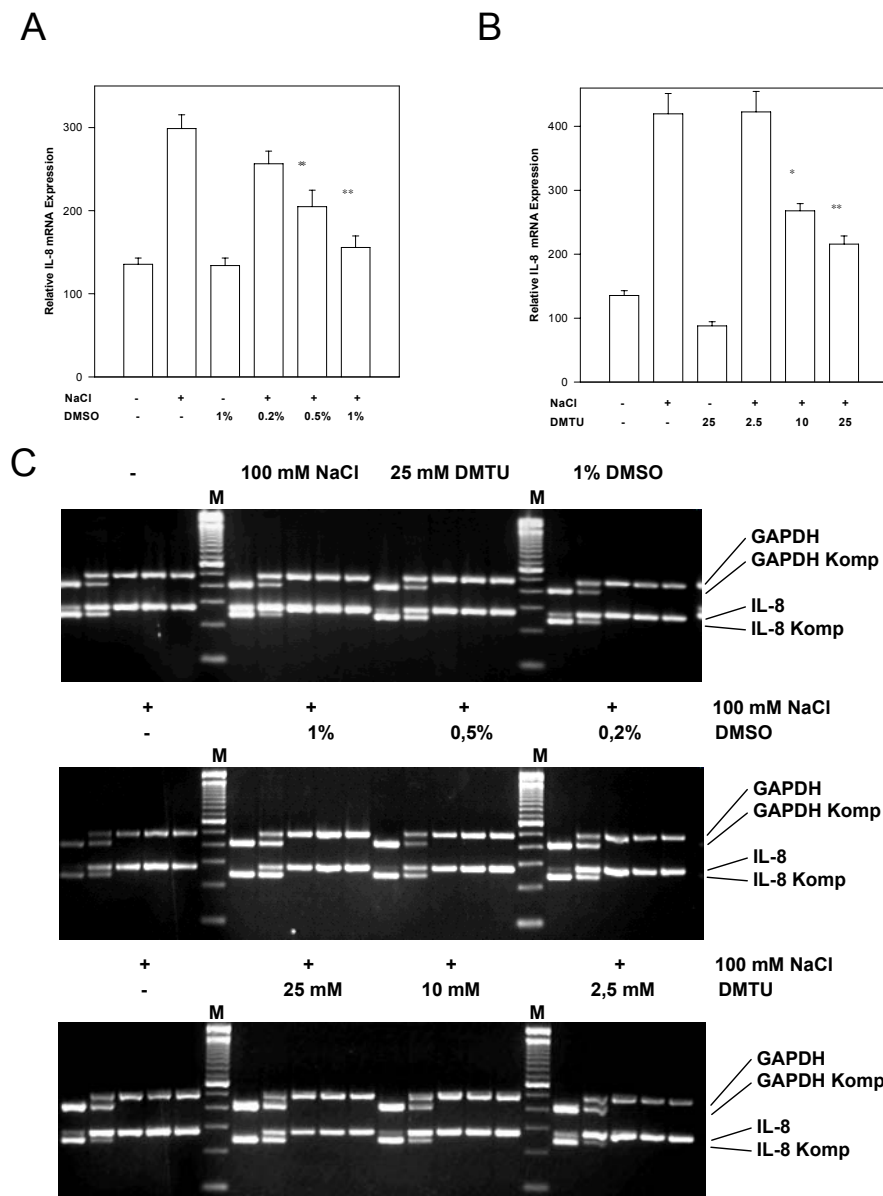


Abb. 3.15: Wirkung von Antioxidantien auf die Induktion der IL-8-mRNA Expression durch hyperosmotischen Stress in primären humanen Bronchialzellen. Die Zellen wurden für 1 h mit 0,2-1% DMSO (A) oder 2,5-25 mM DMTU (B) vorinkubiert. Bis auf die Kontrollen wurde dem Medium anschließend 100 mM NaCl zugegeben. Die IL-8-mRNA-Expression wurde mit Hilfe der RT-kompetitiven Multiplex PCR nach gelelektrophoretischer Auftrennung (B) quantifiziert (n=3). Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler (je n=3). Signifikanz gegenüber den Kontrollen: * $P < 0,005$; ** $P < 0,001$; *** $P < 0,0001$.

3.5.3 Antioxidantien supprimieren die Aktivierung von p38 MAP-Kinase durch hyperosmotischen Stress

Die hyperosmotisch induzierte IL-8-mRNA Expression wird durch die Aktivität der p38 MAP-Kinase kontrolliert. Deshalb sollte überprüft werden, ob Antioxidantien einen Einfluss auf die Aktivierung von p38 MAP-Kinase durch hyperosmotischen Stress besitzen.

Dazu wurde eine Zeitkinetik ermittelt, die die Aktivierung der p38 Map-Kinase durch osmotischen Stress darstellt. Humane Bronchoialepithelzellen wurden mit 100 mM NaCl behandelt, die dem Medium zugegeben wurden. Nach 5, 10, 15, 20 und 30 min wurde Gesamtprotein isoliert. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Membranen transferiert. Mit Hilfe eines Antikörpers wurde die dual phosphorylierte Form der p38 MAP-Kinase auf den Membranen detektiert. Es zeigte sich keine nennenswerte basale Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase in 3 identischen Versuchen. Die Phosphorylierung nahm durch die Salzbehandlung zeitabhängig zu, bis 20 min nach der Behandlung ein Maximum erreicht wurde (**Abb. 3.16 A**). Die Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase war jedoch nach 30 min noch deutlich gegenüber dem Kontrollwert erhöht.

Die folgenden Versuche wurden demnach einer 20-minütigen Salzbehandlung ausgesetzt. Humane Bronchialepithelzellen wurden für eine Stunde mit DMSO vorbehandelt. Danach erfolgte die Zugabe von NaCl (100 mM). Nach 20 min wurde das Gesamtprotein isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Danach erfolgte eine Detektion mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen p38 MAP-Kinase. Dieser Antikörper erkennt nicht die native p38 MAP-Kinase, sondern nur die aktivierte Form, die an Threonin180 und Tyrosin182 dual phosphoryliert ist. **Abb. 3.16 B** zeigt eine dosisabhängige Reduktion der hyperosmotisch-induzierten Phosphorylierung von p38 MAP Kinase durch DMSO.

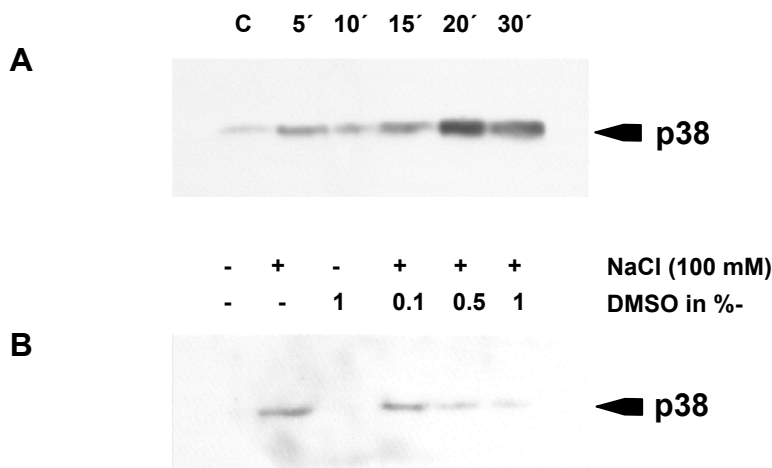


Abb. 3.16: **A)** Zeitabhängige Aktivierung der p38 MAP-Kinase in primären humanen Bronchialepithelzellen durch hyperosmotischen Stress (100 mM NaCl). **B)** DMSO inhibiert konzentrationsabhängig die Aktivierung der p38 MAP-Kinase in primären humanen Bronchialepithelzellen. Die Zellen wurden für 1 Stunde mit DMSO vorinkubiert. Danach erfolgte eine additive Behandlung mit 100 mM NaCl für 20 min. Die Bilder sind exemplarisch für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

3.6 Veränderungen des Zellvolumens sind verantwortlich für die hyperosmotisch induzierte Inflammation

3.6.1 Die hyperosmotische Induktion der Sekretion von IL-6 und IL-8 ist abhängig vom Zellvolumen

Werden Zellen einem osmotischen Stress ausgesetzt, verändert sich ihr Zellvolumen. Hyperosmotischer Stress führt zu einer Abnahme des Zellvolumens, während hypoosmotischer Stress zu einem Anschwellen der Zelle führt. Im Hinblick auf das Bronchialepithel sind diese Vorgänge von besonderem Interesse, da über die Atemwege bis zu 700 ml Flüssigkeit pro Tag verloren gehen, wobei die Atemwegsflüssigkeit ständig regeneriert werden muss.

Hierbei spielt CFTR in der Regulation des Wasser- und Ionenhaushalts eine besonders wichtige Rolle. Es zeigt sich, dass CF-Zellen gerade in der

Regulation ihres Zellvolumens eingeschränkt sind (Valverde et al., 1995; Seidler et al., 2001; Cho et al., 2004). Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob die hyperosmotische Induktion der IL-8-Sekretion eine Folge der Hyperosmolarität *per se* ist, oder abhängig von daraus resultierenden Veränderungen des Zellvolumens.

Dazu wurden drei verschiedene Substanzen verwendet. Mannitol und NaCl können die Zellmembran nicht passieren. Eine hypertone Belastung mit diesen Substanzen führt zu einer Abnahme des Zellvolumens. Für Harnstoff jedoch ist die Zellmembran permeabel. Hyperosmotische Belastungen mit Harnstoff führen zu einer erhöhten Osmolarität in der Zelle wie auch bei NaCl und Mannitol, jedoch zu keiner Veränderung des Zellvolumens.

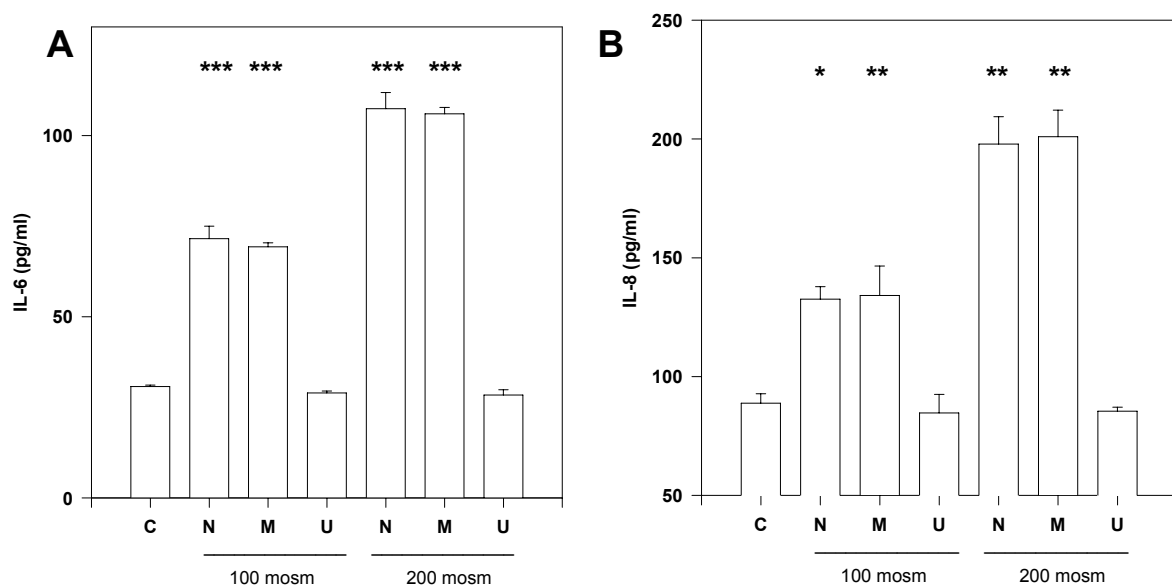


Abb. 3.17: Die hyperosmotisch induzierte Sekretion von IL-6 (**A**) und IL-8 (**B**) ist abhängig vom Zellvolumen. 16HBE14o- Zellen wurden für 6 h mit NaCl (N), Mannitol, (M) oder Harnstoff (Urea; U) behandelt. Die Substanzen wurden in einer Osmolarität von 100 und 200 mosm eingesetzt. NaCl und Mannitol verursachen eine Abnahme des Zellvolumens, Harnstoff nicht. Bei gleicher Osmolarität kommt es nur bei NaCl und Mannitol zu einer Induktion der Sekretion von IL-6 und IL-8. Diese Induktion ist dosisabhängig. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Signifikanz gegenüber den Kontrollen: * $P < 0,005$; ** $P < 0,0005$; *** $P < 0,00005$.

Subkonfluente 16HBE14o- Zellen wurden für 12 h mit 100 und 200 mosm NaCl, Mannitol oder Harnstoff behandelt. Danach wurden die Konzentration von IL-6 und IL-8 in den Zellkulturüberständen mit Hilfe eines ELISA gemessen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg sowohl der Sekretion von IL-6, als auch der Sekretion von IL-8 durch die Behandlung mit NaCl und Mannitol. Harnstoff verursachte keinen Anstieg der IL-6- und IL-8-Sekretion gegenüber den Kontrollen. Der Anstieg der Sekretion von IL-6 und IL-8 durch NaCl und Mannitol wies eine Konzentrationsabhängigkeit auf. Es zeigt sich weiterhin, dass die durch NaCl und Mannitol hervorgerufene Induktion sowohl bei IL-6 als auch bei IL-8 die gleiche Ausprägung aufweist. Dies lässt vermuten, dass die Induktion beider Interleukine abhängig von der Osmolarität und nicht der Molarität beider Substanzen ist.

Da sich bei Harnstoff, trotz identischer Osmolarität, keine Induktion der Interleukin-Sekretion zeigt, ist die hyperosmotisch induzierte Sekretion von IL-6 und IL-8 folglich nicht von der Osmolarität an sich abhängig, sondern von den dadurch verursachten Veränderungen des Zellvolumens.

3.6.2 Hyperosmotische Belastungen mit Mannitol und NaCl, nicht jedoch Harnstoff, führen zu einer Abnahme des Zellvolumens

Die Volumenveränderungen, die durch Mannitol, NaCl und Harnstoff hervorgerufen werden, wurden durchflusszytometrisch überprüft (siehe **2.2.7**). 16HBE14o-Zellen wurden trypsinisiert und nach einer Adaptierungszeit von 45 min entweder isoosmotischem oder hyperosmotischem Medium ausgesetzt. Die Hyperosmolarität wurde mit 150 mosm NaCl, Mannitol oder Harnstoff eingestellt. Abb. **3.18 A** zeigt, dass sowohl NaCl, als auch Mannitol nach einer Behandlung von 90 min zu einer Abnahme des Zellvolumens führen, Harnstoff hingegen nicht. Dies bestätigt die voraus gegangenen theoretischen Überlegungen. Als Messparameter für das Zellvolumen diente das Vorwärtsstreulicht (Vorwärtsstreuung; *forward light scatter*, FSC). Das

Vorwärtsstreulicht ist abhängig von der Zellgröße und kann somit für semiquantitative Analysen des Zellvolumens verwendet werden (Feranchak et al., 2001).

Das Seitwärtsstreulicht (Seitwärtstreuung; *sideward light scatter*, SSC) zeigt die Granularität der Zellen an. Wie Abb. 3.18 B zeigt, führt keine der verwendeten Substanzen zu einer signifikanten Änderung der Granularität der Zellen nach 90 min.

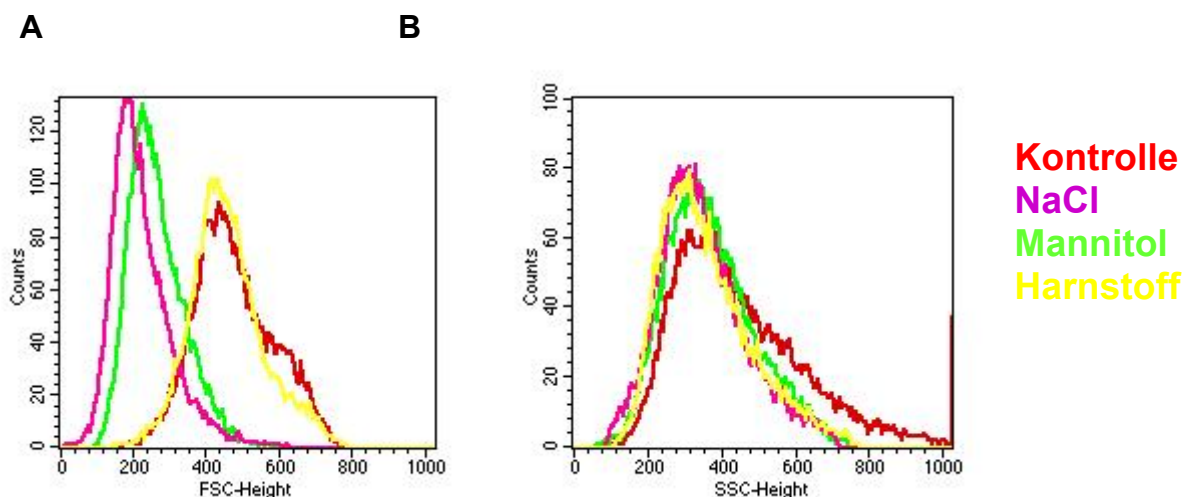


Abb. 3.18: Durchflusszytometrische Bestimmung des Zellvolumens nach Behandlung von 16HBE14o-Zellen mit 150 mosm NaCl, Mannitol und Harnstoff für 90 min. Das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter; FSC) gibt Auskunft über das Zellvolumen (**A**), während das Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter; SSC) Auskunft über die Granularität der Zellen gibt (**B**). Mannitol und NaCl führen nach 90 min zu einer Zellvolumenabnahme, Harnstoff hingegen nicht. Keine der Substanzen führt zu einer signifikanten Veränderung der Granularität der Zellen. Die Bilder sind exemplarisch für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

3.6.3 Die hyperosmotische Aktivierung von p38 MAP-Kinase in Bronchialepithelzellen ist abhängig vom Zellvolumen

Da die hyperosmotische Induktion von IL-8 abhängig von der Aktivierung der p38 MAP-Kinase war und die Sekretion von IL-8 eher auf eine osmotisch bedingte Zellvolumenabnahme als durch die Osmolarität *per se* zurückzuführen war, wurde an 16HBE14o-Zellen überprüft, ob die p38 MAP-

Kinase ebenfalls über Zellvolumenveränderungen beeinflussbar ist. Hinweise darauf ergaben sich durch die Versuche von Roger et al. (1999), die eine Abhängigkeit der Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase von hyperosmotisch bedingten Änderungen des Zellvolumens in Nierenzellen der Ratte nachweisen konnten.

Die 16HBE14o-Zellen wurden mit oder ohne 300 mosm Mannitol, NaCl oder Harnstoff behandelt. Nach 30 min wurde Gesamtprotein isoliert. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Membranen transferiert. Mit Hilfe eines Antikörpers wurde die dual phosphorylierte Form der p38 MAP-Kinase auf den Membranen detektiert. Es zeigte eine geringe basale Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase bei 3 identischen Versuchen. Die Behandlung mit NaCl und Mannitol führte zu einer deutlichen Zunahme der Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase, während die Behandlung mit

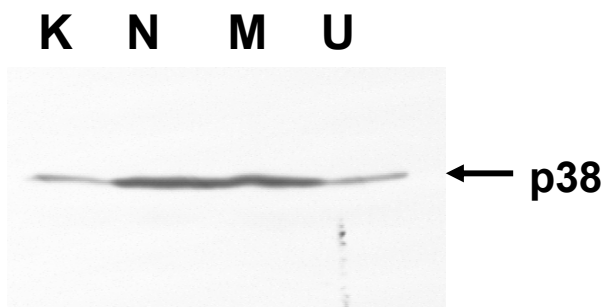


Abb. 3.19: Zellvolumen-abhängige Aktivierung der p38 MAP-Kinase in hyperosmotisch behandelten 16HBE14o-Zellen. Die Zellen wurden für 30 min mit 300 mosm Mannitol (**M**), NaCl (**N**), oder Harnstoff (Urea; **U**) behandelt. NaCl und Mannitol führen zu einer Abnahme des Zellvolumens und zu einer Aktivierung der p38 MAP-Kinase. Harnstoff führt zu keiner Abnahme des Zellvolumens und auch zu keiner Aktivierung der p38 MAP-Kinase. Die Aktivierung der p38 MAP-Kinase ist folglich eher auf die osmotisch bedingte Änderung des Zellvolumens, als auf die Osmolarität an sich zurückzuführen. Die Bilder sind exemplarisch für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

Harnstoff, keine über die basale Aktivierung hinausgehende Phosphorylierung verursachte. Da nur NaCl und Mannitol zu einer Abnahme des Zellvolumens führen, legen die Ergebnisse nahe, dass die Aktivierung der p38 MAP-Kinase in erster Linie von den hyperosmotisch bedingten Veränderungen des Zellvolumens abhängen und nicht von der Osmolarität an sich.

4 Diskussion

4.1 Die Kultivierung primärer humaner Bronchialepithelzellen

Die Etablierung der Kultur humaner Bronchialepithelzellen an unserem Institut ermöglicht erstmals Untersuchungen an einem *in-vitro*-Modell des humanen Bronchialepithels, anstelle der Verwendung immortalisierter Zelllinien. Die Gewinnung des Materials erfolgte aus Lungenteilresektaten unmittelbar nach der Resektion. Die Verwendung spezifischer Kulturbedingungen, wie der Verwendung serumfreier, supplementierter Kulturmedien, sowie die Beschichtung der Kulturoberflächen mit adhärenzoptimierenden Komponenten dient zum einen der selektiven Aussaat reiner Bronchialepithelzellen, als auch deren Propagation und Differenzierung. Die anschließende Charakterisierung der kultivierten Zellen zeigte deren bronchoepithelialen Charakter. Sie zeichneten sich aus durch das charakteristische kopfsteinpflasterartige Erscheinungsbild, sowie durch die immunhistochemische Identifizierung von Cytokeratin 18, das einen Marker der apikalen Zellschicht des Bronchialepithels darstellt. Verunreinigungen der Kultur mit Fibroblasten konnten lichtmikroskopisch nach 2-3 Passagen nicht mehr nachgewiesen werden. Verunreinigungen mit Muskelzellen oder Zellen mesodermalen Ursprungs konnten durch die immunhistochemische Untersuchung mit Antikörpern gegen die Marker Vimentin und Desmin ausgeschlossen werden.

4.1.1 Die Adhärenzoptimierung

Primäre Bronchialepithelzellen adhäreren im Gegensatz zu immortalisierten Bronchialepithelzelllinien nur in geringem Maße an reine Plastikoberflächen. Für die Kultur primärer Bronchialepithelzellen beschichtet man die Plastikoberflächen der Kulturgefäße deshalb mit Kollagen, Fibronectin oder Laminin. Kollagen, Fibronectin und Laminin sind neben Heparansulfat-Proteoglykanen natürlich vorkommende strukturelle Moleküle der extrazellulären Matrix (ECM) (zur Übersicht: Edwards und Streuli, 1995; Lin und

Bissell, 1993). Die Epithelzellen der oberen Atemwege adhären an diese ECM-Moleküle im bronchopulmonalen Interstitium und der Basalmembran.

Für die Kultur bronchialer Epithelzellen wird die Beschichtung der Plastikoberflächen mit Kollagen bevorzugt. Die Verwendung von Kollagen ist hinsichtlich seiner Adhärenzeigenschaften gegenüber primären Bronchialepithelzellen der Verwendung von Fibronektin oder Laminin vorzuziehen. Kollagen ist nicht nur für eine optimale Adhärenz, sondern darüber hinaus auch für die erfolgreiche Differenzierung der primären Bronchialepithelzellen zu mukosekretorischen, zilienbesetzten Zellen *ex vivo* erforderlich (Jetten et al., 1987; Rearick et al., 1987; Wu et al., 1990).

Kollagen induziert dabei Signale, die durch diverse Zelladhäsionsmoleküle vermittelt werden (Rosales et al., 1995), unter denen die Integrine von besonderer Bedeutung sind (Clark und Brugge, 1995). Die Beteiligung von Integrinen führt zu einer Aktivierung von Protein-Tyrosinkinase (PTKs) wie z.B. der *focal adhesion kinase* (FAK) und der Familie der Src-Kinasen, dem Phosphatidylinositol-3'-Kinase-Weg (King et al., 1997) und MAP-Kinasen (Chen et al., 1994; Schlaepfer et al., 1994). Die kollagen-abhängige Regulation dieser Signaltransduktionskaskaden bildet die Grundlage der späteren Propagation und Differenzierung der Bronchialepithelzellen. Die Beschichtung der Kulturgefäße mit Kollagen dient somit der Simulation einer Basalmembran und ermöglicht annäherungsweise physiologische Bedingungen, unter denen Kollagen zusammen mit den anderen Strukturproteinen eine essentielle Rolle bei der Reepithelisierung der Lunge nach entsprechenden Gewebsschädigungen zugerechnet wird (Peter et al., 1990).

4.1.2 Propagierung und Differenzierung primärer humaner Bronchialepithelzellen

Für die Kultur primärer Bronchialepithelzellen ist die Verwendung serumfreier Medien erforderlich. Anfänglich wurde dazu ein kommerziell erhältliches Medium verwendet, das Bronchial Epithelial Cell Growth MediumTM der Fa.

Promocell (Heidelberg). Dieses Medium orientiert sich an den Rezepturen der Medien LHC-8 und LHC-9 von Lechner & Laveck (1985).

Rinder- oder humane Seren führen zu einer dosisabhängigen Reduktion der Proliferation primärer humaner Bronchialepithelzellen, während gleichzeitig das Wachstum von Fibroblasten begünstigt wird. Robinson et al. (1984) quantifizierten die Kontamination der Kultur humaner Bronchialepithelzellen durch Fibroblasten auf 10-20 % bei der Verwendung von 10 % humanem Serum. Mit abnehmendem Serumgehalt wird das Wachstum der Bronchialepithelzellen deutlich gesteigert, während das Wachstum der Fibroblasten abnimmt und die Fibroblastenkontamination unter serumfreien Bedingungen nahezu vollständig gehemmt wird.

Neben einer selektiven Komponente kommt dem Verzicht auf Serum aber auch eine qualitative Bedeutung bei. Ein weiterer unerwünschter Nebeneffekt der Verwendung von Serum für die Kultur humaner Bronchialepithelzellen ist die Förderung der Plattenepithelmetaplasie (Lechner et al., 1984). Sie kennzeichnet sich durch eine Erhöhung der Membranvernetzungen, eine irreversible Hemmung der DNA-Synthese, eine Abnahme der Wachstumsrate und eine Vergrößerung der Zelloberfläche. Im Wesentlichen ist für diese Metaplasierung der im Serum vorhandene Thrombozytenwachstumsfaktor TGF- β verantwortlich. Er scheint nicht nur den Metaplasierungsgrad der Bronchialepithelzellen zu erhöhen, sondern fördert zudem die Proliferation der Fibroblasten.

Durch den Verzicht von Serum entfallen jedoch auch darin enthaltene wachstumsfördernde Inhaltsstoffe. Sie werden in der Regel supplementiert. Wesentlich für eine gleichbleibend hohe Zellvermehrungsrate ist die Supplementierung mit Faktoren, wie Insulin, EGF und Hydrokortison, während die initiale Beschleunigung des Zellauswuchses bioptischer Explantate die Zugabe von Rinderhypophysenextrakt, T3, Adrenalin und Retinolsäure erfordert (Lechner et al., 1984). Retinolsäure und Adrenalin verhindern zudem die Metaplasierung. Lechner und LaVeck zeigten, dass die Wirkung der Supplemente komplexen Interaktionen unterliegt. So ist der Rinderhypophysenextrakt inaktiv, wenn kein EGF vorhanden ist. T3 fördert den

Zellauswuchs nicht, wenn nicht sowohl der Rinderhypophysenextrakt als auch EGF im Medium anwesend sind.

Siegfried und Nesnow (1984) bestätigten diese Ergebnisse. Ohne die Supplementierung des Mediums mit EGF, Insulin und Hydrokortison, erfolgte kein Auswuchs der Kulturen. Fehlten nur ein oder zwei dieser Supplemente, reduzierte sich die Effizienz des Mediums um 50 bis 60 %. Besonders EGF sollte in geringen Konzentrationen immer im Medium vorhanden sein. In höherer Konzentration fördert EGF die Zellvermehrungsrate, es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es ab 10 ng/ml die Differenzierung der Zellen und deren Wachstum inhibiert (Gray et al., 1996; Wu et al., 1997). Unter der in der Literatur häufig verwendeten Konzentration von bis zu 25 ng/ml sind differenzierte Zellen nicht zu erwarten. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit für das Expansionsmedium 5 ng EGF/ml Medium verwendet.

Ebenfalls proliferationsfördernd wirken auf alveoläre Typ II-Zellen der Keratinozyten-Wachstumsfaktor (*keratinocyte growth factor*, KGF; Panos et al., 1993) sowie der Hepatocyten-Wachstumsfaktor (*hepatocyte growth factor*, HGF; Panos et al., 1993; Shiratori et al., 1995). Aus diesem Grund wurden dem Expansionsmedium 5 ng/ml HGF und 10 ng/ml KGF zugegeben. Die Supplementierung des Expansionsmediums mit einer höheren Konzentration an EGF, sowie die zusätzliche Verwendung von KGF und HGF ergab eine deutliche Steigerung der Zellausbeuten gegenüber der Verwendung des Promocell-Originalmediums (siehe 3.1.1).

Für das Differenzierungsmedium wurden die Konzentrationen für EGF, KGF und HGF reduziert um ihren proliferationsfördernden Einfluss einzudämmen. HGF und KGF wirken sich in geringerer Konzentration positiv auf die Differenzierung von Atemwegsepithelzellen aus. Dabei vermag KGF in alveolären Typ II-Zellen die Expression der Surfactant-Proteine A und D aufrechtzuerhalten, deren Bildung mit zunehmender Kulturdauer ansonsten zum Erliegen kommen würde (Mason et al., 2002). Zusätzlich wurden im Differenzierungsmedium Choleratoxin und Retinolsäure supplementiert, die beide einen fördernden Einfluss auf die Differenzierung epithelialer Zellen

besitzen (Rosenfield et al., 2002; DeLuca, 1991) und die Ziliogenese bronchoepithelialer Zellen (De Jong et al., 1994)

4.1.3 Die Kultivierung an der Luft-Medium-Grenzfläche

Die biphasische Kultivierung primärer humaner Bronchialepithelzellen an der Luft-Medium-Grenzfläche (*air-liquid culture*) ist eine wesentliche Voraussetzung für deren mucoziliäre Differenzierung und wurde bei allen Kulturen verwendet. Eine Ausnahme bildete lediglich die apikale Zugabe osmotisch veränderter Medien. De Jong et al. (1994) kultivierten Bronchialepithelzellen sowohl biphasisch an der Luft-Medium-Grenzfläche als auch monophasisch mit apikaler Mediumzugabe. Unter den monophasischen Bedingungen waren elektronenmikroskopisch Prozentriolen, Basalkörper oder funktionsfähige Zilien nicht detektierbar. Unter biphasischen Bedingungen waren nach 21 Tagen funktionelle Zilien zu beobachten und es differenzierte sich ein mucoziliäres Epithel. Die für die Ziliogenese unter monophasischen Bedingungen erforderliche Retinolsäure war unter biphasischen Bedingungen nicht erforderlich. Es wird allgemein angenommen, dass nur *in vitro* ein Substratgradient für die Ziliogenese und Differenzierung erforderlich ist, da die Differenzierung und Ziliogenese *in vivo* auch in der fetalen Lunge stattfindet, also unter monophasischen Bedingungen.

4.2 Grundlagen quantitativer PCR-Verfahren

In der vorliegenden Arbeit wurde ein PCR-Verfahren erstellt, das die Expression von Genen in niedriger Kopienzahl oder aber in Proben mit geringer RNA-Menge ermöglicht. Geringe Ausgangsmengen an RNA wiesen vor allem die Primärkulturen von humanem Bronchialepithel als auch frische Gewebebürstungen des Bronchial- und Nasenepithels auf. Besonders die Primärkulturen ergaben für vergleichende Versuche mit $n=3$ nur etwa 0,5-1,5 μg Gesamt-RNA/Probe, während die Gewebebürstungen zwischen 0,5 und 5 μg variierten.

Die RT-kompetitive Multiplex-PCR erlaubte zuverlässige Bestimmungen und basierte auf einer Weiterentwicklung kompetitiver PCR-Verfahren, die gegenüber der herkömmlichen PCR deutlich präziser sind (Zimmermann und Mannhalter, 1996). Folgende Grundlagen dienen der Erstellung der RT-Kompetitiven Multiplex-PCR

Theoretisch ist die PCR eine Kettenreaktion, bei der das Produkt des vorangegangenen Amplifikationszyklus als Matrize für den nächsten Zyklus dient. Daraus resultiert ein exponentieller Anstieg des Reaktionsprodukts. Die exponentielle Natur des Amplifikationsprozesses verursacht jedoch einige Schwierigkeiten bei der Quantifizierung von Nukleinsäuren, so dass einige Autoren die Quantifizierung von RNA mit Hilfe der PCR skeptisch betrachten (Hengen, 1995). Während der Amplifikation verdoppelt sich die Menge an Reaktionsprodukt theoretisch in jedem PCR-Zyklus:

$$(1) \quad N = N_0 \cdot 2^n$$

N = Anzahl der amplifizierten Moleküle
 N_0 = initiale Anzahl an Molekülen
 n = Anzahl der PCR-Zyklen

Ein entscheidender Faktor für die quantitative PCR ist die Amplifikationseffizienz (E). Damit wird der Anteil des Templates beschrieben, der

in jedem PCR-Zyklus repliziert wird. Da E durch eine große Anzahl von Faktoren beeinflusst wird, ist E experimentell immer kleiner als das Ideal ($E=1$) und führt zu folgender Beschreibung der Akkumulation von PCR-Produkten:

$$(2) \quad N = N_0 \cdot (1 + E)^n \quad \text{oder} \\ \log N = \log N_0 + \log (1 + E)^n$$

Bei der Darstellung von $\log N$ gegen die Anzahl der PCR-Zyklen (n) ergibt sich eine lineare Kurve, deren Schnittpunkt mit der y -Achse den Logarithmus der initialen Molekülmenge ($\log N_0$) und deren Anstieg $(1+E)^n$ repräsentiert. Bei Ermittlung von E aus dem Anstieg der linearen Kurve kann N_0 direkt ermittelt werden.

Gleichung (2) ist jedoch nur gültig, wenn die Syntheseseffizienz E konstant ist. Dies trifft nur auf die exponentielle Phase der PCR zu. Zu Beginn der PCR-Reaktion erhöht sich die PCR-Produktmenge noch exponentiell, und E liegt nahe 1. Dabei ist nur die Menge an Templat limitierend. Später werden andere Faktoren limitierend wie z.B. die verfügbare Menge an Primern oder Nucleotiden und die Abnahme der Polymeraseaktivität. Dies führt zu einer Abnahme der Syntheseseffizienz und die Reaktion erreicht eine Plateauphase. Eine Quantifizierung von Nucleinsäuren ist folglich nur in der exponentiellen Phase der PCR möglich. Der Eintritt in die Plateauphase kann in der Praxis nur schwer kontrolliert werden. Aus Gleichung (2) wird klar, dass das Erreichen der Plateauphase im Wesentlichen von der initialen Molekülmenge N_0 und der Syntheseseffizienz E abhängt. Bei der herkömmlichen PCR kann jedoch weder die Syntheseseffizienz (Siebert und Larrick 1992) noch die initiale Molekülmenge kontrolliert werden (Apostolakos et al. 1993). Aus diesem Grund wurden verschiedene Standardisierungen entwickelt, die diese Probleme kontrollieren sollten.

4.2.1 Der Einsatz von Standards in der quantitativen PCR

Zur Kalibrierung quantitativer PCR-Verfahren wurden in den letzten Jahren verschiedene Standardisierungen entwickelt. Einige Autoren entschieden sich dabei für die simultane Messung eines Referenz- oder Kontrollgens im selben Reaktionsgefäß (interne Standardisierung) oder in parallelen Reaktionsgefäßen (externe Standardisierung) (Chelly et al., 1990; Mohler und Butler, 1991; Noonan et al., 1990; Trapnell et al., 1991). Häufige Beispiele für Referenz- oder Kontrollgene sind dabei die Gene für Aktin (Trapnell et al., 1991) oder die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Rosenfeld et al., 1992; Yoshimura et al. 1992; Loitsch et al. 1999), deren Expression unter den meisten Bedingungen als konstant angesehen wird.

Die externe Standardisierung weist mehrere Nachteile auf. Schwankungen der Syntheseeffizienz (E) zwischen parallelen Reaktionsgefäßen sowie die initiale Molekülmenge (N_0) können nicht ausreichend kontrolliert werden. Selbst geringe Schwankungen in den Reaktionsbedingungen werden somit um ein Vielfaches verstärkt. Die Quantifizierung bleibt auch hier auf die exponentielle Phase der PCR beschränkt.

Interne Standards bieten eine partielle Lösung dieser Probleme. Interne Standards können die erwähnten Referenzgene sein (endogener oder natürlicher Standard) oder ein Standard, der künstlich hergestellt wird und in der Regel mit denselben Primern amplifiziert wird wie das endogene Target (exogener Standard).

4.2.2 Die Quantitative PCR mit internen Standards

Das Ziel der quantitativen PCR ist natürlich, aus der Menge des PCR-Produktes direkt die initiale absolute Anzahl der zu amplifizierenden Moleküle (N_0) oder die relativen Unterschiede in den Ausgangsmengen an N_0 in verschiedenen Proben zu ermitteln. Die Angabe der relativen Unterschiede zwischen verschiedenen Proben ist dabei für die meisten experimentellen Fragestellungen ausreichend.

Bei dem Einsatz von endogenen internen Standards werden Standard und Target im gleichen Reaktionsgefäß amplifiziert. Die Menge an amplifizierten Targetmolekülen (N_t) und endogenem Standard (N_s) wird folgendermaßen beschrieben:

$$(3) \quad N_t = N_{0t} (1 + E_t)^n \quad ; \quad N_s = N_{0s} (1 + E_s)^n$$

N_{0t} = Initiale Anzahl an Targetmolekülen
 N_{0s} = Initiale Anzahl an Standardmolekülen
 N_t = Menge an amplifizierten Targetmolekülen
 N_s = Menge an amplifizierten Standardmolekülen
 E_t = Effizienz der Targetamplifikation
 E_s = Effizienz der Standardamplifikation

aus der Kombination von (3) ergibt sich

$$(4) \quad N_t/N_s = N_{0t} (1 + E_t)^n / N_{0s} (1 + E_s)^n$$

Die Gleichungen (3) und (4) weisen auf ein Problem hin. Die Menge an amplifizierten Molekülen von Target (N_t) und Standard (N_s) sollte nach Möglichkeit vergleichbar sein. Eine Variable dafür ist die initiale Anzahl an Molekülen für Standard (N_{0s}) und Target (N_{0t}). Es zeigt sich in der Praxis, dass die simultane Bestimmung von Genen, die in hoher Kopienzahl exprimiert werden, und von Genen, die in niedriger Kopienzahl exprimiert werden oft nicht möglich ist. Ein Gen, das in hoher Kopienzahl vorliegt, ist oft schon in der Plateauphase, während das Gen mit niedriger Kopienzahl noch gar nicht detektierbar ist.

Eine weitere aus der Gleichung (3) und (4) hervorgehende Ursache für die Unterschiede zwischen N_t und N_s sind Unterschiede in der Syntheseeffizienz von Standard (E_s) und Target (E_t). Es ist nicht ungewöhnlich dass die Verwendung verschiedener Primerpaare bis zu 1000-fache Unterschiede in der Sensitivität hervorrufen kann (He et al., 1994).

Für Gleichung (4) gilt prinzipiell, dass bei bekannter initialer Konzentration der Standards die relative initiale Konzentration der Targets auch bei unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen von Target und Standard ermittelt werden. Günstiger ist es jedoch, mit gleichen Amplifikationseffizienzen zu arbeiten ($E_t = E_s$). Dadurch vereinfacht sich Gleichung (4):

$$(5) \quad N_{0t}/N_{0s} = N_t/N_s = A_t/A_s$$

A_t = Menge an PCR-Produkt der spezifischen cDNA
 A_s = Menge an PCR-Produkt des Standards

Die Verwendung von Gleichung (5) zur absoluten Quantifizierung der initialen Anzahl von Targetmolekülen setzt voraus, dass die Amplifikationseffizienz E in jeder einzelnen PCR ermittelt wird. Diese aufwendige Praxis wird häufig durch den Vergleich der PCR-Produktmenge in verschiedenen Proben ersetzt. Diese semiquantitative oder vergleichende PCR ist für die meisten experimentellen Fragestellungen ausreichend.

In der vorliegenden Arbeit sollte u.a. die Expression des CFTR-Gens bestimmt werden. N_t wäre also die Menge an amplifizierten CFTR-Molekülen, während N_s die Menge an amplifizierten Standardprodukten des Referenzgens GAPDH ist. Der Einsatz unterschiedlicher Primerpaare für CFTR und GAPDH führt zu unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen für Target (E_t) und Standard (E_s). Dies limitiert die Vergleichbarkeit verschiedener Proben. Des Weiteren liegt die CFTR-mRNA in nur geringer Kopienzahl vor. Im menschlichen Bronchialepithel finden sich nur 0,1 – 1 Kopie pro Zelle (Trapnell et al., 1991). Die mRNA von GAPDH liegt jedoch, abhängig vom Zelltyp in einigen 100 bis 1000 Kopien vor. Somit unterscheiden sich N_{0t} und N_{0s} voneinander. Um dieses Problem zu lösen, wäre eine zusätzliche exogene interne Standardisierung erforderlich, bei der gegenüber der endogenen internen Standardisierung die Syntheseeffizienzen für Target (E_t) und Standard (E_s) in der Regel identisch sind. Dazu bedient man sich kompetitiver Quantifizierungssysteme.

4.2.3 Die kompetitive PCR

Bei der kompetitiven PCR wird eine bekannte Anzahl von Kopien eines exogenen internen Standards zusammen mit dem Target koamplifiziert. Der Standard wird so konzipiert, dass zwischen Standard und Target mindestens die Primerbindungsstellen identisch sind. Standard und Target konkurrieren im gleichen Reaktionsgefäß um die Faktoren, die den Amplifikationsprozeß limitieren. Eine Verdünnungsreihe wird entweder vom zu quantifizierenden Target oder vom Standard angefertigt und einer konstanten Menge der jeweils anderen Komponente zugesetzt. Die resultierenden PCR-Produkte von Standard und Target müssen in den nachfolgenden Nachweisreaktionen entweder aufgrund ihrer Größendifferenz, einer unterschiedlichen Restriktionsstelle oder durch eine spezifische Hybridisierungsreaktion voneinander unterscheidbar sein.

Eine grundlegende Voraussetzung für die kompetitive PCR sind identische Amplifikationseffizienzen von Standard und Templat. Erst dann kann die initiale Anzahl von Targetmolekülen (N_{0t}) durch den Vergleich der relativen Menge der amplifizierten Reaktionsprodukte Standard (A_s) und Target (A_t) entsprechend Gleichung (5) bestimmt werden.

Dabei wird der Logarithmus des Quotienten A_t/A_s als Funktion des Logarithmus der initialen Anzahl an Standardmolekülen (N_{0s}) dargestellt. Die initiale Anzahl an Targetmolekülen wird aus dieser Kurve unter der Annahme extrapoliert, daß N_{0t} in dem Punkt gleich N_{0s} ist, in dem beide PCR-Produkte equimolar vorliegen. Der Quotient des Logarithmus der beiden PCR-Produkte ($\log A_t/A_s$) ist dabei 0. Dieser Quotient bleibt im Verlauf der gesamten Amplifikation, sowohl während der exponentiellen Phase, als auch während der Plateau-Phase gleich. Damit ist eine Quantifizierung auch dann möglich, wenn die PCR-Reaktion die Plateauphase erreicht hat (Pannetier et al., 1993; Cottrez et al., 1994; Morrison und Gannon, 1994;).

4.2.4 Die RT-Kompetitive Multiplex-PCR (RCMP)

Die RT-kompetitive Multiplex PCR ist eine Weiterführung der kompetitiven PCR. Dabei werden mehrere kompetitive PCRs in einem Ansatz amplifiziert. Es handelt sich folglich um eine kompetitive PCR mit exogen interner und endogen interner Standardisierung.

Der Einfluß der initialen Kopienzahl und der Syntheseeffizienz von Target (N_{0t} und E_t) und Referenzgen (N_{0s} und E_s) führt in der Regel zu unterschiedlichen Mengen an Amplifikaten zwischen den verschiedenen Target/Kompetitor-Systemen (N_t und N_s). Diese Unterschiede wurden durch die Verwendung verschiedener Mengen an Primern (GAPDH: 5 pmol/Primer; CFTR: 30 pmol/Primer) nivelliert. Damit wird gewährleistet, dass GAPDH früher in die Plateauphase eintritt als CFTR. Die Amplifikation wird fortgesetzt, bis CFTR dieselbe Menge an Amplifikaten erreicht hat. Vorausgesetzt, dass kein anderer Faktor die PCR limitiert, wird die Plateau-Phase der einzelnen Target/Kompetitor-Systeme über die Primerkonzentration eingestellt. Diese Vorgehensweise ist nur mit einem kompetitiven Quantifizierungssystem möglich, da das Verhältnis von Target und Kompetitor während des gesamten Amplifikationsprozesses unverändert bleibt.

Damit sind zwei Probleme der konventionellen RT-PCR gelöst:

1. mRNAs mit hoher oder niedriger Kopienzahl können mit der hier beschriebenen Methode koamplifiziert werden.
2. Die semiquantitative Quantifizierung ist unabhängig von den Syntheseeffizienzen von Target und Referenzgen.

4.2.4.1 Die RCMP kontrolliert die initiale RNA-Menge

Theoretisch sollte bei der RT-kompetitiven Multiplex PCR das Verhältnis zwischen einem Referenzprodukt, wie z.B. GAPDH, und dem zu bestimmenden Produkt, wie z.B. CFTR, unabhängig von der initialen Menge an RNA sein. Führt man diese Überlegung weiter, wäre es nicht erforderlich die initiale

Beladung mit RNA zu bestimmen, solange man garantieren kann, dass die reverse Transkription nicht überladen wird.

Dies würde ein Problem lösen, das bei der Arbeit mit primärem Material oder Primärkulturen oft auftaucht. So ist die RNA-Ausbeute von Zellen die mit Hilfe von Biopsien oder Nasal- und Bronchialbürstungen gewonnen wurden sehr gering. In der Regel gewinnt man nur 0,5 µg RNA pro Bürstung. Vergleichbar geringe Mengen erreichte man auch bei der Kultivierung der primären humanen Bronchialepithelzellen. Diese Menge an RNA ist als Sediment gerade noch mit dem Auge wahrnehmbar, reicht jedoch nicht aus, wenn eine spektrophotometrische Bestimmung der RNA-Menge und eine anschließende RT-PCR vorgenommen werden muss. Wenn die Quantifikation mit der RT-kompetitiven Multiplex-PCR tatsächlich unabhängig von der initialen Menge an RNA sein sollte, dann könnten geringe RNA-Mengen ohne vorherige Quantifikation der mRNA-Menge verwendet werden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden jeweils 6 reverse Transkriptionen mit unterschiedlichen Mengen an RNA vorgenommen. Die Auswertung der anschließenden RT-kompetitiven Multiplex PCR ergab für die verschiedenen RNA-Mengen hochgradig reproduzierbare Ergebnisse für das Verhältnis von GAPDH zu CFTR (**Tab. 3.1**). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die RT-kompetitive Multiplex PCR Schwankungen der initialen Beladung mit RNA ausgleichen kann. Herkömmliche PCRs können, wie bereits erwähnt, die initiale Beladung nicht kontrollieren (Dostal et al., 1994, Auboef und Vidal 1997). Dazu bedarf es einer gleichzeitigen exogen und endogen internen Standardisierung. Mit der RT-kompetitiven Multiplex-PCR ist es erhält man hochreproduzierbare Ergebnisse auch mit limitierten Untersuchungsmaterialien wie Nasal- und Bronchialbürstungen sowie primären Zellkulturen.

4.2.4.2 Die Verwendung Einsatz von cDNA-Kompetitoren

Einige Autoren benutzen als Kompetitoren cDNA-Fragmente (RT-kompetitive PCR), die nach der reversen Transkription zugegeben werden (Auboef und

Vidal, 1997). Andere setzen cRNA-Fragmente ein (Wang et al., 1989; Becker-André und Hahlbrock, 1989), die während der RNA-Isolation oder der reversen Transkription zugegeben werden (kompetitive RT-PCR).

Durch die Verwendung von cRNA-Kompetitoren kann die Effizienz der reversen Transkription kontrolliert werden. Die reverse Transkription ist eine nicht zu unterschätzende Fehlerquelle bei der Quantifizierung von mRNA mit Hilfe der RT-PCR. Ihre Effizienz kann zwischen 5% und 90% schwanken (Simmonds et al., 1990; Henrard et al., 1992). Nicht-kompetitive RT-PCR Verfahren kontrollieren diese Schwankungen durch endogene mRNA-Targets (zur Übersicht: Orlando et al., 1998). Diesen Vorteil nutzt die RT-kompetitive Multiplex PCR gegenüber der kompetitiven PCR. GAPDH bietet eine Kontrolle über die initiale Eintragsmenge an RNA oder cDNA und kontrolliert theoretisch die Effizienz der reversen Transkription. Dazu muss angenommen werden, dass sich Unterschiede in der Transkriptionseffizienz auf das Referenzprodukt GAPDH und das zu bestimmende Produkt, z.B. CFTR in gleicher Weise auswirken. Dadurch kann auf die Verwendung von cRNA-Kompetitoren verzichtet werden.

4.2.4.3 Die RCMP vereinfacht die densitometrische Quantifizierung der PCR-Produkte

Zur Detektion und Analyse der Amplifikationsprodukte steht eine Vielzahl von Methoden zur Auswahl (Jenkins, 1994; Reischl und Kochanowski, 1995). Bei dem Einsatz von Standards, die sich um eine definierte Längendifferenz von der Targetsequenz unterscheiden, wird von den meisten Autoren eine Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung und densitometrischer Quantifizierung verwendet.

Dabei ist zu beachten, dass Ethidiumbromid, wie die meisten anderen Farbstoffe, in Abhängigkeit von der Länge der Nukleotidkette eingebaut wird. Die Targetsequenzen in der kompetitiven PCR ergeben somit stärkere Signale als deletierte Kompetitoren (Apostolakos et al., 1993). Die densitometrisch

ermittelten Ergebnisse sollten in der Regel um einen Faktor korrigiert werden, der den Größenunterschieden von Target und Kompetitor entspricht.

Dies ist bei der RT-kompetitiven Multiplex PCR nicht nötig, da hierbei ein Verhältnis zwischen GAPDH und z.B. CFTR gemessen wird. Die Korrekturfaktoren sind für jedes Target/Kompetitorsystem konstant und sind bei einem vergleichenden System unerheblich.

Die Dauer der Ethidiumbromid-Färbung und -Entfärbung sollte ebenfalls standardisiert werden, da sie die Titrationskurve der Verhältnisse von Kompetitor und Target beeinflusst. Abhängig von der Färbung ergibt sich ein mehr oder weniger starker Hintergrund. Dieser beeinflusst die Steigung der sich ergebenden Gerade, lässt den Äquivalenzpunkt jedoch unverändert (ohne Abb.; Dostal et al., 1994). Somit ist der Einfluss von Schwankungen in der Färbereaktion der Produkte in kompetitiven Systemen minimiert.

4.3 Identifizierung der Osmolyttransporter BGT-1, SMIT und TAUT in primären Bronchialepithelzellen

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss osmotischer Belastungen auf inflammatorische Vorgänge in Bronchialepithelzellen überprüft werden. Dazu wurde evaluiert, inwieweit Bronchialepithelzellen eine ähnliche Abwehrstrategie gegenüber osmotischen Belastungen entwickelt haben, wie sie auch für die Zellen anderer Gewebe beschrieben wird.

Osmotische Belastungen verändern das Zellvolumen der betroffenen Zellen. So kommt es infolge einer hyperosmotischen Belastung zu einer initialen Abnahme des Zellvolumens, die mit einer kompensatorischen Volumenzunahme beantwortet wird, um die Integrität der Membran zu gewährleisten. Man bezeichnet diese kompensatorische Reaktion als „*regulatory volume increase*“ (RVI).

Der RVI beinhaltet unter anderem eine Aufnahme von NaCl (**Abb.4.1**) durch die Zusammenarbeit eines $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ Cotransporters (NKCC), eines Cl^- - HCO_3^- -Austauschers (*anion exchanger*, AE) und eines Na^+ - H^+ -Austauschers ($\text{Na}^+\text{-H}^+$ -

exchanger, NHE) (Larson & Spring, 1987; Levinson, 1992; Okada, 1997; Hara et al., 1999). Die Regulation des Zellvolumens mit Hilfe dieser so genannten anorganischen Osmolyte würde jedoch in kürzester Zeit zu einer Deaktivierung und Destabilisierung von Proteinen führen.

Dem entgegen wirkt die Aufnahme von Wasser, welches über Aquaporine in die Zelle gebracht wird. Die Wasseraufnahme reicht jedoch nicht aus, um die Deaktivierung der Proteine zu vermeiden.

Hyperosmotischer Stress

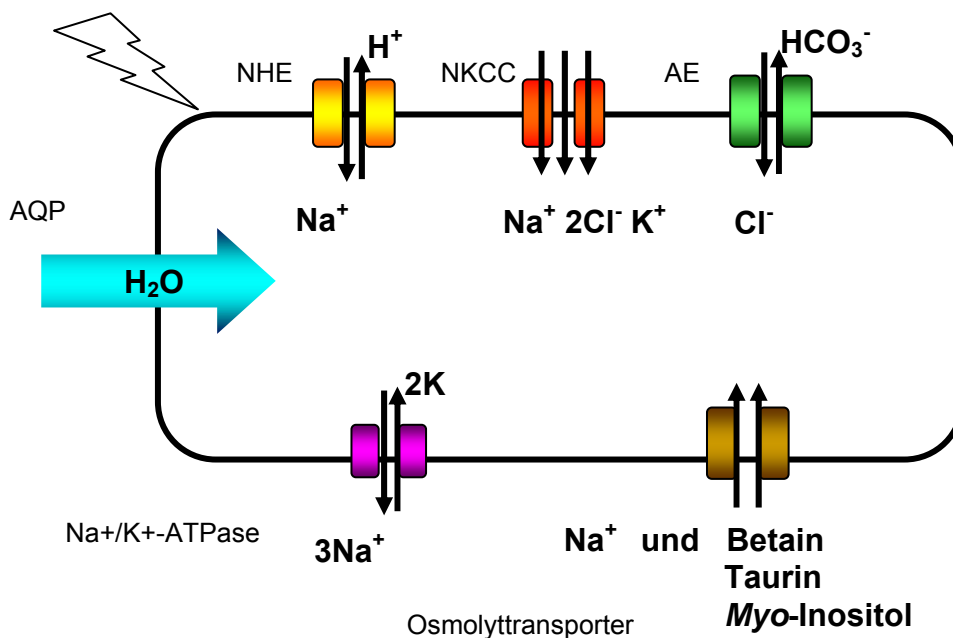


Abb. 4.1: Schema der Transportmechanismen einer Zelle in Antwort auf eine hyperosmotischen Belastung. An der Antwort sind sowohl Ionentransportsysteme, als auch Osmolyttransporter beteiligt. Diese Transportmechanismen gewährleisten eine Kompensation der initialen Abnahme des Zellvolumens. AE: Anionenaustauscher; AQP: Aquaporine; NHE: Natrium-Protonen-Austauscher; NKCC: Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter.

Aus diesem Grund nimmt die Zelle so genannte organische Osmolyte auf. Diese organischen Osmolyte sind osmotisch wirksam, beeinträchtigen die biochemischen Eigenschaften der Zelle jedoch auch in hohen Konzentrationen nicht (Burg et al., 1994). Sie weisen im Gegenteil sogar eine

proteinstabilisierende Wirkung auf. Zu diesen Osmolyten gehören Betain, Taurin und *Myo*-Inositol, die durch die Transporter BGT-1, SMIT und TAUT aufgenommen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die mRNA-Expression der Osmolyttransporter BGT-1, SMIT und TAUT in primären humanen Bronchialepithelzellen gezeigt. Die PCR-Produkte für die entsprechenden Osmolyttransporter wurden zur weiteren Identifikation und Verifizierung kloniert und sequenziert. Antikörper gegen die Osmolyttransporter sind zurzeit nicht verfügbar.

Die beschriebenen Osmolyttransporter konnten bislang in mehreren Geweben auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Die mRNAs von BGT-1, SMIT und TAUT wurden in einer Vielzahl von Organen detektiert, so u.a. in Niere (Handler und Kwon, 1993; Burg, 1994; Kwon und Handler, 1995), Leber (Weik et al., 1998; Peters-Regehr et al. 1999) und Gehirn (Kwon et al., 1992; Smith et al., 1992; Borden et al., 1995). In Darmepithelzelllinien und Dünndarm wurden bislang nur die mRNA des Taurintransporters und die Aufnahme von Taurin nachgewiesen (Tirupathi et al., 1992; Satsu et al., 1997 und 1999).

Das Expressionsprofil der drei Osmolyttransporter ist in den verschiedenen Geweben sehr unterschiedlich. Jedes Gewebe scheint ein anderes so genanntes Hauptosmolyt zu verwenden. Das mit Hilfe der RT-kompetitiven Multiplex-PCR ermittelte Expressionsprofil für Bronchialepithelzellen verdeutlicht, dass alle drei Osmolyttransporter in isoosmotischem Medium exprimiert werden und in unterschiedlicher Menge vorliegen. SMIT und TAUT weisen ein höheres basales Expressionslevel als BGT-1 auf. Die hyperosmotische Induktion der drei Osmolyttransporter weist daraufhin, dass Betain das Hauptosmolyt in Bronchialepithelzellen ist, da die Induktion der mRNA-Expression von BGT-1 deutlich ausgeprägter war als die Induktion der mRNA-Expression von SMIT oder TAUT.

Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass die Beurteilung von Expressionsprofilen nur Vermutungen über die Natur des Hauptosmolyts in Bronchialepithelzellen zulässt. Die Identifizierung des Hauptosmolyts kann nur

über Transportstudien erfolgen, die mit den entsprechend markierten Osmolyten Betain, Taurin und *Myo*-Inositol durchgeführt werden.

Dennoch zeigen die Untersuchungen der mRNA-Expression der Osmolyttransporter, dass Bronchialepithelzellen die Osmolyttransporter exprimieren und nach einer hypoosmotischen Belastung herunterregulieren bzw. nach hyperosmotischer Belastung deutlich induzieren können. Bronchialepithelzellen können osmotische Belastungen perzeptieren und versuchen sie mit Hilfe einer osmotischen Abwehrstrategie zu beantworten, die auch für Niere (Handler und Kwon, 1993), Gehirn (Borden et al., 1995) und Darm beschrieben wurde (Satsu et al., 1997 und 1999).

4.4 Induktion der Expression und Sekretion von IL-8 durch hyperosmotischen Stress: Inflammation ohne Infektion

Die Hochsalz-Hypothese und die Niedrigvolumen-Hypothese kehren trotz ihrer Gegensätzlichkeit die Rolle von CFTR als Ionenkanal und als Regulator anderer Ionenkanäle heraus. Wie es infolge dessen zu einer chronischen Inflammation mit episodischen Infektionen kommen kann, ist zurzeit nicht befriedigend zu erklären.

Eines der Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war deshalb die Beantwortung der Frage, ob osmotische Belastungen von primären Bronchialepithelzellen die Expression und Sekretion von IL-8 beeinflussen können. Dies wurde für einige Zelllinien bereits beschrieben (Shapiro und Dinarello 1995 und 1997; Hashimoto et al., 1999). IL-8 ist sowohl für die Inflammation als auch für die Infektion der Atemwege bei CF über seine Funktion als Chemoattraktor für Neutrophile von besonderer Bedeutung (Khan et al., 1995; Balough et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine hyperosmotische Belastung mit NaCl die Expression und Sekretion von IL-8 in Bronchialepithelzellen induziert. Diese Induktion ist sowohl zeit- als auch dosisabhängig, wobei die Sekretion von IL-8 linear bis zu der 7-fachen Menge

des Kontrollwerts nach 12 h anstieg, während die Expression nach 6 h ein Maximum erreichte das gegenüber der Kontrolle 17-fach erhöht war. Danach folgte ein Rückgang der IL-8 Expression bis auf das 5-fache des Kontrollwerts nach 24 h.

Der Rückgang der IL-8 Expression nach Erreichen des Maximalwerts bei 6 h könnte durch eine Adaptierung der Zellen an die osmotische Belastung begründet sein. So führt eine hyperosmotische Belastung zu einer Abnahme des Zellvolumens. Dieses Schrumpfen der Zelle wird durch diverse zelluläre Gegenmaßnahmen wie dem regulatorischen Volumenanstieg (regulatory volume increase; RVI) wieder kompensiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass hyperosmotische Belastungen zu einer Zeit- und Konzentrations-abhängigen Induktion der Expression und Sekretion von IL-8 führen. Damit wäre eine mögliche Verbindung der Störung des Ionenhaushalts bei CF zu der Inflammation der Atemwege aufgezeigt. Zudem bieten die vorliegenden Ergebnisse auch eine Erklärung für die in einigen Studien beschriebene intrinsische Entzündung, die in Abwesenheit einer detektierbaren Infektion beschrieben wird (Khan et al., 1995; Tirouvanziam et al., 2002). Hinsichtlich der von der Gruppe um Richard Boucher favorisierten Niedrigvolumenhypothese, wäre anzunehmen, dass besonders die Hyperabsorption von Natrium (Kunzelmann et al., 1995; Mall et al., 1998), die auf eine fehlende Inhibition durch CFTR zurückzuführen ist, zu einer intrazellulären Akkumulation von Natrium führt. Die daraus resultierende Zunahme der intrazellulären Ionenstärke wiederum ähnelt den Vorgängen die intrazellulär durch hyperosmotische Belastungen hervorgerufen werden und könnte eine Erklärung dafür bieten, weshalb CF-Zelllinien in geringerem Masse auf hypoosmotische Belastungen (Valverde et al., 1995 und 2000; Seidler et al., 2001; Vazquez et al., 2001 Cho et al., 2004) reagieren.

4.5 p38 MAP-Kinase wird durch hyperosmotische Belastungen aktiviert und ist an der Induktion der Interleukin-8 mRNA-Expression beteiligt.

Um den Signaltransduktionsweg der hyperosmotischen Regulation von IL-8 zu beleuchten, wurde der Einfluss verschiedener mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAP-Kinasen) untersucht. MAP-Kinasen sind Serin/Threonin-Kinasen und fungieren als zentrale Mediatoren der Signalvermittlung. Die MAP-Kinase Familie besteht aus vier verschiedenen Gruppen: der *extracellular signal-regulated kinases* 1 und 2 (ERK1/2; p42/44 MAPK), der c-JUN NH₂-Kinase (JNK; auch Stress-aktivierte Proteinkinase, SAPK), der p38 MAP-Kinase (auch CSBP) und der Big MAP-Kinase 1 (BMK1; auch ERK5) (Cano und Mahadevan, 1995; Cobb und Goldsmith, 1995; Abe et al. 1996). Obwohl sie strukturell verwandt sind, werden sie durch verschiedene Stimuli aktiviert und phosphorylieren unterschiedliche Substrate. Die Aktivierung der MAP-Kinasen durch hyperosmotische Belastungen konnte für verschiedene Zelllinien aufgewiesen werden (Han et al., 1994; Itoh et al., 1994; Matsuda et al., 1995). Die grundlegenden Mechanismen dieser Aktivierung sind jedoch nicht bekannt. Die p38 MAP-Kinase wird durch eine duale Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosin-Resten aktiviert. Die für die hyperosmotisch bedingte Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase verantwortlichen Threonin- und Tyrosin-Kinasen sind bislang noch nicht charakterisiert. Es ist jedoch bekannt, dass osmotischer Stress zu einer Tyrosin-Phosphorylierung (Krump et al., 1997; Szazi et al., 1997) und zu der Aktivierung diverser Mitglieder der Familie der Src-Kinasen führt (Krump et al., 1997; Qin et al., 1997; Kapus et al., 1999). Die Src-Kinasen wurden als geeignete Kandidaten für die Aktivierung der p38 MAP-Kinase bei osmotischen Belastungen angesehen. Bislang konnte jedoch noch keine Abhängigkeit gezeigt werden. PP1, ein selektiver Inhibitor einiger Src-Kinasen, hat keinen Einfluss auf die hyperosmotisch bedingte Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase (Krump et al., 1997). Auch die Aktivierung der c-JUN NH₂-Kinase JNK ist unabhängig von den Src-Kinasen Syk und Lyn (Qin et al., 1997).

Die Beteiligung der p38 MAP-Kinase an der hyperosmotischen Induktion von IL-8 konnte in verschiedenen Zelllinien aufgewiesen werden (Shapiro und Dinarello, 1997; Hashimoto et al., 1999; Nemeth et al., 2002). Auch in den primären humanen Bronchialepithelzellen zeigte sich eine deutlich signifikante Reduktion der IL-8 mRNA Expression durch Inhibition der p38 MAP-Kinase SB-203580. Diese Inhibition war dosisabhängig und begann schon ab einer Konzentration von 5 μM (Loitsch et al., 2000). Dies ist von besonderer Bedeutung, da der Inhibitor SB-203580 ab einer Konzentration von 10 μM auch die Proteinkinase B (PKB) inhibiert und somit nicht mehr spezifisch wirkt (Lali et al., 2000).

Weiterhin zeigte sich, dass p38 MAP-Kinase durch hyperosmotischen Stress selbst phosphoryliert und damit aktiviert wird. Diese Aktivierung war zeitabhängig und erreichte ein Maximum nach 20 min um dann langsam wieder auf den Kontrollwert zurückzukehren. Dieser transiente Charakter der p38 MAP-Kinase-Aktivierung durch hyperosmotische Belastungen wird auch von Roger et al. (1999) beschrieben, der ebenfalls zeigen konnte, dass die Aktivierung der p38-MAP-Kinase wohl auf die Veränderungen des Zellvolumens und nicht auf die Hyperosmolarität an sich zurückgeht.

Die Beteiligung von ERK1/2 an der Induktion von IL-8 durch hyperosmotischen Stress wurde durch die Verwendung des MEK1-Inhibitors PD-98059 überprüft. ERK1/2 wird durch hyperosmotischen Stress aktiviert (Ragette et al. 1997) und ist an der Regulation der IL-8 mRNA-Expression durch andere Stressfaktoren beteiligt ist (Chen et al. 1999; Marie et al. 1999). Dennoch ergab sich kein Hinweis einer Beteiligung von ERK1/2 an der Induktion der IL-8-Sekretion durch osmotischen Stress in Bronchialepithelzellen. Demgegenüber stehen Befunde von Németh et al. (2002), die neben der Beteiligung von p38-MAPK, eine entsprechende Beteiligung von ERK1/2 an der hyperosmotischen Induktion von IL-8 in den immortalisierten Darmepithelzelllinien HT-29 und Caco-2 nachweisen konnten. Es ist zu vermuten, dass Bronchialepithel und Darmepithel hier unterschiedliche Signaltransduktionswege verwenden.

4.6 Reaktive Sauerstoffspezies als Signalvermittler der hyperosmotischen Induktion von IL-8

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass an der hyperosmotisch bedingten Induktion der mRNA-Expression und Sekretion von IL-8 reaktive Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt sind. Mehrere Antioxidantien aus verschiedenen Stoffklassen konnten die hyperosmotisch induzierte Sekretion von IL-8 inhibieren. Die Hydroxylradikalfänger DMSO und DMTU wiesen den größten Einfluss auf und zeigten in weiterführenden Versuchen auch einen Dosis-abhängigen Einfluss auf die Reduktion der hyperosmotisch induzierten Expression von IL-8.

Zahlreiche Untersuchungen stimmen mit diesen Ergebnissen überein. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermögen die Produktion von IL-8 in Bronchialepithelzellen zu stimulieren (DeForge et al., 1993). Des Weiteren werden ROS als wichtige sekundäre Signalmediatoren einer stetig wachsenden Anzahl von Stimuli beschrieben. So sind ROS an der zellulären Antwort auf Wachstumsfaktoren (Sundaresan et al., 1995; Lo et al., 1995), polyungesättigten Fettsäuren (PUFA; Maziere et al., 1999) und verschiedenen inflammatorischen Cytokinen (Feng et al., 1995; Tanaka et al., 1997; Vlahopoulos, et al., 1999) beteiligt.

Es gibt noch keinen direkten Nachweis einer Zunahme von ROS infolge hyperosmotischer Belastungen. Dennoch existieren eine ganze Reihe indirekter Hinweise. So induziert die hyperosmotische Belastung von Zellen der Blut-Hirnschranke der Ratte eine Zunahme einiger Enzyme, die für die Abwehr von Sauerstoffradikalen verantwortlich sind, wie der Katalase, der Superoxid-Dismutase und der Glutathion-Peroxidase (Shukla et al., 1993). Des Weiteren wird die Aktivität der Phospholipase A2 in vielen verschiedenen Zelltypen hyperosmotisch induziert (Hoffmann und Pedersen, 1998), was zu einer gesteigerten Synthese von Prostaglandinen und freien Radikalen führt, die im Rahmen der Interkonversion von Prostaglandinen entstehen (Bagchi et al., 1997). Auch viele der organischen Osmolyte besitzen eine zusätzliche

Funktion in der Abwehr oxidativer Schädigungen (Nakamura et al., 1993; Hong et al., 2000).

Da p38 MAP-Kinase an der hyperosmotischen Induktion von IL-8 beteiligt ist, wurde der Einfluss von DMSO auf die Aktivierung der p38 MAP-Kinase untersucht. Da die hyperosmotisch-bedingte Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase nach 20 min ein Maximum aufwies, wurden die Zellen nach einer 60-minütigen Vorinkubation mit DMSO, für 20 min mit 100 mM NaCl behandelt. DMSO führte zu einer zeitabhängigen Reduktion der hyperosmotisch-bedingten p38 MAP-Kinase Phosphorylierung. ROS sind in der Signaltransduktions-Kaskade folglich vor der p38 MAP-Kinase einzuordnen. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die hyperosmotisch-bedingte Induktion der Expression und Sekretion von IL-8 über eine ROS-vermittelte Aktivierung der p38 MAP-Kinase reguliert wird.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass ROS eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase induzieren (Guyton et al., 1996), wobei die p38 MAP-Kinase sogar als eine wesentliche Komponente intrazellulärer, redox-sensitiver Signalwege angesehen wird (Ushio-Fukai et al., 1998). ROS sind auch wesentlich für die hyperosmotisch bedingte Aktivierung der Src-Kinase Syk in B-Zellen (Qin et al., 1999), auch wenn die Src-Kinasen nicht zu der hyperosmotisch-bedingten Aktivierung der MAP-Kinasen beizutragen scheinen.

4.7 Veränderungen des Zellvolumens sind verantwortlich für die hyperosmotisch induzierte Inflammation

Die Störung des Wasser- und Ionenhaushalts bei der cystischen Fibrose führt nicht nur zu Einschränkungen der Produktion der Atemwegsflüssigkeit, sondern beeinträchtigt auch die Regulation des Wasser- und Ionenhaushalts der Zelle selbst. So konnte an verschiedenen CF-Modellen gezeigt werden, dass die Regulation des Zellvolumens bei CF infolge osmotischer Belastungen gestört ist (Valverde et al., 1995, Valverde et al., 2000; Seidler et al., 2001; Vazquez et al.,

2001; Cho et al., 2004; Davies et al., 2005). Wenn äußere Bedingungen zu Schwankungen der Osmolarität der Atemwegsflüssigkeit führen, müssen Epithelzellen diesen Veränderungen entgegenwirken. Im Falle des Bronchialepithels muss ein fortwährender Verlust von Wasser kompensiert werden, der alleine über die proximalen Atemwege bis zu 700 ml pro Tag betragen kann. Osmotische Belastungen sind für das Bronchialepithel von daher eher die Regel als Ausnahme. Den Bronchialepithelzellen kommt dabei nicht nur die Regulation der Atemwegsflüssigkeit zu, sondern auch der Regulation ihres eigenen Wasser- und Ionenhaushalts.

Da die Regulation des Zellvolumens bei CF-Zelllinien eingeschränkt ist, und auch die Regulation der p38 MAP-Kinase vom Zellvolumen kontrolliert wird (Roger et al., 1999), wurde überprüft, ob die hyperosmotische Induktion der IL-6 und IL-8 Sekretion abhängig von Veränderungen des Zellvolumens ist. Die Behandlung mit NaCl, Mannitol und Harnstoff mit gleicher Osmolarität zeigte, dass nur NaCl und Mannitol zu einer Volumenabnahme der Zelle führen. Harnstoff kann die Zellmembran passieren und verändert trotz gleicher Osmolarität das Zellvolumen nicht. Nur NaCl und Mannitol verursachten eine Induktion der Sekretion inflammatorischer Zytokine. Die Induktion der Sekretion von IL-6 und IL-8 ist folglich eher von osmotisch bedingten Veränderungen des Zellvolumens abhängig, als von der Hyperosmolarität an sich.

Dennoch müssen die Versuche über den Einfluss von NaCl, Mannitol und Harnstoff auf das Zellvolumen kritischer betrachtet werden. Harnstoff kann biologische Membranen passieren und hat mit Sicherheit keinen Einfluss auf das Zellvolumen. Eine Behandlung mit hyperosmotischem NaCl und Mannitol wird neben dem Einfluss auf das Zellvolumen aber eine zusätzliche Störung des Ionenhaushalts verursachen, die infolge Harnstoff vermutlich nicht auftritt.

Rein Zellvolumen-abhängige Prozesse sind auch bei dieser von den meisten Arbeitsgruppen favorisierten Vorgehensweise nur mit Einschränkungen zu interpretieren. Die hyperosmotische Induktion der Sekretion von IL-6 und IL-8 ist sicherlich nur zum Teil abhängig vom Zellvolumen. Betrachtet man die zeitabhängige Induktion der IL-8 mRNA-Expression (**siehe 3.4.2; Abb. 3.11 B**), so fällt auf, dass die Induktion nach 6 h ein Maximum des 20-fachen des

Kontrollwerts erreicht und nach 24 h auf das 5-fache des Kontrollwerts abfällt. Der initiale Anstieg ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Veränderungen des Zellvolumens zurückzuführen. Da diese in der Regel nach 6 h kompensatorisch ausgeglichen sind, muss die persistierend hohe IL-8 mRNA-Expression nach 24 h Ursachen haben, die unabhängig vom Zellvolumen sind.

Nach wie vor ist unklar, auf welche Weise eine Zelle osmotische Veränderungen perzeptiert. Diskutiert werden: 1) Zellvolumenveränderungen die sich über mechanische Veränderungen der Membran oder mechanische Veränderungen des Exo- oder Zytoskeletts auswirken können, 2) Veränderungen der cytoplasmatischen Ionenstärke, 3) eine Änderung der Hydratisierung von Proteinen sowie 4) physikochemische Veränderungen des Membran-Bilayers über Protein-Lipid-Interaktionen (zur Übersicht: Poolman et al., 2002; Davies et al., 2005). Zellvolumenveränderungen können an adhärenen Zellen über mechanische Reize aufgenommen werden, die durch Integrine und die *focal adhesion kinase* (FAK) weitergeleitet werden (Lunn und Rozengurt, 2004). Dieses mechanische Modell würde bei Bronchialepithelzellen dazu führen, dass nicht nur der eigene Wasser- und Ionenhaushalt gemessen werden kann, sondern auch die Zusammensetzung der Atemwegsflüssigkeit. Für die cystische Fibrose kann die Störung der Regulation des Zellvolumens einen Verlust beider Funktionen erklären. Die vorhandenen Daten zeigen weiterhin, dass entzündliche Prozesse durch eine Störung des Ionenhaushalts über Veränderungen des Zellvolumens hervorgerufen werden können.

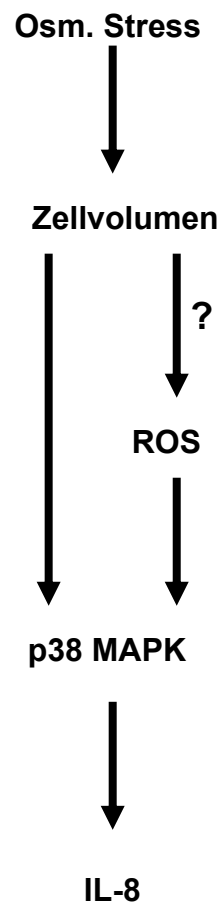


Abb. 4.2 : Schema der Signaltransduktion der hyperosmotischen Induktion von Sekretion und Expression von IL-8 in Bronchialepithelzellen. Die Induktion wird vermittelt von einer Aktivierung der p38-MAP-Kinase, die von Veränderungen de Zellvolumens und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) abhängig ist. Ob die Veränderungen des Zellvolumens ursächlich für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies sind, ist unbekannt.

5 Zusammenfassung

Für die geplanten Untersuchungen wurde eine eigene Methode für die Kultur primärer humaner Bronchialepithelzellen etabliert. Die Bronchialepithelzellen wurden aus Lungenteilresektaten durch eine cytologische Bürstung gewonnen. Die verwendeten Kulturschalen wurden mit Kollagen beschichtet. Als serumfreie Kulturmedien wurden ein Expansionsmedium und ein Differenzierungsmedium verwendet. Dabei enthielt das Expansionsmedium proliferationsfördernde Supplemente, was zu einer deutlich gesteigerten Zellausbeute gegenüber der Verwendung handelsüblicher Medien führte. Im Differenzierungsmedium wurden Supplemente verwendet, die für die Differenzierung und Ziliogenese bronchialer Epithelzellen erforderlich sind. Die Kultur erfolgte an einer Luft-Medium-Grenzfläche, die für Bronchialepithelzellen eine physiologische Umgebung darstellt. Die Charakterisierung der Kulturen zeigte keine Verunreinigungen mit Fibroblasten, Muskelzellen oder Zellen mesenchymalen Ursprungs. Das charakteristische kopfsteinplasterartige Erscheinungsbild, sowie der immunhistochemische Nachweis von Cytokeratin 18 belegten den bronchoepithelialen Charakter der Kulturen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der RT-kompetitive Multiplex-PCR (RCMP) eine Technik entwickelt, mit deren Hilfe die Expression von Genen in niedriger Kopienzahl oder aber in Proben mit geringer RNA-Menge nachgewiesen werden kann. Geringe Ausgangsmengen an RNA wiesen vor allem die Primärkulturen von humanem Bronchialepithel, als auch frische Gewebebürstungen des Bronchial- und Nasenepithels auf. Die RCMP basiert auf einer kompetitiven PCR und kombiniert eine exogen interne und endogen interne Standardisierung. Damit wurde die mRNA-Expression von bis zu vier Genen in einem Ansatz analysiert. Die RCMP löst dabei mehrere Probleme herkömmlicher PCR-Verfahren:

1. mRNAs mit hoher oder niedriger Kopienzahl können in einem Ansatz koamplifiziert werden.

2. Die semiquantitative Quantifizierung ist unabhängig von den Syntheseeffizienzen von Target und Referenzgenen.
3. Die RCMP kontrolliert Schwankungen der initialen RNA-Menge.
4. Die Unabhängigkeit der RCMP von der Kenntnis der initialen RNA Menge erlaubt auch die Bestimmung von Probenmaterial in dem nur geringe mRNA-Mengen vorhanden sind.

Damit eignet sich die RCMP besonders für Expressionsstudien Materialien wie Biopaten, Nasal- oder Bronchialbürstungen, sowie den Kulturen primärer Bronchialepithelzellen.

Mit Hilfe der RCMP wurden erstmals die mRNA der Osmolyttransporter BGT-1, SMIT und TAUT in Bronchialepithelzellen nachgewiesen. Nach Behandlung mit hyperosmotischen Medien wurde die mRNA-Expression dieser Transporter stark induziert. Bronchialepithelzellen perzeptieren osmotische Belastungen und versuchen, ihnen entgegenzuwirken.

Hyperosmotische Belastungen können in Bronchialepithelien zu einer Inflammation ohne zugrunde liegende Infektion führen. Dabei wird zeit- und dosisabhängig sowohl die Sekretion als auch die Expression von IL-8 induziert. An dieser Induktion ist die p38 MAP-Kinase beteiligt.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind sowohl an der Induktion der IL-8 Sekretion und Expression beteiligt, als auch an der Aktivierung der p38 MAP-Kinase.

Weiterhin zeigte sich, dass die Induktion der Sekretion von IL-6 und IL-8 abhängig von osmotisch bedingten Änderungen des Zellvolumens ist. Auch hier wird bereits die p38 MAP-Kinase durch das Zellvolumen reguliert.

Die Ergebnisse legen ein mögliches Modell für die initialen Vorgänge in der CF-Lunge nahe. Die Veränderungen des Ionenhaushalts bei der cystischen Fibrose, sowie die eingeschränkte Zellvolumenkontrolle bei CF-Zelllinien, weisen darauf hin, dass ein defektes CFTR-Protein zu einer von neutrophilen Granulozyten dominierten Inflammation führen kann, ohne dass die Lunge bereits mit Erregern besiedelt wurde.

6 Abkürzungen

AE	Anionenaustauscher (<i>anion exchanger</i>)
ASL	Atemwegsflüssigkeit (<i>airway surface liquid</i>)
ATP	Adenosintri-phosphat
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
BGT-1	Betain/GABA-Transporter
CF	cystische Fibrose; Mukoviszidose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
DEPC	Diethyl-Pyrocbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTU	1,3-Dimethyl-2-Thiourea
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENaC	epithelialer Natrium-Kanal (<i>epithelial sodium channel</i>)
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward light scatter</i>)
GTP	Guanosintri-phosphat
h	Stunden
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure)
NBD	Nukleotidbindedomäne
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher (<i>Na⁺/H⁺ exchanger</i>)
NKCC	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter
ORCC	<i>outwardly rectifying chloride channel</i>
PKA	Proteinkinase A
ROMK	renaler sekretorischer K ⁺ -Kanal (<i>renal outer medullary potassium channel</i>)
SMIT	Natrium-Myo-Inositol-Kotransporter (<i>sodium-myo-inositol cotransporter</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward light scatter</i>)
TAUT	Taurin-Transporter
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne

7 Literatur

- Abe, J., Kusahara, M., Ulevitch, R.J., Berk, B.C., Lee, J.D. (1996). Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J. Biol. Chem.* **271**: 16586-16590.
- Andersen, D.H. (1938). Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. *Am. J. Dis. Child.* **56**: 344. (zitiert nach Busch, R.)
- Anderson, M.P., Rich, D.P., Gregory, R.J., Smith, A.E., Welsh, M.J. (1991a). Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* **251**: 679-682.
- Anderson, M.P., Gregory, R.J., Thompson, S., Souza, D.W., Paul, S., Mulligan, R.C., Smith, A.E., Welsh, M.J. (1991b). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* **253**: 202-205.
- Anderson, M.P., Berger, H.A., Rich, D.P., Gregory, R.J., Smith, A.E., Welsh, M.J. (1991c). Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell* **67**: 775-784.
- Anderson, M.P., Welsh, M.J. (1992). Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science* **257**: 1701-1704.
- Anderson, S.D. (1984). Is there a unifying hypothesis for exercise-induced asthma? *J. Allergy Clin. Immunol.* **73**: 660-665.
- Anderson, S. D. (1996). Exercise-induced asthma and the use of hypertonic saline aerosol as a bronchial challenge. *Respirology* **1**: 175-181.
- Apostolakos, M.J., Schuermann, W.H.T., Frampton, M.W., Utell, M.J., Willey, J.C. (1993). Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **213**: 277-284.
- Auboeuf, D, Vidal H. (1997). The use of the reverse transcription-competitive polymerase chain reaction to investigate the *in vivo* regulation of gene expression in small tissue samples. *Anal. Biochem.* **245**: 141-148.
- Bagchi, D., Wetscher, G.J., Bagchi, M., Hinder, P.R., Perdakis G., Stohs, S.J., Hinder, R.A., Das, D.K. (1997). Interrelationship between cellular calcium homeostasis and free radical generation in myocardial reperfusion injury. *Chem Biol Interact.* **104(2)**: 65-85. (Übersichtsartikel)
- Balough, K.R., McCubbin, M., Weinberger, M., Smits, W., Ahrens, R., Fick, R. (1995). The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **20**: 63-70.
- Bals, R., Weiner, D.J., Wilson, J.M. (1999). The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Invest.* **103**: 303-307.
- Bargon, J., Trapnell, B.C., Yoshimura, K., Dalemans, W., Pavirani, A., Lecocq, J.P., Crystal, R.G. (1992). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene can be regulated by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **267**: 16056-16060.

- Baudouin-Legros, M., Brouillard, F., Cougnon, M., Tondelier, D., Leclerc, T., Edelman, A. (2000). Modulation of CFTR gene expression in HT-29 cells by extracellular hyperosmolarity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **278**: C49-C56.
- Bear, C.E., Duguay, F., Naismith, A.L., Kartner, N., Hanrahan, J.W., Riordan, J.R. (1991). Cl-channel activity in *Xenopus* oocytes expressing the cystic fibrosis gene. *J. Biol. Chem.* **266**: 19142-19145.
- Bear, C.E., Li, C.H., Kartner, N., Bridges, R.J., Jensen, T.J., Ramjeeasingh, M., Riordan, J.R. (1992). Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* **68**: 809-818.
- Bebok, Z., Mazzochi, C., King, S.A., Hong, J.S., Sorscher, E.J. (1998). The mechanism underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61beta and a cytosolic, deglycosylated intermediary. *J. Biol. Chem.* **273**: 29873-29878.
- Becker-André, M., Hahlbrock, K. (1989). Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res.* **17**: 9437-46.
- Becq, F., Fanjul, M., Merten, M., Figarella, C., Hollande, E., Gola, M. (1993). Possible regulation of CFTR-chloride channels by membrane-bound phosphatases in pancreatic duct cells. *FEBS Lett.* **327**: 337-342.
- Berger, H.A., Travis, S.M., Welsh, M.J. (1993). Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel by specific protein kinases and phosphatases. *J. Biol. Chem.* **268**: 2037-2047.
- Boat, T.F., Welsh, M.J., Beaudet, A.L. (1989). Cystic fibrosis. In C.R. Scriver, A.L., Beaudet, W.S. Sly and D. Valle. Editors. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6. Ausgabe, McGraw-Hill, New York. 2649-2680.
- Bonfield, T.L., Panuska, J.R., Konstan, M.W., Hilliard, K.A., Hilliard, J.B., Ghnaim, H., Berger M. (1995). Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**: 2111-2118.
- Borden, L.A., Smith, K.E., Gustafson, E.L., Brancheck, T.A., Weinshank, R.L. (1995). Cloning and expression of a betaine/GABA transporter from human brain. *J. Neurochem.* **64(3)**: 977-984.
- Boucher, R.C., Sutts, M.J., Bromberg, P.A., Gatzky, J.T. (1981). Regional differences in airway surface liquid composition. *J. Appl. Physiol.* **50**: 613-620.
- Boucher, R.C. (1994a). Human airway ion transport. Part one. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**: 271-281.
- Boucher, R.C. (1994b). Human airway ion transport. Part two. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**: 281-293.
- Burg, M.B. (1994). Molecular basis for osmoregulation of organic osmolytes in renal medullary cells. *J. Exp. Zool.* **268**: 171-175.

- Busch, R. (1990). On the history of of cystic fibrosis. *Acta Univ. Carol.* **36**: 13-15.
- Cano, E., Mahadevan, L.C. (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 117-122.
- Carson, M.R., Travis, S.M., Welsh, M.J. (1995). The two nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J. Biol. Chem.* **270**: 1711-1717.
- Celi, F.S., Zenilmann, M.E., Shuldiner, A.R. (1993). A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1047.
- Chao, A.C., de Sauvage, F.J., Dong, Y.J., Wagner, J.A., Goeddel, D.V., Gardner, P. (1994). Activation of intestinal CFTR Cl⁻ channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J.* **13**: 1065-1072.
- Chelly, J., Montarras, D., Pinset, C., Berwald-Netter, Y., Kaplan, J.C., Kahn, A. (1990). Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *Eur. J. Biochem.* **187**: 691-698.
- Chen, Q., Kinch, M.S., Lin, T.H., Burridge, K., Juliano, R.L. (1994). Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **269**: 26602-26605.
- Chen, W., Monick, M.M., Carter, A.B., Hunninghake, G.W. (1999). Activation of ERK2 by respiratory syncytial virus in A549 cells is linked to the production of interleukin 8. *Exp. Lung Res.* **26**: 13-26.
- Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., White, G.A., O'Riordan, C.R. and Smith, A.E. (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* **63**: 827-834.
- Cheng, S.H., Fang, S.L., Zabner, J., Marshall, J., Piraino, S., Schiavi, S.C., Jefferson, D.M., Welsh, M.J., Smith, A.E. (1995). Functional activation of the cystic fibrosis trafficking mutant delta F508-CFTR by overexpression. *Am. J. Physiol.* **268**: L615-624.
- Cheung, M., Akabas, M.H. (1996). Identification of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel-lining residues in and flanking the M6 membrane-spanning segment. *Biophys. J.* **70**: 2688-2695.
- Chmiel, J.F., Konstan, M.W., Knesebeck, J.E., Hilliard, J.B., Bonfield, T.L., Dawson, D.V., Berger, M. (1999). IL-10 attenuates excessive inflammation in chronic Pseudomonas infection in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**: 2040-2047.
- Chmiel, J.F., Konstan, M.W., Saadane, A., Krenicky, J.E., Kirchner, H.L., Berger, M. (2002). Prolonged inflammatory response to acute Pseudomonas challenge in interleukin-10 knockout mice. **165**: 1176-1181.
- Cho, W.K., Siegrist, V.J., Zinzow, W. (2004). Impaired regulatory volume decrease in freshly isolated cholangiocytes from cystic fibrosis mice: implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator effect on potassium conductance. *J. Biol. Chem.* **279**: 14610-14618.

- Choi, J.Y., Muallem, D., Kiselyov, K., Lee, M.G., Thomas, P.J., Muallem, S. (2001). Aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature* **410**: 94-97.
- Clark, E. A., Brugge, J. S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**: 233-239.
- Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* **270**: 14843-14846.
- Cottrez, F., Auriault, C., Capron, A., Groux, H. (1994). Quantitative PCR: validation of the use of a multispecific internal control. *Nucleic Acids Res.* **22**: 2712-2713.
- Cozens, A.L., Yezzi, M.J., Kunzelmann, K., Ohri, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W.E., Widdicombe, J.H., Gruenert, D.C. (1994). CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **10**: 38-47.
- Davies, M.G., Geddes, D.M., Alton, E.W.F.W. (2005). The effect of varying tonicity on nasal epithelial ion transport in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**: 760-763.
- DeForge, L.E., Preston, A.M., Takeuchi, E., Kenney, J., Boxer, L.A., Remick, D.G. (1993). Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J. Biol. Chem.* **268**: 25568-25576.
- de Jong, P.M., van Sterkenburg, M.A., Hesseling, S.C., Kempenaar, J.A., Mulder, A.A., Mommaas, A.M., Dijkman, J.H., Ponec, M. (1994). Ciliogenesis in human bronchial epithelial cells cultured at the air-liquid interface. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **10(3)**: 271-277.
- de Kant, E., Rochlitz, C.F., Herrmann, R. (1994). Gene expression analysis by a competitive and differential PCR with antisense competitors. *BioTechniques* **17**: 934-942.
- Deluca, L.M. (1991). Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J* **5**: 2924-2933.
- Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J.F., Marshall, J., Smith, A.E., Welsh, M.J. (1992). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**: 761-764.
- Di Sant'Agnes, P.A., Darling, R.C., Perera, G.A., Shea, E. (1953). Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* **12(5)**:549-563. (zitiert nach Busch, R.)
- Dostal, D.E., Rothblum, K.N., Baker, K.M. (1994). An improved method for absolute quantification of mRNA using multiplex polymerase chain reaction: determination of renin and angiotensin mRNA levels in various tissues. *Anal. Biochem.* **223**: 239-250.
- Dowd, B.F., Forbush, B. (2003). PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J. Biol. Chem.* **278**: 27347-27353.

- Drumm, M.L., Pope, H.A., Cliff, W.H., Rommens, J.M., Marvin, S.A., Tsui, L.C., Collins, F.S., Frizzell, R.A., Wilson, J.M. (1990). Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* **62**: 1227-1233.
- Edwards, G., Streuli, C. (1995). Signaling in extracellular matrix-mediated control of epithelial cell phenotype. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 464-468.
- Egan, M., Flotte, T., Afione, S., Solow, R., Zeitlin, P.L., Carter, B.J., Guggino, W.B. (1992). Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature* **358**: 581-584.
- Egee, S., Lapaix, F., Decherf, G., Staines, H.M., Ellory, J.C., Doerig, C., Thomas, S.L. (2000) A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Physiol.* **542**: 795-801.
- Fanconi, G., Uehlinger, E., Knauer, C. (1936). Das Coeliakiesyndrom bei angeborener cystischer Pancreasfibromatose und Bronchiektasien. *Wien. med. Wochenschr.* **86**: 753. (zitiert nach Busch, R.)
- Feng, L., Xia, Y., Garcia, G.E., Hwang, D., Wilson, C.B. (1995). Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- α , and lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* **95**: 1669-1675.
- Feranchak, A.P., Berl, T., Capasso, J., Wojtaszek, P.A., Han, J., Fitz, J.G. (2001). p38 MAP kinase modulates liver cell volume through inhibition of membrane Na⁺-permeability. *J. Clin. Invest.* **108**:1495-1504.
- Fischer, H., Machen, T.E. (1996). The tyrosine kinase p60c-src regulates the fast gate of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Biophys. J.* **71**: 3073-3082.
- French, P.J., Bijman, J., Edixhoven, M., Vaandrager, A.B., Scholte, B.J., Lohmann, S.M., Nairn, A.C., de Jonge, H.R. (1995) Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* **270**: 26626-26631.
- Gabriel, S.E., Brigman, K.N., Koller, B.H., Boucher, R.C., Stutts, M.J. (1994). Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* **266**: 107-109.
- Garrod, A.E., Hurtley, W.H. (1912). Congenital family steatorrhoea. *Q. J. Med.* **6**: 242-258. (zitiert nach Busch, R.)
- Gassen, H.G., Schrimpf, G. (1999). Genetische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Gilliland, G., Perrin S., Blanchard K., Bunn H.F. (1990). Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2725-2729.

- Goldman, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., Kari, U.P., Zasloff, M., Wilson, J.M. (1997). Human beta-defensin-1 is a salt sensitive antibiotic in the lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **88**: 553-560.
- Gray, T.E., Guzman, K., Davis, C.W., Abdullah, L.H., Nettekheim P. (1996). Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **14**: 104-112.
- Gregory, R.J., Rich, D.P., Cheng, S.H., Souza, D.W., Paul, S., Manavalan, P., Anderson, M.P., Welsh, M.J., Smith, AE. (1991). Maturation and function of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator variants bearing mutations in putative nucleotide-binding domains 1 and 2. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3886-3893.
- Grubb, B.R., Vick, R.N., Boucher, R.C. (1994). Hyperabsorption of Na⁺ and raised Ca²⁺-mediated Cl⁻ secretion in nasal epithelia of CF mice. *Am. J. Physiol.* **266**: 1478-1483.
- Guba, M., Kuhn, M., Forssmann, W.G., Classen, M., Gregor, M., Seidler, U. (1996). Guanylin strongly stimulates rat duodenal HCO₃⁻ secretion: proposed mechanism and comparison with other secretagogues. *Gastroenterology* **111**: 1558-1568.
- Guyton, K.Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., Holbrook, N.J. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J. Biol. Chem.* **271**: 4138-4142.
- Hadorn, B., Zoppi, G., Shmerling, D.H., Prader, A., McIntyre, I., Anderson, C.M. (1968). Quantitative assessment of exocrine pancreatic function in infants and children. *J. Pediatr.* **73**: 39-50.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**: 808-811.
- Handler JS, Kwon HM. (1993). Regulation of renal cell organic osmolyte transport by tonicity. *Am. J. Physiol.* **265(6 Pt 1)**: C1449-1455.
- Hara, E., Reinach, P.S., Wen, Q., Iserovich, P., Fischbarg, J. (1999). Fluoxetine inhibits K⁺ transport pathways (K⁺ efflux, Na⁺-K⁺-2Cl cotransport and Na⁺ pump) underlying volume regulation in corneal endothelial cells. *J. Membrane Biol.* **171**: 75-85.
- Hashimoto, S., Matsumoto, K., Gon, Y., Nakayama, T., Takeshita, I., and Horie, T. (1999). Hyperosmolarity-induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**: 634-640.
- He, Q., Marjamäki, M., Soini, H., Mertsola, J., Viljanen, M.K. (1994). Primers are decisive for sensitivity of PCR. *Biotechniques* **17**: 82-87.
- Heckner, F., Freund, M. (2001). *Praktikum der mikroskopischen Hämatologie*. Urban & Fischer Verlag.
- Hengen P.N. (1995). Methods and reagents. Quantitative PCR: an accurate measure of mRNA? *Trends Biochem. Sci.* **20(11)**: 476-477.

- Henrard, D.R., Mehaffey, W.F., Allain, J.P. (1992). A sensitive viral capture assay for detection of plasma viremia in HIV-infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8(1)**: 47-52.
- Herrlich, A., Leitch, V., King, L.S. (2004). Role of proneuregulin 1 cleavage and human epidermal growth factor receptor activation in hypertonic aquaporin induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101 (44)**: 15799-15804
- Hwang, T.-C., Lu, L., Zeitlin, P.L., Gruenert, D.C., Haganir, R., Guggino, W.B. (1989). Chloride channels in CF: lack of activation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science* **244**: 1351-1353.
- Hwang, T.-C., Horie, M., Gadsby, D.C. (1993). Functionally distinct phospho-forms underlie incremental activation of protein kinase-regulated Cl conductance in mammalian heart. *J. Gen. Physiol.* **101**: 629-650.
- Hwang, T.C., Nagel, G., Nairn, A.C., Gadsby, D.C. (1994). Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator C1 channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 4698-4702.
- Ho, K., Nichols, C.G., Lederer, W.J., Lytton, J., Vassilev, P.M., Kanazirska, M.V., Hebert, S.C. (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* **362**: 31-38.
- Hoffmann, E.K., Pedersen, S.F. (1998). Sensors and signal transduction in the activation of cell volume regulatory ion transport systems. *Contrib. Nephrol.* **123**: 50-78. (Übersichtsartikel)
- Holma, B., Hegg, P.O. (1989) pH- and protein-dependent buffer capacity and viscosity of respiratory mucus. Their interrelationships and influence on health. *Sci. Total Environ.* **84**:71-82. Zitiert nach: Quinton, P. (2001). The neglected ion: HCO₃⁻. *Nature medicine* **7**: 292-293.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D.P. (2000). Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carbolate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* **122(4)**: 1129-1136.
- Hopf, A., Schreiber, R., Mall, M., Greger, R., Kunzelmann, K. (1999). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits epithelial Na⁺ channels carrying Liddle's syndrome mutations. *J. Biol. Chem.* **274(20)**: 13894-13899.
- Housley, R.M., Morris, C.F., Boyle, W., Ring, B., Biltz, R., Tarpley, J.E., Aukerman, S.L., Devine, P.L., Pierce, G.F. (1994). Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. *J. Clin. Invest.* **94**: 1764-1777.
- Ismailov, I.I., Berdiev, B.K., Shlyonsky, V.G., Fuller, C.M., Prat, A.G., Jovov, B., Cantiello, H.F., Ausiello, D.A., Benos, D.J. (1997). Role of actin in regulation of epithelial sodium channels by CFTR. *Am. J. Physiol.* **272**: C1077-1086.

- Itoh, T., Yamauchi, A., Miyai, A., Yokoyama, K., Kamada, T., Ueda, N., Fujiwara, Y. (1994). Mitogen-activated protein kinase and its activator are regulated by hypertonic stress in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Clin. Invest.* **93**: 2387-2392.
- Jayaraman, S., Joo, N.S., Reitz, B., Wine, J.J., Verkman A.S. (2001a). Submucosal gland secretions in airways from cystic fibrosis patients have normal (Na⁺) and pH but elevated viscosity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 119-123.
- Jayaraman, S., Song, Y., Vetrivel, L., Shankar, L., Verkman, A.S. (2001b). Noninvasive in vivo fluorescence measurement of airway-surface liquid depth, salt concentration and pH. *J. Clin. Invest.* **107**:317-324.
- Jenkins, F.J. (1994). Basic methods for the detection of PCR products. *PCR Methods Appl.* **3**: S77-82.
- Jensen, T.J., Loo, M.A., Pind, S., Williams, D.B., Goldberg, A.L., Riordan, J.R. (1995). Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* **83**: 129-35.
- Jetten, A. M., Brody, A. R., Deas, M. A., Hook, G. E. R., Rearick, J. I., Thacher, S. M. (1987). Retinoic acid and substratum regulate the differentiation of rabbit tracheal epithelial cells into squamous and secretory phenotype. *Lab. Investig.* **56**: 654-664.
- Ji. H.L, Fuller, C.M. Benos, D.J. (1998). Osmotic pressure regulates alpha beta gamma-rENaC expressed in Xenopus oocytes. *Am. J. Physiol.* **275**: C1182-1190.
- Ji. H.L., Chalfant, M.L., Jovov, B., Lockhart, J.P., Parker, S.B., Fuller, C.M., Stanton, B.A., Benos, D.J. (2000). The cytosolic termini of the beta- and gamma-ENaC subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* **275**: 27947-27956.
- Jia, Y., Mathews, C.J., Hanrahan, J.W. (1997). Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **272**: 4978-4984.
- Kapus ,A., Szaszi, K., Sun, J., Rizoli, S., Rotstein, O.D. (1999). Cell shrinkage regulates Src kinases and induces tyrosine phosphorylation of cortactin, independent of the osmotic regulation of Na⁺/H⁺ exchangers. *J. Biol. Chem.* **274**: 8093-8102.
- Kartner, N., Augustinas, O., Jensen, T.J., Naismith, A.L., Riordan, J.R. (1992). Mislocalization of delta F508 in cystic fibrosis sweat gland. *Nat. Genet.* **1**: 321-327.
- Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**: 1073-80.
- Khan, T.Z., Wagener, J.S., Bost, T., Martinez, J., Accurso, F., Riches, D.W.H. (1995). Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**: 1075-1082.

- King, W. G., Mattaliano, M. D., Chan, T.O., Tschlis, P.N., Brugge, J.S. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 4406-4418.
- Kopelman, H., Durie, P., Gaskin, K., Weizman, Z., Forstner, G.(1985). Pancreatic fluid secretion and protein hyperconcentration in cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **312**: 329-334.
- Krump, E., Nikitas, K., Grinstein, S. (1997). Induction of tyrosine phosphorylation and Na⁺/H⁺ exchanger activation during shrinkage of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **272**: 17303-17311.
- Kunzelmann, K., Kathofer, S., Greger, R. (1995). Na⁺ and Cl⁻ conductances in airway epithelial cells: increased Na⁺ conductance in cystic fibrosis. *Pflugers Arch.* **431(1)**: 1-9.
- Kunzelmann, K., Kiser, G.L., Schreiber, R., Riordan, J.R. (1997). Inhibition of epithelial Na⁺ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett.* **400(3)**: 341-344.
- Kwon, H.M., Yamauchi, A., Uchida, S., Preston, A.S., Garcia-Perez, A., Burg, M.B., Handler, J.S. (1992). Cloning of the cDNA for a Na⁺/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J. Biol. Chem.* **267(9)**: 6297-6301.
- Kwon, H.M., Handler, J.S. (1995). Cell volume regulated transporters of compatible osmolytes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7(4)**: 465-471.
- Lali, F.V., Hunt, A.E., Turner, S.J., Foxwell, B.M. (2000). The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **275(10)**: 7395-7402.
- Landsteiner, K. (1905) Darmverschluss durch eingedicktes Meconium. Pankreatitis. *Centr. Allg. Pathol.* **16**: 903-907. (zitiert nach Busch, R.)
- Larson, M., Spring, K.R. (1987). Volume Regulation in Epithelia. In: *Current Topics in Membranes and Transport. Vol. 30. Acad. Press. Inc.*: 105-123.
- Lechner, J.F., Haugen, A., McClendon I.A., Shamsuddin, A.M. (1984). Induction of squamous differentiation of normal human bronchial epithelial cells by small amounts of serum. *Differentiation* **25(3)**: 229-237.
- Lechner, J.F., LaVeck, M.A. (1985). A serum free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. *J. Tissue Cult. Methods* **9**: 43-48.
- Levinson, C. (1992). Regulatory volume increase in ehrlich ascites tumor cells is mediated by the Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransport system. *J. Membrane Biol.* **176**: 277-284.
- Li, M., McCann, J.D., Liedtke, C.M., Nairn, A.C., Greengard, P., Welsh, M.J. (1988). Cyclic AMP-dependent protein kinase opens chloride channels in normal but not cystic fibrosis airway epithelium. *Nature* **331**: 358-360.
- Lin, C.Q., Bissell, M.J. (1993). Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* **7**: 737-743.

- Lo, Y.Y., Cruz, T.F. (1995). Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **270**: 11727-11730.
- Loitsch, S.M., Kippenberger, S., Dauletbaev, N., Wagner, T.O.F., Bargon, J. (1999). Reverse transcription competitive multiplex PCR improves quantification of mRNA in clinical samples – application to the low abundance *CFTR* mRNA. *Clin. Chem.* **45**: 619-624.
- Loo, M.A., Jensen, T.J., Cui, L., Hou, Y., Chang, X.B., Riordan, J.R. (1998). Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J.* **17**: 6879-6887.
- Loussouarn, G., Demolombe, S., Mohammad-Panah, R., Escande, D., Baro, I. (1996). Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K⁺ currents. *Am. J. Physiol.* **271**: C1565-1573.
- Lukacs, G.L., Mohamed, A., Kartner, N., Chang, X.B., Riordan, J.R., Grinstein, S. (1994). Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J.* **13**: 6076-6086.
- Lunn, J.A., Rozengurt, E. (2004). Hyperosmotic stress induces rapid focal adhesion kinase phosphorylation at tyrosines 397 and 577. *J. Biol. Chem.* **279**: 45266-45278.
- Luo, J., Pato, M.D., Riordan, J.R., Hanrahan, J.W. (1998). Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **274**: C1397-C1410.
- Ma, T., Hara, M., Sougrat, R., Verbavatz, J.M., Verkman, A.S. (2002). Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *J. Biol. Chem.* **277(19)**: 17147-17153.
- Mall, M., Bleich, M., Greger, R., Schreiber, R., Kunzelmann, K. (1998). The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *J. Clin. Invest.* **102**: 15-21.
- Marie, C., Roman-Roman, S., Rawadi, G. (1999). Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in interleukin-8 production by human monocytes and polymorphonuclear cells stimulated with lipopolysaccharide or *Mycoplasma fermentans* membrane lipoproteins. *Infect. Immun.* **67**: 688-693.
- Marini, M., Vittori, E., Hollemborg, J., Mattoli, S. (1992). Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**: 1001-1009.
- Mason, R.J., Lewis, M.C., Edeen, K.E., McCormick-Shannon, K., Nielsen, L.D., Shannon, J.M. (2002). Maintenance of surfactant protein A and D secretion by rat alveolar type II cells in vitro. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **282**: L249-258.
- Mathews, C.J., Tabcharani, J.A., Chang, X.B., Jensen, T.J., Riordan, J.R., Hanrahan, J.W. (1998). Dibasic protein kinase A sites regulate bursting rate and nucleotide sensitivity

- of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *J. Physiol.* **508**: 365-377.
- Matsuda, S., Kawasaki, H., Moriguchi, T., Gotoh, Y., Nishida, E. (1995). Activation of protein kinase cascades by osmotic shock. *J. Biol. Chem.* **270**: 12781-12786.
- Matsui, H., Grubb, B.R., Tarran, R., Randell, S.H., Gatzky, J.T., Davis, C.W., Boucher, R.C. (1998). Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* **95**: 1005-1015.
- Maziere, C., Conte, M.A., Degonville, J., Ali, D., Maziere, J.C. (1999). Cellular enrichment with polyunsaturated fatty acids induces an oxidative stress and activates the transcription factors AP1 and NFkappaB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**: 116-122.
- McCulloch, R.K., Choong, C.S., Hurley, D.M. (1995). An evaluation of competitor type and size for use in the determination of mRNA by competitive PCR. *PCR Methods Appl.* **4**: 219-226.
- McDonough, S., Davidson, N., Lester, H.A., McCarty, N.A. (1994). Novel pore-lining residues in CFTR that govern permeation and open-channel block. *Neuron* **13**: 623-634.
- McNicholas, C.M., Guggino, W.B., Schwiebert, E.M., Hebert, S.C., Giebisch, G., Egan, M.E. (1996). Sensitivity of a renal K⁺ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8083-8088.
- McNicholas, C.M., Nason, M.W. Jr, Guggino, W.B., Schwiebert, E.M., Hebert, S.C., Giebisch, G., Egan, M.E. (1997). A functional CFTR-NBF1 is required for ROMK2-CFTR interaction. *Am. J. Physiol.* **273**: F843-848.
- Meacham, G.C., Lu, Z., King, S., Sorscher, E., Tousson, A., Cyr, D.M. (1999). The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J.* **18**: 1492-1505.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M., Cyr, D.M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell. Biol.* **3**: 100-105.
- Mohler, K.M., Butler, L.D. (1991). Quantitation of cytokine mRNA levels utilizing the reverse transcriptase-polymerase chain reaction following primary antigen-specific sensitization in vivo –I. Verification of linearity, reproducibility and specificity. *Mol. Immunol.* **28**: 437-447.
- Morral, N., Nunes, V., Casals, T., Chillon, M., Gimenez, J., Bertranpetit, J., Estivill, X. (1993). Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum. Mol. Genet.* **2**:1015-1022.
- Morral, N., Bertranpetit, J., Estivill, X., Nunes, V., Casals, T., Gimenez, J., Reis, A., Varon-Mateeva, R., Macek, M. Jr., Kalaydjieva, L., Angelicheva, D., Dancheva, R., Romeo, G., Russo, M.P., Gernerone, S., Restagno, G., Ferrari, M., Magnani, C., Claustres, M., Desgeorges, M., Schwartz, M., Schwarz, M., Dallapiccola, B., Novelli, G., Ferec, C., De

- Arce, M., Nemeti, M., Kere J., Anvret, M., Dahl, N., Kadasi, L. (1994). The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat. Genetics* **7**: 169-175.
- Morrison, C., Gannon, F. (1994). The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochim. Biophys. Acta* **1219**: 493-498.
- Mularoni, A., Adessi, G.L., Arbez-Gindre, F., Agnani, G., Nicollier, M. (1996). Competitive RT-PCR to quantify CFTR mRNA in human endometrium. *Clin. Chem.* **42**: 1765-1769.
- Nakamura, T., Ogasawara, M., Koyama, I., Nemoto, M., Yoshida, T. (1993). The protective effect of taurine on the biomembrane against damage produced by oxygen radicals. *Biol. Pharm. Bull.* **16(10)**: 970-972.
- Németh, Z.H., Deitch, E.A., Szabó, C., Haskó, G. (2002). Hyperosmotic stress induces nuclear factor- κ B activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells. *Am. J. Pathol.* **161(3)**: 987-996
- Noonan, K.E., Beck, C., Holzmayer, T.A., Chin, J.E., Wunder, J.S., Andrulis, I.L., Gazdar, A.F., Willman, C.L., Griffith, B., Von Hoff, D.D., Roninson, I.B. (1990). Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7160-7164.
- Okada, Y. (1997). Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am. J. Physiol.* **273**: C755-C789.
- Orlando, C., Pinzani, P., Pazzagli, M. (1998). Developments in quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.* **36**:255-269.
- Ou, W.J., Cameron, P.H., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J. (1993). Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* **364**: 771-776.
- Pannetier, C., Delassus, S., Darche, S., Saucier, C., Kourilsky, P. (1993). Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Res.* **21**: 577-583.
- Panos, R. J., Rubin, J. S., Aaronson, S. A., Mason R. J. (1993). Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. *J. Clin. Invest.* **92**: 969-977.
- Parodi, A.J. (2000). Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 69-93. (Übersichtsartikel)
- Peter, R., Bocker, R., Beaune, P.H., Iwasaki, M., Guengerich, F.P., Yang, C.S. (1990). Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chem. Res. Toxicol.* **3**: 566-573.
- Peters-Regehr, T., Bode, J.G., Kubitz, R., Häussinger, D. (1999). Organic osmolyte transport in quiescent and activated rat hepatic stellate cells (Ito cells). *Hepatology* **29**: 173-180.

- Pier, G.B., Grout, M., Zaidi, T.S. (1992). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 12088-12093.
- Pier, G.B., Grout, M., Zaidi, T., Meluleni, G., Mueschenborn, S.S., Banting, G., Ratcliff, R., Evans, M.J., Colledge, W.H. (1998). *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* **393**: 79-82.
- Piccioletto, M.R., Cohn, J.A., Bertuzzi, G., Greengard, P., Nairn, A.C. (1992). Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **267**: 12742-12752.
- Pind, S., Riordan, J.R., Williams, D.B. (1994). Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **269**: 12784-12788.
- Poolman, B., Blount, P., Folgering, J.H.A., Friesen, R.H.E., Moe, P.C., van der Heide, T (2002). How do membrane proteins sense water stress? *Molecular Microbiology* **44**: 889-902.
- Qin, S., Minami, Y., Hibi, M., Kurosaki, T., Yamamura, H. (1997). Syk-dependent and -independent signaling cascades in B cells elicited by osmotic and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**: 2098-2103.
- Qin, S., Ding, J., Takano, T., Yamamura, H. (1999). Involvement of receptor aggregation and reactive oxygen species in osmotic stress-induced Syk activation in B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**: 231-236.
- Quinton, P.M. (1983). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* **301**: 421-422
- Quinton, P.M. (1986). Missing chloride conductance in cystic fibrosis. *Am. J. Physiol.* **251**: C649-C652.
- Quinton, P.M. (1994). Viscosity versus composition in airway pathology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149**: 6-7.
- Quinton, P.M. (2001). The neglected ion: HCO₃⁻. *Nature Med.* **7**: 292-293.
- Ragette, R., Fu, C., Bhattacharya, J. (1997). Barrier effects of hyperosmolar signaling in microvascular endothelium of rat lung. *J. Clin. Invest.* **100**: 685-692.
- Ramjeesingh, M., Li, C., Garami, E., Huan, L.J., Hewryk, M., Wang, Y., Galley, K., Bear, C.E. (1997). A novel procedure for the efficient purification of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Biochem. J.* **327**: 17-21.
- Ratjen, F., Döring, G. (2003). Cystic fibrosis. *Lancet* **361**: 681-689. (Übersichtsartikel)
- Rearick, J.I., Deas, M., Jetten, A.M. (1987). Synthesis of mucous glycoproteins by rabbit tracheal cells in vitro. Modulation by substratum, retinoids and cyclic AMP. *Biochem. J.* **242**: 19-25.
- Reddy, M.M., Quinton, P.M. (1996). Deactivation of CFTR Cl⁻ conductance by endogenous phosphatases in the native sweat duct. *Am. J. Physiol.* **270**: C474-480.
- Reischl, U., Kochanowski, B. (1995). Quantitative PCR. A survey of the present technology. *Mol. Biotechnol.* **3**: 55-71.

- Rendine, S., Calafell, F., Cappello, N., Gagliardini, R., Caramia, G., Rigillo, N., Silveti, M., Zanda, M., Miano, A., Battistini, F., Marianelli, L., Taccetti, G., Diana, M.C., Romano, L., Romano, C., Giunta, A., Padoan, R., Pianaroli, A., Raia, V., De Ritis, G., Battistini, A., Grzincich, G., Japichino, L., Pardo, F., Antonelli, M., Quatrucci, S., Lucidi, V., Castro, M., Santini, B., Castello, M., Guanti, G., Leoni, G.B., Coa, A., Toffoli, C., Lucci, E., Vullo, C., Torricelli, F., Sbernini, F., Romeo, G., Ronchetto, P., Seia, M., Rossi, A., Ferrari, M., Cremonesi, L., Salvatore, F., Castaldo, G., D'Alcamo, E., Maggio, A., Sangiuolo, F., Dallapiccola, B., Maceratesi, P., Bisceglia, L., Gasparini, P., Carbonara, A., Bonizzato, A., Cabrini, G., Bombieri, C., Pignatti, P.F., Borgo, G., Castellani, C., Villani, A., Arduino, C., Salvatore, D., Mastella, G., Piazza, A. (1997). Genetic history of cystic fibrosis mutations in Italy. I. Regional distribution. *Ann. Hum. Genet.* **61**: 411-424.
- Rich, D.P., Anderson, M.P., Gregory, R.J., Cheng, S.H., Paul, S., Jefferson, D.M., McCann, J.D., Klinger, K.W., Smith, A.E., Welsh, M.J. (1990). Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* **347**: 358-363.
- Richman-Eisenstat, J.B., Jorens, P.G., Hebert, C.A., Ueki, I., Nadel, J.A. (1993). Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am. J. Physiol.* **264**: L413-418.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., Drumm, M., Iannuzzi, M., Collins, F., Tsui, L.C. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**: 1066-1073.
- Robinson, P.C., Voelker, D.R., Mason, R.J. (1984). Isolation and culture of human alveolar type II epithelial cells. Characterization of their phospholipid secretion. *Am. Rev. Respir. Dis.* **130(6)**: 1156-1160.
- Roger, F., Martin, P.-Y., Rousselot, M., Favre, H., Féraillé, E. (1999). Cell shrinkage triggers the activation of mitogen-activated protein kinases by hypertonicity in the rat kidney medullary thick ascending limb of the Henle's loop. *J. Biol. Chem.* **274**: 34103-34110.
- Rokitanski, C. (1842). *Handbuch der speciellen pathologischen Anatomie*, II. Verlag Braumüller und Seidel, Wien. (zitiert nach Busch, R.)
- Ruknudin, A., Schulze, D.H., Sullivan, S.K., Lederer, W.J., Welling, P.A. (1998). Novel subunit composition of a renal epithelial KATP channel. *J. Biol. Chem.* **273**: 14165-14171.
- Rommens, J.M., Iannuzzi, M.C., Kerem, B., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., Hidaka, N., Zsiga, M., Buchwald, M., Riordan, J., Tsui, L.C., Collins, F. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**: 1059-1065.
- Rosales, C., O'Brien, V., Kornberg, L., Juliano R. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1242**: 77-98.

- Rosenfield, R.L., Wu, P.P., Ciletti, N. (2002). Sebaceous epithelial cell differentiation requires cyclic adenosine monophosphate generation. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **38(1)**: 54-57.
- Sade, J., Eliezer, N., Silberberg, A., Nervo, A.C. (1970). The role of mucus in transport by cilia. *Am. Rev. Respir. Dis.* **102**: 58-52.
- Sato, S., Ward, C.L., Krouse, M.E., Wine, J.J., Kopito, R.R. (1996). Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J. Biol. Chem.* **271**: 635-638.
- Satsu, H., Watanabe, H., Arai, S., Shimizu, M. (1997). Characterization and regulation of taurine transport in Caco-2, human intestinal cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **121**: 1082-1087.
- Satsu, H., Miyamoto, Y., Shimizu, M. (1999). Hypertonicity stimulates taurine uptake and transporter gene expression in Caco-2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1419**: 89-96.
- Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T., van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**: 786-791.
- Schoumacher, R.A., Shoemaker, R.L., Halm, D.R., Tallant, E.A., Wallace, R W., Frizzell, R.A. (1987). Phosphorylation fails to activate chloride channels from cystic fibrosis airway cells. *Nature* **330**: 752-754.
- Schreiber, R., Nitschke, R., Greger, R., Kunzelmann, K. (1999). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 11811-11816.
- Schreiber, R., Pavenstadt, H., Greger, R., Kunzelmann, K., (2000). Aquaporin 3 cloned from *Xenopus laevis* is regulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett.* **475**: 291-295.
- Schwiebert, E.M., Egan, M.E., Hwang, T.H., Fulmer, S.B., Allen, S.S., Cutting, G.R., Guggino, W.B. (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* **81**: 1063-1073.
- Schwiebert, E.M., Benos, D.J., Egan, M.E., Stutts, M.J., Guggino, W.B. (1999). CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**: S145-166. (Übersichtsartikel).
- Seidler, U., Bachmann, O., Jacob, P., Christiani, S., Blumenstein, I., Rossmann, H. (2001). Na⁺/HCO₃⁻ cotransport in normal and cystic fibrosis intestine. *JOP* **2**: 247-256.
- Shapiro, L., Dinarello, C.A. (1995). Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 12230-12234.
- Shapiro, L., Dinarello, C.A. (1997). Hyperosmotic stress as a stimulant for proinflammatory cytokine production. *Exp. Cell Res.* **231**: 354-362.
- Shiratori, M., Michalopoulos, G., Shinozuka, H., Singh, G., Ogasawara, H., Katyal, S.L. (1995). Hepatocyte growth factor stimulates DNA synthesis in alveolar epithelial type II cells *in vitro*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **12**: 171-180.

- Shukla, A., Shukla, R., Dikshit, M., Srimal., (1993). Alterations in free radical scavenging mechanisms following blood-brain barrier disruption. *Free Radic. Biol. Med.* **15(1)**: 97-100.
- Shumaker, H., Amlal, H., Frizzell, R., Ulrich, C.D., Soleimani, M. (1999). CFTR drives Na⁺/HCO₃⁻ cotransport in pancreatic duct cells: a basis for defective HCO₃⁻ secretion in CF. *Am. J. Physiol.* **276**: C16-25.
- Siebert, P.D., Larrick J.W. (1992). Competitive PCR. *Nature* **359**: 557-558.
- Siegfried, J.M., Nesnow, S. (1984). Cytotoxicity of chemical carcinogens towards human bronchial epithelial cells evaluated in a clonal assay. *Carcinogenesis* **5(10)** : 1317-1322.
- Simmonds, P., Balfe, P., Peutherer, J.F., Ludlam, C.A., Bishop, J.O., Brown, A.J. (1990). Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J. Virol.* **64**: 864-872.
- Singh-Kaw, P., Zarnegar, R., Siegfried, J. M. (1995). Stimulatory effects of hepatocyte growth factor on normal and neoplastic human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **268**: L1012-L1020.
- Smith, K.E., Borden, L.A., Wang, C.H., Hartig, P.R., Branchek, T.A., Weinshank, R.L. (1992). Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol. Pharmacol.* **42**: 563-569.
- Smith, J.J., Travis, S.M., Greenberg, E.P., Welsh, M.J. (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* **85**: 229-236.
- Soleimani, M., Burnham, C.E. (2001). Na⁺/HCO₃⁻ Cotransporters (NBC): Cloning and characterization. *J. Membrane Biol.* **183**: 71-84.
- Stutts, M.J., Canessa, C.M., Olsen, J.C., Hamrick, M., Cohn, J.A., Rossier, B.C., Boucher, R.C. (1995). CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*; **269**: 847-850.
- Stutts, M.J., Rossier, B.C., Boucher, R.C. (1997). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inverts protein kinase A-mediated regulation of epithelial sodium channel single channel kinetics. *J. Biol. Chem.* **272**: 14037-14040.
- Sundaresan, M., Yu ,Z.-X., Ferrans, V., Irani, K., Finkel, T. (1995). Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270**: 296-299.
- Szaszi, K., Buday, L., Kapus, A. (1997). Shrinkage-induced protein tyrosine phosphorylation in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 16670-16678.
- Tabcharani, J.A., Chang, X.-B., Riordan, J.R., Hanrahan, J.W. (1991). Phosphorylation-regulated Cl channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* **352**: 628-631.
- Tanaka, C., Kamata, H., Takeshita, H., Yagisawa, H., Hirata, H. (1997). Redox regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced interleukin-8 (IL-8) gene expression mediated by NF κ B and AP-1 in human astrocytoma U373 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**: 568-573.

- Tarran, R., Grubb, B.R., Gatzky, J.T., Davis, C.W., Boucher, R.C. (2001). The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *J. Gen. Physiol.* **118**: 223-226.
- Tirouvanziam, R., Khazaal, I., Peault, B. (2002). Primary inflammation in human cystic fibrosis small airways. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **283**: L445-51.
- Tiruppathi, C., Brandsch, M., Miyamoto, Y., Ganapathy, V., Leibach, F.H. (1992). Constitutive expression of the taurine transporter in a human colon carcinoma cell line. *Am. J. Physiol.* **263**: G625-631.
- Trapnell, B.C., Chu, C.-S., Paakko, P.K., Banks, T.C., Yoshimura, K., Ferrans, V.J., Chernick, M.S., Crystal, R.G. (1991). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the respiratory tract of normal individuals and individuals with cystic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6565-6569.
- Travis, S.M., Berger, H.A., Welsh, M.J. (1997). Protein phosphatase 2C dephosphorylates and inactivates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 11055-11060.
- Travis, S.M., Conway, B.D., Zabner, J., Smith, J.J., Anderson, N.N., Singh, P.K., Greenberg, E.P., Welsh, M.J. (1999). Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**: 872-879.
- Trice, J.M., Pinals, R.S. (1985). Dimethyl sulfoxide: a review of its use in the rheumatic disorders. *Semin. Arthritis Rheum.* **15**: 45-60.
- Tsui, L.C., Buchwald, M., Barker, D., Braman, J.C., Knowlton, R., Schumm, J.W., Eiberg, H., Mohr, J., Kennedy, D., Plavsic, N., Zsiga, M., Markiewicz, D., Akots, G., Brown, V., Helms, C., Gravius, T., Parker, C., Rediker, K., Donis-Keller, H. (1985). Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* **230**: 1054-7.
- Uchida, S., Kwon, H.M., Yamauchi, A., Preston, A.S., Marumo, F., Handler, J.S. (1992). Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na⁺- and Cl⁻-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8230-8234.
- Ushio-Fukai, M., Alexander, R.W., Akers, M., Griending, K.K. (1998). p38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive pathways activated by angiotensin II. *J. Biol. Chem.* **273**: 15022-15029.
- Vaandrager, A.B., Smolenski, A., Tilly, B.C., Houtsmuller, A.B., Ehlert, E.M., Bot, A.G., Edixhoven, M., Boomaars, W.E., Lohmann, S.M., de Jonge HR. (1998). Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:1466-1471.
- Valverde, M.A., O'Brien, J.A., Sepulveda, F.V., Ratcliff, R.A., Evans, M.J., Colledge, W.H. (1995). Impaired cell volume regulation in intestinal crypt epithelia of cystic fibrosis mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9038-9041.

- Valverde M.A., Vázquez, E., Munoz, F.J., Nobles, M., Delaney, S.J., Wainwright, B.J., Colledge, W.H., Sheppard, D.N. (2000). Murine CFTR channel and its role in regulatory volume decrease of small intestinal crypts. *Cell. Physiol. Biochem.* **10**: 321-328.
- Vazquez, E., Nobles, M., Valverde, M.A. (2001) Defective regulatory volume decrease in human cystic fibrosis tracheal cells because of altered regulation of intermediate conductance Ca²⁺-dependent potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 5329-5334.
- Venaille, T.J., Ryan, G., Robinson, B.W. (1998). Epithelial cell damage is induced by neutrophil-derived, not pseudomonas-derived, proteases in cystic fibrosis sputum. *Respir. Med.* **92**: 233-240.
- Vishwanath, S., Ramphal, R. (1985). Tracheobronchial mucin receptor for *Pseudomonas aeruginosa*: predominance of amino sugars in binding sites. *Infect. Immun.* **48**: 331-335.
- Vlahopoulos, S., Boldogh, I., Casola, A., Brasier, A.R. (1999). Nuclear factor- κ B-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor α : evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* **94**: 1878-1889.
- Wang, A.M., Doyle, M.V., Mark, D.F. (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9717-9721.
- Ward, C.L., Omura, S., Kopito, R.R. (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**: 121-127.
- Wei, L., Vankeerberghen, A., Cuppens, H., Eggermont, J., Cassiman, J.J., Droogmans, G., Nilius, B. (1999). Interaction between calcium-activated chloride channels and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch.* **438**: 635-641.
- Weik, C., Warskulat, U., Bode, J., Peters-Regehr, T., Haussinger, D. (1998). Compatible organic osmolytes in rat liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* **27**: 569-575.
- Wong, H., Anderson, W.D., Cheng, T., Riabowol, K.T. (1994) Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the „primer dropping“ method. *Anal. Biochem.* **223**: 251-258.
- Wu, R., Martin, W.R., Robinson, C.B., St. George, J. A., Plopper C.G, Kurland, G., Last, J.A., Cross, C.E., McDonald, R.J., Boucher, R. (1990). Expression of mucin synthesis and secretion in human tracheobronchial epithelial cells grown in culture. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3**: 467-478.
- Wu, R., Zhao, Y.H., Chang, M.M.J.. (1997). Growth and differentiation of conducting airway epithelial cells in culture. *Eur. Respir. J.* **10**: 2398-2403.
- Yamaya, M., Finkbeiner, W.E., Chun, S.Y., Widdicombe, J.H. (1992). Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am. J. Physiol.* **262**: L713-724.
- Yamauchi, A., Uchida, S., Kwon, H.M., Preston, A.S., Robey, R.B., Garcia-Perez, A., Burg, M.B., Handler, J.S. (1992) Cloning of a Na⁺- and Cl⁻-dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity. *J. Biol. Chem.* **267**: 649-652.

-
- Yang, Y., Janich, S., Cohn, J.A., Wilson, J.M. (1993) The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9480-9484.
- Yoshimura, T., Matsushima, K., Oppenheim, J.J., Leonard, E.J. (1987). Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin-1 (IL-1). *J. Immunol.* **139**: 788-793.
- Zabner, J., Smith, J.J., Karp, P.H., Widdicombe, J.H., Welsh, M.J. (1998). Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia. *In Vitro Mol. Cell* **2**: 397-403.
- Zhou, H., Tate, S.S., Palmer, L.G. (1994). Primary structure and functional properties of an epithelial K⁺-channel. *Am. J. Physiol.* **266**: C809-824.

8. Anhang

8.1 Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Loitsch SM, Kippenberger S, Dauletbaev N, Wagner TO, Bargon J (1999). Reverse transcription-competitive multiplex PCR improves quantification of mRNA in clinical samples - application to the low abundance CFTR mRNA.
Clin Chem 45(5): 619-624.

Loitsch SM, von Mallinckrodt C, Kippenberger S, Steinhilber D, Wagner TOF, Bargon J. (2000). Reactive oxygen intermediates are involved in IL-8 production induced by hyperosmotic stress in human bronchial epithelial cells.
Biochem Biophys Res Commun 276: 571-578

8.2. Sonstige Veröffentlichungen

Reynders V, **Loitsch S**, Steinhauer C, Wagner TOF, Steinhilber D, Bargon J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha (PPAR alpha) down-regulation in cystic fibrosis lymphocytes
Respiratory Res., in press

Ulrich S, **Loitsch S**, Rau O, von Knethen A, Brüne B, Schubert-Zsilavec M, Stein J. (2006). PPAR gamma as a molecular target of resveratrol-induced modulation of polyamine metabolism.
Cancer Res. 66(14):7348-54.

Hirche TO, **Loitsch S**, Smaczny C, Wagner TOF (2005). New concepts of pathophysiology and therapy in cystic fibrosis.
Pneumologie 59(11):811-8.

Ulrich S, Wachtershauser A, **Loitsch S**, von Knethen A, Brüne B, Stein J. (2005). Activation of PPAR gamma is not involved in butyrate-induced epithelial cell differentiation.
Exp Cell Res. 310(1):196-204.

Junghans M, **Loitsch SM**, Steiniger SC, Kreuter J, Zimmer A (2005). Cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for delivery of antisense c-myc oligonucleotides.
Eur J Pharm Biopharm. 60(2):287-94.

Kippenberger S, **Loitsch S**, Thaci D, Kaufmann R, Bernd A (2005). Detection of human beta defensin-1 and -2 by RT-competitive multiplex PCR.
Arch Dermatol Res. 296(11):539-42.

Kippenberger S, **Loitsch S**, Guschel M, Müller J, Kaufmann R, Bernd A (2005) Hypotonic stress induces E-cadherin expression in cultured human keratinocytes.
FEBS Lett. 579(1): 207-14.

Kippenberger S, **Loitsch S**, Guschel M, Müller J, Knies Y, Kaufmann R, Bernd A (2005). Mechanical stretch stimulates PKB/Akt phosphorylation in epidermal cells via angiotensin II type 1 receptor and epidermal growth factor receptor.
J Biol Chem 2005; 280(4):3060-7.

- Kippenberger S, **Loitsch S**, Muller J, Guschel M, Kaufmann R, Bernd A (2004). Ligation of the beta integrin triggers adhesion behavior of human keratinocytes by an "inside-out" mechanism.
J Invest Dermatol 123: 444-451.
- Brzoska M, Langer K, Coester C, **Loitsch S**, Wagner TO, von Mallinckrodt C (2004). Incorporation of biodegradable nanoparticles into human airway epithelium cells-in vitro study of the suitability as a vehicle for drug or gene delivery in pulmonary diseases.
Biochem Biophys Res Commun 318(2): 562-570.
- Zgouras D, Becker U, **Loitsch S**, Caspary W, Stein J (2004). Modulation of angiogenesis-related protein synthesis by valproic acid.
Biochem Biophys Res Commun 316(3): 693-697.
- Piiper A, Elez R, You SJ, Kronenberger B, **Loitsch S**, Roche S, Zeuzem S (2003). Cholecystokinin stimulates extracellular signal-regulated kinase through activation of the EGF receptor, Yes and protein kinase C: Signal amplification at the level of Raf by activation of protein kinase C epsilon.
J Biol Chem 278: 7065 – 7072.
- Dauletbaev N, Gropp R, Frye M, **Loitsch S**, Wagner TO, Bargon J (2002). Expression of Human Beta Defensin (HBD-1 and HBD-2) mRNA in Nasal Epithelia of Adult Cystic Fibrosis Patients, Healthy Individuals, and Individuals with Acute Cold.
Respiration 69: 46-51
- Kippenberger S, **Loitsch SM**, Grundmann-Kollmann M, Simon S, Dang T-A, Hardt-Weinelt K, Kaufmann R, Bernd A (2001). Activators of peroxisome proliferator-activated receptors protect human skin from ultraviolet-B-light-induced inflammation.
J Invest Dermatol 117: 1430-1436.
- Kippenberger S, **Loitsch S**, Muller J, Guschel M, Ramirez-Bosca A, Kaufmann R, Bernd A (2000). Melanocytes respond to mechanical stretch by activation of mitogen-activated protein kinases.
Pigment Cell Res 13(4): 278-80.
- Wächtershauser A, **Loitsch SM**, Stein J (2000). PPAR-gamma is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate.
Biochem Biophys Res Commun 272: 380-385.
- Kippenberger S, Bernd A, **Loitsch S**, Guschel M, Müller J, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R (2000). Signaling of mechanical stretch in human keratinocytes via MAP kinases.
J Invest Dermatol 114(3): 408-412.
- Wächtershäuser A, Steinhilber D, **Loitsch SM**, Stein J (2000). Expression of 5-lipoxygenase by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during butyrate-induced cell differentiation.
Biochem Biophys Res Commun 268: 778-783.
- Dauletbaev N, Viel K, Behr J, **Loitsch S**, Buhl R, Wagner TO, Bargon J (1999). Effects of short-term inhaled fluticasone on oxidative burst of sputum cells in cystic fibrosis patients.
Eur Respir J 14: 1150-1155.
- Kippenberger S, Bernd A, **Loitsch S**, Muller J, Guschel M, Kaufmann R (1999). Cyclic stretch up-regulates proliferation and heat shock protein 90 expression in human melanocytes.
Pigment Cell Res 12(4): 246-251.

-
- Bargon J, **Loitsch S**, Dauletbaev N, von Mallinckrodt C, Buhl R (1998). Modulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene - expression by elevation of intracellular cyclic AMP.
Eur J Med Res 12/3(5): 256-262.
- Kippenberger S, **Loitsch S**, Solano F, Bernd A, Kaufmann R (1998). Quantification of tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 transcripts in human melanocytes by reverse transcriptase-competitive multiplex PCR - regulation by steroid hormones.
J Invest Dermatol 110(4): 364-367.
- Kippenberger S, Bernd A, Menzel I, **Loitsch S**, Ramirez-Bosca A, Kaufmann R (1997). *Candida albicans* suppresses transcription of melanogenesis enzymes in cultured melanocytes.
Mycoses 1997; 40(9-10): 373-375.
- Kippenberger S, Bernd A, **Loitsch S**, Ramirez-Bosca A, Bereiter Hahn J, Holzmann H (1995). alpha-MSH is expressed in cultured human melanocytes and keratinocytes.
Eur J Dermatol (5): 395-397.
- Bahl A, **Loitsch SM**, Kahl G (1995). Transcriptional activation of plant defense genes by short-term air-pollutant stress.
Environmental Pollution 90: 1-7.

8.3 Förderung und Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Pneumologie und Allergologie der medizinischen Klinik I im Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main angefertigt. Finanziell unterstützt wurde die Arbeit durch den Mukoviszidose e.V. – Bundesverband Selbsthilfe bei Cystischer Fibrose (CF).

Für die Bereitstellung dieses Themas, die Betreuung und die guten Arbeitsbedingungen möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Joachim Bargon, Herrn Prof. Dr. Dieter Steinhilber und Herrn Prof Dr. Thomas Wagner bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Christian von Mallinckrodt und Prof. Dr. Andreas Zimmer für die Untersuchungen der primären Bronchialepithelzellen mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops. Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Stefan Kippenberger für unzählige hilfreiche Ratschläge.

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Stefan Marcel Loitsch
Scharnhorststrasse 9
65195 Wiesbaden
geboren am 19.02.1965 in Hofheim/Ts.
verheiratet
1 Kind

Schulbildung und Wehrersatzdienst

1971 – 1975 Grundschule Sindlinger Wiesen in Kelkheim
1975 – 1981 Gymnasialer Zweig der Eichendorff-Gesamtschule in Kelkheim
1981 – 1984 Gymnasiale Oberstufenschule Kelkheim
Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
1984 – 1986 20-monatiger Wehrersatzdienst in den Städtischen Kliniken Frankfurt am Main -
Höchst

Hochschulausbildung

1986 – 1991 Studium der Biologie
an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
Abschluss mit der Diplomprüfung im Juni 1991

1991 – 1992 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Günther Kahl mit dem Thema:
„Einfluss von Stressoren auf Struktur und Funktion von Superoxiddismutase- und
Katalase-Genen“

1992 – 2006 Aufbau und Leitung eines Forschungslabors für die Abteilungen Pneumologie der
inneren Medizin und der Abteilung Endokrinologie der Allgemeinen Pädiatrie des
Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter PD. Dr.
Klaus Hartmann, PD Dr. Joachim Bargon und Prof. Dr. Thomas Wagner.
Seit 1998 Naturwissenschaftliche Promotion bei Prof. Dr. Dieter Steinhilber am
Institut für Pharmazeutische Chemie unter der externen Betreuung von Prof. Dr.
Joachim Bargon von der Abteilung Pneumologie und Allergologie des Klinikums der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main