

# UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION VON CAVEOLINEN IN DEN UNTEREN ATEMWEGEN

**HEIKE SCHLENZ**



**INAUGURALDISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

# Untersuchungen zur Funktion von Caveolinen in den unteren Atemwegen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Heike Schlenz  
aus Diepholz

Gießen 2010

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachter: Prof. Dr. H. Ardeschir Ghofrani

Tag der Disputation: 28.10.2011

Titelblatt	
Inhaltsverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	
Abbildungsverzeichnis	
Tabellenverzeichnis	

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Caveolae	1
1.2	Caveoline	2
1.2.1	Cav-1	3
1.2.2	Cav-2	4
1.2.3	Cav-3	4
1.3	Funktionen der Caveolae/Caveoline	5
1.4	Aufbau der Atemwege	8
1.5	Innervation der Atemwege	10
1.5.1	Parasympathische Innervation	11
1.5.2	Sympathische Innervation	12
1.5.3	Sensorische Innervation	12
1.6	Muskarinerge Rezeptoren in den Atemwegen	13
1.7	Glattmuskelkontraktion	15
1.8	Caveolae/Caveoline und Glattmuskelkontraktion	17
1.9	Prinzip des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET)	18
1.10	Ziel der Arbeit	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1	Gewebe	22
2.1.1	Mäuse	22
2.1.2	Humane Gewebeproben	22
2.2	Immunhistochemische Verfahren	23
2.2.1	Antikörper	23
2.2.2	Indirekte (Doppel-)Immunfluoreszenz an Kryoschnitten	24

2.2.2.1	Spezifitätskontrollen	26
2.2.3	FRET-CLSM-Analyse	26
2.2.3.1	Zusätzliche Kontrollen	27
2.3	Western Blot	27
2.3.1	Proteingewinnung, Elektrophorese, Proteintransfer und -detektion	27
2.3.2	Spezifitätskontrollen	29
2.4	Laserassistierte Mikrodissektion mit anschließender reverse Transkriptase (RT)-PCR-Analyse	29
2.4.1	Laserassistierte Mikrodissektion	29
2.4.2	RNA-Isolation und reverse Transkription	30
2.4.3	PCR	31
2.4.4	Gelelektrophorese	32
2.5	Real-time quantitative PCR	32
2.6	Videomorphometrie	34
2.7	Elektronenmikroskopie	36
2.8	Statistische Analysen	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	Vorkommen von Caveolae in bronchialen Glattmuskelzellen der Maus	38
3.1.1	Caveolae in M2R <sup>+/+</sup> , M2R <sup>-/-</sup> , M3R <sup>+/+</sup> und M3R <sup>-/-</sup> Mäusen	38
3.1.2	Caveolae in Cav-1 <sup>+/+</sup> und Cav-1 <sup>-/-</sup> Mäusen	39
3.2	Lokalisation von Cav-1 und Cav-3 in Bronchien der Maus und des Menschen	40
3.2.1	Vorkommen von Cav-1 und Cav-3 in Bronchien der Maus	40
3.2.2	Assoziation von Cav-1 mit Cav-3 in der Bronchialmuskulatur der Maus	43
3.2.3	Vorkommen von Cav-1 und Cav-3 in Bronchien des Menschen	44
3.3	Räumliche Beziehung von Cav-1 und Cav-3 zu M2R	46
3.3.1	Überprüfung der Anti-M2R-Antikörperspezifität	46
3.3.2	Kokalisation von Cav-1 und Cav-3 mit M2R	46
3.3.3	Assoziation von Cav-3 mit M2R	47

3.4	Funktionelle Rolle von Caveolae und Cav-1 bei der muskarinergen Bronchokonstriktion	49
3.4.1	Cholesterolentzug durch Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin	49
3.4.2	Kontraktilität der Bronchien von M2R <sup>+/+</sup> , M2R <sup>-/-</sup> , M3R <sup>+/+</sup> und M3R <sup>-/-</sup> Mäusen	51
3.4.3	Kontraktilität der Bronchien von Cav-1 <sup>+/+</sup> und Cav-1 <sup>-/-</sup> Mäusen	56
3.5	M2R-Expression in M3R <sup>+/+</sup> und M3R <sup>-/-</sup> Mäusen	61
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1	Caveolae/Caveoline in den Glattmuskelzellen der Bronchien	63
4.2	Assoziationen von Caveolinen und muskarinergen Rezeptoren	65
4.3	Funktionelle Bedeutung von Caveolae/Caveolinen bei der Bronchokonstriktion	67
4.3.1	Cholesterolentzug	67
4.3.2	KCl und 5-HT als Kontrollen	68
4.3.3	Muskarinerge Bronchokonstriktion	69
4.3.3.1	Funktionelle Kopplung der muskarinergen Bronchokonstriktion an Caveolae	70
4.3.3.2	Die Rolle von Cav-1 bei der muskarinerge Bronchokonstriktion	71
4.3.4	Serotoninerge Bronchokonstriktion	73
4.3.4.1	Funktionelle Kopplung der serotoninergen Bronchokonstriktion an Caveolae	74
4.3.4.2	Die Rolle von Cav-1 bei der serotoninergen Bronchokonstriktion	75
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>79</b>
	Literaturverzeichnis	
	Erklärung	
	Danksagung	
	Lebenslauf	



## Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ACh	Azetylcholin
<i>A. dest.</i>	destilliertes Wasser
$\alpha$ -sma	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphat-Hydrolase
$\beta$ -MG	$\beta$ -Mikroglobulin
Bp	Basenpaare
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cav	Caveolin
Cav-1	Caveolin-1
Cav-2	Caveolin-2
Cav-3	Caveolin-3
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i> (Calcitonin-Gen-verwandtes-Peptid)
CLSM	konfokales Laserrastermikroskop
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CT	<i>cycle threshold</i>
$D_A$	Fluoreszenzintensität des Donors vor dem Akzeptorbleichen
$D_B$	Fluoreszenzintensität des Donors nach dem Akzeptorbleichen
DAG	Diacylglycerin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTPase	Guanosintriphosphat-Hydrolase
HDL	<i>high density lipoproteins</i>
5-HT	5-Hydroxytryptamin = Serotonin

ΔIF	Veränderung der (Donor-)Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
MCD	Methyl-β-Cyclodextrin
MR	muskarinerner Rezeptor
M2R	muskarinerner Rezeptorsubtyp 2
M3R	muskarinerner Rezeptorsubtyp 3
MLC	Myosinleichtkette
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MLCP	Myosinleichtkettenphosphatase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (phosphatgepufferte Lösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PP	Phosphatpuffer
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
ROI	<i>region of interest</i> (untersuchte Region)
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>Sodium-Dodecylsulfate</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TTBS	<i>Tween-20 containing Tris-HCl-buffered saline</i> (Tween-20-haltige Tris-HCl-gepufferte Lösung)
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
VIP21	<i>vesicular integral-membrane protein</i> (Caveolin-1)
VOCC	<i>voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channel</i> (spannungsabhängiger Ca <sup>2+</sup> -Kanal)
WB	Western Blot

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Die Struktur der Caveoline	3
Abbildung 1.2	Wandaufbau eines typischen, mittelgroßen Bronchus einer Katze, vergleichbar mit dem des Menschen	9
Abbildung 1.3	Cholinerge Atemwegskonstriktion	14
Abbildung 1.4	Intrazelluläre Signalwege nach Stimulation von M2R und M3R	16
Abbildung 1.5	FRET. Schematische Darstellung der Methode des Akzeptorbleichens am Beispiel der indirekten immunhistochemischen Doppelmarkierung	20
Abbildung 2.1	Schemazeichnung eines Bronchus bei zunehmender Konstriktion	35
Abbildung 3.1	Transmissionselektronenmikroskopie von Bronchien der M3R <sup>+/+</sup> und M3R <sup>-/-</sup> Mäuse	38
Abbildung 3.2	Transmissionselektronenmikroskopie von Glattmuskelzellen der M2R <sup>+/+</sup> und M2R <sup>-/-</sup> Mäuse	39
Abbildung 3.3	Transmissionselektronenmikroskopie von Caveolae in bronchialen Glattmuskelzellen von Cav-1 <sup>+/+</sup> Mäusen und Cav-1 <sup>-/-</sup> Mäusen	39
Abbildung 3.4	Indirekte Doppelimmunfluoreszenz für Cav-1 und Cav-3 im Bronchus der Maus, CLSM	40
Abbildung 3.5	Immunhistochemische Spezifitätskontrolle der Anti-Cav-1- und Anti-Cav-3-Antikörper.	41
Abbildung 3.6	Spezifitätskontrolle der Anti-Cav-1- und Anti-Cav-3-Antikörper mittels Western Blot	42
Abbildung 3.7	Detektion von Cav-1 und -3-mRNA in der glatten Atemwegsmuskulatur der Maus mittels laserassistierter Mikrodissektion mit nachfolgender RT-PCR	42
Abbildung 3.8	Detektion einer Assoziation von Cav-1 und Cav-3 in der Herzvorhof- und Bronchialmuskulatur der Maus <i>in situ</i> mittels indirekter Doppelimmunfluoreszenz und FRET-CLSM-Analyse	44
Abbildung 3.9	Doppelimmunhistochemie, CLSM. Nachweis von Cav-1- und Cav-3-Immunreaktivität in humanen Bronchien	45
Abbildung 3.10	Immunhistochemische Überprüfung der Anti-M2R-Antikörperspezifität	46

Abbildung 3.11	Indirekte Doppelimmunfluoreszenz für Cav-1 und Cav-3 im Bronchus der Maus, CLSM	47
Abbildung 3.12	Detektion einer Assoziation von Cav-3 und M2R in der Herzvorhof- und Bronchialmuskulatur der Maus <i>in situ</i> mittels indirekter Doppelimmunfluoreszenz und FRET-CLSM-Analyse	48
Abbildung 3.13	Indirekte Doppelimmunfluoreszenz und FRET-CLSM-Analyse zur Untersuchung einer möglichen Assoziation von Cav-1 und M2R in der Herzvorhof- und Bronchialmuskulatur der Maus <i>in situ</i>	49
Abbildung 3.14	Transmissionselektronenmikroskopie von bronchialen Glattmuskelzellen der M3R <sup>+/+</sup> Mäuse nach videomorphometrischer Analyse	50
Abbildung 3.15	Vorkommen von Cav-1-, Cav-3- und M2R-Immunreaktivitäten in Bronchien der Maus nach Vehikel- bzw. MCD-Behandlung	51
Abbildung 3.16	Vergleich der Bronchokonstriktionen nach Zugabe von Muskarin, KCl und 5-HT vor bzw. nach Vehikel-Behandlung der Lungenschnitte von M3R <sup>-/-</sup> und M3R <sup>+/+</sup> Mäusen	53
Abbildung 3.17	Vergleich der Bronchokonstriktionen nach Zugabe von Muskarin, KCl und 5-HT vor bzw. nach Vehikel-Behandlung der Lungenschnitte von M2R <sup>-/-</sup> und M2R <sup>+/+</sup> Mäusen	54
Abbildung 3.18	Bronchokonstriktionen in M3R <sup>-/-</sup> und M3R <sup>+/+</sup> Mäusen und in M2R <sup>-/-</sup> und M2R <sup>+/+</sup> Mäusen nach Vehikel- bzw. MCD-Behandlung und Stimulation mit Muskarin, KCl und 5-HT	55
Abbildung 3.19	Bronchokonstriktionen in Lungenschnitten von Cav-1 <sup>+/+</sup> und Cav-1 <sup>-/-</sup> Mäusen, induziert durch kumulative Gabe von Muskarin	57
Abbildung 3.20	Bronchokonstriktionen in Lungenschnitten von Cav-1 <sup>+/+</sup> und Cav-1 <sup>-/-</sup> Mäusen, induziert durch kumulative Gabe von 5-HT mit unterschiedlichen Initialkonzentrationen	58
Abbildung 3.21	Bronchokonstriktionen, induziert durch kumulative Gabe von 10 <sup>-7</sup> bis 10 <sup>-3</sup> M 5-HT in halblogarithmischen Konzentrationsschritten in Lungenschnitten von Cav-1 <sup>+/+</sup> Mäusen und von Cav-1 <sup>+/+</sup> und Cav-1 <sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich	59
Abbildung 3.22	Bronchokonstriktionen in Cav-1 <sup>-/-</sup> und Cav-1 <sup>+/+</sup> Mäusen nach Vehikel- bzw. MCD-Behandlung und Stimulation mit Muskarin, 5-HT und KCl	61
Abbildung 3.23	Quantitative RT-PCR zur MR-Expression in M3R <sup>+/+</sup> und M3R <sup>-/-</sup> Mäusen	62

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Primärantikörper für immunhistochemische und Western Blot-Analysen an murinem und humanem Gewebe	23
Tabelle 2.2	Sekundärantikörper und Peptide für immunhistochemische und Western Blot-Analysen an murinem und humanem Gewebe	24
Tabelle 2.3	Oligonukleotidprimer für PCR-Analysen	31
Tabelle 2.4	Oligonukleotidprimer für real-time PCR-Analysen	33

Die im Rahmen der Dissertationsarbeit erhobenen Daten wurden zum großen Teil bereits in einem Artikel des American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology (Schlenz H, Kummer W, Jositsch G, Wess J, Krasteva GT: Muscarinic receptor-mediated bronchoconstriction is coupled to caveolae in murine airways. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 298: 626-636, 2010) veröffentlicht. Als Herausgeber erlaubt die American Physiological Society eine Reproduktion dieser Daten im Rahmen einer Dissertation. Im Folgenden wurden diese Daten nicht einzeln gekennzeichnet. Zitiert wurde der Artikel nur, wenn Bezug auf Experimente genommen wurde, die von einem der Koautoren durchgeführt wurden.



# 1 Einleitung

## 1.1 Caveolae

Caveolae sind 50-100 nm große kolbenförmige, im Schnitt  $\Omega$ -förmige Einstülpungen der Plasmamembran, die einzeln oder in Ketten entlang der Zelloberfläche liegen. Ihre Entdeckung geht auf den Nobelpreisträger George Emil Palade zurück (Palade, 1953). Zum ersten Mal wurden Caveolae in Kapillarendothelzellen beschrieben (Palade, 1953). Mittlerweile wurde ihr Vorkommen in fast allen Zelltypen dokumentiert; Ausnahmen sind Erythrozyten, Thrombozyten und Lymphozyten und Neurone des zentralen Nervensystems (Razani et al., 2002a; Stan, 2005).

Etwa 40 Jahre nach Entdeckung der Caveolae wurden die Hauptstrukturproteine, die Caveoline (Cav), in die Definition von Caveolae mit aufgenommen. Sie sind als Strukturproteine für die Bildung der Caveolae essenziell (Razani et al., 2002a; Simons und Toomre, 2000). Seitdem zählen auch Cav-haltige Vesikel ohne Verbindung zur Plasmamembran zu den Caveolae, die in Gruppen in Form von Trauben oder Rosetten zusammenliegen oder miteinander zu Tubuli oder transzellulären Kanälen verschmolzen sind (Razani et al., 2002a). Je nach Zelltyp sind unterschiedliche Formen von Caveolae vertreten. Netzwerke von miteinander in Verbindung stehenden Caveolae kommen beispielsweise in Skelettmuskelzellen, Caveolae-Rosetten in Adipozyten und freie vesikuläre und tubuläre Caveolae in Endothelzellen vor (Parton et al., 1997; Scherer et al., 1994; Simionescu et al., 1975). Nach Beobachtungen an Gefäß- und Atemwegsglattmuskulatur zeigen glatte Muskelzellen normalerweise einzelne oder linear in Reihen liegende, über die gesamte Oberfläche verteilte Caveolae (Dreja et al., 2002; Gosens et al., 2007; Halayko und Stelmack, 2005; Potocnik et al., 2007; Taggart, 2001).

Eine neue Studie von Schlörmann et al. (2010) zeigte nun, dass die einfache  $\Omega$ -Form der Caveolae ein Effekt der Glutaraldehydbehandlung bei der Fixierung des Gewebes für elektronenmikroskopische Untersuchungen ist und dass Caveolae nach schneller Hochdruck-Kryofixierung eine einfache Becher-Form ohne oberflächliche Verengung aufweisen. In humanen Fibroblasten wurden außerdem zwei Formen von Caveolae beschrieben, tiefe und flache (Fujimoto et al., 2000).

Außer der Form ist auch die Oberflächendichte der Caveolae stark variabel. Je nach Polarität des Zelltyps kann das Auftreten von Caveolae auf bestimmte Regionen der Zelloberfläche beschränkt sein (apikal/basolateral) (Stan, 2005). Während primärer



Zellkultur kann sich die Anzahl an Caveolae stark verringern, was in glatten Muskelzellen mit einer Veränderung des Zellphänotyps einhergeht, vom kontraktilen Typ hin zum metabolischen Typ (Thyberg, 2002). Zellen in Suspension präsentieren keine Caveolae an ihrer Oberfläche (Stan, 2005). Gabella und Blundell (1978) bestimmten die Anzahl an Caveolae an der Oberfläche von Endothelzellen und glatten Muskelzellen in den Taeniae coli vom Meerschweinchen an Gefrierbruchpräparaten mit etwa 73 Caveolae pro  $\mu\text{m}^2$  in Endothelzellen und etwa 35 pro  $\mu\text{m}^2$  in Glattmuskelzellen. Eine einzelne Glattmuskelzelle kann um die 168.000 Caveolae enthalten, die etwa 29% ihrer Oberfläche bedecken und eine Zellmembranzunahme von 73% im Vergleich zu einer glatten Oberfläche ausmachen (Gabella, 1976).

Die biochemischen Eigenschaften von Caveolae sind denen der *lipid rafts* sehr ähnlich. Beide bilden Mikrodomänen in der Zellmembran, die stark mit Cholesterol, Sphingolipiden und Proteinrezeptoren angereichert sind (Razani et al., 2002a; Simons und Toomre, 2000). *Lipid rafts* treiben wie Flöße in der Lipiddoppelschicht, wohingegen Caveolae becherförmige Oberflächeninvaginationen darstellen. Je nach Zelltyp enthalten die Caveolae etwa 4-30% des membranären Cholesterols und bis zu 95% der zellulären Sphingolipide (Smart et al., 1999). Die sich daraus ergebende geringe Dichte und Unlöslichkeit in schwachen nicht-ionisierenden Detergenzien wie Triton X-100 wurde zur Grundlage der Identifizierung, Aufreinigung und Charakterisierung von Caveolae (Brown und Rose, 1992; Lisanti et al., 1994). Eine Unterscheidung der Zellmembrandomänen basiert auf dem Vorkommen der Caveoline als Markerproteine, die auch bei der Aufklärung der molekularen Struktur von Caveolae und deren Funktionen eine wichtige Rolle spielen. Es wird angenommen, dass die zelltypspezifische Funktion der Caveolae im Zusammenhang mit deren Ausprägung und Häufigkeit stehen. Die Mechanismen die zur Bildung von Caveolae führen sind jedoch noch unbekannt.

## 1.2 Caveoline

Die Cav-Gene weisen eine starke Homologie auf und sind in den verschiedenen Spezies stark konserviert. Die Familie der Cav umfasst drei Mitglieder im Größenbereich von etwa 18-24 kDa, Cav-1, Cav-2 und Cav-3.

Die Struktur der Cav umfasst eine unterschiedlich lange zytoplasmatisch gerichtete, hydrophile N-terminale Region, eine 33 Aminosäuren lange membranspannende und eine 43-44 Aminosäuren lange, zytoplasmatische C-terminale Region (Tang et al., 1996). Alle drei Cav verfügen über eine Oligomerisierungsdomäne (Aminosäuren 61-101), durch die die Cav miteinander interagieren, und eine *caveolin scaffolding domain* (CSD), ein 20 Aminosäuren langer Bereich (Aminosäuren 82-101), an den verschiedene zelluläre Signalproteine binden können (Cohen et al., 2004; Gosens et al., 2008; Razani et al., 2002a) (Abbildung 1.1).

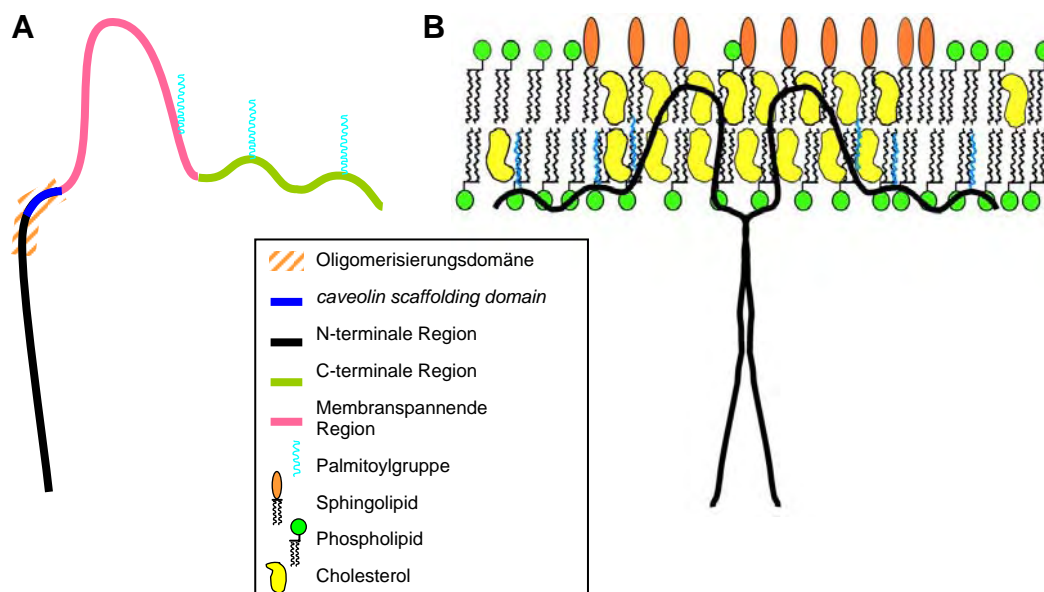


Abbildung 1.1 Die Struktur der Caveoline (Cav). A) Cav verfügen über eine Oligomerisierungsdomäne, eine *caveolin scaffolding domain* (CSD), eine membranspannende Region und C- und N-terminale Regionen. Palmitoylierungsstellen befinden sich an Cystein-133, -143 und -156. B) Über die Oligomerisierungsdomäne bilden die Cav Homooligomere (als Dimer dargestellt) oder Heterooligomere mit anderen Cav aus (nicht gezeigt). Über die hydrophobe membranspannende Region sind sie in einer sphingolipid- und cholesterolreichen Membranregion verankert. Die C- und N-terminalen Regionen liegen zytoplasmatisch. Über die CSD interagieren die Cav mit anderen Proteinen. Mit Erlaubnis modifiziert nach Razani et al. (2002a).

### 1.2.1 Cav-1

Cav-1, ehemals *vesicular integral-membrane protein* (VIP21), tritt in zwei Isoformen auf, Cav-1 $\alpha$  und Cav-1 $\beta$  (Kogo und Fujimoto, 2000). Cav-1 $\alpha$  umfasst die Aminosäuren 1-178 (22 kD), während Cav-1 $\beta$  von einer anderen mRNA translatiert und aus den Aminosäuren 32-178 (19 kD) aufgebaut ist. Unterschiede in der Phosphorylierung begründen möglicherweise die unterschiedliche zelltypspezifische

Verteilung der beiden Cav-1-Isoformen (Kogo et al., 2004) und das unterschiedliche Vorkommen in tiefen und flachen Caveolae. Cav-1 $\alpha$  ist ausschließlich in tiefen Caveolae lokalisiert und effizienter bei der Bildung von Caveolae als Cav-1 $\beta$ , welches vorwiegend flache Caveolae ausbildet (Fujimoto et al., 2000). Die funktionelle Bedeutung der beiden Isoformen ist unklar.

Cav-1 ist fast ubiquitär exprimiert; am stärksten in Endothel-, Epithel-, Fett-, Glattmuskelzellen und Fibroblasten (Cohen et al., 2004). Es kann im Golgi-Apparat homooligomere Komplexe ausbilden, die den Transport zur Zellmembran gewährleisten und vermutlich für die Strukturgebung der Caveolae notwendig sind (Monier et al., 1995; Sargiacomo, 1995). Die Expression von Cav-1 allein ist ausreichend, um Caveolae auszubilden (Fra et al., 1995).

### **1.1.2 Cav-2**

Die Sequenz von Cav-2 weicht von der Sequenz der anderen Cav stark ab (Razani et al., 2002a). Cav-2 weist aber ein ähnliches Expressionsmuster auf wie Cav-1. Interessanterweise ist Cav-2 allein nicht in der Lage homooligomere Komplexe zu bilden und Caveolae zu formieren, kann aber zusammen mit Cav-1 Heterooligomere ausbilden (Drab et al., 2001; Razani et al., 2002b; Scherer et al., 1997; Zhao et al., 2002). Für die Lokalisation innerhalb der Caveolae ist Cav-2 ebenfalls auf Cav-1 angewiesen, da bei dessen Abwesenheit Cav-2 im Golgi-Apparat zurückgehalten wird (Mora et al., 1999; Parolini et al., 1999).

### **1.2.3 Cav-3**

Cav-3 besteht zu 65% aus den gleichen Aminosäuren wie Cav-1 und ist stark homolog zu diesem (Razani et al., 2002a). Während Cav-1 und Cav-2 zusammen weit verbreitet exprimiert sind, galt Cav-3 zunächst als skelett- und herzmuskelspezifisches Strukturprotein der Caveolae, das an der Modulation der Interaktion von Zellmembran und Zytoskelett beteiligt sein könnte (Cohen et al., 2004; Sotgia et al., 2000;). Cav-3 kann, wie auch Cav-1, homooligomerisieren und daher unabhängig von anderen Caveolin-Isoformen Caveolae ausbilden (Bergdahl und Swärd 2004; Tang et al., 1996). Ein Verlust von Cav-3 allein reicht aus, die Bildung von Caveolae in Skelett- und Herzmuskulatur komplett zu verhindern, da diese Zelltypen nur sehr geringe Mengen anderer Cav exprimieren (Galbiati et al., 2001; Hagiwara et al., 2000; Woodman et al., 2002).

Zusätzlich wurde Cav-3 aber auch in glatten Muskelzellen, Chondrozyten, Astrozyten und Endothelzellen der Milzsinus detektiert (Ikezu et al., 1998; Schwab et al., 1999; Song et al., 1996; Uehara und Miyoshi, 2002). In der glatten Muskulatur sind häufig alle drei Caveoline exprimiert (Je et al., 2004; Park et al., 2002; Shakirova et al., 2006; Song et al., 1996; Voldstedlund et al., 2001; Woodman et al., 2004a), wobei die Expression von Cav-3 im Vergleich zur Skelett- und Herzmuskulatur hier niedriger ist (Song et al., 1996). Cav-3 kann sowohl mit Cav-1 als auch mit Cav-2 interagieren (Woodman et al., 2004a).

Die Expression von Cav-3 ist in Glattmuskelzellen geringer als die von Cav-1 (Daniel et al., 2001; Doyle et al., 2003; Shakirova et al., 2006; Voldstedlund et al., 2001). Da in Cav-3-defizienten Mäusen die Anzahl an Caveolae in der glatten Muskulatur der Harnblase unverändert scheint, während sie in Cav-1-defizienten Mäusen auf etwa 15% reduziert ist, wird auch eine geringere Beteiligung von Cav-3 als von Cav-1 an der Ausbildung von Caveolae angenommen (Woodman et al., 2004a). Die restlichen Caveolae in Cav-1-defizienten Mäusen werden vermutlich aus einem homooligomeren Gerüst aus Cav-3 gebildet, da in Cav-1/3 Doppelknockout Mäusen überhaupt keine Caveolae mehr ausgeprägt sind (Park et al., 2002). Ob es bei Anwesenheit aller Cav innerhalb einer Zelle zur Bildung unterschiedlicher Caveolae kommt, die nur aus Cav-1- bzw. nur aus Cav-3-Strukturproteinen aufgebaut sind, ist unklar. Für ein Vorkommen gemischter Caveolae spricht jedoch die Tatsache, dass beide Cav miteinander zum Teil hochmolekulare Heterooligomere ausbilden können (Monier et al., 1995; Sargiacomo et al., 1995; Scherer et al., 1997; Woodman et al., 2004a).

### **1.3 Funktionen der Caveolae/Caveoline**

Durch Oligomerisierung formen die Cav ein Gerüst an der Zelloberfläche, an dem sich viele verschiedene Signalmoleküle ansammeln und miteinander interagieren (Galbiati et al., 2001; Shaul und Anderson, 1998; Smart et al., 1999). Dadurch werden Caveolae zu wichtigen regulatorischen Zentren, *Signalosomen*, und sind an verschiedenen zellulären Funktionen beteiligt. Sie wirken bei der Signaltransduktion, bei trans- und endozytotischen Prozessen, bei der Regulation der Cholesterol- und Lipidhomöostase und bei der Tumorsuppression mit. Ihre physiologische Rolle ist

dabei abhängig vom Zelltyp und Organsystem (Cohen et al., 2004; Razani et al., 2002a).

In Endothelien und Epithelien spielen die Cavolae bei der Internalisierung und Vesikelbildung eine tragende Rolle. Diese Internalisierung unterscheidet sich von der Clathrin-vermittelten Endozytose insofern, als dass sie langsamer und durch Sterol-bindende Reagenzien beeinflussbar ist (Smart und Anderson, 2002). In der Lunge scheinen Caveolae an der Beseitigung von Flüssigkeit und Elektrolyten aus dem Alveolarraum beteiligt zu sein, was bei einer Dysregulation zur Bildung eines Lungenödems führen kann (Gosens et al., 2008). Moleküle wie Albumin, Cholera- und Tetanustoxin und sogar einige Viren und Bakterien können über Caveolae aufgenommen werden (Razani und Lisanti, 2001). Sogar ein völlig neuer Mechanismus der Internalisierung kleiner Moleküle (<1 kDa) über Caveolae und deren nicht-vesikulären Transport zu Endo-/Lysosomen ist für die Aufnahme von Folat beschrieben (Anderson et al., 1992).

Cav fungieren außerdem als Begleitproteine, die den intrazellulären Transport von *de novo* synthetisiertem Cholesterol vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran vermitteln. In den Caveolae wird zelluläres Cholesterol an *high density lipoproteins* (HDLs) abgegeben oder HDL Cholesterolester in die Zelle aufgenommen (Smart et al., 1999).

Da die meisten Interaktionen von Cav mit Signalmolekülen hemmend auf die nachfolgende Signaltransduktionkaskaden wirken und dadurch die basale Aktivität verschiedenster Signalmoleküle kontrollieren, werden Cav allgemein als negative Regulatoren aufgefasst. Da einige der mit Cav interagierenden Moleküle bei permanenter Aktivierung Zelltransformationen verursachen können, gelten Cav auch als Tumorsuppressor-Kandidaten. In einigen humanen Tumoren und transformierten Zelllinien sind Cav-1-mRNA und -Proteinlevel nachweislich verringert (Galbiati, 1998; Hayashi et al., 2001; Smart et al., 1999). Einige Studien weisen zudem auf eine anti-inflammatorische Wirkung von Cav-1 in der Lunge hin (Gosens et al., 2008).

Caveolae beheimaten viele an der zellulären Signaltransduktion beteiligte Moleküle, fungieren als eine Art Sammelstelle. Für einige G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) ist die Lokalisation in Caveolae jedoch dynamisch. Der  $\beta_2$ -Adrenorezeptor, der bei der Relaxation der Atemwegsmuskulatur eine Rolle spielt und normalerweise in Caveolae angereichert ist, verlässt diese nach Aktivierung (Ostrom et al., 2001). Im Gegensatz dazu bewirkt eine Stimulation von B1- und B2-Bradykininrezeptoren,

die gefäßerweiternd und atemwegsverengend wirken, die Translokation dieser Rezeptoren in die Caveolae hinein (Sabourin et al., 2002). Im Unterschied zur adrenergen Wirkung ist die Bradykininrezeptor-vermittelte Reaktion sogar funktionell abhängig von Cav-1 (Prakash et al., 2007), und auch die Funktion der endothelialen Stickoxid-Synthase, die durch Stickstoffmonoxid-Produktion eine gefäßerweiternde Wirkung in der Lunge hat, wird nach Transport in die Caveolae durch Cav-1 reguliert (Feron et al., 1996).

Obwohl Caveolae zunehmend als Plattform für die Interaktionen von Signalmolekülen angesehen werden und an der Regulation verschiedenster Zellprozesse beteiligt sind, haben sie keine überlebenswichtige Funktion, da Cav-1/Cav-3-Doppelknockout Mäuse trotz Abwesenheit von Caveolae vital und fertil sind (Park et al., 2002). Dennoch brachte die Generierung der Cav-gendefizienten Mausstämmen wichtige neue Einsichten in die pathophysiologischen Funktionen der Caveolae/Cav.

Unabhängig voneinander wurden in drei verschiedenen Laboren Mäuse mit einem Defekt im Cav-1 Gen generiert (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001; Zhao et al., 2002). Das Fehlen von Cav-1 führt in der Lunge zu ausgeprägten pathologischen Veränderungen. Normalerweise sind etwa 70% der Zelloberfläche von Alveolarepithelzellen Typ I mit Caveolae bedeckt (Gumbleton, 2001). Diese fehlen in Cav-1-defizienten Mäusen. In diesem Mausstamm sind die Durchmesser der Alveolen reduziert, die Alveolarsepten verdickt und hyperzellulär. Retikuläre Fasern in der Basalmembran und fibrilläre Ablagerungen in der extrazellulären Matrix treten vermehrt auf (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001). Solche proliferativen Veränderungen sind auch bei Lungenerkrankungen wie Asthma, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD), idiopathischer pulmonaler Fibrose, obliterativer Bronchiolitis und zystischer Fibrose zu beobachten. Eine verminderte Expression von Cav-1 könnte ein Auslöser für diese Erkrankungen sein (Gosens et al., 2008).

Die Cav-1-defizienten Mäuse zeigen zudem eine reduzierte Ausdauer im Schwimmtest, interessanterweise in dem gleichen Ausmaß wie Cav-2-defiziente Mäuse. Obwohl die Bildung von Caveolae in Cav-2-defizienten Mäusen intakt ist, zeichnen sich die gleichen histopathologischen Veränderungen der Lunge wie bei einer Cav-1-Defizienz ab. Interessanterweise ist die Cav-1-Proteinexpression in der Lunge Cav-2-defizienter Mäuse um etwa 50% reduziert (Razani et al., 2002b).

Angaben zu Lungenerkrankungen von Cav-3-defizienten Mäusen fehlen in der Literatur, obwohl bereits zwei Cav-3-defiziente Stämme generiert wurden (Galbiati et al., 2001; Hagiwara et al., 2000). Beschrieben sind lediglich eine perivaskuläre Fibrose und zelluläre Infiltration in der Lunge (Woodman, 2004b).

#### **1.4 Aufbau der Atemwege**

Der Atmungsapparat ermöglicht den Gasaustausch. Die Lungen nehmen durch die Atembewegungen sauerstoffreiche Luft auf und geben kohlendioxidreiche Luft wieder ab. Die oberen Atemwege werden von Nasenhöhle und Rachen gebildet. Die unteren Atemwege beginnen mit dem Kehlkopf und setzen sich über die Luftröhre/Trachea bis in das Bronchialsystem der Lunge fort. Innerhalb der Atemwege wird zwischen den proximalen konduktiven, luftleitenden Atemwegen und den distalen, mit Alveolen besetzten, dem Gasaustausch dienenden Bereichen unterschieden. In den Alveolen gelangt der Sauerstoff aus der Luft durch Diffusion ins Blut der Lungenkapillaren, wird mit dem Blut zum Herzen transportiert und im gesamten Kreislaufsystem verteilt (Duncker und Kummer, 2008).

Eine speziesspezifische Untergliederung des Lungengewebes in einzelne Lungenlappen ist durch Einziehungen der *Pleura visceralis* bedingt. Der rechte Lungenflügel des Menschen besteht in der Regel aus drei, der linke aus zwei Lungenlappen. Im Gegensatz dazu ist der rechte Lungenflügel der Maus in vier Lappen untergliedert, von denen einer zu einem großen Teil auf die linke Seite des Thorax ragt. Der linke Lungenflügel der Maus ist nicht untergliedert (Valerius, 1996).

Der Bronchialbaum entsteht durch dichotome Teilung. Der Trachea folgen zwei Hauptbronchien, diesen nach Eintritt in die Lunge die Lappenbronchien und Segmentbronchien, und während der nächsten sechs bis zwölf Aufzweigungen mittelgroße bis kleinere Bronchien. Darauf folgen die Bronchioli, die mit ihren Aufzweigungen jeweils ein Lungenläppchen versorgen. Die Bronchioli teilen sich in *Bronchioli terminales*, die das Ende des konduktiven Bronchialbaumes bilden. Daran schließt sich der respiratorische Anteil der Atemwege an, mit *Bronchioli respiratorii*, die bereits Alveolen entlang der Wände besitzen, *Ductuli alveolares* und den endständigen *Sacculi alveolares*.



Abbildung 1.2 Wandaufbau eines typischen, mittelgroßen Bronchus einer Katze, vergleichbar mit dem des Menschen. Respiratorisches Epithel (1) und darunter liegende *Lamina propria mucosae* (2) gehören zur *Tunica mucosa*, glatte Muskulatur (3), seromuköse Drüsen (4) und Knorpelfragmente (5) zur *Tunica fibromusculo-cartilaginea*, umliegendes faserreiches Bindegewebe zur *Tunica adventitia*. Hämatoxylin/Eosin.

Damit die Atemwege bei der Expiration nicht kollabieren, sind Trachea und Hauptbronchien von Knorpelspangen in der *Tunica fibromusculocartilaginea* umgeben. Die Knorpelspangen sind nach dorsal offen, wo sie durch eine bindegewebige Membran und den vorwiegend quer verlaufenden glatten *Musculus trachealis* gespannt sind. Der Knorpelanteil der Bronchien nimmt nach distal hin ab, wo nur noch Fragmente zu finden sind. Bronchioli weisen keine Knorpelfragmente mehr auf (Nickel, 1987). Eine Schleimhaut, die *Tunica mucosa*, kleidet die Atemwege aus. In Trachea und proximalen Bronchien ist ein mehrreihiges, hochprismatisches Flimmerepithel auf einer gut entwickelten *Lamina propria mucosae* aus lockerem Bindegewebe mit reichlich elastischen Fasern und gemischten Drüsen ausgebildet. Das Epithel setzt sich aus Basalzellen, zilientragenden Epithelzellen, wenigen Bürstenzellen und verschiedenen nicht-zilientragenden Zellen zusammen (Plopper et al., 1983). Zu letzteren gehören die mukösen Becherzellen, die als Stammzellen im Bronchialepithel dienenden Clarazellen, die Neuropeptide enthaltenden neuroendokrinen Zellen und andere. Das Epithel in den Bronchioli wird nach distal einschichtig und flacher, die gemischten Drüsen werden seltener und verschwinden in den Bronchioli gänzlich. Das Bindegewebe der äußeren *Tunica adventitia* enthält



Nerven, Blut- und Lymphgefäße und dient der Verankerung der Atemwege im umliegenden Gewebe.

Im Vergleich zum Menschen besteht das Bronchialsystem der Maus aus einem konduktiven Stammbronchus, aus welchem die Nebenbronchien erster Ordnung in drei Reihen entlang des Stammbronchus entspringen (Valerius, 1996). Knorpelspannen sind nur in der Trachea, den beiden Stammbronchien und den Anfangsteilen einiger Neben- und Lappenbronchien zu finden. Alle anderen konduktiven Wege besitzen keine Knorpel Elemente in den Wänden (Valerius, 1996). Auch die Zusammensetzung des Atemwegsepithels weist Unterschiede zu anderen Spezies auf. Clarazellen dominieren hier mit einem Anteil von 50-60%. Becherzellen werden lediglich im Bereich der Bifurkation und des Stammbronchus vermehrt gefunden, und submuköse Drüsen sind in der Schleimhaut nur bis zu den Lappenbronchien zu finden, so dass die unteren Abschnitte drüsenfrei sind (Pack et al., 1981).

### **1.5 Innervation der Atemwege**

Die unteren Atemwege werden von *efferenten* Nervenfasern des autonomen Systems, mit sympathischem und parasympathischem Anteil, und von *viscerosensorischen* Fasern innerviert. Die verschiedenen Nervenfaserp Populationen bilden an der Hinterwand der Trachea ein Nervengeflecht, das am Lungenhilus in die Lunge eintritt. Neben den Neurotransmittern Noradrenalin in postganglionären sympathischen und Acetylcholin (ACh) in parasympathischen Neuronen existieren in den autonomen und sensorischen Nervenfasern eine Reihe von Neurotransmittern und Neuropeptiden, die zusätzliche Effekte auf den Muskeltonus von Blutgefäßen und Bronchien sowie auf Drüsensekretion und Entzündungs- und Immunzellen haben (Boichot et al., 1993; Iwamoto et al., 1993; Lundberg et al., 1988). Ein weiterer Neurotransmitter ist Serotonin (5-HT). Zusätzlich wird 5-HT im Rahmen von allergischen Reaktionen und Entzündungen von Mastzellen, Thrombozyten und neuroendokrinen Zellen des Respirationstrakts freigesetzt und verursacht in vielen Säugetieren Bronchokonstriktionen (Barnes, 2001; Krop et al., 2010). Diese Konstriktionen sind sensitiv gegenüber Atropin, da 5-HT zu einer ACh-Freisetzung aus cholinergen parasympathischen Nervenfasern führt (Eum et al., 1999; Levitt und

Mitzner, 1989). Dass die 5-HT-induzierte Trachealkonstriktion in der Maus nach mechanischer Entfernung des Epithels reduziert ist, zeigt eine Beteiligung des respiratorischen Epithels (Moffatt et al., 2004). In den Bronchien ist diese epithelvermittelte Konstriktion nicht ACh-vermittelt, da eine unverminderte 5-HT-induzierte Reaktion in M2R/M3R-defizienten Bronchien detektiert wurde, die absolut keine Reaktionen auf Muskarin zeigen (Kummer et al., 2006). 5-HT wirkt also sowohl direkt auf die glatte Muskulatur der Atemwege, als auch indirekt über Nervenfasern und über eine unbekannte Epithelkomponente (Kummer et al., 2006) und kann so die parasympathische Wirkung auf die Atemwegsmuskulatur unterstützen.

### 1.5.1 Parasympathische Innervation

Die präganglionär parasympathischen Neurone liegen im *Nucleus dorsalis nervi vagi* und im *Nucleus ambiguus* und entsenden ihre Axone als Teil des *Nervus vagus* zu den Neuronen in den Ganglien entlang der Atemwege. Hier erfolgt die Umschaltung auf kurze postganglionäre Nervenfasern, die zu den Zielgebieten, den unteren Atemwegen ziehen.

Der Transmitter der prä- und postganglionären parasympathischen Neurone ist ACh. Es wird durch die Cholinazetyltransferase in den Nervenendigungen aus Cholin und Azetyl-Coenzym A synthetisiert, über einen vesikulären Azetylcholintransporter in Speichervesikel aufgenommen, durch den Einstrom von  $Ca^{2+}$  bei der Erregungsfortleitung ausgeschüttet und durch Cholinesterasen gespalten und inaktiviert. Das Spaltprodukt Cholin kann über hochaffine Cholintransporter wieder in die Nervenendigung aufgenommen werden (Starke, 1996). Andere Quellen für ACh in der Lunge können die glatte Muskulatur der Atemwege, das Bronchialepithel, das Endothel und Immunzellen sein (Canning und Fischer, 1997; Haberberger et al., 1997; Klapproth et al., 1997; Pfeil et al., 2003; Wessler et al., 1999; Wessler und Kirkpatrick, 2001).

Das freigesetzte ACh wirkt über zwei Arten von ACh-Rezeptoren auf der prä- und postsynaptischen Membran der beteiligten Zellen. Die nikotinergen Rezeptoren, nach der agonistischen Wirkung des Alkaloids der Tabakpflanze benannt, sind ligandengesteuerte Kationenkanäle. Sie sind die klassischen Rezeptoren des zentralen Nervensystems, der neuromuskulären Endplatte und der ganglionären autonomen Synapse. Die muskarinergen Rezeptoren (MR), nach einem Alkaloid des Fliegenpilzes benannt, kommen in den Atemwegen in Neuronen, in der Atemwegsmuskulatur, in submukösen Drüsen und Gefäßen vor, wo sie eine

Gefäßerweiterung, eine Bronchokonstriktion und eine gesteigerte Mukussekretion vermitteln (Coulson und Fryer, 2003) (siehe Abschnitt 1.6).

Zusätzlich wurden in parasympathischen Neuronen der Atemwege weitere Überträgerstoffe mit pharmakologischen Wirkungen entdeckt. Dazu gehören das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP), Stickstoffmonoxid (NO), Substanz P, das Calcitonin-Gen-verwandte-Peptid (*calcitonin gene-related peptide*, CGRP) und Opioide (de Rada et al., 1993; Dey et al., 1981, 1988; Fontan et al., 2000; Nohr et al., 1995; Shimosegawa et al., 1990). Zudem erhalten parasympathische Neurone der Atemwege modifizierende Einflüsse von Neuronen unterschiedlicher Herkunft (Andersson und Grundstrom, 1987; Coburn und Tomita, 1973; Kummer et al., 1992a).

### **1.5.2 Sympathische Innervation**

Die präganglionären Neurone des Sympathikus liegen im *Nucleus intermediolateralis* und im *Nucleus intercalatus* des thorakalen Rückenmarks. Ihre Axone verlassen das Rückenmark gemeinsam mit den motorischen Fasern über die Vorderwurzeln und ziehen zu den paravertebralen Ganglien. Postganglionäre sympathische Neurone projizieren vom *Ganglion cervicale craniale* und *Ganglion stellatum* und von den oberen thorakalen, paravertebralen Grenzstrangganglien zu Trachea und Lunge (Nickel, 1987). Der Neurotransmitter der postganglionären sympathischen Nervenfasern ist Noradrenalin, das aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert und bis zur Freisetzung in Vesikeln gespeichert wird.

Die sympathische Innervation der Atemwege weist einige Speziesunterschiede auf. Beim Meerschweinchen wurde ein dichtes Geflecht noradrenerger Nervenfasern gefunden (Coburn und Tomita, 1973), während sympathische Fasern beim Menschen nur im Bereich von Gefäßen und submukösen Drüsen und spärlich in der glatten Atemwegsmuskulatur vorkommen, wo sie eine Erweiterung der Bronchien bewirken (Laitinen, 1985; Pack und Richardson, 1984; Partanen et al., 1982).

### **1.5.3 Sensorische Innervation**

Die sensorischen (*afferenten*) Nervenfasern der Atemwege und der Lunge entspringen vorwiegend aus dem *Ganglion jugulare* und *Ganglion nodosum* (Kummer et al., 1992a) und erreichen über den *Nervus vagus* den *Nucleus tractus solitarii* und das Atemzentrum im Hirnstamm. Informationen werden vor allem von

Dehnungsrezeptoren in der Atemwegsmuskulatur, von Irritanzienrezeptoren in der Schleimhaut und verschiedenen C-Faser-Rezeptoren aus allen Atemwegsschichten, darunter auch Schmerzrezeptoren, vermittelt. Zusätzlich können nach Reizung aus den sensorischen Nervenendigungen Mediatoren mit lokaler Wirkung freigesetzt werden, unter anderen NO, CGRP und Tachykinine, zu denen die Neuropeptide Substanz P und Neurokinin A gehören (Kummer et al., 1992b; Levine et al., 1985; Stretton, 1991; Verastegui et al., 1997).

## **1.6 Muskarinerge Rezeptoren in den Atemwegen**

Fünf muskarinerge Rezeptorsubtypen sind bekannt (M1R-M5R), wovon nur drei Rezeptoren (M1R-M3R) physiologische Effekte in den Atemwegen haben. In submukösen Drüsen sind sowohl der M1R als auch der M3R exprimiert und an der Regulation von Schleim-, Wasser- und Elektrolytsekretion beteiligt (Okayama et al., 1993; Rogers, 2001). Die ACh-induzierte Gefäßerweiterung in der Lunge ist wahrscheinlich ebenfalls M3R-vermittelt (Walch et al., 1999, 2001).

Anhand von Bindungsstudien und Northern Blotting wurde das Vorkommen von M2R und M3R in der Atemwegsmuskulatur verschiedener Spezies, inklusive des Menschen, gezeigt (Barnes, 1993; Mak et al., 1992). Da die relative Proteinexpression von M2R und M3R in allen bisher untersuchten Spezies in etwa gleich stark war, wird eine ähnliche Expression für humane Atemwegsmuskulatur angenommen (Eglen et al., 1996). Für die Vermittlung der Bronchokonstriktion sind beide MR essenziell, wie an M2/3R-Doppelknockout Mäusen bereits gezeigt wurde (Struckmann et al., 2003; Wess, 2004). Durch Stimulierung der M2R und der M3R werden in den bronchialen Glattmuskelzellen unterschiedliche Signaltransduktionswege aktiviert, die letztlich zur Kontraktion führen (Chilvers und Nahorski, 1990; Pfaff et al., 2005; Racké und Matthiesen, 2004) (siehe Abschnitt 1.6).

Unter physiologischen Bedingungen dominieren in der Atemwegsmuskulatur MR mit M2R-typischen Bindungseigenschaften (Fernandes et al., 1992; Haddad et al., 1994; Roffel et al., 1988). Funktionell wurde für die Atemwegskonstriktion jedoch eine Dominanz des M3R gezeigt, da die cholinerge Konstriktion in M3R<sup>-/-</sup> im Vergleich zu M2R<sup>-/-</sup> Mäusen stärker reduziert ist und in M2R/M3R-Doppelknockout Mäusen komplett aufgehoben ist (Struckmann et al., 2003; Wess, 2004).

Neben den postsynaptischen M2R an der Oberfläche der Glattmuskelzellen spielen auch die präsynaptischen M2R der parasympathischen Nervenendigungen eine Rolle bei der neuromuskulären Signalübertragung. Dieser präsynaptische M2R, der in parasympathischen postganglionären Nervenendigungen der Atemwege aller Spezies vorkommt, dient der negativen Rückkopplung und hemmt die Freisetzung von weiterem ACh (Coulson und Fryer, 2003) (Abbildung 1.3). Auch der M1R wurde in parasympathischen und sympathischen Neuronen gefunden. Über ihn ist eine indirekte Modulation der Erregungsübertragung auf Höhe der Ganglien möglich (Coulson und Fryer, 2003).

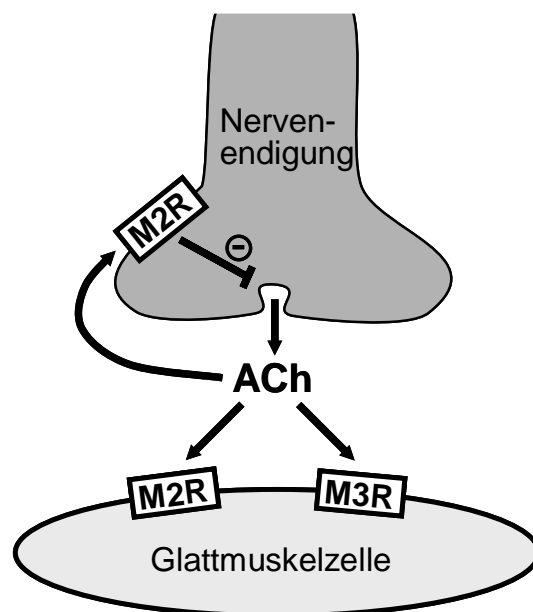


Abbildung 1.3 Cholinerge Atemwegskonstriktion. Eine Azetylcholin(ACh)-Ausschüttung aus den Nervenendigungen der postganglionären parasympathischen Neurone führt über M2R und M3R zur Kontraktion der Glattmuskelzellen in den Atemwegen. Der präsynaptische M2R dient der negativen Rückkopplung und hemmt die Freisetzung von weiterem ACh.

Die funktionelle Relevanz des M2R steigt unter pathologischen Bedingungen. Atemwegserkrankungen wie COPD und Asthma sind mit einer bronchialen Hyperreagibilität assoziiert. Die Veränderungen des Atemwegswiderstandes werden dabei zu einem erheblichen Teil vom Durchmesser der kleineren, peripheren Atemwege bestimmt (Escolar et al., 2003; Martin, 2002). Nach heutiger Auffassung liegt bei Asthma eine Dysfunktion des präsynaptischen M2R vor, welche direkt durch virale Infektionen oder indirekt durch Aktivierung eosinophiler Leukozyten oder Ozon-Exposition verursacht sein kann. Der Verlust der negativen Rückkopplung durch den präsynaptischen M2R führt zu vermehrter ACh-Freisetzung und ist für die erhöhte

Atemwegsreagibilität verantwortlich (Coulson und Fryer, 2003). Ob Anzahl und Funktion der postsynaptischen M2R bei Asthma verändert sind, ist nicht bekannt. Postsynaptische M1R und M3R in der Lunge zeigten sich in bisherigen Studien bei Asthma in Anzahl und Aktivität unverändert (Chiba und Misawa, 1995; Fryer und Wills-Karp, 1991; Whicker et al., 1990). Für die physiologische und pathologische Kontraktilität der Atemwege scheinen jedenfalls beide MR, M2R und M3R, eine starke Bedeutung zu haben.

### 1.7 Glattmuskelkontraktion

Eine Kontraktion der glatten Muskelzellen wird durch einen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol ausgelöst. Zum einen kann  $\text{Ca}^{2+}$  durch potenzialabhängige oder rezeptorgekoppelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmen, zum anderen wird es über den sekundären Botenstoff Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Unter Mitwirkung von Calmodulin (CaM) aktiviert das  $\text{Ca}^{2+}$  die Myosinleichtkettenkinase (MLCK), welche einen Phosphatrest von Adenosintriphosphat (ATP) auf die leichte Kette des Myosins überträgt, wodurch der sogenannte Querbrückenzyklus ablaufen kann und sich das kontraktile Aktin-Myosin-Skelett der Zelle verkürzt (Marhl et al., 2006; Sanderson et al., 2008) (Abbildung 1.4C). Das zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  kann zusätzlich indirekt auf die Erregbarkeit der Zelle wirken, indem es die Aktivität der Ionenkanäle in der Plasmamembran verändert (Perez-Zoghbi et al., 2009).

Zur Relaxation wird das  $\text{Ca}^{2+}$  durch  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter und  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-Hydrolasen (ATPasen) aus dem Innenraum der Zelle zurück in den Extrazellulärraum bzw. das sarkoplasmatische Retikulum transportiert. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-Komplex dissoziiert und die Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP) dephosphoryliert die leichte Kette des Myosinmoleküls (MLC).

Die MLCP kann durch die monomere Guanosintriphosphat-Hydrolase (GTPase) *Ras homolog gene family, member A* (RhoA) oder durch die Proteinkinase C (PKC) gehemmt werden, was zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilisierung der Myofilamente und einer Steigerung der Kontraktilität führt (Bergdahl und Swärd, 2004; Taggart, 2001). Möglicherweise sind Gewebe- und Speziesunterschiede für variierende Signalwege und nachfolgende molekulare Mechanismen verantwortlich.

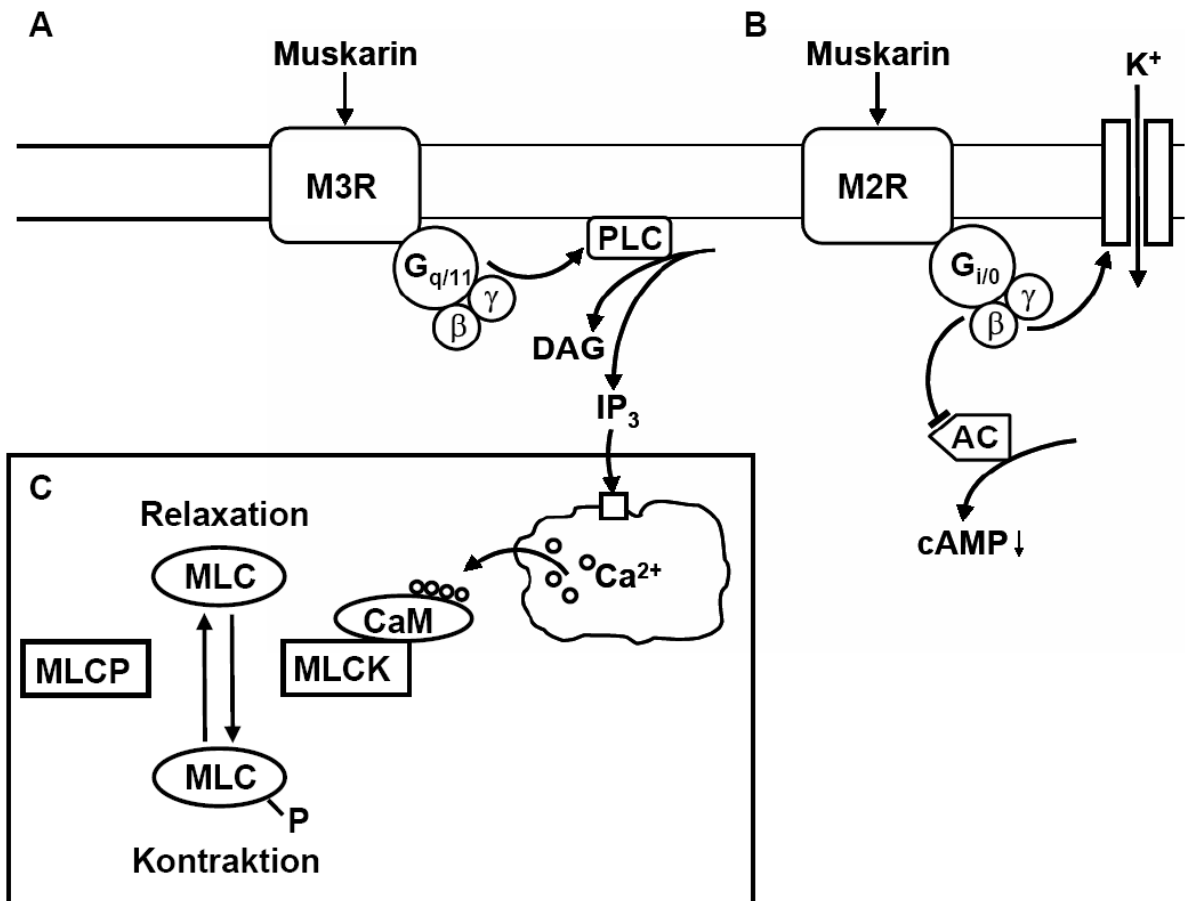


Abbildung 1.4 Intrazelluläre Signalwege nach Stimulation von M2R und M3R. A) Signalweg über den Phosphoinositolzyklus nach Stimulation des M3R. B) Signalweg über die Hemmung der Adenylatzyklase (AC) nach Stimulation des M2R. C) Aktivierung der Myosinleichtketten(MLC)-Phosphorylierung. Calmodulin (CaM), zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Diacylglycerin (DAG), Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>), Myosinleichtkettenkinase (MLCK), Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP), Phospholipase C (PLC).

Die cholinerge Bronchokonstriktion wird in der Glattmuskelzelle durch den M2R und den M3R vermittelt (Struckmann et al., 2003). Der M3R ist G<sub>q/11</sub>-Protein-gekoppelt und vermittelt die Kontraktion durch Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die über IP<sub>3</sub> zum Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) führt (Chilvers et al., 1990; Grandordy et al., 1986) (Abbildung 1.4A). Der M2R interagiert hingegen mit G<sub>i/o</sub>-Proteinen. Zum einen hemmt er die Adenylatzyklase (AC), wodurch die Menge des zytosolischen zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) reduziert wird (Abbildung 1.4B). In der Atemwegsmuskulatur kann dadurch eine cAMP-vermittelte Bronchodilatation verhindert werden und somit die Wirkung des Sympathikus über β-Adrenorezeptoren gehemmt werden (Fernandes et al., 1992; Ostrom und Ehlert, 1998). Zum anderen werden Ca<sup>2+</sup>-abhängige K<sup>+</sup>-Kanäle aktiviert, was letztendlich vermutlich zu einer Potenzierung der durch den M3R ausgelösten Kontraktion führt

(Ehlert, 2003). Die Mechanismen, über die der M2R seine kontraktile Wirkung überträgt, sind jedoch nicht eindeutig geklärt. Eine Studie von Pfaff et al. (2005) zeigte, dass auch die Aktivierung der Sphingosinkinase und die nachfolgende Generierung von Sphingosin-1-Phosphat hier eine Rolle spielen könnten.

An der serotoninerger Kontraktion der Atemwegsmuskulatur ist der 5-HT-Rezeptorsubtyp 2A (5-HT<sub>2A</sub>) beteiligt (Moffatt et al., 2004; Zhang et al., 2007). Möglicherweise ist zusätzlich der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor an der Glattmuskelkontraktion der Atemwege beteiligt, wie in isolierten Tracheen der Ratte gezeigt wurde (Germonpré et al., 1998). Die 14 verschiedenen 5-HT-Rezeptoren sind in sieben Subklassen unterteilt, 5-HT<sub>1-7</sub> (Björk et al., 2010). Außer den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren gehören alle 5-HT-Rezeptoren der Familie der GPCR an (Gray und Roth, 2001), von denen die zelluläre Wirkung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors über die Hemmung der AC und Reduktion des cAMP vermittelt wird, die des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors über die Aktivierung der PLC und Steigerung der IP<sub>3</sub> und DAG-Bildung (Björk et al., 2010; Conn et al., 1986; Leysen et al., 1984; Roth et al., 1984).

### **1.8 Caveolae/Caveoline und Glattmuskelkontraktion**

Caveolae enthalten Anreicherungen an GPCR, deren G-Proteinen und mit ihnen assoziierten, sekundären Signalenzymen, unter anderen auch solchen, die an der Regulation des Ca<sup>2+</sup>-Haushalts der Zelle beteiligt sind (Bergdahl und Swärd, 2004; Gosens et al., 2008; Razani et al., 2002a). So liefern Studien an unterschiedlichen Zelltypen bereits Hinweise darauf, dass GPCR, IP<sub>3</sub>-Rezeptoren, Ca<sup>2+</sup>-ATPasen, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher, die Ca<sup>2+</sup>-bindenden Proteine Calsequestrin und Calreticulin, PKC $\alpha$  und RhoA in Caveolae lokalisiert sind (Bush et al., 1994; Darby et al., 2000; Fujimoto, 1993; Fujimoto et al., 1992; Isshiki und Anderson, 2003; Moore et al., 1993; Taggart et al., 2000). Diese intrazellulären Effektormoleküle können einer Regulation durch Cav-1 unterliegen. Taggart und Mitarbeiter (2000) zeigten eine Cav-1-abhängige Translokation von PKC $\alpha$  und RhoA in die Caveolae, indem sie die CSD von Cav-1 blockierten.

Caveolae sind in enger räumlicher Nähe zum sarkoplasmatischen Retikulum zu finden, wo sie möglicherweise bei der Wiederauffüllung dieser intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher aus dem Ca<sup>2+</sup>-reichen Extrazellulärraum eine Rolle spielen (Gherghiceanu



und Popescu, 2006; Taggart, 2001). Außerdem ist eine direkte Verknüpfung der Caveolae mit dem Aktingerüst der Zelle über eine Interaktion von Cav-1 mit dem Dystrophin-Dystroglycan-Komplex gezeigt worden (Halayko und Stelmark, 2005). Zusammen legen diese Studien die Möglichkeit nahe, dass Caveolae eine Rolle während der Kontraktionsinitiation in glatten Muskelzellen spielen könnten.

Eine funktionelle Kopplung zwischen Cav-1 und der cholinerg induzierten Glattmuskelkontraktion wurde zum ersten Mal von Lai und Mitarbeitern (2004) für die Harnblase gezeigt. In Cav-1-defizienten Mäusen war die kontraktile Antwort auf Carbachol, einen ACh-Rezeptoragonisten, um 67% vermindert. Es stellt sich daher die Frage, ob auch die MR-Signaltransduktionswege der Atemwegsmuskulatur an Caveolae/Cav gekoppelt sind. Eine Assoziation zwischen Cav-3 und einem MR-Radioligand wurde bereits in Herzkammermyozyten nach einer Agonist-induzierten Translokation des M2R in die Caveolae durch Koimmunopräzipitation gezeigt (Feron et al., 1997) Ob dies auch in den Glattmuskelzellen der Atemwege der Fall ist und ob auch der M3R in Caveolae lokalisiert ist und mit Cav interagiert ist noch unklar.

Bezüglich der serotoninergen Glattmuskelkontraktion wurde für Cav-1 in verschiedenen Zelltypen eine Komplexbildung mit dem 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor gezeigt und elektronenmikroskopisch eine 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor-Immunreaktivität in Caveolae von Glattmuskelzellen lokalisiert (Bhatnagar et al., 2004; Fiorica-Howells et al., 2002). Durch die caveoläre Lokalisation dieses Rezeptors ist auch eine funktionelle Abhängigkeit der serotoninergen Bronchokonstriktion von Caveolae/Cav-1 denkbar. Angaben über eine Beziehung zwischen 5-HT-Rezeptoren und Cav-3 fehlen in der Literatur bisher.

## **1.9 Prinzip des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET)**

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde das Prinzip des FRET für die Untersuchung der Protein-Protein-Assoziation angewandt.

FRET ist ein nicht radiativer Transfer von Energie zwischen zwei Fluorophoren, einem Energie abgebenden Donor und einem Energie aufnehmenden Akzeptor. Da die Effizienz des Energietransfers mit der sechsten Potenz der Distanz zwischen den beiden Fluorophoren abnimmt, kann ein effizienter Transfer nur dann stattfinden,

wenn zwei Fluorophore weniger als 10 nm voneinander entfernt sind (Jares-Erijman und Jovin, 2003; Kenworthy et al., 2001).

Eine FRET-Analyse mittels konfokalen Laserrastermikroskops (CLSM) ist eine geeignete Methode, die enge räumliche Assoziation zweier Proteine, deren Expression nicht pathologisch verändert wurde, *in situ*, in ihrer natürlichen Umgebung zu detektieren. Da die Funktion eines Proteins häufig von mit ihm interagierenden Proteinen moduliert wird, kann die Identifikation seiner Interaktionspartner Hinweise auf die Funktion des Proteins liefern. Mit dem CLSM ist es zusätzlich möglich, eine Aussage über die subzelluläre Lokalisation der Protein-Protein-Assoziationen zu treffen.

Zur FRET-Detektion kann die Methode des Akzeptorbleichens eingesetzt werden, wobei die Donorfluoreszenz vor und nach dem Bleichen des Akzeptors verglichen wird (Bastiaens et al., 1996). Im Falle einer Assoziation zwischen den beiden Molekülen wird nach dem Bleichen des Akzeptorsfluorophors keine Energie mehr vom Donor auf den Akzeptor übertragen, so dass es zu einem Anstieg der Donorfluoreszenz kommt (Abbildung 1.5). Die Veränderung der Donorimmunfluoreszenz ( $\Delta IF$ ) in der gebleichten Region gibt die Stärke des FRET-Effekts wieder und errechnet sich wie folgt:

$$\Delta IF = D_B - D_A,$$

wobei  $D_B$  die Fluoreszenzintensität des Donors nach dem Akzeptorbleichen und  $D_A$  die Fluoreszenzintensität des Donors vor dem Akzeptorbleichen ist.

König und Mitarbeiter (2006) etablierten indirekte Immunhistochemie kombiniert mit FRET und CLSM-Analyse unter Anwendung der Methode des Akzeptorbleichens an Gewebeschnitten. Mit dieser Technik wurden *in situ*-Assoziationen von Cav-1 und Cav-2 im Gefäßendothel der Maus bestätigt, die in anderen Geweben mit anderen Techniken bereits gezeigt waren, und zum ersten mal Cav-1/Cav-2-Assoziationen im Trachealepithel gezeigt (Feron et al., 1996; König et al., 2006; Krasteva et al., 2006; Scheiffele, 1998).

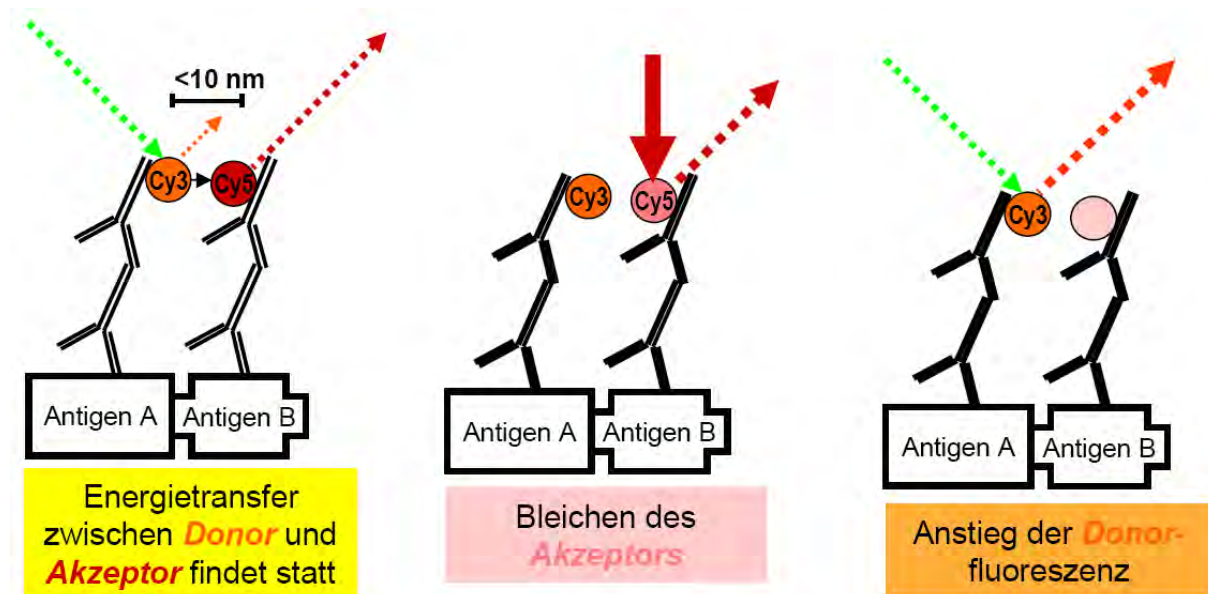


Abbildung 1.5 FRET. Schematische Darstellung der Methode des Akzeptorbleichens am Beispiel der indirekten immunhistochemischen Doppelmarkierung. A) Donor wird angeregt. Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor findet statt, wenn die Distanz zwischen den beiden Fluorophoren  $<10\text{ nm}>$  beträgt. B) Akzeptorfluorophor wird gebleicht. C) Akzeptorfluorophor ist ausgebleicht. Der Akzeptor kann keine Energie mehr vom Donor aufnehmen. Dieser emittiert daher stärker. Mit Erlaubnis modifiziert nach Krasteva (2006).

### 1.10 Ziel der Arbeit

Atemwegserkrankungen wie COPD und Asthma sind mit einer bronchialen Hyperreagibilität assoziiert. Um die bronchiale Hyperreagibilität bei Patienten mit Asthma zu reduzieren, werden neben anderen Bronchodilatoren Anticholinergika eingesetzt, welche die M2R- und M3R-vermittelte Atemwegskonstriktion unterdrücken. In Anbetracht dessen war das Ziel dieser Arbeit die Identifikation und Untersuchung von Schlüssel-molekülen für die Regulation der MR-vermittelten Atemwegskonstriktion.

Um der Frage nachzugehen, ob die cholinerge Bronchokonstriktion an Caveolae/Cav gekoppelt ist, wurde zunächst das Vorkommen von Cav-1, Cav-3 und M2R in der Atemwegsmuskulatur intrapulmonaler Bronchien der Maus auf mRNA-Ebene mittels laserassistierter Mikrodissektion mit anschließender RT-PCR-Analyse und auf Proteinebene mittels Western Blot und Immunhistochemie in Maus und Mensch charakterisiert. Für die nähere Bestimmung der molekularen Zusammensetzung der Caveolae wurden die Protein-Protein-Assoziationen von Cav-1, Cav-3 und M2R *in situ* in murinen Gewebeschnitten mittels indirekter Doppelimmunhistochemie kombiniert mit FRET-CLSM-Analyse untersucht.

Die funktionelle Bedeutung der Caveolae/Cav für die Bronchokonstriktion wurde in Lungenschnitten von Wildtyp-, M2R-, M3R- und Cav-1-defizienten Mäusen vor und nach Zerstörung der Caveolae durch Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (MCD), einem Cholesterol-bindenden Agenz, aufgeklärt. Das Vorkommen von Caveolae in der Bronchialmuskulatur M2R-, M3R- bzw. Cav-1-defizienter Mäuse wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Gewebe

#### 2.1.1 Mäuse

1) Immunhistochemie (IHC), einschließlich FRET-CLSM-Analyse, und Western Blot (WB) wurden an männlichen und weiblichen FVB-Mäusen im Alter von 10-25 Wochen durchgeführt, die unter Standardbedingungen gehalten und durch Inhalation von Isofluran (Baxter, Unterschleißheim) getötet wurden.

2) Zur Überprüfung der M2R-Antikörperspezifität wurden zwei weibliche M2/3R doppel-knockout ( $M2/3R^{-/-}$ ) Mäuse ( $\geq 20$  Wochen) und zwei korrespondierende Wildtyp-Mäuse ( $M2/3R^{+/+}$ ) mit demselben genetischen Hintergrund [129/J1 (25%) $\times$ 129SvEv (50%) $\times$ CF1 (25%)] ( $\geq 12$  Wochen) eingesetzt. Die Generierung dieses Mausstammes wurde bereits von Struckmann et al. (2003) beschrieben.

3) Zur Überprüfung der Cav-1-Antikörperspezifität wurden zwei 17-18 Wochen alte, männliche Cav-1-defiziente ( $Cav-1^{-/-}$ ) Mäuse und zwei korrespondierende 20 Wochen alte Wildtyp-Mäuse verwendet. Die Generierung der Cav-1-defizienten Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 $\times$ sv129 wurde durch Razani et al. (2001) beschrieben.

4) Videomorphometrische Experimente, Elektronenmikroskopie, laserassistierte Mikrodisektion und Polymerasekettenreaktion (PCR)-Analysen wurden an 10-20 Wochen alten männlichen M2R-, M3R- und Cav-1-defizienten Mäusen ( $M2R^{-/-}$ ,  $M3R^{-/-}$ ,  $Cav-1^{-/-}$ ) und an korrespondierenden Wildtyp-Mäusen ( $M2R^{+/+}$ ,  $M3R^{+/+}$ ,  $Cav-1^{+/+}$ ) aus spezifiziert-pathogenfreier Haltung durchgeführt. Die Generierung der  $M2R^{-/-}$  und  $M3R^{-/-}$  Mäuse wurde von Gomeza et al. (1999) und Yamada et al. (2001) beschrieben. Für videomorphometrische Experimente wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, um einen möglichen Einfluss eines Narkosemittels auf die Kontraktilität der Bronchien auszuschließen.

Alle Tiere wurden gemäß den aktuellen Vorschriften der Bundesrepublik Deutschland für die Zucht von Labortieren gehalten.

#### 2.1.2 Humane Gewebeproben

Für immunhistochemische Untersuchungen an humanen Lungen wurden 10% formalinfixierte Lungenproben (n=4) über Nacht bei 4°C mit Zamboni-Fixans [1,85%

Formaldehyd und 15% gesättigte Pikrinsäure-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer (PP)] nachfixiert, zur Kryoprotektion über Nacht mit 18% Saccharose enthaltendem 0,1 M PP inkubiert, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und ebenfalls bei -80°C gelagert.

Alle humanen Gewebeproben entstammen gespendeten Lungen aus der Pathologie, die nach den Richtlinien zur Organspende der Bundesärztekammer entnommen, aber nicht zur Transplantation genutzt werden konnten.

## 2.2 Immunhistochemische Verfahren

### 2.2.1 Antikörper

Folgende primäre und sekundäre Antikörper und Peptide wurden für IHC und WB benutzt:

Tabelle 2.1 Primärantikörper für immunhistochemische und Western Blot-Analysen an murinem und humanem Gewebe

#### Primärantikörper

Antigen	Wirtsspezies, Code bzw. Klon	Verdünnung	Quelle
Cav-1 $\alpha$ (N-20) N-Terminus	Kaninchen, polyklonal, sc-894	IHC 1:800 WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Cav-3	Kaninchen, polyklonal, PA1-066	IHC 1:500 WB 1:4000	Affinity BioReagents, CO, USA
M2R	Ratte, monoklonal IgG2a, MAB367	IHC 1:800	Chemicon, Temecula, CA, USA

#### Primärantikörper, direkt markiert

Antigen	Wirtsspezies, Code bzw. Klon	Konjugat	Verdünnung	Quelle
$\alpha$ -sma	Maus, monoklonal, IgG2a, F3777, Klon 1A4	FITC	IHC 1:1000	Sigma-Aldrich, Sternheim
Cav-1 $\alpha$ (N-20) N-Terminus	Kaninchen, polyklonal, sc-894	TRITC	IHC 1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

$\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -sma), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Immunglobulin (Ig), Immunhistochemie (IHC), Tetramethylrhodamin-Isouthiocyanat (TRITC), Western Blot (WB)

Tabelle 2.2 Sekundärantikörper und Peptide für immunhistochemische und Western Blot-Analysen an murinem und humanem Gewebe

### Sekundärantikörper

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Ig-Größe	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-IgG	Esel	Cy3	gesamtes Molekül	IHC 1:1000	Chemicon, Temecula, CA, USA
Kaninchen-IgG	Esel	Cy5	F(ab') <sub>2</sub> Fragmente	IHC 1:400	Dianova, Hamburg
Ratten-IgG	Esel	Cy3	gesamtes Molekül	IHC 1:2000	Dianova, Hamburg
Kaninchen-IgG	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	gesamtes Molekül	WB 1:10.000	Pierce, Rockford, USA

### Synthetisches Peptid

Antigen	Sequenz	Konzentration	Quelle
Cav-3	Aminosäuren 1-18 des Antigens	IHC 100 µg/ml WB 8,3 µg/ml	Affinity BioReagents, CO, USA

Immunglobulin (Ig), Immunhistochemie (IHC), Western Blot (WB)

## 2.2.2 Indirekte (Doppel-)Immunfluoreszenz an Kryoschnitten

Immunhistochemische Untersuchungen wurden an murinen und humanen Lungenproben durchgeführt. Zur Gewinnung von unfixiertem Gewebe von FVB-Mäusen, Cav-1- bzw. M2/3R-defizienten Mäusen und deren korrespondierenden Wildtypstämmen (je  $n \geq 2$ ) wurde der Thorax der Maus eröffnet und die Trachea freigelegt. Über einen Einschnitt wurde eine Venenverweilkanüle (1,1 mm Durchmesser, Braun, Melsungen) in die Trachea eingeführt. Über diese Kanüle wurden 1-1,5 ml Einbettungsmedium (O.C.T.-Compound, Sakura, Zoeterwoude, Niederlande), das mit dem gleichen Volumen an 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) verdünnt wurde, in die Lunge eingefüllt. Die Kanüle wurde entfernt, die Trachea im zervikalen Bereich abgeklemmt und alle thorakalen Organe (Lunge, Herz, Trachea, Oesophagus, Thymus, Aorta thoracica) *en bloc* herauspräpariert, mit Einbettungsmedium auf einem Stück Filterpapier ausgerichtet, in schmelzendem Isopentan (Fluka, Sigma, Taufkirchen) schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Es wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt (Microm HM 560, MICROM, Walldorf) und auf Objektträger (SuperFrostPlus, Menzel-Gläser,

Braunschweig) aufgezogen. Die Schnitte wurden für 10 min bei -20°C in Aceton fixiert und 1 h lang luftgetrocknet. Die Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen erfolgte für 1 h mit 5% normalem Ziegenerum (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) und 5% Rinderserumalbumin (Sigma) in 0,005 M PBS.

Für Einzelimmunfluoreszenzmarkierungen wurden die primären Antikörper mit 0,005 M PBS mit einem Zusatz von 0,01%  $\text{NaN}_3$  und 4,48 g/l NaCl (PBS+ $\text{NaN}_3$ +NaCl) verdünnt und mit dem Gewebe über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen (3x10 min) mit PBS wurde der mit PBS+ $\text{NaN}_3$ +NaCl verdünnte Cy3-konjugierte sekundäre Antikörper auf das Gewebe aufgetragen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Für Doppelfärbungen wurden die mit 0,005 M PBS verdünnten primären Antikörper zusammen auf das Gewebe gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Folgende Kombinationen primärer Antikörper wurden eingesetzt: 1) Anti-Cav-1 $\alpha$ /Anti-M2R, 2) Anti-Cav-3/Anti-M2R, 3) Anti-Cav-1 $\alpha$ /Anti-Cav-3, 4) Anti-Cav-1 $\alpha$ /Anti- $\alpha$ -sma und 5) Anti-Cav-3/Anti- $\alpha$ -sma. Nach mehrmaligem Waschen wurde der mit PBS verdünnte Cy5-konjugierte sekundäre Antikörper auf das Gewebe aufgetragen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschrritten wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 1 h dem mit PBS verdünnten Cy3-konjugierten sekundären Antikörper ausgesetzt. Bei Anwendung direkt markierter primärer Antikörper für doppelimmunhistochemische Untersuchungen erfolgte erst die indirekte Immunmarkierung mit einem Cy3 bzw. Cy5-konjugierten sekundären Antikörper und dann (bei Anwendung des Anti- $\alpha$ -sma-FITC-markierten-Antikörpers an humanem Gewebe nach Postfixierung) über Nacht die Inkubation mit dem direkt markierten Antikörper.

Die Gewebeschnitte wurden erneut mit PBS gespült (3x10 min) und für 10 min in PBS-gepuffertem 4% Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt) postfixiert, um die Bindungen zwischen primären und sekundären Antikörpern zu fixieren. Nach einem abschließenden Waschen (10 min in PBS) wurden die Objektträger mit Karbonat-gepuffertem Glycerol (pH 8,6) bzw. für die Anwendung der FRET-CLSM-Analyse gegen Ausbleichen mit Mowiol (pH 8,6; Calbiochem, Merck) eingedeckelt und bei 4°C dunkel gelagert. Die Immunfluoreszenzen wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena) mit passenden Filtern und mit einem CLSM (Leica-TCS SP2 AOBS; Leica, Mannheim) untersucht.



### 2.2.2.1 Spezifitätskontrollen

Die Spezifität der Markierung durch die verwendeten primären Antikörper wurde 1) für den Anti-Cav-3-Antikörper mittels Inkubation mit dem korrespondierenden Peptid (Tabelle 2.1) für 1 h direkt vor der Inkubation mit dem Gewebe bei Raumtemperatur und 2) für den Anti-Cav-1 $\alpha$ - und den Anti-M2R-Antikörper mittels Immunhistochemie an Gewebe von jeweils zwei Cav-1- bzw. M2/3R-defizienten Mäusen überprüft.

Die Spezifität der sekundären Antikörper wurde an Schnitten überprüft, welche mit PBS statt mit den primären Antikörpern inkubiert wurden.

### 2.2.3 FRET-CLSM-Analyse

König et al. (2006) etablierten indirekte Immunhistochemie kombiniert mit FRET und CLSM-Analyse unter Anwendung der Methode des Akzeptorbleichens (siehe Abschnitt 1.9) in Gewebeschnitten *in situ*. Zur Untersuchung der Assoziation von Cav-1, Cav-3 und M2R in Herzvorhof- und Bronchialmuskulatur wurden an Kryoschnitten von Thoraxpaketen von FVB-Mäusen indirekte Doppelimmunfluoreszenzmarkierungen für Cav-1/Cav-3, Cav-1/M2R und Cav-3/M2R wie unter 2.2.2 beschrieben durchgeführt.

Ausgewählte doppelimmunmarkierte Gewebeflächen (ROI=*region of interest*) wurden im CLSM (TCS-SP2 AOBS, Leica) mehrmals bei 100%-iger Laseraktivität und maximalem Zoom durch den 633 nm Laser bestrahlt, um die Akzeptor-Fluorophore (Cy5) zu bleichen (5 mal für Cav-1/Cav-3, 10 mal für Cav-1/M2R und Cav-3/M2R). Der Anstieg der Donorimmunfluoreszenz ( $\Delta F$ ) des Cy3- bzw. TRITC-Signals in der gebleichten Region gibt die Stärke des FRET-Effekts wieder. Für jedes Gewebe (je  $n \geq 4$ ) wurden mindestens 10 Messungen für jede Kombination der Doppelmarkierungen bzw. deren jeweilige Kontrolle (ohne Primärantikörper für den Donor wie unter 2.2.3.1 beschrieben) durchgeführt.

Die Lasereinstellungen waren zur Anregung von Cy3 und TRITC: 52% der Laserkraft bei 543 nm, Detektion bei 555–620 nm; zur Anregung von Cy5: 20% Laserkraft bei 633 nm, Detektion bei 639–738 nm. Das *pinhole* wurde auf 3 *Airy Units* eingestellt und die *Photomultiplier*-Einstellungen lagen zwischen 495 und 599 V (noch im linearen Messbereich). Die Einstellungen wurden bei jedem Versuch konstant gehalten. Für die Messungen wurden vor und nach dem Bleichen sowohl im Cy-3(Donor)- als auch im Cy-5(Akzeptor)-Kanal gleichzeitig Bilder aufgenommen.

Um das Hintergrundfluoreszenzrauschen in den Aufnahmen zu reduzieren, wurden die Bilder dreimal eingescannt und das Signal gemittelt. Der FRET-Effekt wurde durch die Messung der Intensität der Donorfluoreszenz vor und nach dem Bleichen innerhalb des geblichenen Bereichs quantifiziert.

### **2.2.3.1 Zusätzliche Kontrollen**

Als Kontrolle für die Stabilität des Messsystems wurden außerhalb des geblichenen Bereiches benachbarte Regionen von gleicher Fläche gemessen. Wenn in diesen Regionen Werte in der FRET-Effizienz von über 2% gemessen wurden, wurde diese Messserie von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Da alle untersuchten Proteine membranständig waren und ihre Immunreaktivitäten insbesondere an den Plasmamembranen in der Muskulatur auftraten, wurden diese Membranregionen innerhalb des geblichenen Bereiches mittels Software-Werkzeugs per Hand umkreist.

Um unspezifische FRET-Signale durch Spezies-Kreuzreaktivität der sekundären Antikörper auszuschließen, wurden in Kontrollen die Primärantikörper für den Donor (Anti-M2R-Antikörper) weggelassen, aber beide sekundären Antikörper eingesetzt. Bei Verwendung des direkt TRITC-markierten Anti-Cav-1 $\alpha$ -Antikörpers als Donor wurde stattdessen der Primärantikörper für den Akzeptor (Anti-Cav-3-Antikörper) weggelassen.

## **2.3 Western Blot**

### **2.3.1 Proteingewinnung, Elektrophorese, Proteintransfer und -detektion**

Von drei verschiedenen FVB-Mäusen wurden Lungenschnitte präpariert wie für die Videomorphometrie-Experimente beschrieben (siehe Abschnitt 2.6). Jeweils zwei Schnitte wurden unter Zusatz eines Lysispuffers mit einer Kugelmühle (MixerMill 300, Qiagen, Hilden) homogenisiert. Der Lysispuffer enthielt 10 mM Tris (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 60 mM Octylglucosid (Sigma) und eine Tablette Proteaseinhibitoren (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) pro 10 ml Pufferlösung. Nach Inkubation der Proteinlösungen für 1 h bei 4°C wurden sie 5 min bei 20.800 g zentrifugiert. Da die Pufferlösung eine sehr hohe Konzentration von Octylglucosid enthielt, war die

Proteinbestimmung photometrisch nicht möglich. Unterschiedliche Mengen des Gewebehomogenats wurden auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinmengen wurden durch eine Färbung mit Simply Blue<sup>TM</sup> Safe Stain (Invitrogen, Karlsruhe) sichtbar gemacht. Für Western Blot-Versuche wurden die Proteinkonzentrationen gewählt, bei denen die beste Auftrennung und Intensität der Banden zu beobachten war. Die Volumina dieser Proben wurden je nach Auftrennung und Intensität der Banden mit destilliertem Wasser (*A. dest.*) auf 10 µl angeglichen. Die so verdünnte Proteinlösung und 2 µl 5x Probenpuffer [320 mM Tris-HCl, pH 6,8, 5% Natrium-Dodecylsulfat (SDS, Serva, Heidelberg), 50% Glycerol, 0,25 mg/ml Bromphenolblau und 1% β-2-Mercaptoethanol] wurden für 5 min auf 95°C erhitzt, um die Proteine vollständig zu lösen, Tertiärstrukturen zu unterbinden und eventuelle Proteasen zu inaktivieren. Um eine gute Auftrennung der Proteine im Trennbereich von 10-60 kDa zu erreichen, wurden ein 15%-iges SDS-PAGE-Trenngel [15 ml 30% Acrylamid (Roth, Karlsruhe); 5,6 ml 2 M Tris-HCl, pH 8,8; 150 µl 20% SDS; 160 µl 10% Ammoniumpersulfat (Merck); 12 µl TEMED (Roth); 9,25 ml *A. dest.*] gegossen, das nach Auspolymerisieren von einem Sammelgel (1 ml 30% Acrylamid; 50 µl 20% SDS; 1,25 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8; 80 µl 10% Ammoniumpersulfat; 10 µl TEMED; 7,7 ml *A. dest.*) überschichtet wurde. Nach Zugabe des Elektrophoresepuffers (0,025 M Tris; 0,192 M Glycin; 2,5 ml 20% SDS und *A. dest.* pro Liter) und Auftragen der Proteine auf das Gel wurde die Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Das Sammeln der aufgetragenen Proteine erfolgte in etwa 20 min bei 75 V, das Auftrennen in etwa 60 min bei 150 V. Danach wurden die Proteine vom Gel elektrophoretisch auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Immobilon-P; Fisher Scientific, UK) übertragen, die durch Methanol aktiviert und zusammen mit den Filterpapieren in einem Blot-Puffer (NuPAGE Transfer Buffer, Invitrogen) getränkt wurde. Die Membran und das Gel wurden ohne Luftblasen zwischen sechs Lagen Filterpapier gebettet und für 1 h bei 100 mA geblottet. Die Polyvinylidenfluorid-Membran wurde mit Ponceau S (Sigma) angefärbt, um den Proteintransfer auf die Membran zu überprüfen. Nach 3x5 min Waschen in einer Tween-20-haltigen Tris-HCl-gepufferten Lösung [*Tween-20 containing Tris-HCl-buffered saline* (TTBS), pH 8,0; 0,025 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,05% Tween-20] wurden unspezifische Proteinbindungsstellen durch 90-minütige Inkubation der Membran mit 10% in TTBS gelöstem Milchpulver (Roth) bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Membran wurde über Nacht bei Raumtemperatur

mit dem primären Antikörper (Tabelle 2.1) inkubiert, der mit 5% Milchpulver in TTBS verdünnt wurde. Nach wiederholtem Waschen (6x5 min) in TTBS wurde der Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper (Tabelle 2.2) in mit 2,5% Milchpulver versetztem TTBS verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Für die Visualisierung der Proteine wurde die Membran für 5 min abgedunkelt mit einem Chemilumineszenzsubstrat (Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate, Pierce, Bonn) inkubiert. Zur Detektion der Chemilumineszenzreaktion wurde ein Röntgenfilm (Amersham, UK) für einige min der Membran exponiert. Um die Sensitivität der Detektion zu erhöhen, wurde die Dauer der Exposition gegebenenfalls von 1 min auf bis zu 30 min erhöht. Danach wurden die Filme manuell entwickelt.

### **2.3.2 Spezifitätskontrollen**

Die Spezifität der Markierung der verwendeten primären Antikörper wurde für Anti-Cav-1 $\alpha$  an Lungenhomogenaten Cav-1-defizienter Mäuse ausgetestet. Für die Untersuchung der Spezifität des Anti-Cav-3-Antikörpers wurde dieser mit dem korrespondierenden Peptid für 1 h unmittelbar vor der Applikation auf die Membran bei Raumtemperatur inkubiert.

Um eine Kreuzreaktivität dieses Antikörpers mit Cav-1 auszuschließen, wurde dieser Antikörper zusätzlich an Lungenschnitten Cav-1-defizienter Tiere angewendet. Zur Bestimmung der Spezifität der sekundären Antikörper wurden diese in einer Inkubation ohne die jeweiligen primären Antikörper eingesetzt.

## **2.4 Laserassistierte Mikrodissektion mit anschließender reverse Transkriptase (RT)-PCR-Analyse**

Die Lasermikrodissektion wurde zum Isolieren von glatter Muskulatur aus Kryoschnitten unfixierter Tracheen und Bronchioli von drei Wildtyp-Mäusen (M3R<sup>+/+</sup>) genutzt. Das isolierte Gewebe wurde anschließend für mRNA-Analysen eingesetzt.

### **2.4.1 Laserassistierte Mikrodissektion**

Das Gewebe wurde wie bereits in Abschnitt 2.2.2 für die Immunhistochemie beschrieben entnommen und eingefroren. Seriengefrierschnitte von 6  $\mu$ m Dicke wurden angefertigt und auf membranbeschichtete Objektträger (P.A.L.M. Microlaser

Technologies, Bernried) aufgezogen, die zuvor für 30 min mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt wurden. Innerhalb einer Stunde nach Anfertigung der Schnitte wurden diese zur besseren Gewebedifferenzierung mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt und die Muskulatur mittels Laser in Stücken ausgeschnitten und durch Hochdruck in den Deckel eines 0,5 ml Reaktionsgefäßes katapultiert (MicroBeam System, P.A.L.M. Microlaser Technologies). Damit die katapultierten Zellen am Deckel hafteten, wurde dieser zuvor an der Innenseite mit 2 µl Mineralöl beschichtet. In jedes Reaktionsgefäß wurde in etwa die gleiche Gewebemenge (etwa 20 Stücke à 30x30 µm) aufgenommen. Zu jeder Probe wurden 346,5 µl Lysispuffer (Qiagen) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol (Sigma) zugegeben. Durch einen kurzen Zentrifugationsschritt wurden die Zellen vom Deckel in die Pufferlösung überführt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum nächsten Tag bei -80°C aufbewahrt.

Als Kontrollen für eventuelle Kontaminationen mit RNA von anderen Zelltypen, die durch das Schneiden verschleppt werden und zu einem falsch-positivem Nachweis führen könnten, wurden luminale Flächen, die mit dem Einbettungsmedium ausgefüllt waren, ausgeschnitten und gesammelt. Diese Flächen entsprachen in Größe und Anzahl den isolierten Gewebeproben. Zusätzlich wurde ein mit Mineralöl beschichtetes, aber kein Gewebe enthaltendes Reaktionsgefäß, mitgeführt, um eine RNA-Kontamination des Mineralöls auszuschließen.

#### **2.4.2 RNA-Isolation und reverse Transkription**

Die Isolation der Gesamt-RNA der mikrodisektierten Proben wurde mit Hilfe des RNeasy Micro Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der DNase-Verdau wurde bei der Isolation jedoch ausgelassen, da bei diesem Schritt ein Teil der RNA zerstört werden könnte. Durch die Anwendung genspezifischer, intronspannender Primerpaare während der PCR konnte in der abschließenden Gel-Analyse anhand der Größe des Fragments eventuell noch vorhandene genomische DNA von neusynthetisierten Fragmenten eindeutig differenziert werden. Je 10 µl RNA wurden für 5 min auf Eis inkubiert, kurz zentrifugiert und danach im Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg) für 10 min bei 70°C erwärmt. Anschließend wurden die Proben bis zur Zugabe des RT-Mix aus 2 µl 10xPCR Puffer II (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3), 4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl dNTPs (10 mM je dNTP, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), 1 µl Random

Hexamers (50 mM), 0,5 µl RNase Inhibitor (20 U/µl), 1 µl MurineLeukemiaVirus (MuLV) RT (50 U/µl) und 0,5 µl *A. dest.* (alle Reagenzien von Applied Biosystems, Darmstadt) wieder auf Eis gelegt. Zur Aktivierung der RT wurde die RNA für 10 min bei 20°C inkubiert, dann 75 min lang bei 43°C in cDNA umgeschrieben. Zur Inaktivierung der MuLV-RT wurde der PCR-Ansatz anschließend für 5 min auf 99°C erhitzt, dann bis zur unmittelbar darauf folgenden PCR auf 4°C abgekühlt.

### 2.4.3 PCR

Für die nachfolgende PCR wurden genspezifische, intronspannender Primerpaare für Cav-1, Cav-3 und β-Mikroglobulin (β-MG; Tabelle 2.3) benutzt.

Tabelle 2.3 Oligonukleotidprimer für PCR-Analysen

Gen	Genbank Nr.	Primersequenz (5'→3')	Produktlänge (Bp)
Cav-1	NM007616.3	forward GCA CAC CAA GGA GAT TGA CC	212
		reverse AGA TGA GTG CCA TTG GGA TG	
Cav-3	NM007617	forward AGG ACA TTC ACT GCA AGG AG	167
		reverse GTA CTT GGA GAC GGT GAA CG	
β-MG	NM009735.3	forward TGG TCT TTC TGG TGC TTG TC	108
		reverse GTA TGT TCG GCT TCC CAT TC	

Basenpaare (Bp), Caveolin (Cav), β-Mikroglobulin (β-MG).

Zur Amplifikation der bekannten DNA-Abschnitte wurden jeweils 4 µl cDNA und je 0,5 µl forward und reverse Primer (je 20 pM, MWG Biotech, Ebersberg) zu einem Mastermix aus 2,5 µl 10×PCR buffer II, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µl dNTPs (10 mM je dNTP), 0,2 µl AmpliTaq Gold Polymerase (5 U/µl, alle Reagenzien von Applied Biosystems) und 14,8 µl *A. dest.* in ein 200 µl Reaktionsgefäß gegeben. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler (Mastergradient Personal, Eppendorf). Durch 4-minütiges Erhitzen auf 95°C wurde zuerst die doppelsträngige DNA zu Einzelsträngen geschmolzen und die AmpliTaq Gold Polymerase aktiviert. Darauf folgten 50 Zyklen mit folgendem Ablauf: 20 s Erhitzen auf 95°C zum Schmelzen doppelsträngiger DNA, 20 s bei 59°C (für die verwendeten Primerpaare spezifische Anlagerungstemperatur) und 20 s bei 73°C für die Synthese neuer DNA-Fragmente. Die 20 s kurzen Schritte verhindern das Amplifizieren langer, unspezifischer Produkte. Nach Beendigung des letzten Zyklus wurde die Temperatur für 7 min auf 73°C gehalten, um die noch nicht abgeschlossene Synthese von DNA-Fragmenten abzuschließen, und dann auf 4°C gesenkt. Als Kontrolle für eine Verunreinigung der

Reagenzien mit genomischer DNA wurden PCR-Ansätze mit *A. dest.* ohne die entsprechende Matrize (ohne cDNA) mitgeführt.

#### **2.4.4 Gelelektrophorese**

Die Größe der PCR-Produkte wurde anschließend durch Elektrophorese in einem 1,5% TRIS-Azetat-Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Agarosegel [pH 8,0; 15 g/l Agarose (Genagarose L.E., iNNO-TRAIN Diagnostik, Kronberg), 482 g/l TRIS (USB, Cleveland, USA), 104,2 ml/l Eisessig (Merck), 200 ml/l 0,5 M EDTA (Invitrogen) mit *A. dest.* auf 1 l aufgefüllt] mit einem Zusatz von 8 µl/l Ethidiumbromid (1%, Roth) überprüft. Je 25 µl der PCR-Produkte wurden mit 5 µl Ladepuffer [aus 0,1 g Orange G dye (Sigma), 5,88 ml 87%-igem Glycerol (Sigma), 250 µl TRIS-HCl-Puffer (pH 8,0), 1 ml EDTA-Lösung (pH 8,0, Sigma) ad 10 ml *A. dest.*] vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die PCR-Produkte wurden durch eine horizontale Elektrophorese in einer Horizon 11·14 Kammer (Life Technologies, Gibco) aufgetrennt. Als Längenmarker wurden 10 µl 100 bp DNA ladder Gene Ruler TM (Fermentas, St- Leon-Rot) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 150 V über 45 min. Die PCR-Fragmente im Gel wurden unter UV-Licht detektiert.

#### **2.5 Real-time quantitative PCR**

Durch Eröffnung des Thorax bzw. Abdomens wurden M3R<sup>+/+</sup> und M3R<sup>-/-</sup> Mäusen (jeweils n=3) unfixierte Gewebeproben von Lunge, Trachea und Harnblase entnommen. Die Gesamt-RNA wurde mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA-Menge wurde photometrisch bestimmt, auf 1 µg/µl mit *A. dest.* verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Zur Zerstörung genomischer DNA wurde ein DNase-Verdau mittels DNase I (Invitrogen) durchgeführt. Hierzu wurden 1 µg/µl der isolierten RNA mit *A. dest.* auf 8 µl aufgefüllt und mit 1 µl DNase I (1 U/µl, Invitrogen) und 1 µl 10xDNase I Reaction Buffer (Invitrogen) für 15 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl EDTA (25mM, pH 8,0, Invitrogen) wurde das Enzym anschließend wieder inaktiviert. Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde der Ansatz mit 1 µl Oligo-dTs (500 µg/µl, Perkin Elmer, Ohio, USA), 4 µl 5xFirst Strand Buffer (Invitrogen), 1 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP) und 2 µl Dithiothreitol (0,1 M, Invitrogen) versetzt. Nach Zugabe

von 1 µl Superscript II Reverse Transcriptase (200 U/µl, Invitrogen) erfolgte die reverse Transkription 50 min lang bei 42°C. Zur Inaktivierung des Superscript II Enzyms wurde der Ansatz danach für 15 min auf 70°C erhitzt und bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

Die anschließende real-time quantitative PCR erfolgte im I-Cycler (Bio-Rad, München) mit Hilfe des QuantiTec SYBR Green PCR Kits (Bio-Rad) unter Verwendung genspezifischer intronspannender Primerpaare für M2R, M3R und β-MG (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4 Oligonukleotidprimer für real-time PCR-Analysen

Gen	Genbank Nr.	Primersequenz (5'→3')	Produktlänge (Bp)
M2R	AF264049	forward TGT CTC CCA GTC TAG TGC AAG G reverse CAT TCT GAC CTG ACG ATC CAA C	369
M3R	AF264050	forward GTA CAA CCT CGC CTT TGT TTC C reverse GAC AAG GAT GTT GCC GAT GAT G	245
β-MG	NM009735.3	forward TGG TCT TTC TGG TGC TTG TC reverse GTA TGT TCG GCT TCC CAT TC	108

Basenpaare (Bp), β-Mikroglobulin (β-MG).

Die cDNA wurde 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10.000 in sterilem *A. dest.* vorverdünnt, um diejenige Verdünnung zu ermitteln, bei der die Amplifikation der cDNA-Fragmente eine Effizienz von nahezu 100% hat. Zu 4 µl der 1:2 vorverdünnten cDNA wurden 12,5 µl 2xQuantiTecProbe Master-Mix, jeweils 0,75 µl eines intronspannenden Forward- und Reverseprimers (20 pM) und 7 µl *A. dest.* gegeben. Die PCR-Bedingungen umfassten ein 10-minütiges Schmelzen der DNA bei 95°C, gefolgt von 45 Zyklen mit je 30 s bei 95°C, 30 s bei 60°C und 30 s bei 72°C. Anschließend wurden die Probenansätze für 7 min auf 73°C erhitzt und danach auf 4°C heruntergekühlt.

Der Anstieg der SYBR Green-Fluoreszenz, der durch die Bindung von SYBR Green an die im Laufe der PCR-Reaktion zunehmende doppelsträngige DNA hervorgerufen wurde, diente zur Quantifizierung der entstandenen DNA-Fragmente. Für jeden Zyklus wurde eine zugehörige Fluoreszenzintensität ermittelt. Für jeden Lauf wurde ein Schwellenwert in der exponentiellen Phase festgelegt, in welcher sich die Anzahl der Produkte in jedem Zyklus exakt verdoppelte. Der *cycle threshold* (CT)-Wert wurde als diejenige Zykluszahl ermittelt, in der die Fluoreszenz der PCR-Produkte diesen Schwellenwert überstieg. Jede Probe wurde dreifach bestimmt und der



Mittelwert wurde ermittelt. Für die Quantifizierung wurde die Expression des untersuchten Gens immer im Vergleich zur Expression eines bekannten Gens (*Housekeeping*-Gen) derselben Probe errechnet. Die  $\Delta CT$  von M2R ( $\Delta CT_{M2R}$ ) und M3R ( $\Delta CT_{M3R}$ ) wurden in Bezug auf das mitgeführte *Housekeeping*-Gen  $\beta$ -MG wie folgt errechnet:

$$\Delta CT_{M2R \text{ bzw. } M3R} = CT_{M2R \text{ bzw. } M3R} - CT_{\beta\text{-MG}}$$

Kontrollen umfassten PCR-Ansätze ohne cDNA (siehe Abschnitt 2.2.3). Die PCR-Produkte wurden anschließend wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben in einem 1,5%-igen TRIS-Azetat-EDTA-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Produktlängen anhand eines Längenmarkers überprüft. Die Reinheit der amplifizierten Produkte wurde anhand der ermittelten Schmelzkurve überprüft. Da die Schmelztemperaturen aufgrund der Basenzusammensetzung für die untersuchten doppelsträngigen DNA-Fragmente spezifisch waren, wurden Kontaminationen oder Primerdimerisierung anhand der Schmelzkurven ausgeschlossen, um die Effektivität der Amplifikation der gewünschten DNA sicherzustellen.

## 2.6 Videomorphometrie

In videomorphometrischen Experimenten wurde *ex vivo* die Kontraktilität intrapulmonaler Bronchien von M2R-, M3R- und Cav-1-defizienten und den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen (je  $n \geq 4$ ) in Lungenpräzisionsschnitten ermittelt und ein Einfluss von Caveolae/Cav auf die Bronchokonstriktion untersucht.

Nach einem abgewandelten Protokoll von Martin et al. (1996) und Struckmann et al. (2003) wurden Präzisionslungenschnitte angefertigt: Der Thorax der Maus wurde eröffnet und die Trachea freigelegt. Über einen Einschnitt in der Trachea wurde eine Venenverweilkanüle (1,1 mm Durchmesser, Braun, Melsungen) eingeführt, über welche die Lunge mit 1-1,5 ml Low-Melting-Point-Agarose (Bio-Rad) gefüllt und somit entfaltet wurde. Die Kanüle wurde entfernt, die Trachea im zervikalen Bereich abgebunden, alle thorakalen Organe *en bloc* herauspräpariert und in 4°C kalten HEPES-Ringer Puffer getaucht, um die Agarose aushärten zu lassen.

Mit einem Vibratom (Vibratome VT1000S, Leica) wurde der linke Lungenlappen in 200  $\mu$ m dicke Scheiben geschnitten und für 2-6 h bei 37°C in Medium (minimal essential medium, GIBCO, Karlsruhe) mit 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Penicillin

10.000 Units/ml Streptomycin 10 mg/ml; PAA Laboratories GmbH, Cölbe) unter Normoxie (21% O<sub>2</sub>, 5,3% CO<sub>2</sub>) inkubiert, um die Agarose auszuwaschen.

Die Experimente erfolgten in einer Perfusionskammer (Hugo Sachs Elektronik, March) unter mikroskopischer Beobachtung mittels eines inversen Mikroskops, an das eine *charge-coupled device* (CCD)-Kamera angeschlossen war. Die Durchmesser der untersuchten Bronchien betrugen zwischen 150-250 µm. Alle 60 Sekunden wurde ein Bild des Bronchus aufgenommen (Abbildung 2.1) und mit Optimas 6.5 Software (Stemmer Imaging, Puchheim) analysiert.

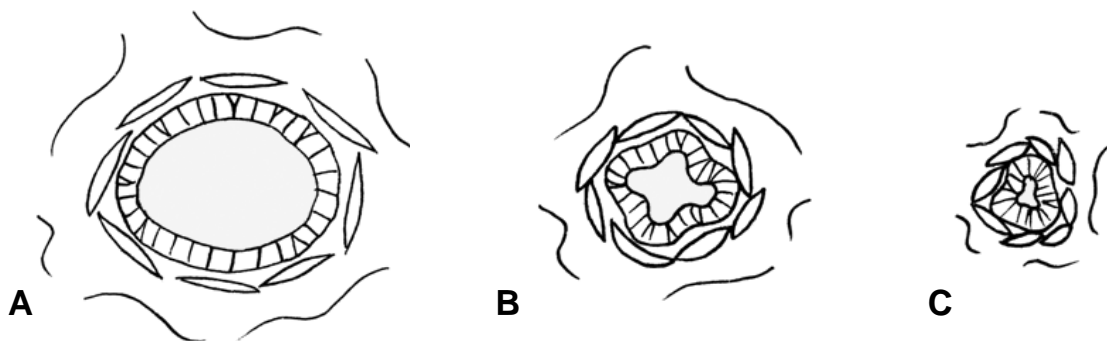


Abbildung 2.1 Schemazeichnung eines Bronchus bei zunehmender Konstriktion. Skizziert ist das Epithel umgeben von glatten Muskelzellen und lockerem Bindegewebe. Die farbig unterlegte Region illustriert die Veränderung der bei videomorphometrischen Untersuchungen ermittelten Fläche des Bronchuslumens.

Die Fläche des Atemwegslumens nach 5- bzw. 10-minütiger Perfusion mit HEPES-Ringer-Puffer in der Kammer wurde als 100% gesetzt. Eine Bronchokonstriktion wurde in prozentualer Verringerung dieser Fläche ausgedrückt. Nach Stimulation mit Muskarin (Sigma), KCl oder 5-HT (Sigma) wurden die Schnitte jeweils 15 min lang mit Puffer gewaschen. Die Daten der videomorphometrischen Experimente wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Fläche des Bronchuslumens zeitabhängig in einer Kurve zusammengefasst.

In einigen Versuchen an M2R-, M3R- und Cav-1-defizienten und Wildtyp-Mäusen wurden die Lungenschnitte nach einem ersten Versuchsdurchlauf für 1 h bei 37°C unter Normoxie mit 10 mM MCD (Sigma) inkubiert, um die Caveolae zu zerstören. MCD entzieht diesen cholesterol- und sphingolipidreichen Membrandomänen das Cholesterol, was zur Relokalisierung der sich in Caveolae befindenden Signalmoleküle führt (Smart und Anderson, 2002). Kontrollschnitte wurden unter den gleichen Bedingungen mit dem Vehikel (*A. dest.*) behandelt. Danach wurden diese Lungenschnitte in einem zweiten Versuchsdurchlauf erneut mit gleichen

Konzentrationen an Muskarin, KCl und 5-HT stimuliert. Statistische Vergleiche der Kontraktionsreaktionen wurden für die jeweils letzte Minute der Inkubation mit einem Agonisten angestellt. Nur Bronchien, die in beiden Versuchsdurchläufen auf KCl mit einer Reduktion des Lumens um mindestens 20% reagierten, wurden in die Auswertung aufgenommen.

## 2.7 Elektronenmikroskopie

Für die konventionelle Elektronenmikroskopie wurden Lungenschnitte von M2R<sup>-/-</sup>, M3R<sup>-/-</sup>, Cav-1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen aus videomorphometrischen Experimenten nach Behandlung mit MCD bzw. dem Vehikel gesammelt (je n≥3). Die Schnitte wurden zwischen 3 h und mehreren Tagen in einem Fixans aus 1,5% Glutardialdehyd und 2% Paraformaldehyd in 0,1 M PP fixiert, mehrmals in 0,1 M PP und 3x5 min in 0,1 M Tris-HCl (pH 7,6) (Tris, Roth) gewaschen. Danach erfolgte die Osmierung für 40 min in 1% OsO<sub>4</sub> (Sigma) in *A. dest.*. Das Gewebe wurde 3x5 min in 0,05 M Maleinsäure-Tris-NaOH-Puffer (Maleatpuffer, pH 5,2) (Maleinsäure, Merck) inkubiert und in 1% Uranylazetat (Merck) in 0,05 M Maleatpuffer (pH 6,0) *en bloc* für 1 h kontrastiert. Nach erneutem Waschen (3x5 min) in 0,05 M Maleatpuffer (pH 5,2) folgte eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Lungenschnitte wurden flach in Epon [480 g/kg Epoxyresin (Agar Scientific, Essex, GB); 320 g/kg Dodeceny Succinic Anhydride (Agar Scientific, Stansted, GB); 200 g/kg Methyl Nadic Anhydride (Agar Scientific); 3% N-Benzyl dimethylamine (Agar Scientific)] eingebettet, dessen Polymerisierung über Nacht bei 60°C erfolgte. Geeignete Regionen der Lungenschnitte wurden unter Nutzung eines Durchlichtmikroskops bestimmt, ausgeschnitten und auf ein Blindblöckchen aufgeklebt. Anschließend wurden von diesen Regionen Semidünnschnitte von 0,5-1 µm und Ultradünnschnitte von etwa 80 nm Dicke mit einem Ultramikrotom (Reichert Ultracut E, Leica) angefertigt, die für 30 min mit gesättigtem, gefiltertem Uranylazetat kontrastiert, mit *A. dest.* gewaschen, für 2 min mit alkalischem Bleizitrat nachkontrastiert, erneut gewaschen und mit einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 902, Zeiss) untersucht wurden.

## **2.8 Statistische Analysen**

Für die statistische Datenanalyse wurden nichtparametrische Tests genutzt. Unterschiede zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe in FRET-Experimenten und zwischen mRNA-Expressionsleveln in RT-PCR-Analysen wurden mittels SPSS Software, Version 11.5 (SPSS GmbH Software, München) im Kruskal-Wallis Test analysiert. Wenn  $p \leq 0,05$ , wurde daraufhin der Mann-Whitney U-Test angewendet (Maurer et al., 1995).

Zum Vergleich der Ergebnisse verschiedener Versuchsbedingungen in videomorphometrischen Untersuchungen wurde auf gepaarte Daten der Wilcoxon Rangsummentest und auf nicht-gepaarte Daten der Kruskal-Wallis Test, gefolgt vom Mann-Whitney U-Test angewandt. Differenzen wurden als signifikant angesehen wenn  $p \leq 0,05$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vorkommen von Caveolae in bronchialen Glattmuskelzellen der Maus

In Lungenschnitten der in dieser Arbeit untersuchten Mausstämme wurde zunächst das Vorkommen von Caveolae in den glatten Muskelzellen der Bronchien elektronenmikroskopisch bestimmt.

##### 3.1.1 Caveolae in M2R<sup>+/+</sup>, M2R<sup>-/-</sup>, M3R<sup>+/+</sup> und M3R<sup>-/-</sup> Mäusen

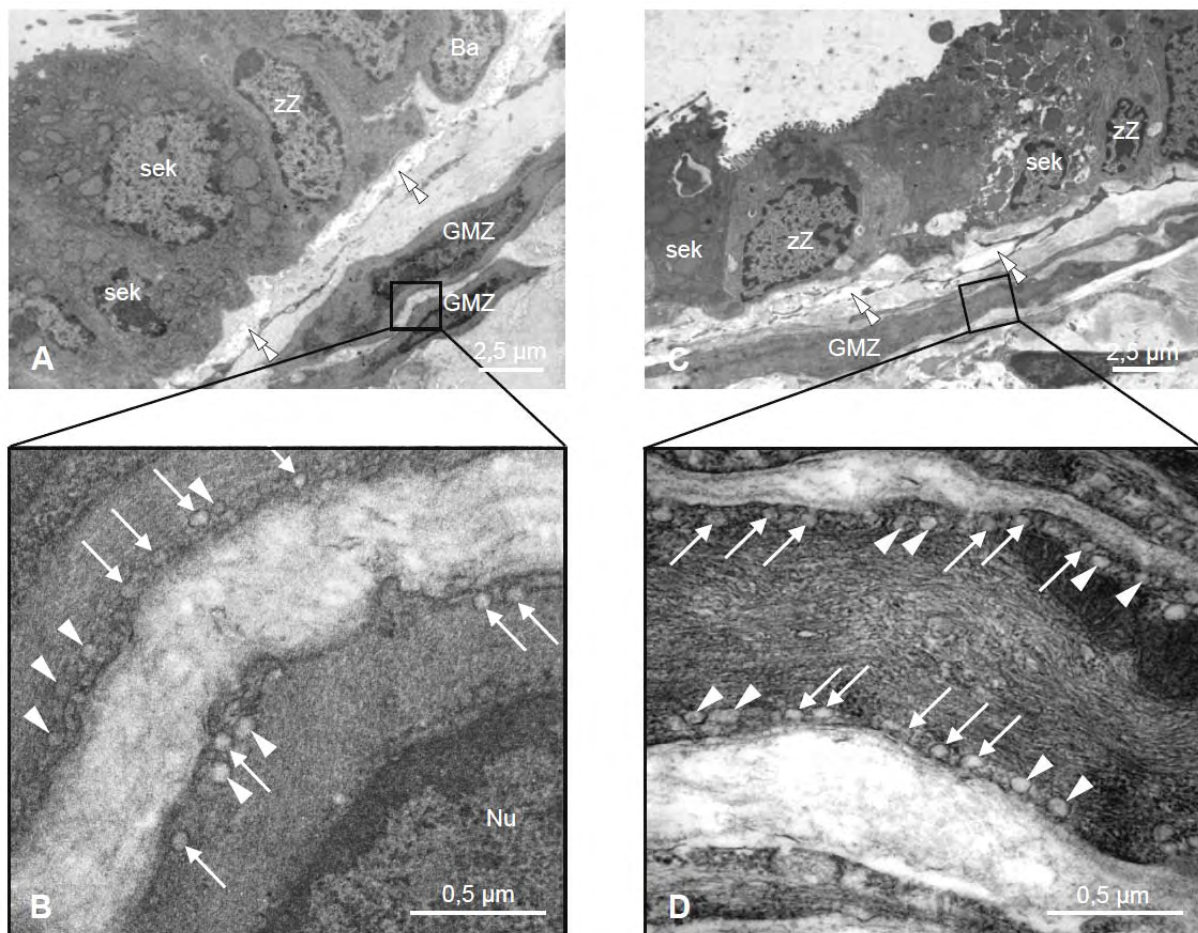


Abbildung 3.1 Transmissionselektronenmikroskopie von Bronchien der M3R<sup>+/+</sup> und M3R<sup>-/-</sup> Mäuse. Übersichtsbild der Bronchuswand einer M3R<sup>+/+</sup> (A) bzw. M3R<sup>-/-</sup> (C) Maus mit zilientragenden Zellen (zZ), Basalzellen (Ba) und sekretorischen Zellen (sek) der Lamina epithelialis mucosae, Lamina propria mit Elastin (Doppelpfeilköpfe) und darunter liegender Tunica muscularis mit glatten Muskelzellen (GMZ). Glattmuskelzellen der M3R<sup>+/+</sup> (B) bzw. M3R<sup>-/-</sup> (D) Mäuse besitzen an der Oberfläche Ansammlungen von Caveolae (Pfeile) und anderer Vesikel (Pfeilköpfe). Nu: Nukleus.

Bronchiale Glattmuskelzellen der M2R<sup>+/+</sup> und M3R<sup>+/+</sup> Mäuse besaßen eine große Anzahl an Caveolae, die meist in hoher Dichte in Ketten entlang der Zelloberfläche lagen, aber auch einzeln vorkamen (Abbildung 3.1B, 3.2A). In M2R<sup>-/-</sup> und M3R<sup>-/-</sup>

Mäusen war die Verteilung von Caveolae im Vergleich zu den Wildtyp-Stämmen unverändert (Abbildung 3.1D, 3.2B).

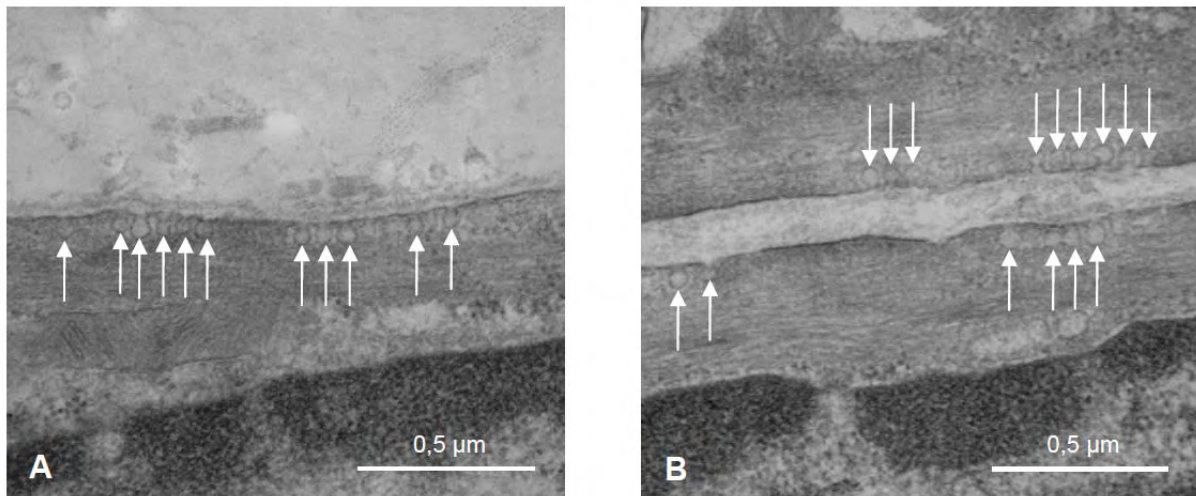


Abbildung 3.2 Transmissionselektronenmikroskopie von Glattmuskelzellen der  $M2R^{+/+}$  (A) und  $M2R^{-/-}$  Mäuse (B) mit Ansammlungen von Caveolae (Pfeile) an der Oberfläche.

### 3.1.2 Caveolae in $Cav-1^{+/+}$ und $Cav-1^{-/-}$ Mäusen

Während Häufigkeit und Verteilung von Caveolae in bronchialen Glattmuskelzellen von  $Cav-1^{+/+}$  Mäusen mit denen von  $M2R^{+/+}$  und  $M3R^{+/+}$  Mäusen vergleichbar war, traten in  $Cav-1^{-/-}$  Mäusen deutlich seltener Ketten von Caveolae auf. Auch die Anzahl an Caveolae innerhalb dieser Ansammlungen war geringer (Abbildung 3.3).

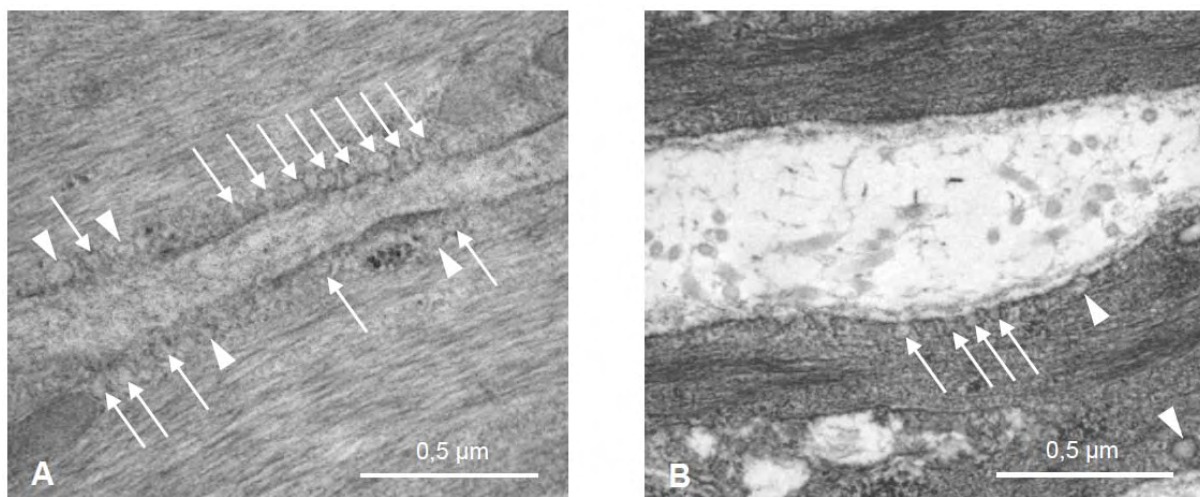


Abbildung 3.3 Transmissionselektronenmikroskopie von Caveolae in bronchialen Glattmuskelzellen von  $Cav-1^{+/+}$  Mäusen (A) und  $Cav-1^{-/-}$  Mäusen, an deren Zelloberfläche weniger Caveolae ausgebildet sind (B). Pfeile: Caveole; Pfeilköpfe: andere Vesikel.



## 3.2 Lokalisation von Cav-1 und Cav-3 in Bronchien der Maus und des Menschen

### 3.2.1 Vorkommen von Cav-1 und Cav-3 in Bronchien der Maus

In Lungenschnitten der Maus wurde das Vorkommen von Cav-1 und -3 in Glattmuskelzellen der Bronchien immunhistochemisch untersucht. Für beide Cav wurden Immunreaktivitäten an der Plasmamembran der bronchialen Glattmuskelzelle festgestellt. Zusätzlich war eine Cav-1-Markierung in den Basalzellen des Bronchialepithels und, wie bereits von Krasteva et al. (2006) beschrieben, in Gefäßendothelzellen und unidentifizierten Zellen der Lamina propria, wahrscheinlich Fibroblasten, zu beobachten. Auch in der Alveolarregion waren die Endothelzellen Cav-1-positiv, ebenso wie Alveolarepithelzellen des Typs I. Cav-3-Immunreaktivität war außer in Glattmuskelzellen im apikalen Teil einer Gruppe von hochprismatischen Atemwegsepithelzellen detektierbar. Des Weiteren zeigte eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung für Cav-1 und Cav-3 eine Kolokalisation der beiden Cav an der Plasmamembran der Bronchialmuskulatur (Abbildung 3.4).

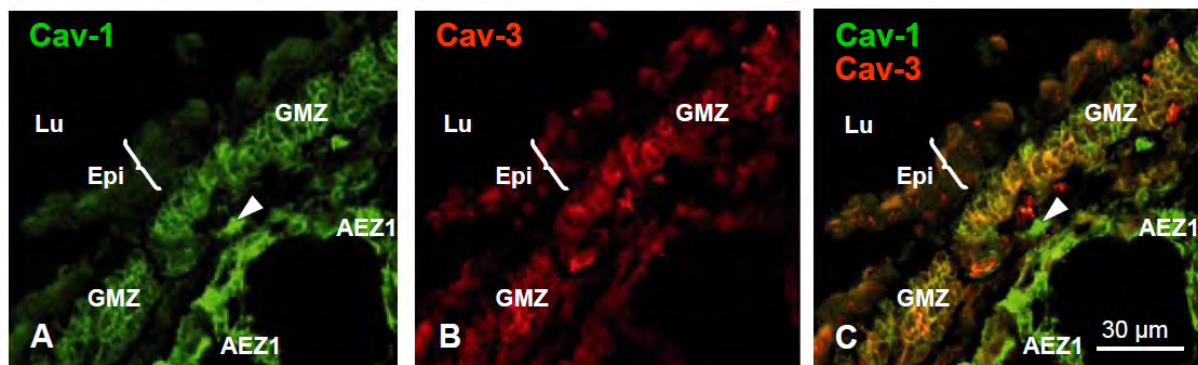


Abbildung 3.4 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz für Cav-1 und Cav-3 im Bronchus der Maus, CLSM. A) Cav-1-Immunreaktivität tritt an der Plasmamembran der glatten Muskulatur der Atemwege, in Zellen der Lamina propria, im Gefäßendothel und in Alveolarepithelzellen des Typs I auf. B) Eine Cav-3-Immunreaktivität ist ebenfalls in glatten Bronchialmuskelzellen und zudem in der apikalen Region hochprismatischer Zellen des Bronchialepithels nachzuweisen. C) Eine Kolokalisation beider Cav in der bronchialen Glattmuskulatur ist an der gelben Farbe erkennbar, die aus der Überlappung der Immunfluoreszenzen in A und B resultiert. Pfeilköpfe: Endothel; Epi: Epithel; GMZ: Glattmuskelzellen; Lu: Atemwegslumen; AEZ1: Alveolarepithelzelle Typ I.

Die Spezifität des Anti-Cav-1-Antikörpers wurde durch das Fehlen einer Cav-1-Immunreaktivität in Lungen Cav-1-defizienter Mäuse nachgewiesen (Abbildung 3.5A+B). Zusätzlich wurde die Antikörperspezifität mittels Western Blot überprüft. In

Lungenhomogenaten von Wildtypmäusen traten Cav-1-immunreaktive Banden von etwa 23 kDa, 50 kDa und 90 kDa auf; nicht jedoch in Lungenhomogenaten Cav-1-defizienter Tiere (Abbildung 3.6A).

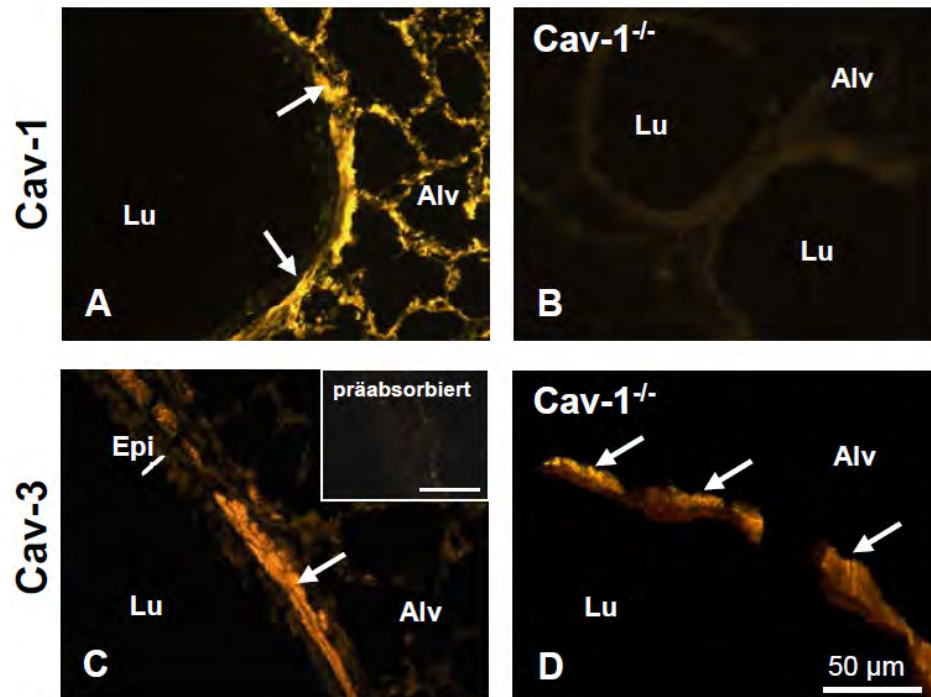


Abbildung 3.5 Immunhistochemische Spezifitätskontrolle der Anti-Cav-1- und Anti-Cav-3-Antikörper. A+B) Der Anti-Cav-1-Antikörper markiert Glattmuskulzellen und Zellen der Alveolarregion in Cav-1<sup>+/+</sup> Mäusen, nicht jedoch in Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen. C+D) Cav-3-Markierung der glatten Muskulatur der Bronchien einer FVB- und einer Cav-1<sup>-/-</sup> Maus. Inset: Präabsorption des Anti-Cav-3-Antikörpers mit dem korrespondierenden Peptid verhindert die Cav-3-Markierung. Alv: Alveolarregion; Pfeile: Glattmuskulzellen; Epi: Epithel; Lu: Atemwegslumen.

Die Spezifität des Anti-Cav-3-Antikörpers wurde durch das Fehlen einer Cav-3-Immunreaktivität nach Inkubation mit dem korrespondierenden Peptid bestätigt (Abbildung 3.5B, Inset). Im Western Blot an Lungenhomogenaten markierte dieser Antikörper drei Banden von 21 kDa, 35 kDa und 45 kDa, die ebenfalls präabsorbierbar waren (Abbildung 3.6B). Des Weiteren wurde eine mögliche Kreuzreaktivität des Anti-Cav-3-Antikörpers mit dem Cav-1-Protein durch die unveränderte Markierung für Cav-3 in Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen ausgeschlossen (Abbildung 3.5D).



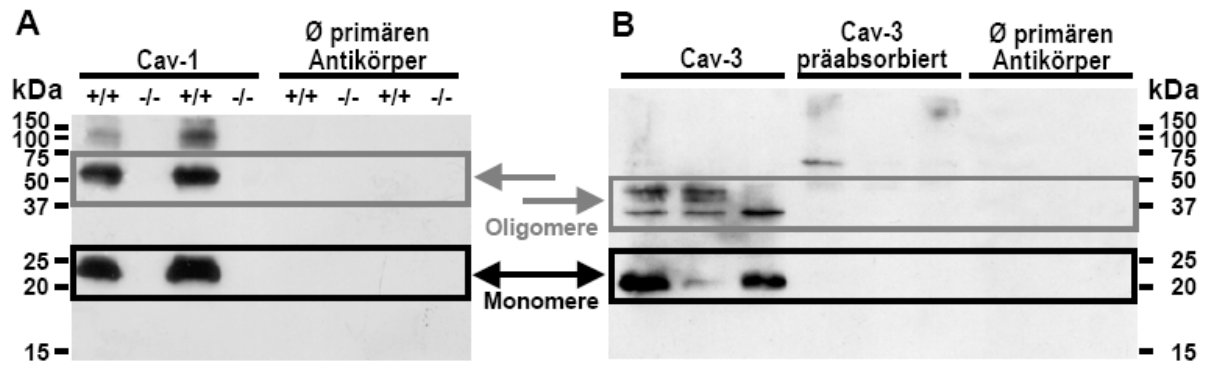


Abbildung 3.6 Spezifitätskontrolle der Anti-Cav-1- und Anti-Cav-3-Antikörper mittels Western Blot. A) An Lungenhomogenaten der Cav-1<sup>+/+</sup>-Mäuse sind drei Banden mit dem Anti-Cav-1-Antikörper markiert, die mit molekularen Gewichten von etwa 23 kDa, 50 kDa und 90 kDa Cav-1-Monomeren und -Oligomeren entsprechen. In Lungen-homogenaten der Cav-1<sup>-/-</sup>-Mäuse sind keine Banden für Cav-1 detektierbar. B) Der Anti-Cav-3-Antikörper markiert in Lungenhomogenaten von FVB-Mäusen Banden von etwa 21 kDa, 35 kDa und 45 kDa, die mit ihren molekularen Gewichten Cav-3-Monomeren und -Oligomeren entsprechen. Diese Banden sind mit dem korrespondierenden Cav-3-Antigen präabsorbierbar. In Kontrollen zur Spezifität des genutzten sekundären Reagens (Ø primären Antikörper) treten ebenfalls keine Banden auf.

Des Weiteren wurde Cav-1- und Cav-3-mRNA in isolierten Bronchial- und Trachealmuskelzellen der Maus mittels laserassistierter Mikrodissektion mit nachfolgender RT-PCR-Analyse nachgewiesen. Die Länge der amplifizierten PCR-Produkte mit den gewählten Primerpaaren stimmte mit den zu erwartenden Fragmentlängen überein. In keiner Negativkontrolle wurde Cav-1 oder Cav-3-mRNA detektiert (Abbildung 3.7).

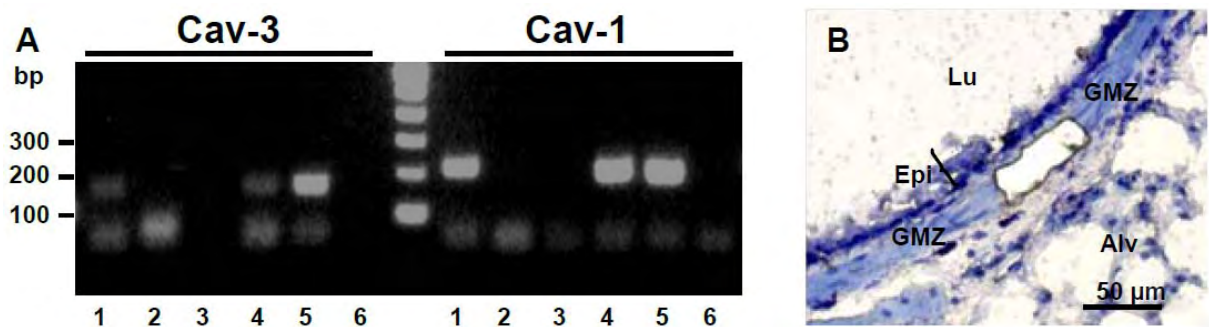


Abbildung 3.7 Detektion von Cav-1 und -3-mRNA in der glatten Atemwegsmuskulatur der Maus mittels laserassistierter Mikrodissektion mit nachfolgender RT-PCR. A) Detektion von Cav-1- und Cav-3-mRNA in 1) Tracheal- und 4+5) Bronchialmuskulatur. Kontrollen umfassten 2) Öl, 3) luminale Regionen der Bronchien in der Nähe der entnommenen Muskulatur und 6) *A. dest.* B) *Fast-blue* Färbung eines Bronchialschnittes nach Gewinnung von Glattmuskelzellen. Alv: Alveolarregion; Epi: Epithel; GMZ: Glattmuskelzellen; Lu: Atemwegslumen.

### 3.2.2 Assoziation von Cav-1 mit Cav-3 in der Bronchialmuskulatur der Maus

Um zu untersuchen, ob Cav-1 und Cav-3 in Bronchialmuskelzellen *in situ* in enger räumlicher Nähe vorkommen, wurde die konventionelle indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit nachfolgender FRET-CLSM-Analyse angewendet. Bei Anwendung der Methode des Akzeptor-Bleichens zeigt ein Anstieg der Donorfluoreszenz eine Assoziation zweier Proteine an. Da es sich bei den Cav um Membranproteine handelt, wurden nur Regionen an der Zelloberfläche zur Untersuchung herangezogen.

Um zu demonstrieren, dass mit der verwendeten Methode und den in dieser Arbeit eingesetzten Antikörpern eine Assoziation zwischen Cav-1 und Cav-3 detektierbar ist, wurde zunächst eine bekannte Assoziation beider Proteine untersucht. Mittels FRET-CLSM-Analyse wurde die Assoziation zwischen Cav-1 und Cav-3 in Vorhofkardiomyozyten der Maus bestätigt, die bereits von Volonte et al. (2008) für Herzkammermyozyten beschrieben wurde. Im Herzvorhof trat eine starke Cav-1-Immunreaktivität in den Endothelzellen der Kapillaren auf, während sie in den Kardiomyozyten vergleichsweise schwach ausgeprägt war. Eine Cav-3-Markierung war an den Zelloberflächen der Myozyten und schwächer im Zytoplasma zu detektieren. Nach Bleichen des Akzeptors war in den Vorhofkardiomyozyten in der gebleichten Region ein Anstieg der Donorfluoreszenz ( $\Delta F=1,28$ ) zu detektieren. Dieser Anstieg war im Vergleich zur Kontrolle ( $\Delta F=0,43$ ) signifikant (Abbildung 3.8F;  $p<0,001$ ).

Mit dem gleichen Versuchsaufbau wurde hiernach eine Assoziation von Cav-1/Cav-3 in bronchialen Glattmuskelzellen detektiert. In der gebleichten Membranregion der Muskulatur war im Vergleich zur Kontrolle ein signifikanter Anstieg der Donorfluoreszenz zu verzeichnen (Abbildung 3.8G; Cav1/Cav3  $\Delta F=5,16$ ; Kontrolle  $\Delta F=0,46$ ;  $p<0,001$ ).

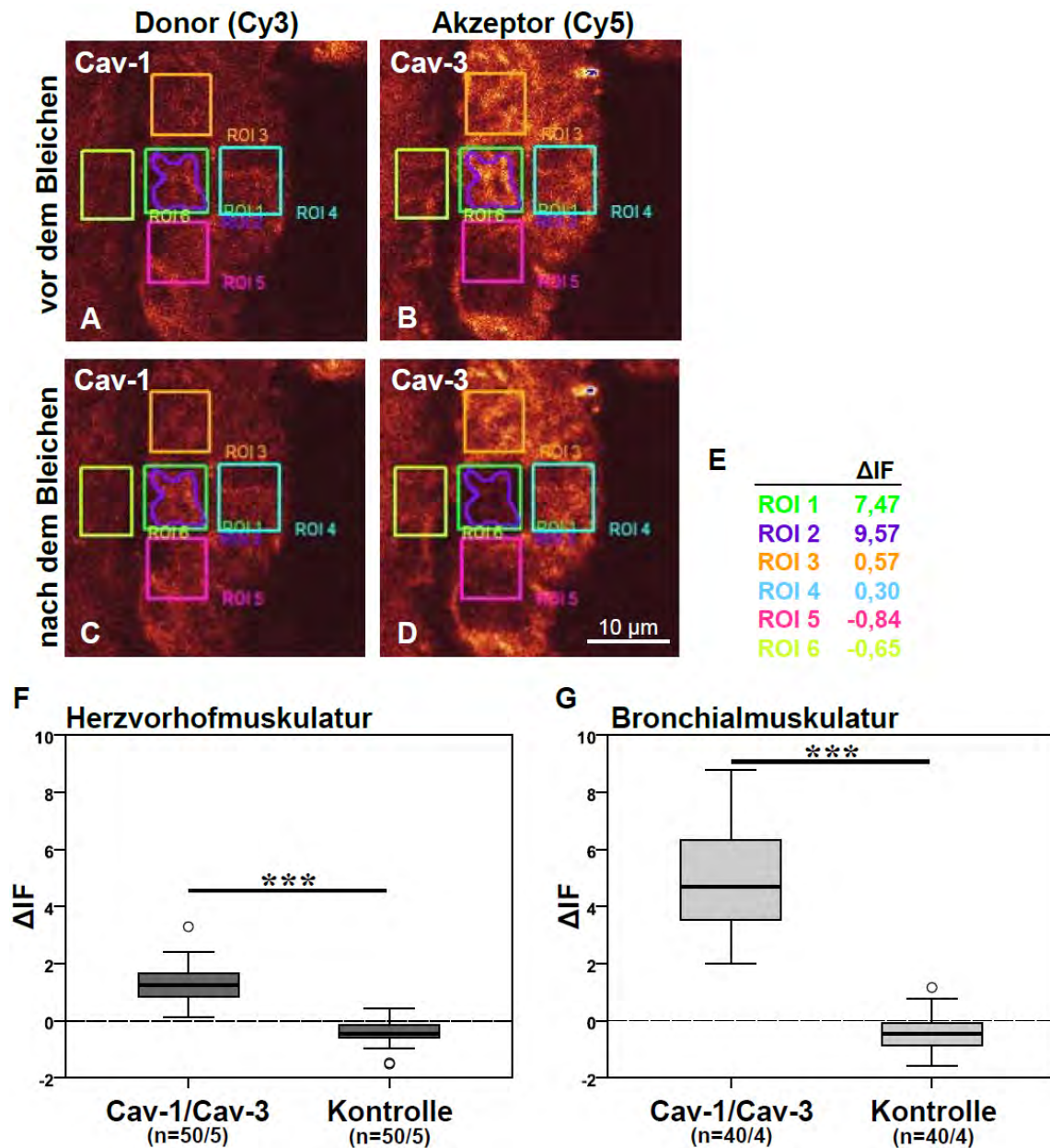


Abbildung 3.8 Detektion einer Assoziation von Cav-1 und Cav-3 in der Herzvorhof- und Bronchialmuskulatur der Maus *in situ* mittels indirekter Doppelimmunfluoreszenz und FRET-CLSM-Analyse. A-D) Donor- und Akzeptorfluoreszenz in der Bronchialmuskulatur vor und nach Bleichen des Akzeptors in der untersuchten Region 1 (ROI1). ROI3-6: benachbarte, nicht gebleichte Kontrollregionen. E) Anstieg der Donorfluoreszenz ( $\Delta I F$ ) in allen ROI nach Bleichen des Akzeptors in ROI1. F)  $\Delta I F$  in Herzvorhofmyozyten im Vergleich zur Kontrolle. G)  $\Delta I F$  in der Membranregion der Bronchialmuskulatur im Vergleich zur Kontrolle. \*\*\*  $p \leq 0,001$  (Mann-Whitney U-Test); n=Anzahl der gebleichten ROI/Mäuse; Boxplots: Perzentile (0, 25, Median, 75, 100), Extremwerte (o).

### 3.2.3 Vorkommen von Cav-1 und Cav-3 in Bronchien des Menschen

In humanen Bronchien waren Cav-1- und Cav-3-Immunreaktivitäten in der glatten Muskulatur und im Epithel erkennbar (Abbildung 3.9D+E). Doppelimmunmarkierung von  $\alpha$ -sma, einem Glattmuskelzellmarker, und Cav-1 bzw. Cav-3 zeigte eine



jeweilige Kollokalisierung in der Atemwegsmuskulatur an (Abbildung 3.9D''+E''). Kontrollen umfassten 1) das Auslassen des primären Anti-Cav-Antikörpers und 2) die Präabsorption des Anti-Cav-3-Antikörpers mit dem korrespondierenden Antigen. Beide Kontrollen resultierten in einer ausschließlichen Markierung von  $\alpha$ -sma (Abbildung 3.9B+C).

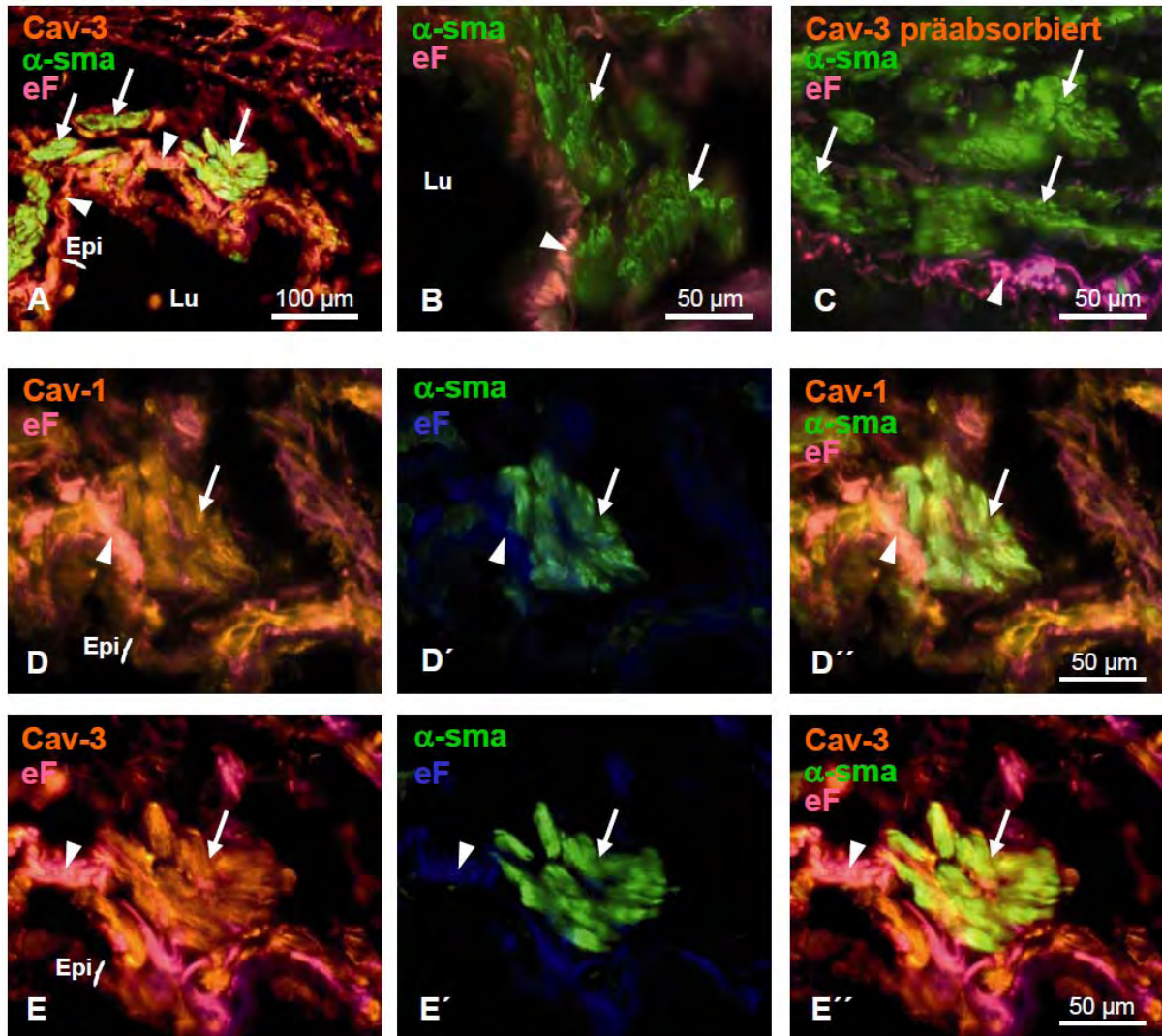


Abbildung 3.9 Doppelimmunhistochemie, CLSM. Nachweis von Cav-1- und Cav-3-Immunreaktivität in humanen Bronchien. A) Querschnitt eines humanen Bronchus markiert mit Anti-Cav-3- und Anti- $\alpha$ -sma-Antikörpern. B+C) Kontrollen ohne primäre Anti-Cav-Antikörper (B) und Präabsorption des Anti-Cav-3-Antikörpers mit dem korrespondierenden Antigen (C) resultieren in einer ausschließlichen Markierung von  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -sma). D-E'') Cav-1- (D), Cav-3- (E) und  $\alpha$ -sma-Immunreaktivitäten (D'+E') und das Überlagerungsbild für  $\alpha$ -sma/Cav-1- bzw.  $\alpha$ -sma/Cav-3-Immunreaktivitäten (D''+E'') in der Bronchialwand. Um die spezifische Markierung von Cav-1 (orange; D) und Cav-3 (orange; E) von der Autofluoreszenz der elastischen Fasern (eF) zu unterscheiden, sind diese Fasern durch einen Filter für kurze Wellenlängen im blauen Lichtspektrum dargestellt (D'+E'). Übereinanderlegen der Bilder ergibt eine rosafarbene Darstellung der elastischen Fasern (A-E, D''+E''). Pfeil: Bronchialmuskulatur; Pfeilkopf: Basalmembran; Epi: Epithel; Lu: Atemwegslumen.

### 3.3 Räumliche Beziehung von Cav-1 und Cav-3 zu M2R

#### 3.3.1 Überprüfung der Anti-M2R-Antikörperspezifität

Für die immunhistochemische Untersuchung der räumlichen Beziehung der Cav zum M2R wurde zunächst die Antikörperspezifität gegen den M2R an Lungenschnitten von Wildtyp- ( $M2/3R^{+/+}$ ) und M2R/M3R-doppelknockout-Mäusen ( $M2/3R^{-/-}$ ) überprüft. In  $M2/3R^{+/+}$  Mäusen war eine M2R-Immunreaktivität in der glatten Muskulatur der Bronchien und im luminalen Bereich zilientragender Zellen feststellbar (Abbildung 3.10A).

Bei Anwendung des Anti-M2R-Antikörpers an Lungenschnitten von  $M2/3R^{-/-}$  Mäusen war keine Immunfluoreszenzmarkierung in der bronchialen Glattmuskulatur detektierbar, wodurch die Bindungsspezifität des Antikörpers in Bronchialmuskulazellen nachgewiesen wurde. Im Bereich der Zilien der zilientragenden Zellen in den  $M2/3R$ -defizienten Tieren wurde dagegen eine Kreuzreaktivität des Anti-M2R-Antikörpers mit Proteinen dieser zilientragenden Zellen festgestellt (Abbildung 3.10).

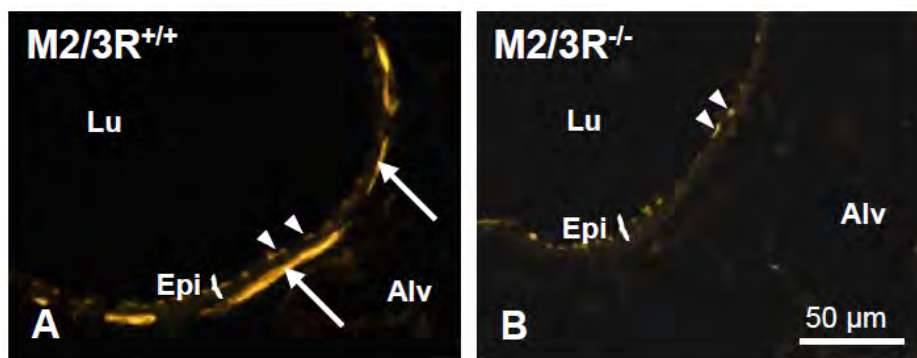


Abbildung 3.10 Immunhistochemische Überprüfung der Anti-M2R-Antikörperspezifität. A) Der Anti-M2R-Antikörper markiert Glattmuskelzellen (Pfeil) und die Zilien zilientragender Zellen (Pfeilköpfe) in Wildtyp-Mäusen. B) In  $M2/3R^{-/-}$  Mäusen tritt keine Glattmuskelzellmarkierung auf. Alv: Alveolarregion; Epi: Epithel; Lu: Atemwegslumen.

#### 3.3.2 Kolokalisation von Cav-1 und Cav-3 mit M2R

Indirekte Doppelimmunfluoreszenz zur Untersuchung der räumlichen Beziehung von Cav-1 und Cav-3 mit dem M2R zeigte eine Kolokalisation beider Cav mit dem M2R an der Plasmamembran bronchialer Glattmuskelzellen in der Maus. Die glatte Muskulatur der Bronchien zeigte eine Markierung für Cav-1, Cav-3 und M2R insbesondere an den Zelloberflächen (Abbildung 3.11A, A', B, B'). Da sich durch das Übereinanderlegen der Fluoreszenzmarkierungen für Cav-1 und den M2R bzw. für

Cav-3 und den M2R eine gelbe Färbung innerhalb der Bronchialmuskulatur ergab, besteht hier eine Kolokalisation dieser Proteine (Abbildung 3.11A''+B'').

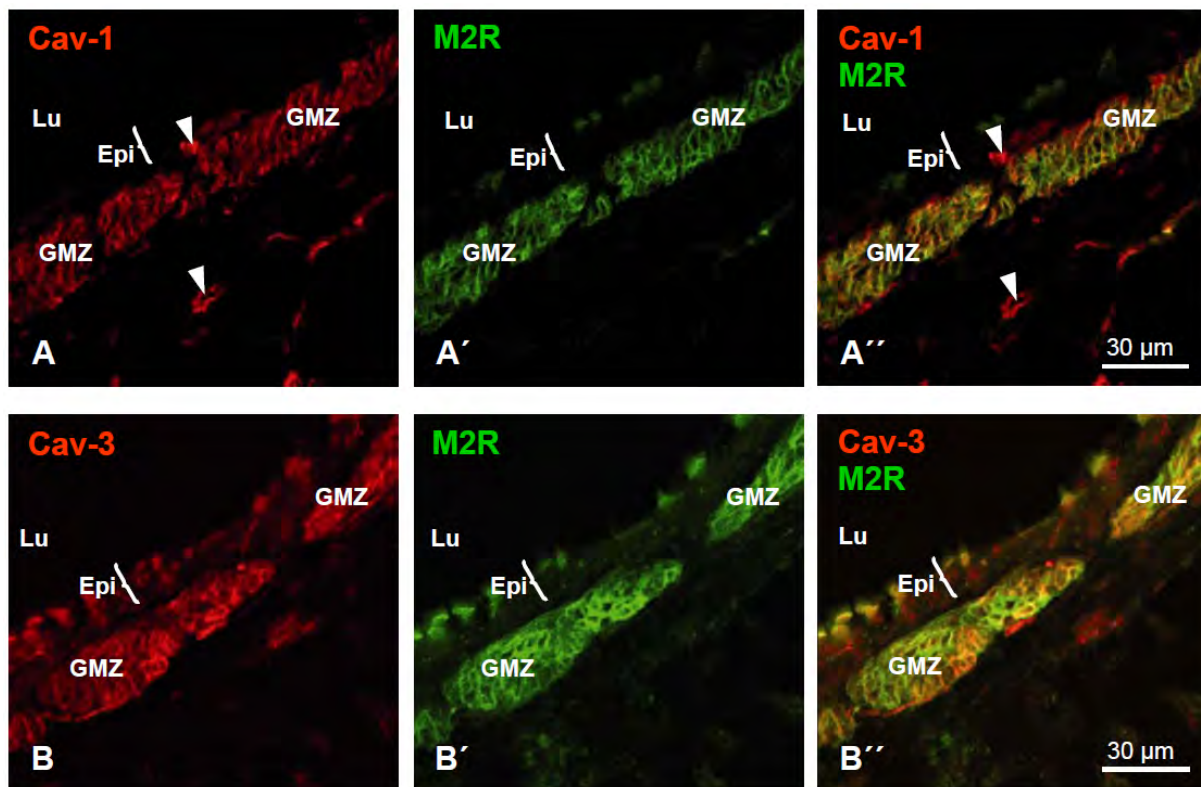


Abbildung 3.11 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz für Cav-1 und Cav-3 im Bronchus der Maus, CLSM. Cav-1-Immunreaktivität (A) tritt an der Plasmamembran der glatten Muskulatur der Atemwege auf. Eine Cav-3-Immunreaktivität (B) und eine M2R-Immunreaktivität (A', B') ist jeweils in glatten Bronchialmuskelzellen und zudem in der apikalen Region zilientrager Zellen des Bronchialepithels nachzuweisen. Eine Kolokalisation der beiden Cav (rot) mit dem M2R (grün) in der bronchialen Glattmuskulatur resultiert in gelber Farbe im Überlagerungsbild (A''+B''). Pfeilköpfe: Endothel; Epi: Epithel; GMZ: Glattmuskelzellen; Lu: Atemwegslumen.

### 3.3.3 Assoziation von Cav-3 mit M2R

Um eine räumlicher Nähe von Cav-1 bzw. Cav-3 zum M2R näher zu untersuchen und mögliche Proteinassoziationen aufzuzeigen, wurde die konventionelle indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit nachfolgender FRET-CLSM-Analyse angewendet.

Um zu zeigen, dass mit den eingesetzten Antikörpern mittels FRET eine Assoziation zwischen Cav-3 und M2R detektierbar ist, wurde zunächst eine Assoziation dieser Proteine in Vorhofkardiomyozyten der Maus bestätigt (Feron et al., 1997) ( $p < 0,001$ ; Abbildung 3.12F). Mit dem gleichen Versuchsaufbau wurde hiernach eine Assoziation von Cav-3/M2R in bronchialen Glattmuskelzellen detektiert. In der



gebleichten Membranregion war im Vergleich zur Kontrolle ein signifikanter Anstieg der Donorfluoreszenz zu verzeichnen ( $p < 0,001$ ; Abbildung 3.12A-E, G).

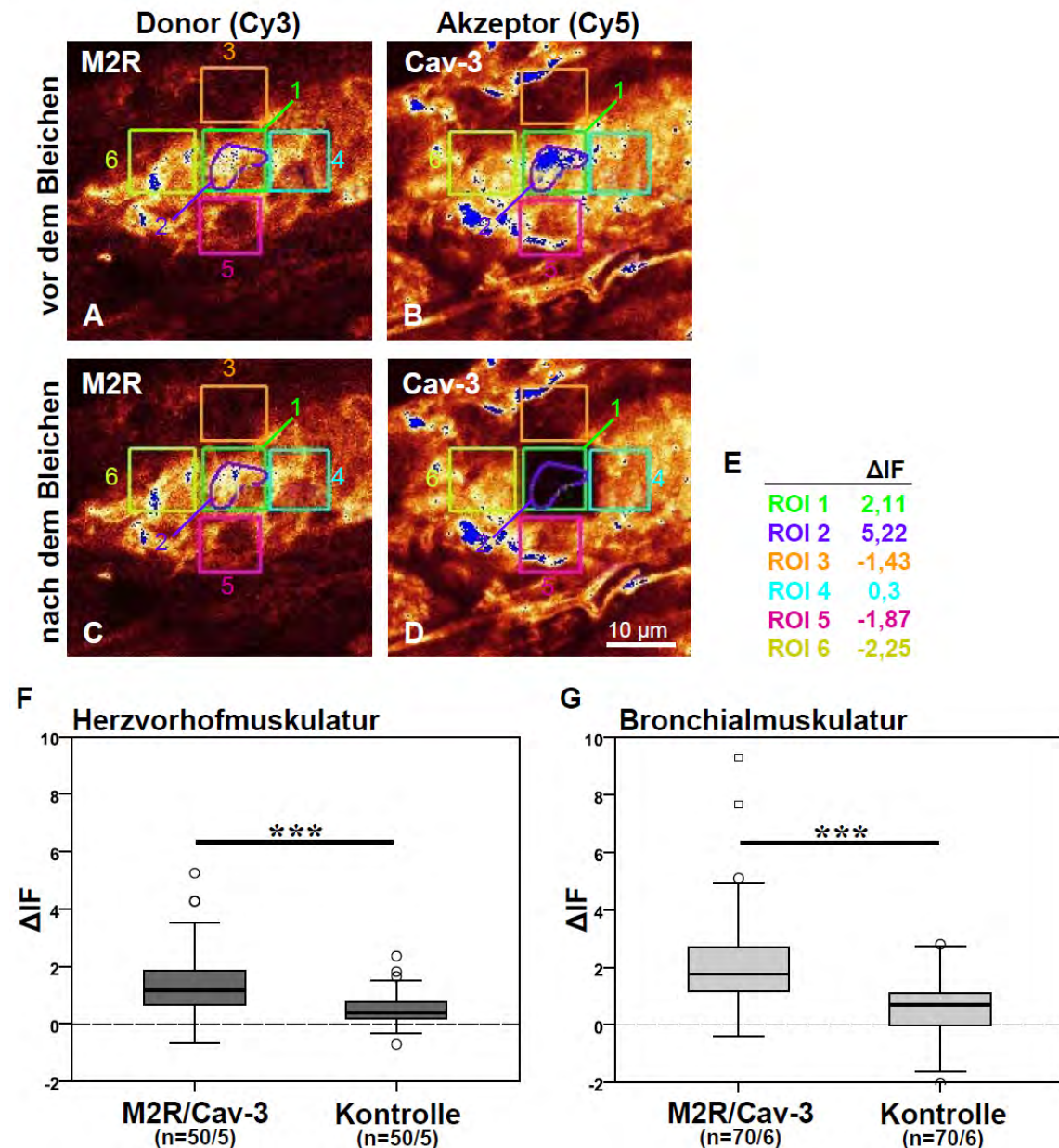


Abbildung 3.12 Detektion einer Assoziation von Cav-3 und M2R in der Herzvorhof- und Bronchialmuskulatur der Maus *in situ* mittels indirekter Doppelimmunfluoreszenz und FRET-CLSM-Analyse. A-D) Verhalten der Donor- und Akzeptorfluoreszenz in der Bronchialmuskulatur vor und nach Bleichen des Akzeptors in der untersuchten Region 1 (ROI1). ROI3-6: benachbarte, nicht gebleichte Kontrollregionen. E) Anstieg der Donorfluoreszenz ( $\Delta I F$ ) in allen ROI nach Bleichen des Akzeptors in ROI1. F)  $\Delta I F$  in Herzvorhofmyozyten im Vergleich zur Versuchskontrolle. G)  $\Delta I F$  in der Membranregion der Bronchialmuskulatur im Vergleich zur Versuchskontrolle. \*\*\*  $p \leq 0,001$  (Mann-Whitney U-Test); n=Anzahl der gebleichten ROI/Mäuse; Boxplots: Perzentile (0, 25, Median, 75, 100), Extremwerte (o), Ausreißer ( $\square$ ).

Für Cav-1/M2R wurde sowohl in der Herzvorhofmuskulatur als auch in den Glattmuskelzellen der Bronchien kein Anstieg der Donorfluoreszenz verzeichnet und daher keine Assoziation gefunden (Abbildung 3.13). Die Donorfluoreszenz war nach Bleichen des Akzeptors gegenüber der Kontrolle sogar signifikant verringert (Herzvorhofmuskulatur  $p=0,004$ ; Bronchialmuskulatur  $p=0,021$ ).

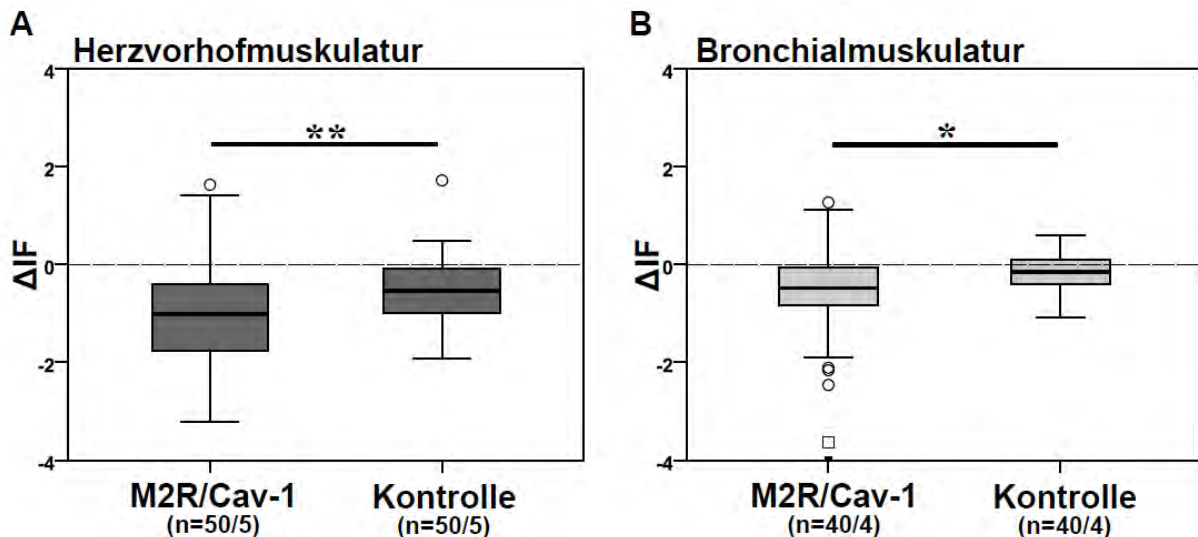


Abbildung 3.13 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz und FRET-CLSM-Analyse zur Untersuchung einer möglichen Assoziation von Cav-1 und M2R in der Herzvorhof- und Bronchialmuskulatur der Maus *in situ*. A) In Herzvorhofmyozyten und B) Bronchialmuskulatur ist nach Bleichen des Akzeptors im Vergleich zur Kontrolle kein Anstieg, sondern eine Verringerung der Donorfluoreszenz ( $\Delta F$ ) zu detektieren. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*  $p \leq 0,05$  (Mann-Whitney U-Test); n=Anzahl der gebleichten ROI/Mäuse; Boxplots: Perzentile (0, 25, Median, 75, 100), Extremwerte (o), Ausreißer ( $\square$ ).

### 3.4 Funktionelle Rolle von Caveolae und Cav-1 bei der muskarinergen Bronchokonstriktion

Um der Frage nachzugehen, ob Caveolae/Cav eine Rolle bei der muskarinergen Bronchokonstriktion spielen, wurden lebende Lungenschnitte angefertigt, an denen die Kontraktilität intrapulmonaler Bronchien videomorphometrisch untersucht wurde. Ein Einfluss von Caveolae auf die muskarinerge Bronchokonstriktion wurde in diesen Präzisionslungenschnitten durch die Zerstörung der Caveolae geprüft.

#### 3.4.1 Cholesterolentzug durch Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin

Um einen Einfluss der cholesterolreichen Caveolae auf die muskarinerge Bronchokonstriktion zu untersuchen, wurden die Lungenschnitte nach videomorphometrischer Analyse der Kontraktilität mit MCD inkubiert, einem



Cholesterol-bindenden Agenz. Danach wurde das Ausmaß der Bronchokonstriktion auf dieselben Stimulanzen erneut erfasst.

Die Behandlung von Lungenschnitten mit dem Vehikel (*A. dest.*) hatte keine strukturell sichtbaren Auswirkungen auf die Atemwegsmuskulatur. Die bronchialen Glattmuskelzellen von  $M2R^{-/-}$ ,  $M3R^{-/-}$ ,  $M2R^{+/+}$ ,  $M3R^{+/+}$  und  $Cav-1^{+/+}$  besaßen wie unter 3.1 beschrieben eine große Anzahl Caveolae. Nach Cholesterolentzug durch Behandlung der Lungenschnitte mit MCD kamen in den meisten Glattmuskelzellen keine Caveolae mehr vor (Abbildung 3.14B). In einigen wenigen Zellen waren Caveolae von abgeflachter Struktur erkennbar und nur sehr selten und vereinzelt waren Caveolae mit normaler Morphologie auffindbar. Weitere strukturelle Veränderungen durch die Behandlung mit MCD waren nicht erkennbar.

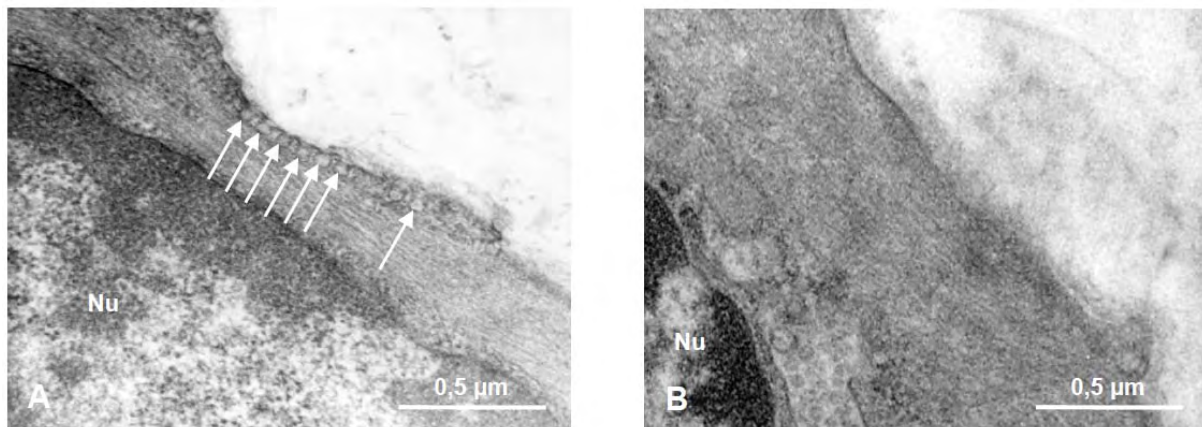


Abbildung 3.14 Transmissionselektronenmikroskopie von bronchialen Glattmuskelzellen der  $M3R^{+/+}$  Mäuse nach videomorphometrischer Analyse. A) Vehikelbehandelte Glattmuskelzellen besitzen an der Oberfläche Ansammlungen von Caveolae (Pfeile). B) Die Oberflächenregion einer entsprechenden Glattmuskelzelle nach Cholesterolentzug durch Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (MCD). Nu: Nucleus.

Auch das Vorkommen von Cav-1-, Cav-3- und M2R-Immunreaktivitäten in der bronchialen Glattmuskulatur wurde nach MCD-Behandlung der Lungenschnitte auf lichtmikroskopischer Ebene überprüft und war unverändert (Abbildung 3.15).

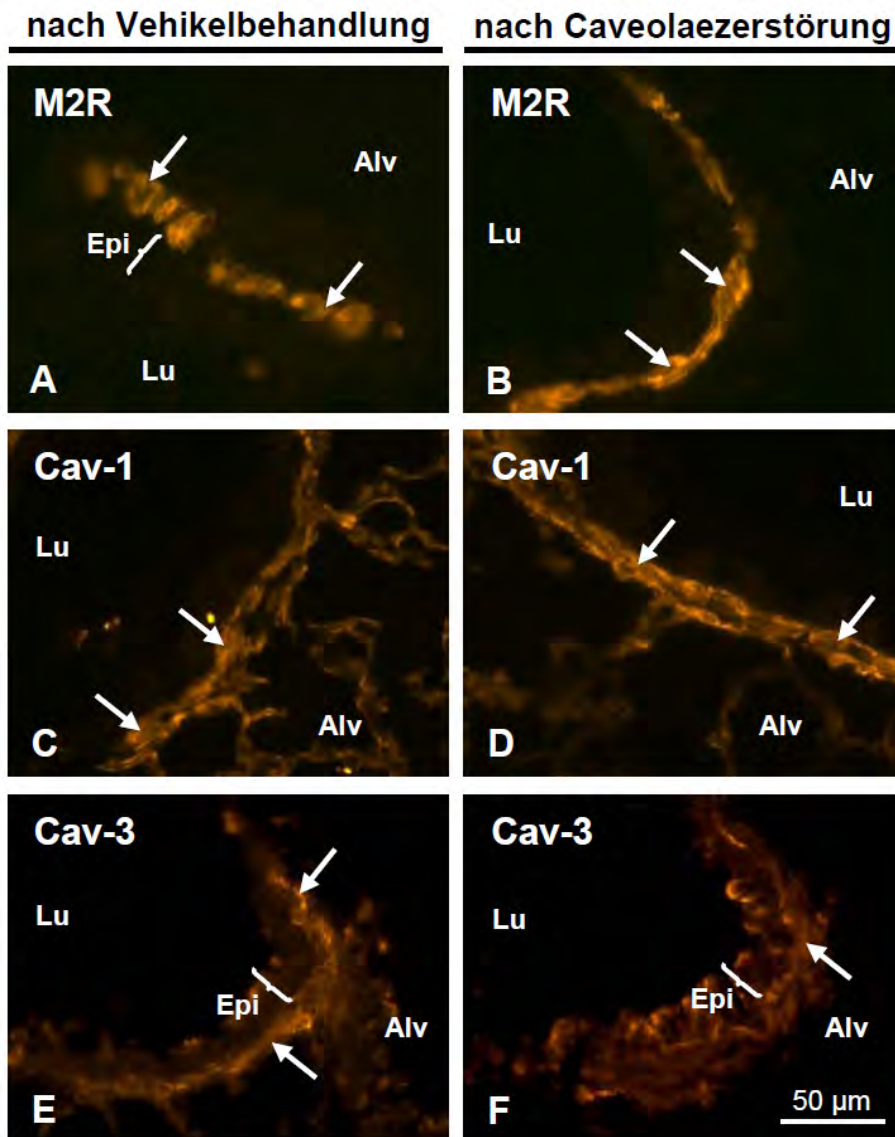


Abbildung 3.15 Vorkommen von Cav-1-, Cav-3- und M2R-Immunreaktivitäten in Bronchien der Maus nach Vehikel- bzw. Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin(MCD)-Behandlung. Die Immunmarkierung der Glattmuskelzellen (Pfeil) durch A+B) den Anti-M2R-Antikörper, C+D) den Anti-Cav-1-Antikörper und E+F) den Anti-Cav-3-Antikörper ist nach Cholesterolentzug unverändert. Alv: Alveolarregion; Epi: Epithel; Lu: Atemwegslumen.

### 3.4.2 Kontraktilität der Bronchien von M2R<sup>+/+</sup>, M2R<sup>-/-</sup>, M3R<sup>+/+</sup>, M3R<sup>-/-</sup> Mäusen

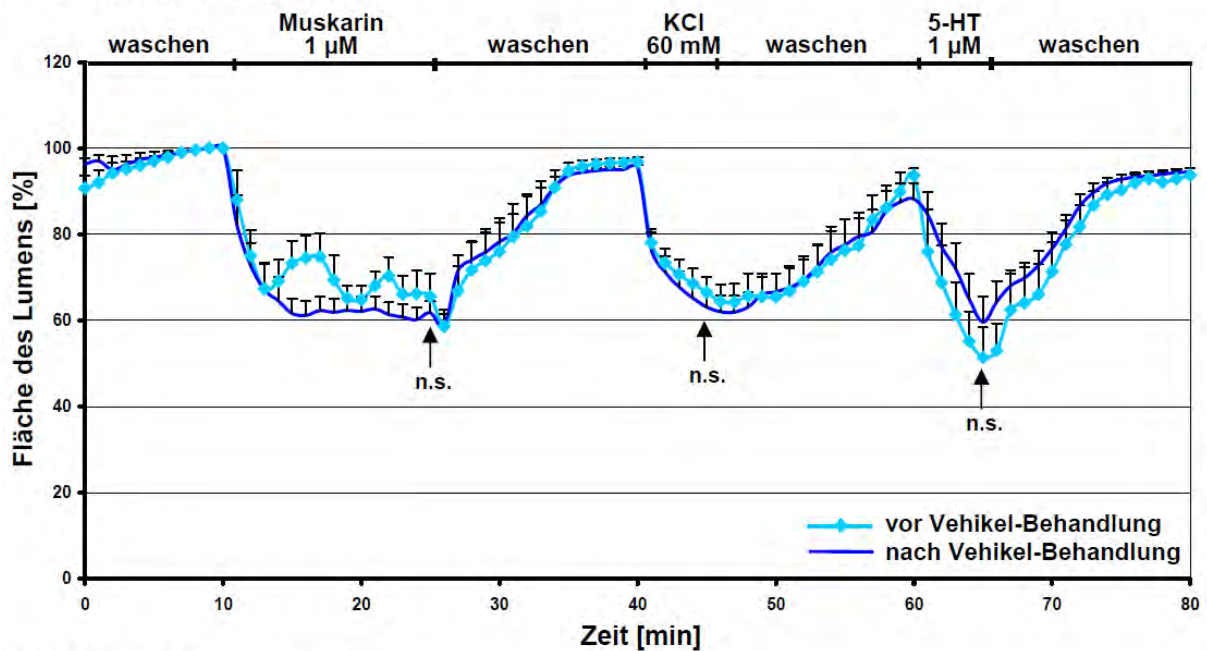
Die Kontraktilität intrapulmonaler Bronchien mit einem mittleren Ruhedurchmesser von  $216 \pm 8 \mu\text{m}$  (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler) in M3R<sup>+/+</sup> (n=15) und  $205 \pm 6 \mu\text{m}$  in M3R<sup>-/-</sup> Mäusen (n=16; p=0,395) und von  $190 \pm 9 \mu\text{m}$  in M2R<sup>+/+</sup> (n=22) und  $178 \pm 8 \mu\text{m}$  in M2R<sup>-/-</sup> Mäusen (n=14; p=0,232) wurde videomorphometrisch untersucht. Die Bronchien aller Mäuse reagierten auf Stimulation mit  $1 \mu\text{M}$  Muskarin,  $60 \text{ mM}$  KCl und  $1 \mu\text{M}$  5-HT mit sofortiger Konstriktion. Die Stimulanzen wurden einzeln verabreicht, wobei jedes Stimulanz eine progressive Reduktion der luminalen

Fläche verursachte bis es nach 15 min Inkubation mit Muskarin oder 5 min Inkubation mit KCl bzw. 5-HT durch Perfusion mit Puffer wieder ausgewaschen wurde. Im Allgemeinen erreichten die Bronchien während des 15-minütigen Waschens die Erweiterung ihrer Lumina auf die Ausgangsfläche, mindestens jedoch auf >90% der Ausgangsfläche.

Im Einklang mit den ultrastrukturellen Beobachtungen war die Kontraktilität nach Behandlung der Lungenschnitte mit dem Vehikel in allen vier Mausstämmen unverändert, mit Ausnahme einer etwas stärkeren Antwort auf KCl in M2R<sup>+/+</sup> Mäusen im Vergleich zur Antwort vor der Vehikel-Behandlung (Abbildungen 3.16 und 3.17). Die Stärke beider Antworten der M2R<sup>+/+</sup> Mäuse auf KCl ist jedoch mit den Reaktionen der M2R<sup>-/-</sup> Mäuse auf KCl vergleichbar (Abbildung 3.17; vor Vehikel-Behandlung  $p=0,180$ ; nach Vehikel-Behandlung  $p=0,884$ ). Bei vergleichender Betrachtung aller Vehikel- und MCD-behandelter Schnitte wurde eine Präkontraktion der glatten Muskulatur, also eine Verkleinerung des Bronchuslumens nach der MCD-Behandlung vor Beginn der zweiten Aufnahmeserie festgestellt ( $p<0,001$ ).

Beim Vergleich der Bronchokonstriktionen von Vehikel-behandelten M3R<sup>+/+</sup> und M3R<sup>-/-</sup> Mäusen war eine signifikant stärkere Reduktion des Lumens nach Muskarinzugabe in M3R<sup>+/+</sup> Mäusen zu verzeichnen auf  $41\% \pm 6\%$  in M3R<sup>+/+</sup> gegenüber  $62\% \pm 3\%$  in M3R<sup>-/-</sup> Mäusen ( $p=0,009$ ; Abbildung 3.18A). Der Cholesterolentzug durch MCD hatte einen hemmenden Effekt auf die Kontraktilität beider Mausstämmen. In M3R<sup>+/+</sup> Mäusen führte sie zu einer verringerten Konstriktion ( $p=0,004$ ) und in M3R<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer kompletten Hemmung der Konstriktion ( $p<0,001$ ; Abbildung 3.18A). Interessanterweise war die Reduktion der Kontraktilität in beiden Mausstämmen gleich stark ausgeprägt. Die Differenz der maximalen Verkleinerung des Lumens betrug  $37\% \pm 4\%$  in M3R<sup>+/+</sup> und  $36\% \pm 12\%$  in M3R<sup>-/-</sup> Mäusen ( $p=0,093$ ).

### A M3R<sup>-/-</sup> Mäuse (n=8/5)



### B M3R<sup>+/+</sup> Mäuse (n=7/5)

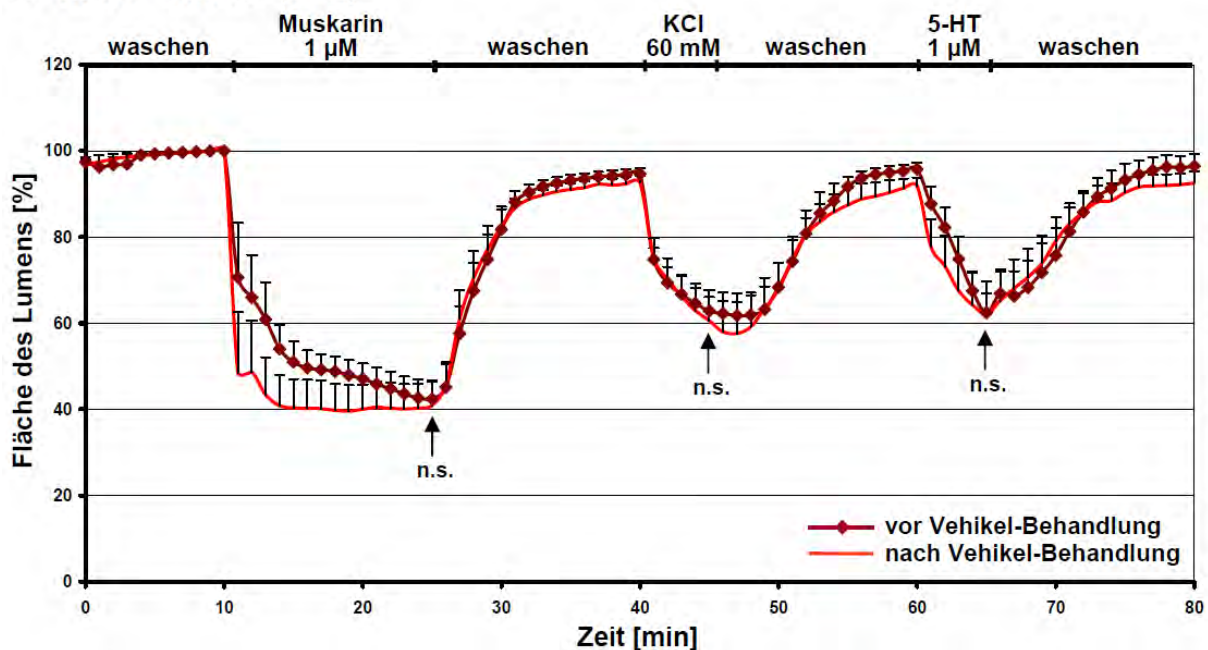
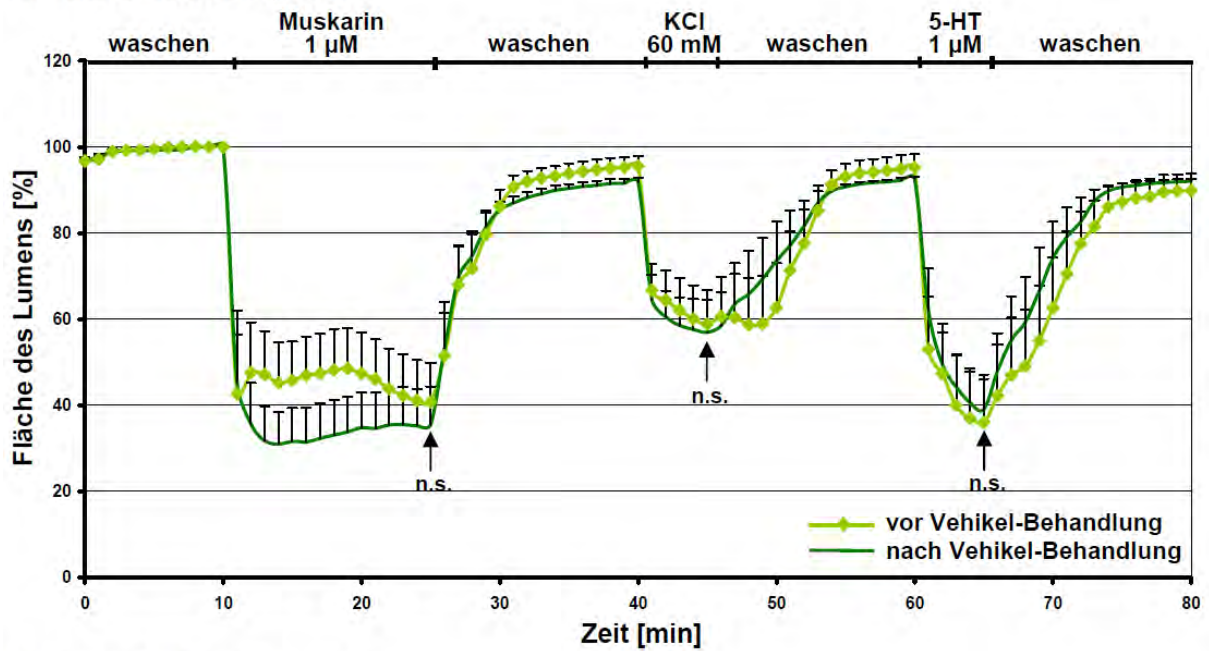


Abbildung 3.16 Vergleich der Bronchokonstriktionen nach Zugabe von Muskarin (1  $\mu$ M), KCl (60 mM) und 5-HT (1  $\mu$ M) vor bzw. nach Vehikel-Behandlung der Lungenschnitte von A) M3R<sup>-/-</sup> (Muskarin p=0,208; KCl p=0,263; 5-HT p=0,327) und B) M3R<sup>+/+</sup> Mäusen (Muskarin p=0,612; KCl p=0,237; 5-HT p=0,237). Dargestellt sind die Veränderungen der Luminaflächen peripherer Atemwege als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n.s.=nicht signifikant (Wilcoxon Rangsummentest); n=Anzahl der Bronchien/Mäuse.



**A M2R<sup>-/-</sup> Mäuse (n=6/4)**



**B M2R<sup>+/+</sup> Mäuse (n=11/5)**

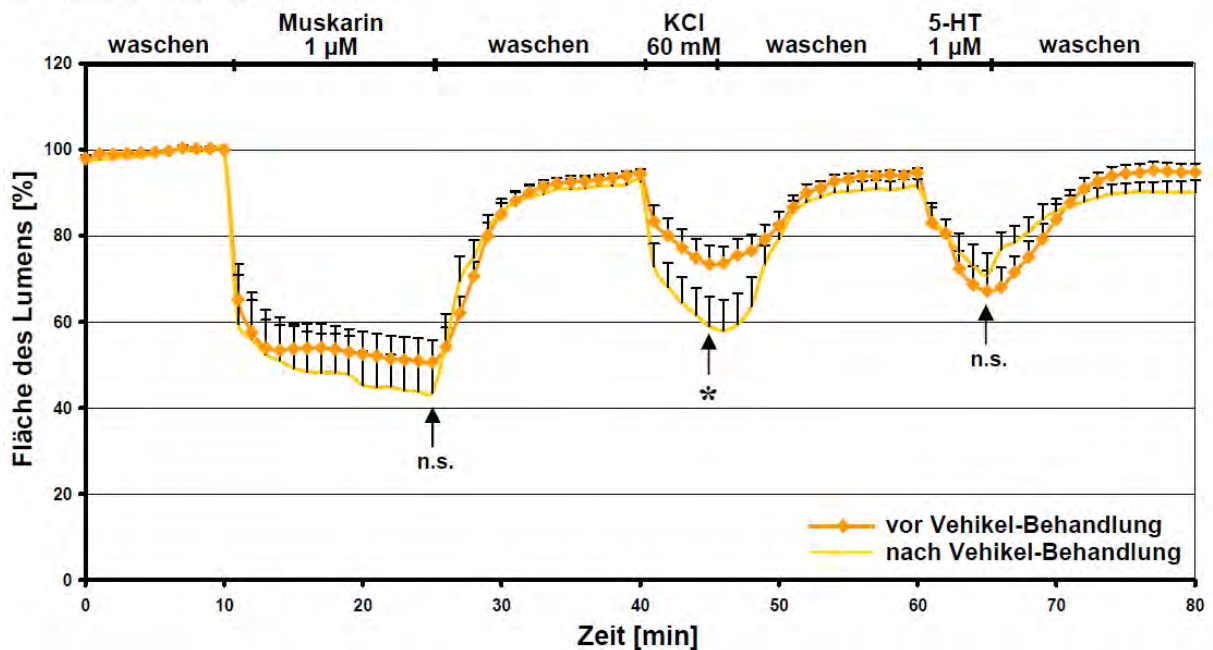


Abbildung 3.17 Vergleich der Bronchokonstriktionen nach Zugabe von Muskarin (1  $\mu\text{M}$ ), KCl (60 mM) und 5-HT (1  $\mu\text{M}$ ) vor bzw. nach Vehikel-Behandlung der Lungenschnitte von A) M2R<sup>-/-</sup> (Muskarin  $p=0,075$ ; KCl  $p=0,463$ ; 5-HT  $p=0,345$ ) und B) M2R<sup>+/+</sup> Mäusen (Muskarin  $p=0,110$ ; KCl  $p=0,013$ ; 5-HT  $p=0,534$ ). Dargestellt sind die Veränderungen der Luminaflächen peripherer Atemwege als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p \leq 0,05$ ; n.s.=nicht signifikant (Wilcoxon Rangsummentest); n=Anzahl der Bronchien/Mäuse.

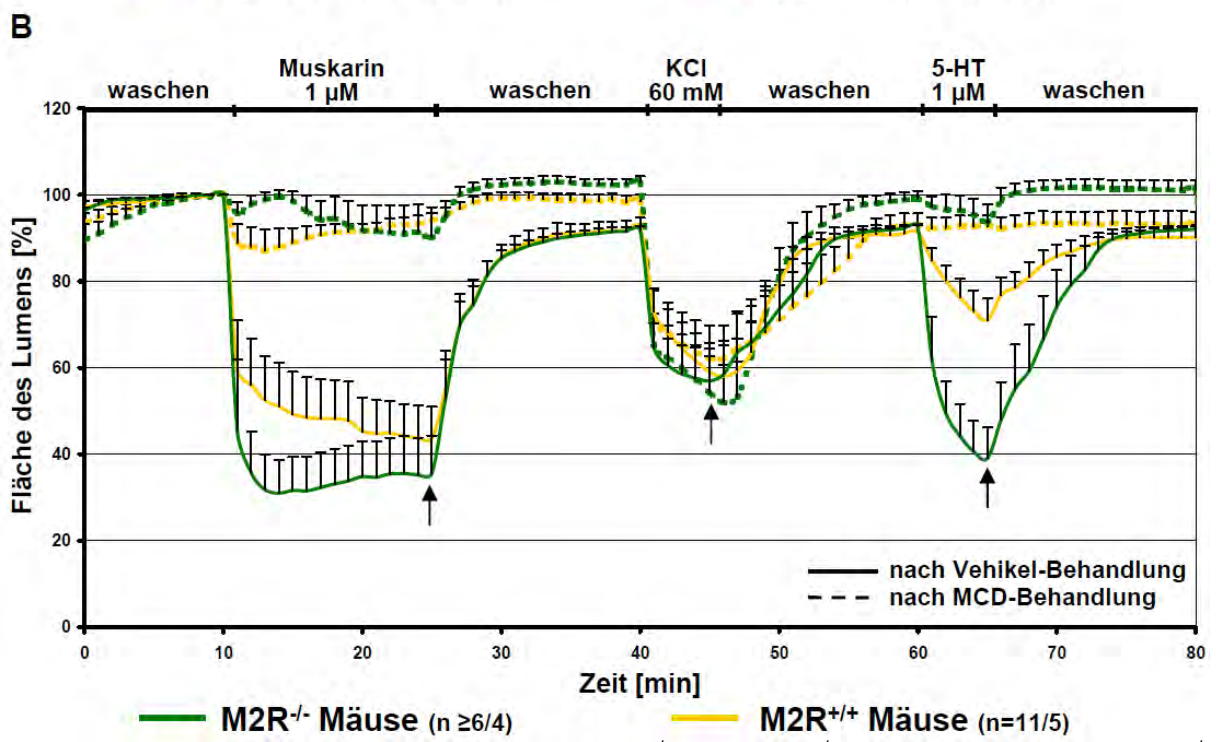
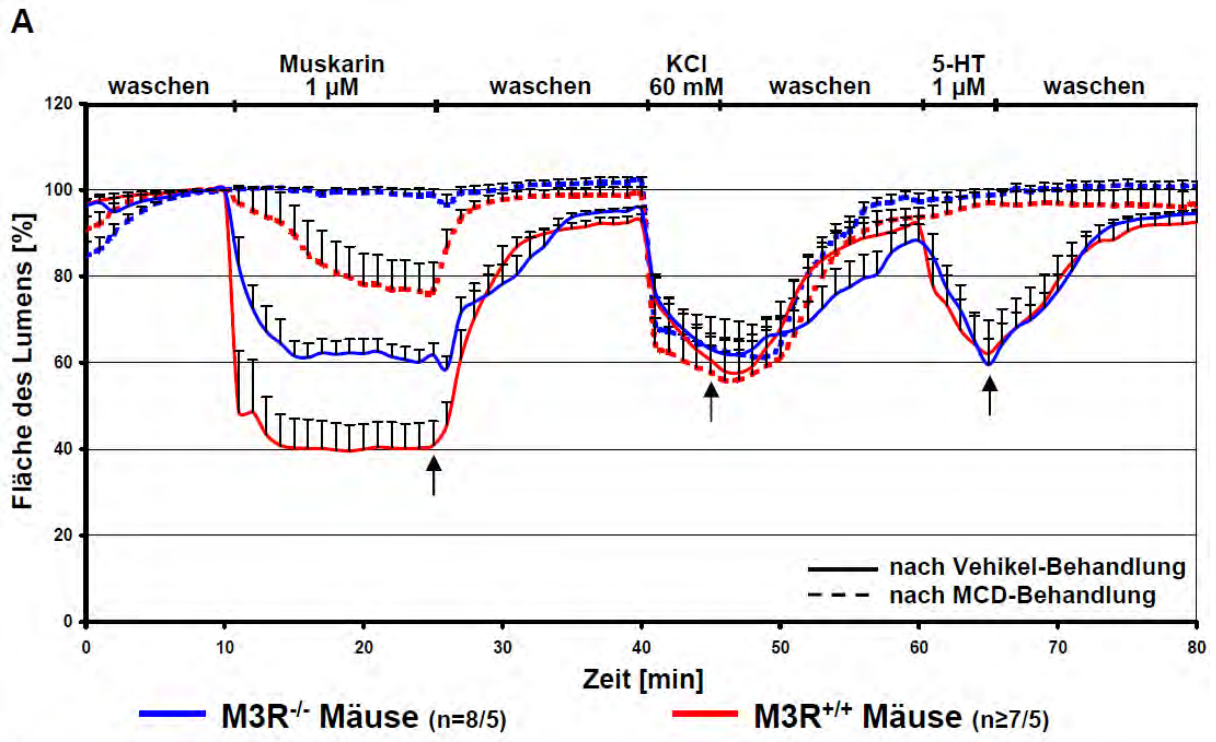


Abbildung 3.18 Bronchokonstriktionen in M3R<sup>-/-</sup> und M3R<sup>+/+</sup> Mäusen (A) und in M2R<sup>-/-</sup> und M2R<sup>+/+</sup> Mäusen (B) nach Vehikel- bzw. Methyl-β-Cyclodextrin(MCD-)Behandlung und Stimulation mit Muskarin (1 µM), KCl (60 mM) und 5-HT (1 µM). Dargestellt sind die Veränderungen der Luminaflächen peripherer Atemwege als Mittelwert ± Standardfehler. Pfeile markieren die Zeitpunkte, zu denen vergleichende Statistik mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt wurde. n=Anzahl der Bronchien/Mäuse.

Der Vergleich der Bronchokonstriktionen von M2R<sup>+/+</sup> und M2R<sup>-/-</sup> Mäusen nach Vehikel-Behandlung ergab, dass sich die Bronchokonstriktionen nach 15-minütiger Inkubation mit Muskarin in diesen beiden Mausstämmen nicht signifikant unterschieden ( $p=0,350$ ; Abbildung 3.18B). Nach Behandlung mit MCD war im Vergleich zur Vehikel-Behandlung die Antwort auf Muskarin in beiden Stämmen stark, auf weniger als 10% Restkontraktion, verringert (M2R<sup>-/-</sup>  $p=0,003$ ; M2R<sup>+/+</sup>  $p<0,001$ ; Abbildung 3.18B). Die Reduktion der Konstriktion war mit einer Differenz der maximalen Verkleinerung des Lumens von  $50\% \pm 5\%$  in M2R<sup>+/+</sup> und  $54\% \pm 8\%$  in M2R<sup>-/-</sup> Mäusen in beiden Mausstämmen gleich stark ausgeprägt ( $p=0,492$ ). Stimulation mit KCl rief in Vehikel-behandelten M3R<sup>+/+</sup> und M3R<sup>-/-</sup> Mäusen gleich starke Reaktionen hervor ( $p=1,000$ ), die auch nach MCD-Behandlung unverändert waren (M3R<sup>+/+</sup>  $p=0,867$ ; M3R<sup>-/-</sup>  $p=0,505$ ; Abbildung 3.18A). Dies galt auch für M2R<sup>+/+</sup> und M2R<sup>-/-</sup> Mäuse nach KCl-Stimulation (M2R<sup>+/+</sup>  $p=0,884$ ; M2R<sup>+/+</sup>  $p=0,748$ ; M2R<sup>-/-</sup>  $p=0,755$ ; Abbildung 3.18B).

Nach 5-HT-Applikation waren die Bronchokonstriktionsreaktionen in M3R<sup>+/+</sup> und in M3R<sup>-/-</sup> nach Vehikelbehandlung vergleichbar stark ( $p=0,694$ ) jedoch nach MCD-Behandlung in beiden Mausstämmen komplett aufgehoben (M3R<sup>+/+</sup>  $p=0,006$ ; M3R<sup>-/-</sup>  $p=0,007$ ; Abbildung 3.18A). In M2R<sup>-/-</sup> Mäusen war die Reaktion auf 5-HT stärker ausgeprägt als in M2R<sup>+/+</sup> Mäusen ( $p=0,007$ ; Abbildung 3.18B). Nach MCD-Behandlung war die Antwort auf 5-HT auch in diesen beiden Mausstämmen aufgehoben (M2R<sup>+/+</sup>  $p=0,002$ ; M2R<sup>-/-</sup>  $p=0,001$ ; Abbildung 3.18B).

### 3.4.3 Kontraktilität der Bronchien von Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen

Die funktionelle Rolle von Cav-1 in der muskarinergen Bronchokonstriktion wurde an Lungenschnitten Cav-1-defizienter Mäuse und deren Wildtypen videomorphometrisch geklärt.

Zunächst wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Muskarin- bzw. 5-HT-induzierten Bronchokonstriktionen in diesen Mausstämmen untersucht. Die mittleren Ruhedurchmesser der untersuchten Bronchien betragen  $180 \pm 6 \mu\text{m}$  in Cav-1<sup>+/+</sup> ( $n=52$ ) und  $195 \pm 8 \mu\text{m}$  in Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen ( $n=36$ ;  $p=0,172$ ). Die Vitalität der Bronchien wurde zu Beginn und Ende des Versuchs durch Auslösen einer Kontraktion mit dem Kontrollstimulus KCl (60 mM) bestätigt.

Auf ansteigende Konzentrationen von Muskarin ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) reagierten die Bronchien aller Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Mäuse einheitlich dosisabhängig. Niedrige

Muskarinkonzentrationen  $<10^{-7}$  M verursachten keine bis geringe Konstriktionen. Bei Muskarin-Konzentrationen von  $10^{-7}$  bis  $10^{-5}$  M wurde eine progressive Reduktion der Fläche des Bronchuslumens gemessen: von 93% auf 16% bei Cav-1<sup>+/+</sup> und von 92% auf 9% bei Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen. Bei Konzentrationen  $>10^{-5}$  M hatten die Bronchien die maximale Konstriktion erreicht, so dass die Dosis-Wirkungs-Kurve einen sigmoiden Verlauf zeigt (Abbildung 3.19).

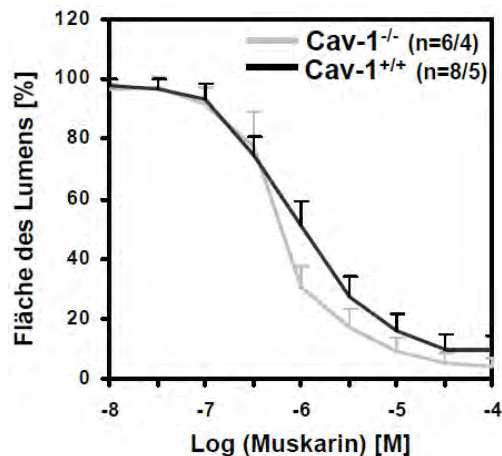


Abbildung 3.19 Bronchokonstriktionen in Lungenschnitten von Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen, induziert durch kumulative Gabe von Muskarin. Dargestellt sind die Veränderungen der Luminaflächen peripherer Atemwege als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Für keinen der Messpunkte ergab sich eine signifikante Differenz zwischen dem Verhalten der Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Bronchien (Mann-Whitney U-Test). n=Anzahl der Bronchien/Mäuse.

Im Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve von  $10^{-8}$  bis  $10^{-4}$  M 5-HT wurden die stärksten Reaktionen der Bronchien von Cav-1<sup>+/+</sup> Mäusen auf  $50\% \pm 8\%$  bei  $10^{-5}$  M 5-HT gemessen. Niedrige 5-HT-Konzentrationen von  $10^{-8}$  bis  $10^{-6}$  M verursachten eine progressive Konstriktion der Bronchien. Interessanterweise nahm die Fläche der Bronchuslumina bei  $10^{-4}$  M 5-HT wieder zu (Abbildung 3.20A).

Eine aufsteigende Konzentrationsreihe, beginnend mit  $10^{-6}$  M 5-HT als Initialkonzentration, zeigte das gleiche Verhalten. Die stärksten Reaktionen der Bronchien wurden bei  $10^{-5}$  M 5-HT gemessen. Durch Zugabe von  $10^{-4}$  M 5-HT wurden die Lumina erweitert (Abbildung 3.20C). Durch die Initialkonzentration  $10^{-4}$  M 5-HT wurden die Bronchuslumina auf eine Größe von  $64\% \pm 6\%$  reduziert, die mit der Größe der Bronchien bei  $10^{-4}$  M 5-HT nach vorhergehender maximaler Kontraktion aus den anderen Dosis-Wirkungs-Kurven vergleichbar war ( $p=0,602$ ; Kruskal-Wallis Test; Abbildung 3.20 E+G). Kumulative Zugabe von  $10^{-3}$  M 5-HT führte zu keiner signifikanten Erweiterung der Lumina.



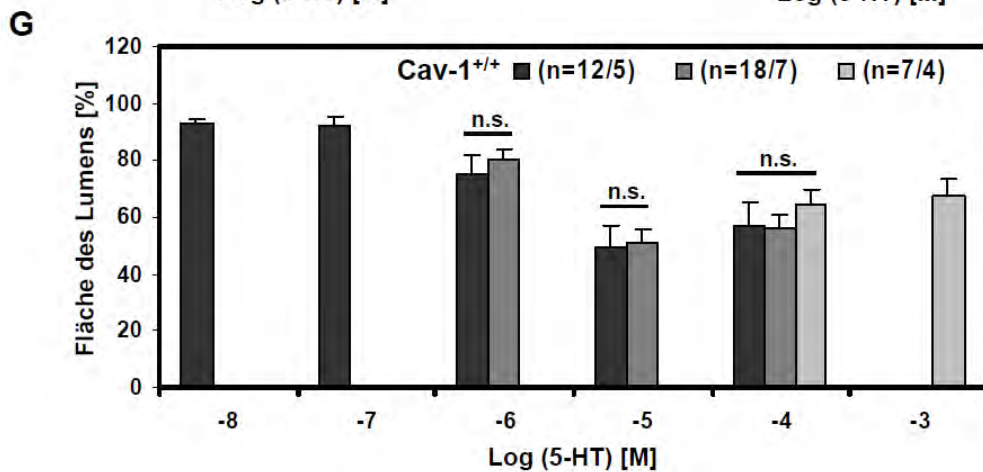
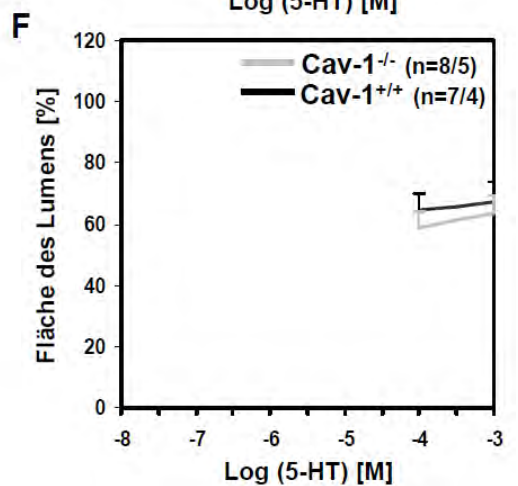
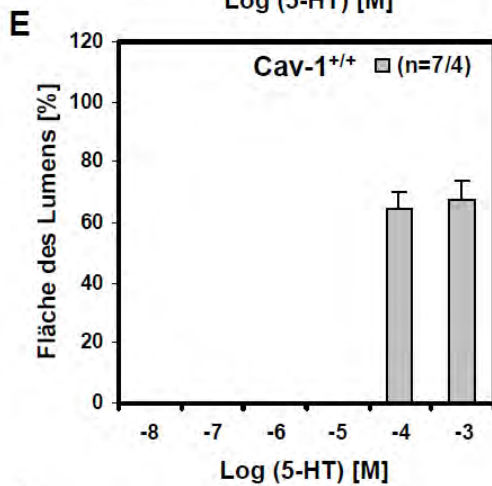
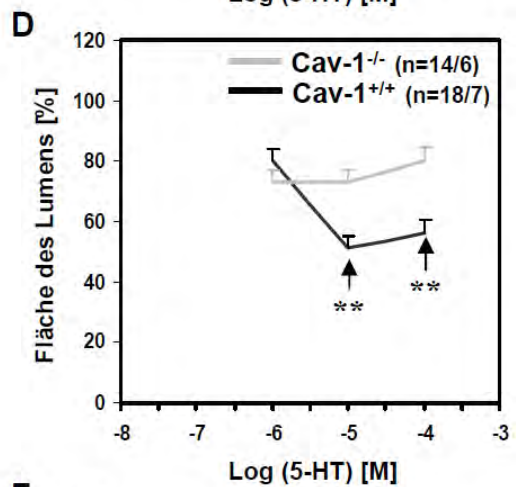
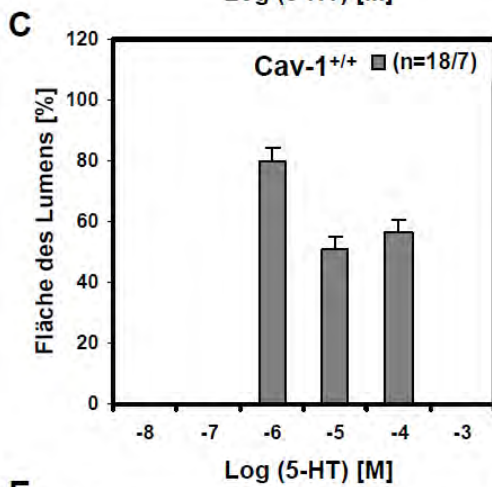
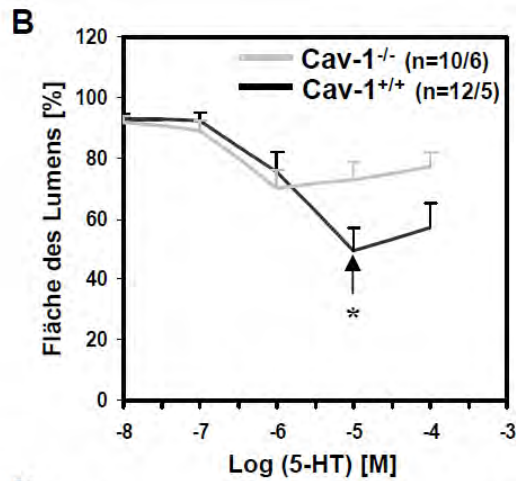
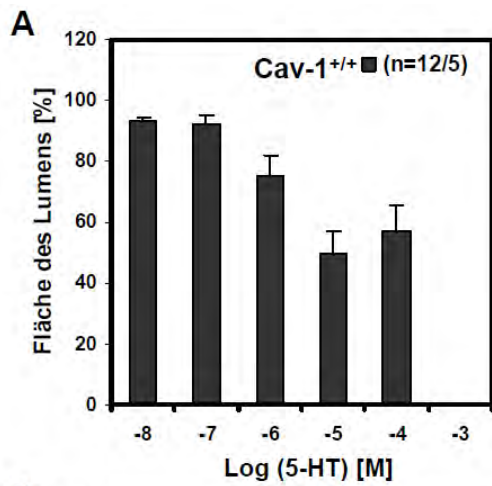


Abbildung 3.20 Bronchokonstriktionen in Lungenschnitten von Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen, induziert durch kumulative Gabe von 5-HT mit unterschiedlichen Initialkonzentrationen. Dosis-Wirkungs-Kurven in logarithmischen Konzentrationsschritten von 10<sup>-8</sup> bis 10<sup>-4</sup> M 5-HT (A+B), von 10<sup>-6</sup> bis 10<sup>-4</sup> M 5-HT (C+D) und von 10<sup>-4</sup> bis 10<sup>-3</sup> M 5-HT (E+F) in Cav-1<sup>+/+</sup> Mäusen (A, C, E, ) und in Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich (B, D, F). G) Die dosisabhängige 5-HT-induzierte Reaktion von Cav-1<sup>+/+</sup> Bronchien nach unterschiedlichen Initialkonzentrationen aus A, C, E im Vergleich. Dargestellt sind die Veränderungen der Luminaflächen peripherer Atemwege als Mittelwert ± Standardfehler; \*p≤0,05; \*\*p≤0,01; n.s.=nicht signifikant (Vergleich der dosisabhängigen Reaktionen in G) mittels Kruskal-Wallis Test bzw. Mann-Whitney U-Test, Vergleich der Reaktionen von Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen mittels Mann-Whitney U-Test); n=Anzahl der Bronchien/Mäuse.

Die Bronchien Cav-1-defizienter Mäuse zeigten eine geringere Reaktion auf 10<sup>-5</sup> M und 10<sup>-4</sup> M 5-HT als die der Wildtypmäuse, wenn diese Konzentrationen auf eine Vorstimulation mit geringeren 5-HT-Konzentration folgten (p=0,043 und p=0,001 bei 10<sup>-5</sup> M; p=0,001 bei 10<sup>-4</sup> M; Abbildung 3.20B, D). Durch 10<sup>-4</sup> M 5-HT als Initialstimulus wurde hingegen eine mit dem Wildtyp vergleichbar starke Reaktion ausgelöst (p=0,613; Abbildung 3.20F).

In Cav-1<sup>+/+</sup> Mäusen war die Stärke der ausgelösten Reaktion in den 5-HT Verdünnungsreihen (10<sup>-8</sup>-10<sup>-4</sup> M, 10<sup>-6</sup>-10<sup>-4</sup> M und 10<sup>-4</sup>-10<sup>-3</sup> M 5-HT) unabhängig von der Initialkonzentration. Die stärkste Reduktion der Bronchuslumina auf 50% ± 4% erfolgte bei 10<sup>-5</sup> M 5-HT (Abbildung 3.20 G).

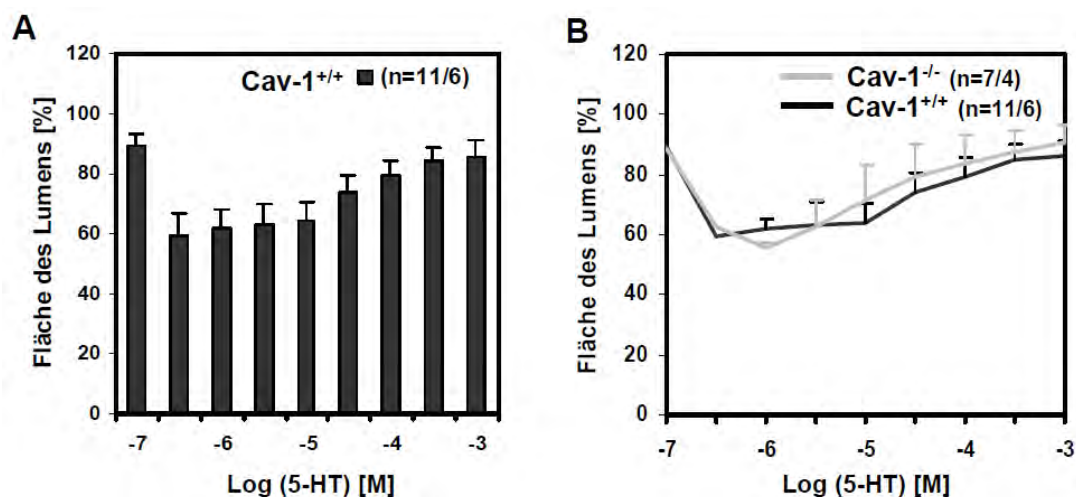


Abbildung 3.21 Bronchokonstriktionen, induziert durch kumulative Gabe von 10<sup>-7</sup> bis 10<sup>-3</sup> M 5-HT in halblogarithmischen Konzentrationsschritten in Lungenschnitten von Cav-1<sup>+/+</sup> Mäusen (A) und von Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich (B). Dargestellt sind die Veränderungen der Luminaflächen peripherer Atemwege als Mittelwert ± Standardfehler. Für keinen der Messpunkte ergab sich eine signifikante Differenz zwischen dem Verhalten der Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Bronchien (Mann-Whitney U-Test). n=Anzahl der Bronchien/Mäuse.

Im Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve von  $10^{-7}$  bis  $10^{-3}$  M 5-HT in halblogarithmischen Konzentrationsschritten wurde die stärkste Reaktion der Bronchien auf  $60\% \pm 7\%$  der Fläche bereits mit einer geringeren Konzentration erreicht ( $5 \times 10^{-7}$  M) als bei logarithmischer Konzentrationssteigerung. Höhere Konzentrationen verursachten eine progressive Erweiterung der Bronchien (Abbildung 3.21A). Die Bronchien Cav-1-defizienter Mäuse zeigten die gleiche Reaktion wie die des Wildtypstammes (Abbildung 3.21B).

Zusätzlich wurde die Kontraktilität der Bronchien in Lungenschnitten Cav-1-defizienter Mäuse und deren Wildtypmäusen nach Cholesterolentzug durch MCD-Behandlung untersucht. Im Vergleich zu Versuchen mit Lungenschnitten M2R<sup>-/-</sup>, M3R<sup>-/-</sup> und korrespondierender Wildtypmäuse (siehe Kapitel 3.4.2) wurde 5-HT hier in einer 10-fach höheren Konzentration ( $10^{-5}$  M) appliziert, da diese Konzentration in Cav-1<sup>+/+</sup> Mäusen die stärkste Reaktion hervorrief (Abbildung 3.20G).

Die mittleren Ruhedurchmesser der Bronchien betragen  $163 \pm 9$   $\mu\text{m}$  (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler) in Cav-1<sup>+/+</sup> (n=19) und  $185 \pm 8$   $\mu\text{m}$  in Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen (n=20; p=0,068). Alle Bronchien reagierten auf Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  Muskarin, 10  $\mu\text{M}$  5-HT bzw. 60 mM KCl mit sofortiger progressiver Konstriktion bis die Stimulanzien nach 15 min Inkubation (Muskarin) oder 5 min Inkubation (5-HT) durch Perfusion mit Puffer wieder ausgewaschen wurden.

Die Bronchokonstriktionsreaktionen von Vehikel-behandelten Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen verhielten sich gleich. Nach 15-minütiger Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Muskarin (p=0,436), nach 5-minütiger Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  5-HT (p=0,730) bzw. nach 5-minütiger Zugabe von 60 mM KCl (p=1,000) waren keine Unterschiede detektierbar (Abbildung 3.22).

Nach Behandlung mit MCD war die Antwort auf Muskarin in Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen ebenfalls gleich stark (p=0,918). Im Vergleich zur Vehikel-Behandlung war die Antwort auf Muskarin in beiden Stämmen jedoch stark verringert (Cav-1<sup>-/-</sup> p=0,025; Cav-1<sup>+/+</sup> p=0,028). Die Differenz zwischen der maximalen Verkleinerung des Lumens nach Vehikel- und MCD-Behandlung betrug  $31\% \pm 3\%$  in Cav-1<sup>+/+</sup> und  $21\% \pm 6\%$  in Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen (p=0,468; Abbildung 3.22).

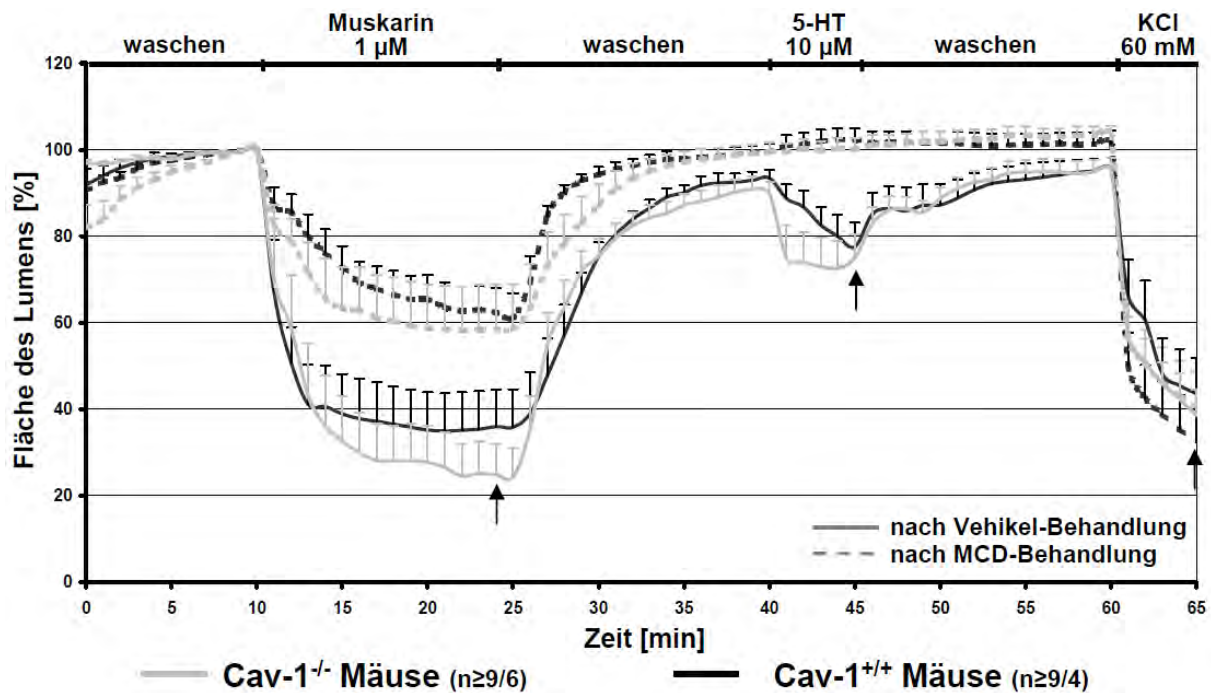


Abbildung 3.22 Bronchokonstriktionen in Cav-1<sup>-/-</sup> und Cav-1<sup>+/+</sup> Mäusen nach Vehikel- bzw. MCD-Behandlung und Stimulation mit Muskarin (1 µM), 5-HT (10 µM) und KCl (60 mM). Dargestellt sind die Veränderungen der Luminaflächen peripherer Atemwege als Mittelwert ± Standardfehler. Pfeile markieren die Zeitpunkte, zu denen vergleichende Statistik mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt wurde. n=Anzahl der Bronchien/Mäuse.

Die Antwort auf 5-HT war nach Behandlung mit MCD in beiden Mausstämmen komplett aufgehoben (Cav-1<sup>+/+</sup> p=0,001; Cav-1<sup>-/-</sup> p<0,001; Abbildung 3.22).

Stimulation mit KCl rief in MCD-behandelten Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen gleich starke Reaktionen hervor (p=0,468), die auch im Vergleich zur Vehikel-Behandlung unverändert waren (Cav-1<sup>+/+</sup> p=0,356; Cav-1<sup>-/-</sup> p=0,882; Abbildung 3.22).

### 3.5 M2R-Expression in M3R<sup>+/+</sup> und M3R<sup>-/-</sup> Mäusen

Um eine mögliche funktionelle Kompensation des M3R durch den M2R in M3R<sup>-/-</sup> Mäusen auszuschließen, wurde das Expressionsniveau von M2R und M3R in M3R<sup>+/+</sup> und M3R<sup>-/-</sup> Mäusen bestimmt. Eine RT-PCR der Gesamt-mRNA zeigte gleiche Expressionslevel für M2R und M3R in Lungenhomogenaten (p=0,222), Trachealmuskulatur (p=0,886) und Harnblasenhomogenaten (p=0,886) von M3R<sup>+/+</sup> Mäusen. In M3R<sup>+/+</sup> und M3R<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte die Quantifizierung der relativen Expression der M2R-mRNA vergleichbar hohe Expressionslevels in Lungenhomogenaten (p=0,841), im Trachealmuskel (p=0,686) und in der Harnblase

( $p=0,886$ ; Abbildung 3.23). Die PCR-Produkte hatten die erwartete Länge, und es wurden keine Banden in den Kontrollreaktionen ohne DNA-Template detektiert.

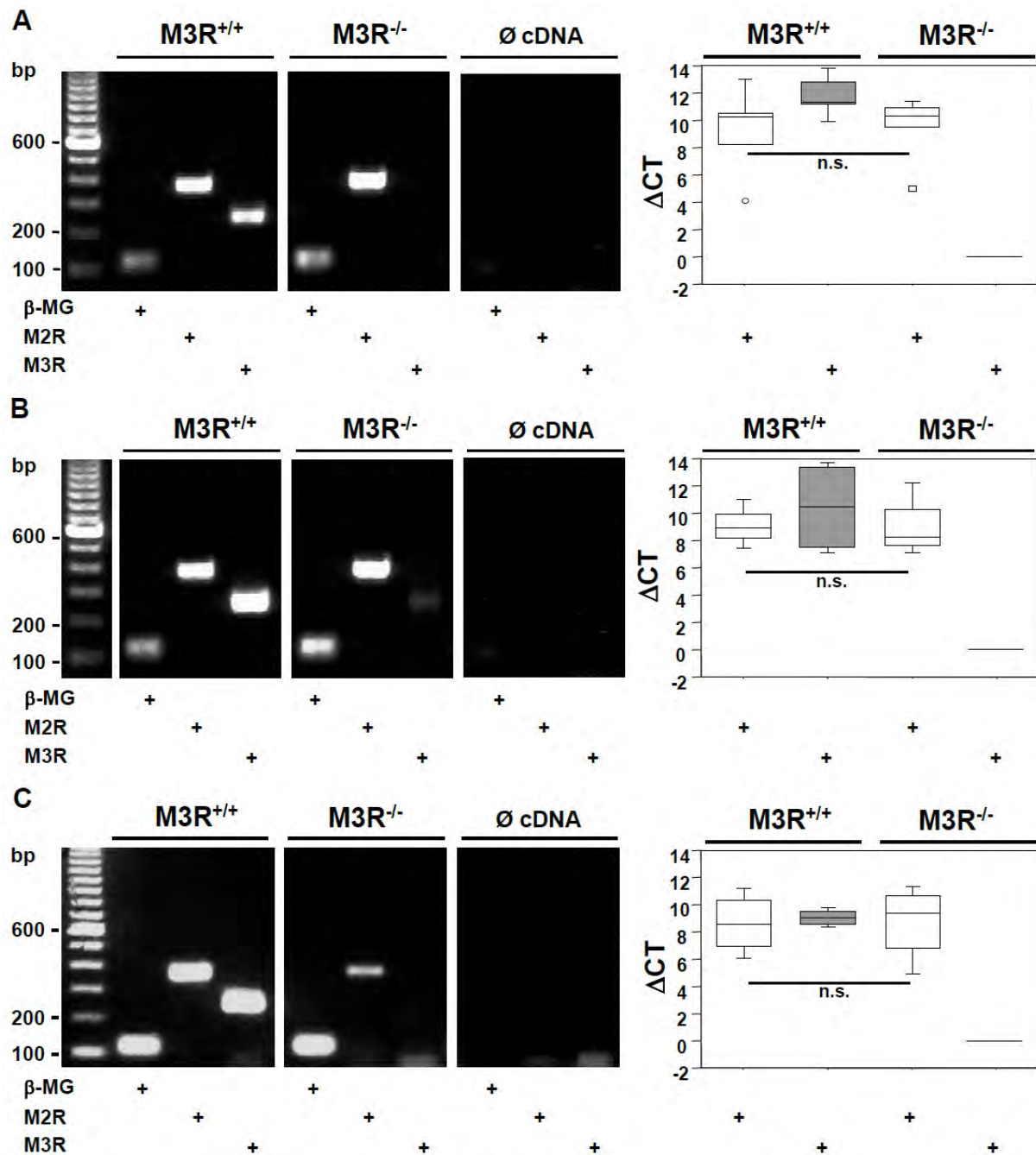


Abbildung 3.23 Quantitative RT-PCR zur MR-Expression in M3R<sup>+/+</sup> und M3R<sup>-/-</sup> Mäusen. cDNA aus A) Lungenhomogenaten (n=5), B) Trachealmuskulatur (n=4) und C) Harnblasenhomogenaten (n=4) von M3R<sup>-/-</sup> und M3R<sup>+/+</sup> Mäusen und Kontrollen ohne cDNA (∅cDNA; A. dest.). PCR-Produkte für M2R, M3R und  $\beta$ -Mikroglobulin ( $\beta$ -MG) im Agarosegel aufgetrennt und  $\Delta$ CT-Werte für M2R und M3R mit  $\beta$ -MG als Referenzgen berechnet. n.s.=nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test); n=Anzahl der Tiere; Boxplots: Perzentile (0, 25, Median, 75, 100), Extremwerte (o), Ausreißer ( $\square$ ).

## 4 Diskussion

Dysregulation der muskarinergen, GPCR-vermittelten Bronchokonstriktion und Atemwegshyperreagibilität sind Kennzeichen von obstruktiven Lungenerkrankungen wie Asthma und COPD (Coulson und Fryer, 2003). Daher ist die Untersuchung der zugrunde liegenden regulatorischen Mechanismen von hoher Relevanz. Ansammlungen von GPCR und verschiedenen sekundären Signalmolekülen, die an der Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts und der Kontraktilität der Atemwegsmuskulatur beteiligt sind, befinden sich in Caveolae (Bergdahl und Swärd, 2004; Gosens et al., 2008; Razani et al., 2002a). Überdies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in der Bronchialmuskulatur der Maus erstmals eine Kopplung des M2R an Caveolae/Cav-3 gezeigt.

### 4.1 Caveolae/Caveoline in den Glattmuskelzellen der Bronchien

Von den drei bekannten Caveolinen sind nur Cav-1 und Cav-3 in unterschiedlichen Zelltypen in der Lage Caveolae zu formen (Bergdahl und Swärd, 2004). Daher wurde die Verteilung von Cav-1 und Cav-3 in Lungenschnitten von Bronchien der Maus untersucht. In der vorliegenden Studie wurde das Vorkommen von Cav-1 in Glattmuskelzellen der Bronchien der Maus bestätigt, das in anderen Studien bereits für Maus, Ratte, Hund und Mensch beschrieben wurde (Gosens et al., 2007; Krasteva et al., 2006; Prakash et al., 2007; Song et al., 1996). Erstmals wurde auch das Vorkommen von Cav-3 in diesen Zellen gezeigt. Bisher war die Präsenz von Cav-3 in der Atemwegsmuskulatur nur für die Spezies Ratte und Hund beschrieben (Gosens et al., 2007; Krasteva et al., 2007), während in isolierter humaner Atemwegsmuskulatur bisher von einem Fehlen von Cav-3 berichtet wurde (Gosens et al., 2007, 2008; Prakash et al., 2007). Erstmals gelang auch der Nachweis von Cav-3 in der Atemwegsmuskulatur des Menschen, wo Cav-3 sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene detektiert wurde (Schlenz et al., 2010). Die Diskrepanz dieser Befunde ist möglicherweise auf die Verwendung unterschiedlicher Antikörper für die Detektion und/oder auf eine Veränderung der Cav-3-Expression durch Isolierung der Glattmuskelzellen zurückzuführen. Der Nachweis von Cav-3 in Maus und Mensch macht eine Verbreitung von Cav-3 in der Atemwegsmuskulatur aller Säuger wahrscheinlich.



In den Cav-1- und Cav-3-haltigen glatten Muskelzellen der Bronchien von M2R<sup>+/+</sup>, M2R<sup>-/-</sup>, M3R<sup>+/+</sup>, M3R<sup>-/-</sup> bzw. Cav-1<sup>+/+</sup> Mäusen wurden über die gesamte Zelloberfläche verteilt Ansammlungen  $\Omega$ -förmiger Caveolae gefunden. Entsprechend den Beschreibungen anderer Studien an Gefäß- und Atemwegsglattnuskulatur waren die Caveolae dabei meist in Reihen entlang der Zelloberfläche angeordnet (Dreja et al., 2002; Gosens et al., 2007; Halayko und Stelmack, 2005; Potocnik et al., 2007; Taggart, 2001).

Da Caveolae auch in Cav-1-defizienten Glattmuskelzellen der Atemwege vorgefunden wurden, muss in diesen Zellen auch Cav-3 eine Rolle bei der Bildung von Caveolae zukommen. Eine verminderte Anzahl an Caveolae in glatten Muskelzellen der Harnblase Cav-1-defizienter Mäuse wurde auch von Woodman et al. (2004a) beobachtet, wohingegen die Anzahl an Caveolae in Cav-3-defizienten Tieren unverändert schien. Die primäre Rolle bei der Bildung von Caveolae in Glattmuskelzellen kommt daher Cav-1 zu, sodass ein großer Anteil an Cav-3 in diesen Zellen möglicherweise gar nicht an der Generierung von Caveolae beteiligt ist, sondern andere zelluläre Funktionen übernimmt. Denkbar ist aber auch, dass es in Cav-3-defizienter glatter Muskulatur zur verstärkten Ausbildung von Caveolae durch Cav-1 kommt, während dies umgekehrt bei Cav-1-defizienten Glattmuskelzellen nicht der Fall ist. Kenntnisse zu den relativen Anteilen von Cav-1 und Cav-3 in glatten Muskelzellen fehlen bisher. Zelltypabhängig wurden morphologische Unterschiede der Caveolae festgestellt, die mit der Zusammensetzung des Proteingerüsts der Caveolae in Zusammenhang stehen könnten. In Endothelzellen und Fibroblasten wurden, Caveolae mit gestreiften Oberflächen und in Epithelzellen, Hepatozyten und anderen Zelltypen mit rauen Oberflächen beschrieben („*stripe-surfaced and bumpy-surfaced uncoated vesicles*“, Izumi et al., 1989). In humanen Fibroblasten wurden außerdem tiefe und flache Formen von Caveolae beschrieben (Fujimoto et al., 2000). Möglicherweise werden einige Caveolae aus Cav-1 und Cav-3 gemeinsam, andere Caveolae ausschließlich von Cav-1 oder ausschließlich von Cav-3 gebildet, was die unterschiedlichen Morphologien der Caveolae erklären könnte. Die verbleibende Anzahl an Caveolae in Cav-1<sup>-/-</sup> Atemwegsmuskulatur entspricht dementsprechend vermutlich dem aus Cav-3 aufgebauten Anteil der Caveolae.

## 4.2 Assoziationen von Caveolinen und muskarinergen Rezeptoren

Obwohl die genauen Mechanismen noch unklar sind, scheinen zwei charakteristische Merkmale der Cav für die Transformation der Plasmamembran zu  $\Omega$ -förmigen Caveolae verantwortlich zu sein: die Bindung von Cholesterol und Sphingolipiden und die Fähigkeit zur Oligomerisierung (Razani et al., 2002a). Sowohl für Cav-1 als auch für Cav-3 ist die Bildung von Homo- und Heterooligomeren mit Cav-2 bekannt (Capozza et al., 2005). In der vorliegenden Studie wurden im Western Blot muriner Lungenhomogenate unter Verwendung spezifischer Antikörper jeweils drei Banden für Cav-1 und Cav-3 detektiert, die ebenfalls für die Bildung von homooligomeren Komplexen in bronchialen Glattmuskelzellen sprechen. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Befunden überein, dass Cav-1 und Cav-3 etwa 350 kDa Homooligomere aus 14-16 Monomeren bilden können (Tang et al., 1996). Cav-1/Cav-3-Heterooligomerisierung wurde erst vor wenigen Jahren durch Koimmunopräzipitation in Herzmuskelzellen von Ratten und in Skelettmuskulatur Cav-1-überexprimierender Mäuse gezeigt (Capozza et al., 2005; Volonte et al., 2008). Mittels FRET-CLSM-Analyse, eine Methode, die unlängst etabliert und methodisch beschrieben wurde (König et al., 2006), konnte in der vorliegenden Arbeit eine *in situ*-Assoziation von Cav-1 und Cav-3 in murinen Herzvorhofmyozyten bestätigt und darüber hinaus erstmals in Atemwegsmuskelzellen gezeigt werden. Einige Proteine, die an Cav-3 binden, sind auch in der Lage mit Cav-1 zu interagieren, was eine Kompensation im Falle des Fehlens eines Cav vermuten lässt. Beispiele sind die endotheliale und neuronale Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS), die über die CSD sowohl an Cav-1 als auch an Cav-3 binden können (Feron et al., 1996; Smart et al., 1999; Venema, 1997).

Mit Cav interagierende Proteine können eingeteilt werden in a) jene, die in Caveolae angereichert sind, b) solche, die nach Aktivierung in die Caveolae transloziert werden und c) Proteine, die Cav nur als Chaperone zum Transport an andere Zielorte benötigen (Wyse et al., 2003). Für den M2R ist in Herzkammermyozyten der Ratte eine agonistabhängige Translokation in die Caveolae bekannt, wo er mit Cav-3 koimmunopräzipitiert wurde (Feron et al., 1997). Mittels Doppelimmunhistochemie kombiniert mit FRET-CLSM-Analyse wurde eine Assoziation des M2R an Cav-3 in Herzvorhofmyozyten der Maus detektiert. Mit dieser Technik wurde hier außerdem erstmals gezeigt, dass der M2R auch in der Bronchialmuskulatur der Maus *in situ* direkt mit Cav-3 assoziiert ist. Diese Protein-Assoziation zwischen Cav-3 und M2R,



die ohne vorherige cholinerge Stimulation detektierbar war, weist anders als in Herzkammermyozyten (Feron et al., 1997) auf eine stationäre Lokalisation des M2R in den Caveolae der Glattmuskelzellen hin.

Obwohl einige Proteine sowohl an Cav-3 als auch an Cav-1 binden können (Feron et al., 1996; Smart et al., 1999; Venema 1997), wurde hier mittels FRET-CLSM-Analyse weder in Kardiomyozyten noch in bronchialen Glattmuskelzellen eine Assoziation zwischen Cav-1 und M2R festgestellt. Diese Daten unterstützen daher die Auffassung, dass die verschiedenen Cav-Isoformen unterschiedliche, spezifische Funktionen erfüllen (Kogo et al., 2006).

Obwohl Cav-3 sowohl mit Cav-1 als auch mit M2R assoziiert, ist eine gleichzeitige Komplexbildung aller Proteine unwahrscheinlich. Zum einen überschneiden sich die voraussichtlich beteiligten Cav-3-Bindungsdomänen für Cav-1 und M2R (CSD: Aminosäuren 82-101 und Oligomerisierungsdomäne: Aminosäuren 61-101; Cohen et al., 2004). Zum anderen wurde mittels FRET-CLSM-Analyse gezeigt, dass der M2R für eine Komplexbildung wahrscheinlich nicht nahe genug an Cav-1 lokalisiert ist (>10 nm). Da diese Methode auf indirekter Immunhistochemie basiert, sind direkte Vergleiche der räumlichen Entfernung verschiedener Proteinpartner anhand des FRET-Effekts nicht möglich und Proteinassoziationen nicht quantifizierbar. Für die immunhistochemische Detektion membranständiger Antigene ist die Spezifität von Antikörpern außerdem häufig ein Problem. Falsch positive immunhistochemische Markierungen aufgrund Proteinhomologien oder ionischer Interaktionen (auch in Abwesenheit von Sequenzhomologien auf Aminosäurelevel) sind möglich, obwohl diese präabsorbierbar sind (Grube, 1980; Lorincz und Nusser, 2008). Die Überprüfung der Antikörperspezifität in Abwesenheit des Antigens ist daher wünschenswert. Dies ist nur auf Gewebe von gendefizienten Mäusen möglich, wie in dieser Studie für Cav-1 und M2R durchgeführt. Cav-3-defiziente Mäuse standen trotz mehrfacher Bemühungen leider nicht zur Verfügung, da die zwei Arbeitsgruppen, in denen bereits Cav-3-defiziente Stämme generiert wurden (Galbiati et al., 2001; Hagiwara et al., 2000) trotz mehrfacher Anfragen nicht reagierten. Daher erfolgte die Bestätigung der Spezifität des Anti-Cav-3-Antikörpers durch Präabsorption. Unterstützend lieferte die Markierung des Anti-Cav-3-Antikörpers an Cav-1-defizientem Gewebe einen weiteren Hinweis auf die Antikörperspezifität, da sie eine Kreuzreaktivität des Anti-Cav-3-Antikörpers mit dem zu 65% homologen Cav-1 ausschloss (Razani et al., 2002a).

Auch für die Detektion von GPCR ist die Spezifität von Antikörpern aufgrund des hohen Grades an Homologie zwischen den Rezeptorsubtypen innerhalb einer GPCR-Familie ebenfalls häufig ein Problem, beispielsweise für  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -Adrenozeptoren, Dopamin- und Galanin-Rezeptoren (Michel et al., 2009). Dies gilt auch für muskarinerge Rezeptoren (Jositsch et al., 2009; Pradidarcheep et al., 2009). Da gegen den M3R bisher kein Antikörper bekannt ist, der sich in M3R<sup>-/-</sup> Gewebe als spezifisch erwiesen hat, obwohl neun Anti-M3R-Antikörper unter jeweils mindestens 18 verschiedenen Konditionen getestet worden sind (Jositsch et al., 2009), wurden immunhistochemische Untersuchungen zu Assoziationen von Cav-1 und Cav-3 mit muskarinergen Rezeptoren der Atemwegsmuskulatur auf M2R beschränkt.

Ob eine Assoziation zwischen M3R und Cav-1 besteht, entsprechend der hier gezeigten Assoziation zwischen M2R und Cav-3, muss daher mit anderen Techniken untersucht werden, die nicht auf der Anwendung von Anti-MR-Antikörpern basieren, wie beispielsweise einer Koimmunpräzipitation mit Detektion durch Anti-Cav-Antikörper nach ligandenbindungsabhängiger Aufreinigung von MR-haltigen Gewebelysaten mittels Rezeptor-Liganden-Affinitätschromatographie.

Zusammenfassend sind Cav-1 und Cav-3 in der Atemwegsmuskulatur in der Lage homo- und heterooligomere Komplexe zu bilden, die für die Transformation der Plasmamembran zu Caveolae notwendig sind. Des Weiteren wurde eine Assoziation des M2R an Cav-3 gefunden, die der Verankerung des M2R innerhalb der Caveolae dienen könnte.

### **4.3 Funktionelle Bedeutung von Caveolae/Caveolinen bei der Bronchokonstriktion**

#### **4.3.1 Cholesterolentzug**

Die funktionelle Bedeutung von Caveolae in der MR-vermittelten Bronchokonstriktion wurde an Lungenschnitten untersucht, in denen die Caveolae mittels MCD-Behandlung zerstört wurden. Da Cholesterol eine kritische Rolle für die Bildung von Caveolae spielt, fehlen morphologisch identifizierbare Caveolae nach Behandlung von Zellen mit Agenzien wie Nystatin, Filipin und Cyclodextrin (Hailstones et al., 1998; Rothberg et al., 1992; Schnitzer et al., 1994;). Die Effizienz eines

Cholesterolentzug kann zwischen unterschiedlichen Zelltypen und Spezies variieren (Kilsdonk et al., 1995). Die in dieser Studie verwendete MCD-Konzentration wurde bereits erfolgreich an Gefäß- und Atemwegsglattmuskulatur eingesetzt (Dreja et al., 2002; Gosens et al., 2007; Potocnik et al., 2007; Prakash et al., 2007). Der Behandlungseffekt wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie überprüft und ist mit den Beobachtungen an Glattmuskelzellen aus caninen Tracheen, Rattenschwanzarterien und isolierten Skelettmuskelarteriolen der Ratte vergleichbar (Dreja et al., 2002; Gosens et al., 2007; Potocnik et al., 2007). Nach MCD-Behandlung treten Caveolae nur sporadisch auf und die vereinzelt verbleibenden sind meist in ihrer Form abgeflacht. Diese wenigen restlichen Caveolae könnten für die geringe, erhaltene Konstriktion der M3R<sup>+/+</sup>, M2R<sup>+/+</sup> und M2R<sup>-/-</sup> Bronchien auf Muskarin nach der Behandlung verantwortlich sein. Die MCD-Behandlung zeigte in dieser und anderen Studien keinen sichtbaren Effekt auf die Verteilung von Cav und M2R auf lichtmikroskopischer Ebene (Dreja et al., 2002; Scheiffele et al., 1998). Ob Cav und MR nach Cholesterolentzug noch innerhalb der Plasmamembran lokalisiert sind, kann wegen der begrenzten Auflösung lichtmikroskopisch nicht eindeutig festgestellt werden. Auf elektronenmikroskopischer Ebene waren alle nicht-caveolären zellulären Strukturen optisch intakt, was für die Selektivität der Behandlung spricht. Überdies wurden die Effizienz und Selektivität der Caveolae-Zerstörung funktionell anhand der Teststimulanzen KCl und 5-HT bewiesen.

#### **4.3.2 KCl und 5-HT als Kontrollen**

Dass durch den Cholesterolentzug keine Schäden an der Plasmamembran entstanden, wurde durch die unveränderte Reaktion der Bronchien auf KCl-Stimulation vor und nach MCD-Behandlung gezeigt. Anders als 5-HT und Muskarin aktiviert KCl keine GPCR-Signalwege, sondern löst die Glattmuskelzellkontraktion durch Membrandepolarisierung und Aktivierung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (*voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels*; VOCC) aus (Ratz et al., 2005). In caniner Trachealmuskulatur wurden VOCC in Cav-1-haltigen Membranregionen gefunden (Darby et al., 2000), und in Glattmuskelzellen der Harnblase Cav-1-defizienter Mäuse wurde eine reduzierte kontraktile Antwort auf KCl festgestellt (Woodman et al., 2004a). Beides deutet auf eine Caveolin-1-Abhängigkeit der VOCC hin. Die Mehrzahl der Hinweise sprechen hingegen für eine Caveolae/Caveolin-1-unabhängige Funktion der VOCC (Bergdahl und Swärd, 2004). In Gefäß- und Atemwegs-

muskulatur waren die Strömungsamplituden, der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg und die Vaso- und Bronchokonstriktionen gegenüber KCl nach Cholesterolentzug und in Cav-1-defizienten Mäusen unverändert (Drab et al., 2001; Dreja et al., 2002; Lohn et al. 2000; Potocnik et al., 2007; Prakash et al., 2007). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Caveolae- und Caveolin-1-unabhängige Funktion der VOCC in der murinen Atemwegsmuskulatur und weisen auf spezie- und organspezifische Unterschiede der Caveolae-Abhängigkeit der KCl-induzierten Glattmuskelkontraktion hin.

Stimulation der Lungenschnitte von  $\text{M2R}^{+/+}$ ,  $\text{M2R}^{-/-}$ ,  $\text{M3R}^{+/+}$  und  $\text{M3R}^{-/-}$  Mäusen mit 5-HT diente zusätzlich zur elektronenmikroskopischen Überprüfung des Vorkommens von Caveolae der funktionellen Bestätigung der Inaktivierung Caveolae-abhängiger Signalwege durch die MCD-Behandlung. Die fehlende Bronchokonstriktion auf 5-HT-Stimulation nach Cholesterolentzug stimmt mit Befunden aus der Trachealmuskulatur des Rindes und der Gefäß- und Harnblasenmuskulatur der Ratte überein, wo Cholesterolentzug zur Reduktion der 5-HT-induzierten Kontraktionskraft der glatten Muskulatur führte (Christofaro et al., 2007; Dreja et al., 2002; Sommer et al., 2009).

Cholesterolentzug führte in dieser Studie zur Präkontraktion der glatten Muskulatur, also zu einer Verkleinerung des Bronchuslumens nach der MCD-Behandlung vor Beginn der zweiten Aufnahmeserie. Solch eine Präkontraktion der Muskulatur wurde auch in anderen Studien beschrieben, wo sie mit einem Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels und einem Anstieg des Grundmuskeltonus einher ging (Dreja et al., 2002; Potocnik et al., 2007; Prakash et al., 2007). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht eindeutig aufgeklärt (Dreja et al., 2002; Potocnik et al., 2007).

### **4.3.3 Muskarinerge Bronchokonstriktion**

Die funktionelle Bedeutung des M3R bei der Atemwegskonstriktion wird oft hervorgehoben. Die durch systemische Applikation eines ACh-Rezeptoragonisten oder durch Stimulation der pulmonalen Vagusefferenzen induzierte Bronchokonstriktion ist in *in vivo*-Experimenten an  $\text{M3R}^{-/-}$  Mäusen vollkommen aufgehoben (Fisher et al., 2004). Allerdings gewinnt der M2R in Modellen aus

isolierten Atemwegssegmenten an Bedeutung. In isolierten Trachealsegmenten und intrapulmonalen Bronchien M3R-defizienter Mäuse rufen ACh-Rezeptoragonisten eine kontraktile Antwort hervor, die auf eine Beteiligung des M2R zurückgeführt wird, da sie in M2/3R Doppelknockout-Mäusen vollkommen aufgehoben ist (Stengel et al., 2002; Struckmann et al., 2003). Damit übereinstimmend wurde auch in den hier durchgeführten Experimenten eine deutliche, durch Muskarin hervorgerufene Bronchokonstriktion in M3R<sup>-/-</sup> Mäusen gemessen, die im Vergleich zum Wildtyp jedoch signifikant verringert war. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass der M2R die Funktion des M3R in dessen Abwesenheit übernimmt. Die M2R-mRNA-Level in Lungenhomogenaten und in isolierter Trachealmuskulatur von M3R<sup>-/-</sup> Mäusen waren jedoch nicht erhöht. Wess und Mitarbeiter (2004) zeigten ebenfalls, dass der Verlust eines muskarinischen Rezeptorsubtyps die mRNA- und Proteinexpressionslevel der anderen Subtypen nicht beeinflusst. Beides spricht gegen eine kompensatorische Funktionsübernahme durch andere MR und für eine reguläre Beteiligung des M2R an der Bronchokonstriktion. Auch das Vorkommen und die Verteilung von Caveolae an der Zelloberfläche der Atemwegsmuskulatur von M2R<sup>-/-</sup>, M2R<sup>+/+</sup>, M3R<sup>-/-</sup> und M3R<sup>+/+</sup> Mäusen waren gleich. Die beschriebenen Unterschiede in der Muskarin-induzierten Bronchokonstriktion zwischen M2R<sup>-/-</sup> und M3R<sup>-/-</sup> Mäusen und zwischen M3R<sup>+/+</sup> und M3R<sup>-/-</sup> Mäusen sowie die Unterschiede der 5-HT-induzierten Konstriktion zwischen M2R<sup>+/+</sup> und M2R<sup>-/-</sup> Mäusen sind folglich nicht auf die Anzahl vorhandener Caveolae zurückzuführen. Eine Studie von Novi und Mitarbeitern (2005) zeigte die Notwendigkeit der Homo- und Heterodimerisierung des M2R für die  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierung und Aktivierung des Signalwegs, wobei M2R/M3R den effizientesten Komplex bildeten. Folglich könnte man spekulieren, dass eine MR-Homodimerisierung statt einer Heterodimerisierung die Unterschiede in der Bronchokonstriktion zwischen M2R<sup>-/-</sup> bzw. M3R<sup>-/-</sup> Mäusen und ihren jeweiligen Wildtypen bedingt.

#### **4.3.3.1 Funktionelle Kopplung der muskarinergen Bronchokonstriktion an Caveolae**

Die verminderte Bronchokonstriktion in M2R<sup>-/-</sup> und M3R<sup>-/-</sup> Mäusen nach Cholesterolentzug durch MCD zeigt eine Caveolae-Abhängigkeit der M3R- und M2R-Signalwege. Dass Caveolae bei der cholinergen Atemwegskonstriktion beteiligt sind, suggerieren auch andere Studien an caninen isolierten Trachealmuskelstreifen und

isolierten Glattmuskelzellen humaner Bronchien, in denen nach Cholesterolentzug die Kontraktionskraft und der Anstieg von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  weniger sensitiv gegenüber ACh waren (Gosens et al., 2007; Prakash et al., 2007). In Anbetracht der Abhängigkeit der muskarinergen Bronchokonstriktion von intakten Caveolae und der hier gezeigten Assoziation von M2R und Cav-3 erscheint eine Verankerung des M2R in den Caveolae mittels Cav-3 für die Initiierung der M2R-vermittelten Bronchokonstriktion essenziell. Für einen endgültigen Nachweis sind jedoch weitere funktionelle Studien an Cav-3-defizienten Mäusen erforderlich.

#### **4.3.3.2 Die Rolle von Cav-1 bei der muskarinergen Bronchokonstriktion**

Es wurde gezeigt, dass der M2R in der glatten Atemwegsmuskulatur der Maus mit Cav-3, nicht jedoch mit Cav-1 assoziiert. Möglicherweise ist jedoch der M3R mit Cav-1 assoziiert. Der M3R wurde nach Dichtegradientenzentrifugation in cholesterolreichen, Cav-1-enthaltenden Fraktionen humaner und caniner Atemwegsmuskulaturlysate gefunden (Gosens et al., 2007). Außerdem wurde nach Knockdown von Cav-1 durch Transfektion mit Cav-1 siRNA bzw. nach Blockierung der CSD durch ein CSD-bindendes Peptid der ACh-induzierte Anstieg von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  in humanen Bronchialmuskelzellen bei Konzentrationen  $\leq 10^{-6}$  M ACh reduziert (Gosens et al., 2007; Prakash et al., 2007). Diese Ergebnisse führten zur Annahme, dass Cav-1 den M3R-vermittelten Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  erleichtert (Gosens et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit waren die untersuchten Konstriktionsreaktionen von Cav-1<sup>-/-</sup> Bronchien gegenüber Muskarin im Vergleich zu denen der Cav-1<sup>+/+</sup> Bronchien jedoch unverändert, was gegen eine Rolle von Cav-1 bei der muskarinergen Bronchokonstriktion spricht. Die Differenzen dieser Befunde können zum einen darauf beruhen, dass unterschiedliche Spezies untersucht wurden. Eine funktionelle Kopplung der cholinergen Glattmuskelkontraktion an Cav-1 scheint zudem organspezifisch zu sein. In der glatten Muskulatur der Harnblase von Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen wurde eine verminderte Kontraktilität festgestellt, während in intestinalen glatten Muskelzellen von Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen die Reaktion auf einen ACh-Rezeptoragonisten unverändert war (Lai et al., 2004; Shakirova et al., 2006; Woodman et al., 2004a). Weiterhin spiegeln *ex vivo* gewonnene videomorphometrische Befunde von lebenden Lungenschnitten den *in vivo*-Zustand besser wider als aus dem Gewebeverband gelöste, immortalisierte Glattmuskelzellen, deren Expressionsmuster durch Kultivierung bereits verändert sein könnten.

In Zellkultur verändern sich isolierte glatte Muskelzellen der Atemwege von einem kontraktilem Phänotyp hin zu einem proliferativen, metabolisch aktiven Typ und verlieren ihre cholinerge Kontraktilität (Devore-Carter et al., 1988; Halayko et al., 2008; Panettieri et al., 1989). Des Weiteren führt eine Kultivierung von Trachealmuskelzellen in Medium mit 10% Serumanteil zu einem Verlust der MR an der Zelloberfläche (Yang, 1990). Durch Serumdeprivation kann der kontraktile Phänotyp von Trachealmuskelzellen wieder hergestellt werden, wobei im Western Blot gezeigt wurde, dass die Expression des M3R ansteigt, während die Expression des M2R abnimmt (Mitchell et al., 2000). Auch in kultivierten Trachealmuskelsträngen war die M2R-Expression bereits nach 24 h um etwa 20% reduziert und der M2R funktionell nicht mehr an der cholinergen Kontraktion beteiligt (Gosens et al., 2004; Hsieh und Farley, 2002). Um eine starke Veränderung der MR-Expression auszuschließen, wurden die vorliegenden videomorphometrischen Untersuchungen der Bronchokonstriktionen daher am selben Tag der Anfertigung der Lungenschnitte durchgeführt. Möglicherweise sind für den Erhalt der MR-Expression und -Funktionalität an der Zelloberfläche der glatten Muskelzellen Zellinteraktionen mit Epithelzellen oder Neuronen oder andere Faktoren aus dem umliegenden Gewebe verantwortlich, die bei isolierten Zellen in Kultur nicht gegeben sind (Yang et al., 1991). Es ist naheliegend anzunehmen, dass Gewebe- bzw. Zellkultivierung nicht nur einen Einfluss auf die Expression der MR, sondern auch auf andere Regulationsmechanismen der MR-vermittelten Glattnuskelkontraktion haben, wodurch die gegensätzlichen Befunde zur Cav-1-Abhängigkeit der muskarinergen Bronchokonstriktion erklärt werden könnten. Denkbar ist auch eine kompensatorische Veränderung der Cav-3-Expression in Cav-1-defizienten Tieren. Allerdings war die Expression von Cav-3 in der glatten Muskulatur von Ileum und Harnblase und in Lungenextrakten von Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen unverändert bzw. reduziert, anstatt kompensatorisch erhöht (Drab et al., 2001; Shakirova et al., 2006; Woodman et al., 2004a). Auch die hier beschriebene geringe Anzahl an aus Cav-3 gebildeten Caveolae an der Zelloberfläche Cav-1-defizienter Bronchialmuskelzellen widerspricht der Annahme einer Kompensation.

Die Zerstörung dieser restlichen Caveolae in Cav-1<sup>-/-</sup> Bronchialmuskelzellen durch Cholesterolentzug führte interessanterweise zu einer Reduktion der Reaktion auf Muskarin, was auf eine Beteiligung von Cav-3 an der muskarinergen Bronchokonstriktion hinweist und möglicherweise auf eine Störung der Verankerung

des M2R durch Cav-3 zurückzuführen ist. Ob auch der M3R mit Cav-3 assoziieren kann, bleibt in nachfolgenden Studien zu klären.

#### **4.3.4 Serotoninerge Bronchokonstriktion**

Mehrere Studien zeigten, dass der 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor an der murinen 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion beteiligt ist (Cogolludo et al., 2006; Moffatt et al., 2004; Zhang et al., 2007). Im Verlauf verschiedener Dosis-Wirkungs-Kurven mit unterschiedlichen Initialkonzentrationen von 5-HT wurde mit 10<sup>-5</sup> M 5-HT die maximale Bronchokonstriktion erreicht. Nachfolgend applizierte, höhere Konzentrationen induzierten eine Erweiterung der Bronchuslumina. Diese abnehmende Reaktivität mit zunehmenden 5-HT-Konzentrationen ist wahrscheinlich auf eine agonistinduzierte Rezeptordesensibilisierung zurückzuführen, die für den 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor schon mehrfach beschrieben wurde (Apud et al., 1992; Ben-Harari et al., 1994; Ivins und Molinoff, 1991). Eine anhaltende Stimulierung des GPCR führt über Rekrutierung von GPCR-Kinasen zur agonistabhängigen Phosphorylierung des GPCR und Bindung von Arrestinen, die weitere durch das G-Protein vermittelte Signale blockieren (Gray und Roth, 2001). Zusätzlich zu dieser agonistinduzierten, homologen Rezeptordesensibilisierung können 5-HT-Rezeptoren auch durch heterologe Desensibilisierung reguliert werden, bei der Agonisten anderer GPCR sekundär Proteinkinasen aktivieren, die zur Phosphorylierung der 5-HT-Rezeptoren führen können (Gray und Roth, 2001). Die vorliegende Studie liefert Hinweise darauf, dass der M2R eine heterologe Desensibilisierung der 5-HT-Rezeptoren auslösen kann. In M2R<sup>-/-</sup> Bronchien war die Reaktion auf 5-HT stärker ausgeprägt als in M2R<sup>+/+</sup> Bronchien. Eine Defizienz des M2R führte dementsprechend zum Wegfall der 5-HT-Rezeptordesensibilisierung und zu einer stärkeren Reaktion der Bronchien auf 5-HT. Allerdings wurde in M2/3R Doppelknockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp keine Verstärkung der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktionen nach vorhergehender Stimulation mit Muskarin beschrieben (Kummer et al., 2006). Eine andere Ursache für die stärkere Reaktion auf 5-HT in M2R<sup>-/-</sup> Bronchien könnte eine veränderte 5-HT-Rezeptor-Expression in diesem Mausstamm sein. Bei genetisch veränderten Tieren werden unter Umständen nur die Linien selektioniert, die erfolgreiche Kompensationsmechanismen aufweisen. Ob es im Rahmen der MR-Defizienzen zu Veränderungen der 5-HT-Rezeptor-Expression oder der Beteiligung anderer 5-HT-Rezeptorsubtypen an der Bronchokonstriktion kommt, wurde bisher nicht untersucht,



sollte aber im Hinblick auf eine muskarinerge 5-HT-Rezeptordesensibilisierung in nachfolgenden Studien überprüft werden.

Die Annahme einer muskarinergen 5-HT-Rezeptordesensibilisierung wird aber von der Beobachtung einer schwächeren 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion durch vorhergehende Stimulation mit Muskarin unterstützt. Die durch  $10^{-5}$  M 5-HT induzierte Bronchokonstriktion der Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Bronchien war nach vorhergehender Stimulation mit Muskarin schwächer ausgeprägt als die Reaktionen der Bronchien auf dieselbe 5-HT-Konzentration innerhalb der Dosis-Wirkungsreihen, wo  $10^{-5}$  M 5-HT unabhängig von der 5-HT-Initialkonzentration immer die maximale Bronchokonstriktionen auslöste.

Mehrfach wurde gezeigt, dass die PKC an der Phosphorylierung und heterologen Desensibilisierung des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors beteiligt ist (Kagaya et al., 1990; Rahimian und Hrdina, 1995; Weng et al., 1994). Eine Rekrutierung der PKC führt über Hemmung der MLCP und Ca<sup>2+</sup>-Sensibilisierung der Myofilamente aber auch zur Steigerung der Kontraktilität glatter Muskelzellen (Bergdahl und Swärd, 2004; Taggart, 2001). Die gesteigerte Kontraktilität wird möglicherweise von der Rezeptordesensibilisierung überdeckt, da insgesamt eine abgeschwächte Reaktion der Bronchien nach vorheriger Stimulation mit Muskarin beobachtet wurde.

#### **4.3.4.1 Funktionelle Kopplung der serotoninergen Bronchokonstriktion an Caveolae**

Die in dieser Studie beobachtete aufgehobene 5-HT-induzierte Reaktion der Bronchien von M2R<sup>+/+</sup>, M3R<sup>+/+</sup>, M2R<sup>-/-</sup> und M3R<sup>-/-</sup> Mäusen nach Cholesterolentzug durch MCD zeigt eine Caveolae-Abhängigkeit der serotoninergen Signaltransduktion. Dass Caveolae bei der 5-HT-induzierten Glattmuskelkontraktion beteiligt sind, suggerierten auch andere Studien an der Trachealmuskulatur des Rindes und der Gefäß- und Harnblasenmuskulatur der Ratte, in denen die Reaktion auf 5-HT nach Cholesterolextraktion ebenfalls verringert war (Christofaro et al., 2007; Dreja et al., 2002; Sommer et al., 2009).

Die von Dreja und Mitarbeitern (2002) beschriebene Reduktion des Ca<sup>2+</sup>-Anstiegs nach Cholesterolentzug in den glatten Muskelzellen der Rattenschwanzarterie ist höchstwahrscheinlich auf einen Defekt zu Beginn der Signaltransduktion zurückzuführen, der der G-Protein-Aktivierung vorangeht. Die direkte Aktivierung des G-Proteins nach Cholesterolentzug führte nämlich zu einer normalen Reaktion und

stellte so die Funktionalität der nachfolgenden Signalkaskade sicher (Dreja et al., 2002). Zusätzlich zeigte diese Studie, dass die Expression des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors durch die Cholesterolextraktion nicht beeinflusst wurde (Dreja et al., 2002). Übereinstimmend mit den vorliegenden Befunden deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine Verankerung dieses Rezeptors innerhalb cholesterolreicher Membranregionen für dessen einwandfreie Funktion notwendig ist.

#### **4.3.4.2 Die Rolle von Cav-1 bei der serotoninergen Bronchokonstriktion**

In Anbetracht der Abhängigkeit der serotoninergen Bronchokonstriktion von intakten Caveolae und der bekannten Komplexbildung des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors mit Cav-1 (Bhatnagar et al., 2004) ist eine Verankerung des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors in den Caveolae mittels Cav-1 denkbar, die für die Initiierung der 5-HT-vermittelten Bronchokonstriktion essenziell ist. In C6 Gliomazellen wurde durch Knockdown von Cav-1 der durch  $1\text{-}5 \times 10^{-9}$  M 5-HT induzierte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Anstieg fast komplett ausgelöscht und damit dessen funktionelle Abhängigkeit von Cav-1 aufgezeigt (Bhatnagar et al., 2004). In lebenden Lungenschnitten von Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden hingegen erst bei 5-HT-Konzentrationen  $\geq 10^{-7}$  M leichte Bronchokonstriktionen gemessen. Erst bei kumulativer Zugabe von  $10^{-5}$  M und  $10^{-4}$  M 5-HT reagierten die Bronchien von Cav-1<sup>+/+</sup> und Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen unterschiedlich stark, wodurch eine dosisspezifische, funktionelle Kopplung an Cav-1 gezeigt wurde. In der glatten Muskulatur des Ileums von Cav-1<sup>-/-</sup> Mäusen wurde bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M 5-HT jedoch kein Unterschied in der Kraftentwicklung zu Cav-1<sup>+/+</sup> Mäusen festgestellt (Shakirova et al., 2006). Dies könnte einerseits an der eingesetzten 5-HT-Konzentration von  $10^{-6}$  M liegen, die auch in den Cav-1<sup>-/-</sup> Bronchien keinen Unterschied zeigte, andererseits auf das Vorkommen anderer Cav-1-unabhängiger Rezeptorsubtypen zurückzuführen sein, vermutlich 5-HT<sub>1</sub> und 5-HT<sub>3</sub> (Yamano et al., 1997). Der 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor, der an der 5-HT-induzierten Bronchokonstriktion beteiligt ist (Cogolludo et al., 2006; Moffatt et al., 2004; Zhang et al., 2007) und eine Cav-1-Abhängigkeit zeigte, ist im Ileum möglicherweise kaum beteiligt.

Bei der serotoninergen Bronchokonstriktion kann zusätzlich zur dosisspezifischen Cav-1-Abhängigkeit auch eine Abhängigkeit von Cav-3 erwartet werden, da die 5-HT-induzierten Konstriktion in Cav-1<sup>-/-</sup> Lungenschnitten nach Zerstörung der restlichen Cav-3-haltigen Caveolae durch Cholesterolentzug komplett aufgehoben

war. Ob der 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor auch in der Lage ist, mit Cav-3 zu interagieren, und sowohl durch Cav-1 als auch durch Cav-3 innerhalb der Caveolae verankert ist, bleibt in nachfolgenden Studien zu untersuchen.

Für die funktionelle Bedeutung von Caveolae/Cav bei der Bronchokonstriktion lässt sich zusammenfassend feststellen, dass sowohl die muskarinerge als auch die serotoninerge Bronchokonstriktion funktionell an Caveolae gekoppelt ist, wobei Cav-1 bei der muskarinergen Reaktion keine, bei der serotoninergen eine eingeschränkte, dosisabhängige Rolle zukommt. In Anbetracht der Abhängigkeit der muskarinergen Bronchokonstriktion von intakten Caveolae und der ermittelten Assoziation zwischen M2R und Cav-3 erscheint eine Verankerung des M2R in den Caveolae mittels Cav-3 für die Initiierung der M2R-vermittelten Bronchokonstriktion essenziell. Für den endgültigen Nachweis sind jedoch weitere funktionelle Studien an Cav-3-defizienten Mäusen erforderlich, die leider für diese Studie nicht zur Verfügung gestellt wurden. Eine weitere Aufklärung der Mechanismen, die der Caveolae-Abhängigkeit der muskarinergen Atemwegsregulation zugrunde liegen, ist besonders im Hinblick auf Assoziationen des M3R mit Cav wichtig. Die hier gewonnenen Erkenntnisse, dass die MR und 5-HT-Rezeptoren in den Glattmuskelzellen der Atemwege an Caveolae/Cav gekoppelt sind, bieten eine Grundlage für mögliche pharmakologische Ansätze für die Behandlung obstruktiver Lungenerkrankungen.

## 5 Zusammenfassung

Der bedeutendste neurogene Bronchokonstriktor ist Azetylcholin. Es wird von parasympathischen Nervenfasern ausgeschüttet und wirkt über die muskarinergen Rezeptorsubtypen M2R und M3R auf die glatten Muskelzellen der Atemwege während die Azetylcholin-Ausschüttung gleichzeitig über den präsynaptischen M2R gehemmt wird. Ein weiterer bronchokonstriktorischer Neurotransmitter ist Serotonin (5-HT), das im Rahmen von allergischen und entzündlichen Reaktionen zusätzlich von Mastzellen, Thrombozyten und neuroendokrinen Zellen des Respirationstrakts freigesetzt wird. Aus der Muskulatur von Herz und Harnblase und verschiedenen anderen Zelltypen sind strukturelle bzw. funktionelle Verbindungen sowohl der muskarinergen als auch der serotoninergen Rezeptoren mit Caveolin-1 und -3 (Cav-1, Cav-3), den Strukturproteinen der Caveolae, bekannt. Caveolae sind cholesterolreiche,  $\Omega$ -förmige Einstülpungen der Plasmamembran. Innerhalb der Caveolae befinden sich neben G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, darunter Muskarin- und 5-HT-Rezeptoren, auch Ansammlungen verschiedener sekundärer Signalmoleküle, die an der Regulation des  $Ca^{2+}$ -Haushalts und der Kontraktilität der Atemwegsmuskulatur beteiligt sind. In Anbetracht dessen wurde untersucht, ob die cholinerge und serotoninerge Bronchokonstriktion an Caveolae gekoppelt ist und den Caveolinen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Atemwegskonstriktion zukommt.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde zunächst das Vorkommen von Cav-1 in der Atemwegsmuskulatur intrapulmonaler Bronchien der Maus auf mRNA-Ebene mittels laserassistierter Mikrodissektion mit anschließender RT-PCR-Analyse und auf Proteinebene mittels Western Blot und Immunhistochemie in Atemwegen der Maus und des Menschen bestätigt und erstmals das Vorkommen von Cav-3 aufgezeigt.

Für die nähere Bestimmung der molekularen Zusammensetzung der Caveolae wurden die Protein-Protein-Assoziationen von Cav-1, Cav-3 und M2R *in situ* in murinen Gewebeschnitten mittels indirekter Doppelimmunhistochemie kombiniert mit FRET-CLSM-Analyse untersucht. In der Bronchialmuskulatur wurde so eine Assoziation von Cav-1 und Cav-3 nachgewiesen. Darüber hinaus wurden für Cav-1 und Cav-3 im Western Blot homo- und heterooligomere Komplexe detektiert, die für die Ausbildung von Caveolae essenziell sind. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Vorkommen von Caveolae in der Bronchialmuskulatur von Wildtyp- und Cav-1-defizienten Mäusen zeigten außerdem eine verringerte Anzahl

an Caveolae in Cav-1-defizienten Mäusen. Demnach sind sowohl Cav-1 als auch Cav-3 in der Bronchialmuskulatur an der Bildung von Caveolae beteiligt, wobei Cav-1 höchstwahrscheinlich eine größere Rolle zukommt.

Die funktionelle Bedeutung der Caveolae/Caveoline für die Bronchokonstriktion wurde in lebenden Lungenschnitten von Wildtyp-, M2R-, M3R- und Cav-1-defizienten Mäusen vor und nach Zerstörung der Caveolae durch Cholesterolextraktion aufgeklärt. Mittels Elektronenmikroskopie wurde die Effizienz des Cholesterolentzugs bestätigt. Intakte Caveolae waren für die M2R- und M3R-vermittelte Bronchokonstriktion essenziell. Interessanterweise zeigten Cav-1-defiziente Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine unveränderte Reaktion. Dies deutet auf eine funktionelle Kopplung der muskarinergen Bronchokonstriktion an Cav-3 hin. Dies unterstützend wurde in der Bronchialmuskulatur mittels FRET-CLSM-Analyse eine Assoziation des M2R mit Cav-3 detektiert, nicht jedoch mit Cav-1. In Anbetracht der Abhängigkeit der muskarinergen Bronchokonstriktion von intakten Caveolae erscheint eine Verankerung des M2R in den Caveolae mittels Cav-3 für die Initiierung der M2R-vermittelten Bronchokonstriktion essenziell. Der endgültige Beweis muss in nachfolgenden Studien an Cav-3-defizienten Mäusen erbracht werden.

Weiterhin wurde eine Cav-1-Abhängigkeit der serotoninergen Bronchokonstriktion nur bei maximaler Stimulation durch 5-HT festgestellt. Dies deutet auf eine Beteiligung mehrerer Subtypen von 5HT-Rezeptoren mit unterschiedlicher Cav-1-Abhängigkeit hin.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse, dass die Muskarin- und 5-HT-Rezeptoren in den Glattmuskelzellen der Atemwege an Caveolae/Caveoline gekoppelt sind, bieten eine Grundlage für mögliche pharmakologische Ansätze für die Behandlung obstruktiver Atemwegserkrankungen wie COPD und Asthma. Dabei auf Cav-1-abhängige Signalwege abzielen, würde die allergische serotoninerge, nicht aber die cholinerge Bronchokonstriktion direkt beeinflussen.

## 6 Summary

Acetylcholine is the most important neurogenic bronchoconstrictor. It is released by parasympathetic neurons and acts on airway smooth muscle cells via muscarinic receptor subtypes M2R and M3R. At the same time further acetylcholine release is inhibited via presynaptic M2R. Another neurotransmitter that induces bronchoconstriction is serotonin (5-HT). During allergic and inflammatory processes it is also released by mast cells, platelets and neuroendocrine cells of the respiratory tract. In various cell types, including cardiac myocytes and urinary bladder smooth muscle cells, muscarine and 5-HT receptors are linked to caveolin-1 and -3 (cav-1, cav-3), the structural proteins of caveolae. Caveolae are cholesterol-rich,  $\Omega$ -shaped invaginations of the plasma membrane. They provide a scaffold for multiple G-protein receptors, including muscarine and 5-HT receptors, and signalling molecules involved in  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostasis and contractility of airway smooth muscle cells. Hence, we hypothesized that cholinergic and serotonergic bronchoconstriction are coupled to caveolae with caveolins playing a key role in the regulation of airway constriction.

To address this issue we confirmed the presence of cav-1 in murine intrapulmonary bronchial smooth muscle on mRNA-level by laser-assisted microdissection with subsequent RT-PCR-analysis and on protein level by Western Blot analysis and immunohistochemistry in murine and human airways, and identified cav-3 as a novel caveolar protein here. For further investigation of the molecular composition of caveolae protein-protein associations between cav-1, cav-3 and M2R were determined *in situ* by FRET-CLSM-analysis in immunolabeled murine lung sections. Thereby, an association between cav-1 and cav-3 was discovered in bronchial smooth muscle. Furthermore, caveolin homo- and heterooligomeric complexes that are essential for the formation of caveolae were detected in Western Blot. Moreover, a decrease in the number of caveolae was found in bronchial smooth muscle from cav-1-deficient mice in comparison to wildtype mice by electron microscopy, demonstrating the involvement of both caveolin isoforms in caveolae formation with cav-1 probably playing the major role.

The functional impact of caveolae/caveolins for bronchoconstriction was elucidated by recording bronchial constriction responses in living lung slice preparations from wildtype, M2R-, M3R- and cav-1-deficient mice before and after caveolae disruption by cholesterol extraction. Electron microscopy was used to validate the efficiency of cholesterol extraction. Functionally, M2R- and M3R-mediated bronchoconstriction

were dependent on intact caveolae. Interestingly, cav-1-deficient mice showed an unchanged response compared to wildtype mice, pointing to a functional coupling of muscarinic bronchoconstriction to cav-3. In line with this, FRET-CLSM-analysis revealed an association of the M2R with cav-3, but not with cav-1. Considering the dependency of muscarinic bronchoconstriction on intact caveolae one can assume that an anchorage of M2R in caveolae via cav-3 might be essential for the initiation of M2R-mediated bronchoconstriction. However, further functional studies with cav-3-deficient mice are necessary to prove this.

Besides, a cav-1 dependency of serotonergic bronchoconstriction was detected only at maximal stimulation by 5-HT, suggesting an involvement of various 5-HT receptor subtypes with different cav-1 dependencies.

Regarding the coupling of muscarine and 5-HT receptors to caveolae/caveolins in airway smooth muscle these findings provide novel basic knowledge that might be valuable for pharmacological targeting and treatment of obstructive airway diseases like COPD and asthma. Addressing cav-1-dependent signalling pathways may target allergic serotonin-induced but not cholinergic bronchoconstriction.

## Literaturverzeichnis

1. Anderson RG, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW: Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 255: 410-411, 1992.
2. Andersson RG, Grundstrom N: Innervation of airway smooth muscle. Efferent mechanisms. *Pharmacol Ther* 32: 107-130, 1987.
3. Apud JA, Grayson DR, De EE, Costa E: Pharmacological characterization of regulation of phosphoinositide metabolism by recombinant 5-HT<sub>2</sub> receptors of the rat. *Neuropharmacology* 31: 1-8, 1992.
4. Barnes PJ: Muscarinic receptor subtypes in airways. *Eur Respir J* 6: 328-331, 1993.
5. Barnes PJ: Histamine and serotonin. *Pulm Pharmacol Ther* 14: 329-339, 2001.
6. Bastiaens PI, Jovin TM: Microspectroscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: fluorescent-labeled protein kinase C beta I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8407-8412, 1996.
7. Ben-Harari RR, Dalton BA, Garg UC: Modulation of rate at which serotonin-induced contraction decays in guinea pig trachea. *Am J Physiol* 266: R221-R227, 1994.
8. Bergdahl A, Swärd K: Caveolae-associated signalling in smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 289-299, 2004.
9. Bhatnagar A, Sheffler DJ, Kroeze WK, Compton-Toth B, Roth BL: Caveolin-1 interacts with 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptors and profoundly modulates the signaling of selected G $\alpha$ q-coupled protein receptors. *J Biol Chem* 279: 34614-34623, 2004.
10. Björk K, Sjögren B, Svenningsson P: Regulation of serotonin receptor function in the nervous system by lipid rafts and adaptor proteins. *Exp Cell Res* 316: 1351-1356, 2010.
11. Boichot E, Lagente V, Paubert-Braquet M, Frossard N: Inhaled substance P induces activation of alveolar macrophages and increases airway responses in the guinea-pig. *Neuropeptides* 25: 307-313, 1993.
12. Brown DA, Rose JK: Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68: 533-544, 1992.
13. Bush KT, Stuart RO, Li SH, Moura LA, Sharp AH, Ross CA, Nigam SK: Epithelial inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Multiplicity of localization, solubility, and isoforms. *J Biol Chem* 269: 23694-23699, 1994.



14. Canning BJ, Fischer A: Localization of cholinergic nerves in lower airways of guinea pigs using antisera to choline acetyltransferase. *Am J Physiol* 272: L731-L738, 1997.
15. Capozza F, Cohen AW, Cheung MW, Sotgia F, Schubert W, Battista M, Lee H, Frank PG, Lisanti MP: Muscle-specific interaction of caveolin isoforms: differential complex formation between caveolins in fibroblastic vs. muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C677-C691, 2005.
16. Chiba Y, Misawa M: Characteristics of muscarinic cholinergic receptors in airways of antigen-induced airway hyperresponsive rats. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 111: 351-357, 1995.
17. Chilvers ER, Nahorski SR: Phosphoinositide metabolism in airway smooth muscle. *Am Rev Respir Dis* 141: S137-S140, 1990.
18. Coburn RF, Tomita T: Evidence for nonadrenergic inhibitory nerves in the guinea pig trachealis muscle. *Am J Physiol* 224: 1072-1080, 1973.
19. Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Frazziano G, Cobeno L, Tamargo J, Perez-Vizcaino F: Serotonin inhibits voltage-gated K<sup>+</sup> currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT<sub>2A</sub> receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization. *Circ Res* 98: 931-938, 2006.
20. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP: Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 84: 1341-1379, 2004.
21. Conn PJ, Sanders-Bush E: Biochemical characterization of serotonin stimulated phosphoinositide turnover. *Life Sci* 38: 663-669, 1986.
22. Coulson FR, Fryer AD: Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther* 98: 59-69, 2003.
23. Cristofaro V, Peters CA, Yalla SV, Sullivan MP: Smooth muscle caveolae differentially regulate specific agonist induced bladder contractions. *NeuroUrol Urodyn* 26: 71-80, 2007.
24. Daniel EE, Jury J, Wang YF: nNOS in canine lower esophageal sphincter: colocalized with Cav-1 and Ca<sup>2+</sup>-handling proteins? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G1101-G1114, 2001.
25. Darby PJ, Kwan CY, Daniel EE: Caveolae from canine airway smooth muscle contain the necessary components for a role in Ca<sup>2+</sup> handling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1226-L1235, 2000.
26. de Rada OD, Villaro AC, Montuenga LM, Martinez A, Springall DR, Polak JM: Nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in human and porcine respiratory tract. *Neurosci Lett* 162: 121-124, 1993.
27. Devore-Carter D, Morway PF, Weiss EB: Isolation and characterization of guinea-pig tracheal smooth muscle cells that retain differentiated function in long-term subculture. *Cell Tissue Res* 251: 325-331, 1988.

28. Dey RD, Shannon WA, Jr., Said SI: Localization of VIP-immunoreactive nerves in airways and pulmonary vessels of dogs, cat, and human subjects. *Cell Tissue Res* 220: 231-238, 1981.
29. Dey RD, Hoffpauir J, Said SI: Co-localization of vasoactive intestinal peptide- and substance P-containing nerves in cat bronchi. *Neuroscience* 24: 275-281, 1988.
30. Doyle DD, Upshaw-Earley J, Bell E, Palfrey HC: Expression of caveolin-3 in rat aortic vascular smooth muscle cells is determined by developmental state. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 22-25, 2003.
31. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV: Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293: 2449-2452, 2001.
32. Dreja K, Voldstedlund M, Vinten J, Trandum-Jensen J, Hellstrand P, Sward K: Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1267-1272, 2002.
33. Duncker HR, Kummer W: Atemsystem. In: *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1*. Hrsg: Benninghoff A.; Drenckhahn D. Urban & Fischer, München, 2008.
34. Eglén RM, Hegde SS, Watson N: Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev* 48: 531-565, 1996.
35. Ehlert FJ: Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle. *Life Sci* 74: 355-366, 2003.
36. Escolar JD, Escolar MA, Guzman J, Roques M: Morphological hysteresis of the small airways. *Histol Histopathol* 18: 19-26, 2003.
37. Eum SY, Norel X, Lefort J, Labat C, Vargaftig BB, Brink C: Anaphylactic bronchoconstriction in BP2 mice: interactions between serotonin and acetylcholine. *Br J Pharmacol* 126: 312-316, 1999.
38. Fernandes LB, Fryer AD, Hirshman CA: M2 muscarinic receptors inhibit isoproterenol-induced relaxation of canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 119-126, 1992.
39. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T: Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 271: 22810-22814, 1996.
40. Feron O, Smith TW, Michel T, Kelly RA: Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 272: 17744-17748, 1997.

41. Fiorica-Howells E, Hen R, Gingrich J, Li Z, Gershon MD: 5-HT(2A) receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT(2A) knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G877-G893, 2002.
42. Fisher JT, Vincent SG, Gomeza J, Yamada M, Wess J: Loss of vagally mediated bradycardia and bronchoconstriction in mice lacking M2 or M3 muscarinic acetylcholine receptors. *FASEB J* 18: 711-713, 2004.
43. Fontan JJ, Cortright DN, Krause JE, Velloff CR, Karpitskyi VV, Carver TW, Jr., Shapiro SD, Mora BN: Substance P and neurokinin-1 receptor expression by intrinsic airway neurons in the rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L344-L355, 2000.
44. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG: De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8655-8659, 1995.
45. Fryer AD, Wills-Karp M: Dysfunction of M2-muscarinic receptors in pulmonary parasympathetic nerves after antigen challenge. *J Appl Physiol* 71: 2255-2261, 1991.
46. Fujimoto T, Nakade S, Miyawaki A, Mikoshiba K, Ogawa K: Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol* 119: 1507-1513, 1992.
47. Fujimoto T: Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol* 120: 1147-1157, 1993.
48. Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T: Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci* 113 Pt 19: 3509-3517, 2000.
49. Gabella G: Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli. *Cell Tissue Res* 170: 161-186, 1976.
50. Gabella G, Blundell D: Effect of stretch and contraction on caveolae of smooth muscle cells. *Cell Tissue Res* 190: 255-271, 1978.
51. Galbiati F, Volonte D, Engelman JA, Watanabe G, Burk R, Pestell RG, Lisanti MP: Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J* 17: 6633-6648, 1998.
52. Galbiati F, Engelman JA, Volonte D, Zhang XL, Minetti C, Li M, Hou H, Jr., Kneitz B, Edelmann W, Lisanti MP: Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem* 276: 21425-21433, 2001.
53. Germonpré PR, Joos GF, Pauwels RA: Modulation by 5-HT1A receptors of the 5-HT2 receptor-mediated tachykinin-induced contraction of the rat trachea in vitro. *Br J Pharmacol* 123: 1571-1578, 1998.

54. Gherghiceanu M, Popescu LM: Caveolar nanospaces in smooth muscle cells. *J Cell Mol Med* 10: 519-528, 2006.
55. Gomeza J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H, Wess J: Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1692-1697, 1999.
56. Gosens R, Bromhaar MM, Tonkes A, Schaafsma D, Zaagsma J, Nelemans SA, Meurs H: Muscarinic M(3) receptor-dependent regulation of airway smooth muscle contractile phenotype. *Br J Pharmacol* 141: 943-950, 2004.
57. Gosens R, Stelmack GL, Dueck G, Mutawe MM, Hinton M, McNeill KD, Paulson A, Dakshinamurti S, Gerthoffer WT, Thliveris JA, Unruh H, Zaagsma J, Halayko AJ: Caveolae facilitate muscarinic receptor-mediated intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and contraction in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L1406-L1418, 2007.
58. Gosens R, Mutawe M, Martin S, Basu S, Bos ST, Tran T, Halayko AJ: Caveolae and caveolins in the respiratory system. *Curr Mol Med* 8: 741-753, 2008.
59. Grandordy BM, Cuss FM, Sampson AS, Palmer JB, Barnes PJ: Phosphatidylinositol response to cholinergic agonists in airway smooth muscle: relationship to contraction and muscarinic receptor occupancy. *J Pharmacol Exp Ther* 238: 273-279, 1986.
60. Gray JA, Roth BL: Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT(2A) receptors by agonists and antagonists. *Brain Res Bull* 56: 441-451, 2001.
61. Grube D: Immunoreactivities of gastrin (G-) cells. II. Non-specific binding of immunoglobulins to G-cells by ionic interactions. *Histochemistry* 66: 149-167, 1980.
62. Gumbleton M: Caveolae as potential macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium. *Adv Drug Deliv Rev* 49: 281-300, 2001.
63. Haberberger R, Schemann M, Sann H, Kummer W: Innervation pattern of guinea pig pulmonary vasculature depends on vascular diameter. *J Appl Physiol* 82: 426-434, 1997.
64. Haddad EB, Mak JC, Hislop A, Haworth SG, Barnes PJ: Characterization of muscarinic receptor subtypes in pig airways: radioligand binding and northern blotting studies. *Am J Physiol* 266: L642-L648, 1994.
65. Hagiwara Y, Sasaoka T, Araishi K, Imamura M, Yorifuji H, Nonaka I, Ozawa E, Kikuchi T: Caveolin-3 deficiency causes muscle degeneration in mice. *Hum Mol Genet* 9: 3047-3054, 2000.
66. Hailstones D, Sleur LS, Parton RG, Stanley KK: Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J Lipid Res* 39: 369-379, 1998.

67. Halayko AJ, Stelmack GL: The association of caveolae, actin, and the dystrophin-glycoprotein complex: a role in smooth muscle phenotype and function? *Can J Physiol Pharmacol* 83: 877-891, 2005.
68. Halayko AJ, Tran T, Gosens R: Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins. *Proc Am Thorac Soc* 5: 80-88, 2008.
69. Hayashi K, Matsuda S, Machida K, Yamamoto T, Fukuda Y, Nimura Y, Hayakawa T, Hamaguchi M: Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res* 61: 2361-2364, 2001.
70. Hsieh JT, Farley JM: Characterization of contractile function and expression of muscarinic receptors, G proteins and adenylate cyclase in cultured tracheal smooth muscle of Swine. *J Biomed Sci* 9: 339-347, 2002.
71. Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, Galbiati F, Byrd AL, Bassell G, Serizawa H, Lane WS, Lisanti MP, Okamoto T: Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res* 804: 177-192, 1998.
72. Isshiki M, Anderson RG: Function of caveolae in Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup>-dependent signal transduction. *Traffic* 4: 717-723, 2003.
73. Ivins KJ, Molinoff PB: Desensitization and down-regulation of 5-HT<sub>2</sub> receptors in P11 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 259: 423-429, 1991.
74. Iwamoto I, Nakagawa N, Yamazaki H, Kimura A, Tomioka H, Yoshida S: Mechanism for substance P-induced activation of human neutrophils and eosinophils. *Regul Pept* 46: 228-230, 1993.
75. Izumi T, Shibata Y, Yamamoto T: The cytoplasmic surface structures of uncoated vesicles in various tissues of rat as revealed by quick-freeze, deep-etching replicas. *J Electron Microsc (Tokyo)* 38: 47-53, 1989.
76. Jares-Erijman EA, Jovin TM: FRET imaging. *Nat Biotechnol* 21: 1387-1395, 2003.
77. Je HD, Gallant C, Leavis PC, Morgan KG: Caveolin-1 regulates contractility in differentiated vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H91-H98, 2004.
78. Jositsch G, Papadakis T, Haberberger RV, Wolff M, Wess J, Kummer W: Suitability of muscarinic acetylcholine receptor antibodies for immunohistochemistry evaluated on tissue sections of receptor gene-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 389-395, 2009.
79. Kagaya A, Mikuni M, Kusumi I, Yamamoto H, Takahashi K: Serotonin-induced acute desensitization of serotonin<sub>2</sub> receptors in human platelets via a mechanism involving protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 305-311, 1990.

80. Kenworthy AK: Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* 24: 289-296, 2001.
81. Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW, Bangerter FW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH: Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* 270: 17250-17256, 1995.
82. Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Munch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Hohle KD, Schemann M, Racke K, Wessler I: Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355: 515-523, 1997.
83. Kogo H, Fujimoto T: Caveolin-1 isoforms are encoded by distinct mRNAs. Identification Of mouse caveolin-1 mRNA variants caused by alternative transcription initiation and splicing. *FEBS Lett* 465: 119-123, 2000.
84. Kogo H, Aiba T, Fujimoto T: Cell type-specific occurrence of caveolin-1alpha and -1beta in the lung caused by expression of distinct mRNAs. *J Biol Chem* 279: 25574-25581, 2004.
85. Kogo H, Ito SY, Moritoki Y, Kurahashi H, Fujimoto T: Differential expression of caveolin-3 in mouse smooth muscle cells in vivo. *Cell Tissue Res* 324: 291-300, 2006.
86. König P, Krasteva G, Tag C, König IR, Arens C, Kummer W: FRET-CLSM and double-labeling indirect immunofluorescence to detect close association of proteins in tissue sections. *Lab Invest* 86: 853-864, 2006.
87. Krasteva G, Pfeil U, Drab M, Kummer W, König P: Caveolin-1 and -2 in airway epithelium: expression and in situ association as detected by FRET-CLSM. *Respir Res* 7: 108, 2006.
88. Krasteva G: Untersuchung der Lokalisation und Interaktion von Caveolinen im Endothel und Atemwegsepithel mittels indirekter Immunfluoreszenz und CLSM-FRET-Analyse. Dissertation. Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2006.
89. Krasteva G, Pfeil U, Filip AM, Lips KS, Kummer W, König P: Caveolin-3 and eNOS colocalize and interact in ciliated airway epithelial cells in the rat. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 615-625, 2007.
90. Krop M, Ozünal ZG, Chai W, de Vries R, Fekkes D, Bouhuizen AM, Garrelds IM, Danser AH: Mast cell degranulation mediates bronchoconstriction via serotonin and not via renin release. *Eur J Pharmacol* 640: 185-189, 2010.
91. Kummer W, Fischer A, Kurkowski R, Heym C: The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience* 49: 715-737, 1992a.
92. Kummer W, Fischer A, Mundel P, Mayer B, Hoba B, Philippin B, Preissler U: Nitric oxide synthase in VIP-containing vasodilator nerve fibres in the guinea-pig. *Neuroreport* 3: 653-655, 1992b.

93. Kummer W, Wiegand S, Akinci S, Wessler I, Schinkel AH, Wess J, Koepsell H, Haberberger RV, Lips KS: Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. *Respir Res* 7: 65, 2006.
94. Lai HH, Boone TB, Yang G, Smith CP, Kiss S, Thompson TC, Somogyi GT: Loss of caveolin-1 expression is associated with disruption of muscarinic cholinergic activities in the urinary bladder. *Neurochem Int* 45: 1185-1193, 2004.
95. Laitinen A: Autonomic innervation of the human respiratory tract as revealed by histochemical and ultrastructural methods. *Eur J Respir Dis Suppl* 140: 1-42, 1985.
96. Levine JD, Collier DH, Basbaum AI, Moskowitz MA, Helms CA: Hypothesis: the nervous system may contribute to the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 12: 406-411, 1985.
97. Levitt RC, Mitzner W: Autosomal recessive inheritance of airway hyperreactivity to 5-hydroxytryptamine. *J Appl Physiol* 67: 1125-1132, 1989.
98. Leysen JE, de Chaffoy de CD, De CF, Niemegeers CJ, Van Nueten JM: Serotonin-S<sub>2</sub> receptor binding sites and functional correlates. *Neuropharmacology* 23: 1493-1501, 1984.
99. Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M: Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126: 111-126, 1994.
100. Lorincz A, Nusser Z: Specificity of immunoreactions: the importance of testing specificity in each method. *J Neurosci* 28: 9083-9086, 2008.
101. Löhn M, Furstenau M, Sagach V, Elger M, Schulze W, Luft FC, Haller H, Gollasch M: Ignition of calcium sparks in arterial and cardiac muscle through caveolae. *Circ Res* 87: 1034-1039, 2000.
102. Lundberg JM, Hemsén A, Rudehill A, Harfstrand A, Larsson O, Sollevi A, Saria A, Hokfelt T, Fuxe K, Fredholm BB: Neuropeptide Y- and alpha-adrenergic receptors in pig spleen: localization, binding characteristics, cyclic AMP effects and functional responses in control and denervated animals. *Neuroscience* 24: 659-672, 1988.
103. Mak JC, Baraniuk JN, Barnes PJ: Localization of muscarinic receptor subtype mRNAs in human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7: 344-348, 1992.
104. Marhl M, Noble D, Roux E: Modeling of molecular and cellular mechanisms involved in Ca<sup>2+</sup> signal encoding in airway myocytes. *Cell Biochem Biophys* 46: 285-302, 2006.
105. Martin C, Uhlig S, Ullrich V: Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *Eur Respir J* 9: 2479-2487, 1996.

106. Martin RJ: Therapeutic significance of distal airway inflammation in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109: S447-S460, 2002.
107. Maurer W, Hothorn L, Lehmacher W: Multiple Comparisons in Drug Clinical Trials and Preclinical Assays: a Priori Ordered Hypothesis. In: *Biometrie in der chemisch-pharmazeutischen Industrie*. Hrsg: Vollmar J. Fischer, Stuttgart, pp. 3-21, 1995.
108. Michel MC, Wieland T, Tsujimoto G: How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 385-388, 2009.
109. Mitchell RW, Halayko AJ, Kahraman S, Solway J, Wylam ME: Selective restoration of calcium coupling to muscarinic M(3) receptors in contractile cultured airway myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L1091-L1100, 2000.
110. Moffatt JD, Cocks TM, Page CP: Role of the epithelium and acetylcholine in mediating the contraction to 5-hydroxytryptamine in the mouse isolated trachea. *Br J Pharmacol* 141: 1159-1166, 2004.
111. Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV: VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 6: 911-927, 1995.
112. Moore ED, Etter EF, Philipson KD, Carrington WA, Fogarty KE, Lifshitz LM, Fay FS: Coupling of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Nature* 365: 657-660, 1993.
113. Mora R, Bonilha VL, Marmorstein A, Scherer PE, Brown D, Lisanti MP, Rodriguez-Boulan E: Caveolin-2 localizes to the golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1. *J Biol Chem* 274: 25708-25717, 1999.
114. Nickel RS, Schummer A, Seiferle E: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Paul Parey, Berlin, Hamburg, 1987.
115. Nohr D, Eiden LE, Weihe E: Coexpression of vasoactive intestinal peptide, calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactivity in parasympathetic neurons of the rhesus monkey lung. *Neurosci Lett* 199: 25-28, 1995.
116. Novi F, Stanasila L, Giorgi F, Corsini GU, Cotecchia S, Maggio R: Paired activation of two components within muscarinic M3 receptor dimers is required for recruitment of beta-arrestin-1 to the plasma membrane. *J Biol Chem* 280: 19768-19776, 2005.
117. Okayama M, Mullol J, Baraniuk JN, Hausfeld JN, Feldman B, Merida M, Shelhamer JH, Kaliner MA: Muscarinic receptor subtypes in human nasal mucosa: characterization, autoradiographic localization, and function in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8: 176-187, 1993.



118. Ostrom RS, Ehlert FJ: M2 muscarinic receptors inhibit forskolin- but not isoproterenol-mediated relaxation in bovine tracheal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 234-242, 1998.
119. Ostrom RS, Gregorian C, Drenan RM, Xiang Y, Regan JW, Insel PA: Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 276: 42063-42069, 2001.
120. Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G: The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. *J Anat* 132: 71-84, 1981.
121. Pack RJ, Richardson PS: The aminergic innervation of the human bronchus: a light and electron microscopic study. *J Anat* 138 ( Pt 3): 493-502, 1984.
122. Palade GE: An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1: 188-211, 1953.
123. Panettieri RA, Murray RK, DePalo LR, Yadvish PA, Kotlikoff MI: A human airway smooth muscle cell line that retains physiological responsiveness. *Am J Physiol* 256: C329-C335, 1989.
124. Park DS, Woodman SE, Schubert W, Cohen AW, Frank PG, Chandra M, Shirani J, Razani B, Tang B, Jelicks LA, Factor SM, Weiss LM, Tanowitz HB, Lisanti MP: Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype. *Am J Pathol* 160: 2207-2217, 2002.
125. Parolini I, Sargiacomo M, Galbiati F, Rizzo G, Grignani F, Engelman JA, Okamoto T, Ikezu T, Scherer PE, Mora R, Rodriguez-Boulan E, Peschle C, Lisanti MP: Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J Biol Chem* 274: 25718-25725, 1999.
126. Partanen M, Laitinen A, Hervonen A, Toivanen M, Laitinen LA: Catecholamine- and acetylcholinesterase-containing nerves in human lower respiratory tract. *Histochemistry* 76: 175-188, 1982.
127. Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E: Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol* 136: 137-154, 1997.
128. Perez-Zoghbi JF, Karner C, Ito S, Shepherd M, Alrashdan Y, Sanderson MJ: Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function. *Pulm Pharmacol Ther* 22: 388-397, 2009.
129. Pfaff M, Powaga N, Akinci S, Schutz W, Banno Y, Wiegand S, Kummer W, Wess J, Haberberger RV: Activation of the SPHK/S1P signalling pathway is coupled to muscarinic receptor-dependent regulation of peripheral airways. *Respir Res* 6: 48, 2005.
130. Pfeil U, Haberberger RV, Lips KS, Eberling L, Grau V, Kummer W: Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia. *Life Sci* 72: 2087-2090, 2003.

131. Plopper CG, Mariassy AT, Wilson DW, Alley JL, Nishio SJ, Nettekheim P: Comparison of nonciliated tracheal epithelial cells in six mammalian species: ultrastructure and population densities. *Exp Lung Res* 5: 281-294, 1983.
132. Potocnik SJ, Jenkins N, Murphy TV, Hill MA: Membrane cholesterol depletion with beta-cyclodextrin impairs pressure-induced contraction and calcium signalling in isolated skeletal muscle arterioles. *J Vasc Res* 44: 292-302, 2007.
133. Pradidarcheep W, Stallen J, Labruyere WT, Dabhoiwala NF, Michel MC, Lamers WH: Lack of specificity of commercially available antisera against muscarinic and adrenergic receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 397-402, 2009.
134. Prakash YS, Thompson MA, Vaa B, Matabdin I, Peterson TE, He T, Pabelick CM: Caveolins and intracellular calcium regulation in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L1118-L1126, 2007.
135. Racké K, Matthiesen S: The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther* 17: 181-198, 2004.
136. Rahimian R, Hrdina PD: Possible role of protein kinase C in regulation of 5-hydroxytryptamine 2A receptors in rat brain. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 1686-1691, 1995.
137. Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS: Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C769-C783, 2005.
138. Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di VD, Hou H, Jr., Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelman W, Lisanti MP: Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 276: 38121-38138, 2001.
139. Razani B, Lisanti MP: Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function and human disease. *J Clin Invest* 108: 1553-1561, 2001.
140. Razani B, Woodman SE, Lisanti MP: Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54: 431-467, 2002a.
141. Razani B, Wang XB, Engelman JA, Battista M, Lagaud G, Zhang XL, Kneitz B, Hou H, Jr., Christ GJ, Edelman W, Lisanti MP: Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol* 22: 2329-2344, 2002b.
142. Roffel AF, Elzinga CR, Van Amsterdam RG, De Zeeuw RA, Zaagsma J: Muscarinic M2 receptors in bovine tracheal smooth muscle: discrepancies between binding and function. *Eur J Pharmacol* 153: 73-82, 1988.
143. Rogers DF: Motor control of airway goblet cells and glands. *Respir Physiol* 125: 129-144, 2001.

144. Roth BL, Nakaki T, Chuang DM, Costa E: Aortic recognition sites for serotonin (5HT) are coupled to phospholipase C and modulate phosphatidylinositol turnover. *Neuropharmacology* 23: 1223-1225, 1984.
145. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG: Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68: 673-682, 1992.
146. Sabourin T, Bastien L, Bachvarov DR, Marceau F: Agonist-induced translocation of the kinin B(1) receptor to caveolae-related rafts. *Mol Pharmacol* 61: 546-553, 2002.
147. Sanderson MJ, Delmotte P, Bai Y, Perez-Zogbhi JF: Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca<sup>2+</sup> signaling and sensitivity. *Proc Am Thorac Soc* 5: 23-31, 2008.
148. Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP: Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9407-9411, 1995.
149. Scheiffele P, Verkade P, Fra AM, Virta H, Simons K, Ikonen E: Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J Cell Biol* 140: 795-806, 1998.
150. Scherer PE, Lisanti MP, Baldini G, Sargiacomo M, Mastick CC, Lodish HF: Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J Cell Biol* 127: 1233-1243, 1994.
151. Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van DE, Peters P, Lisanti MP: Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 272: 29337-29346, 1997.
152. Schlenz H, Kummer W, Jositsch G, Wess J, Krasteva GT: Muscarinic receptor-mediated bronchoconstriction is coupled to caveolae in murine airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298: 626-636, 2010.
153. Schlörmann W, Steiniger F, Richter W, Kaufmann R, Hause G, Lemke C, Westermann M: The shape of caveolae is omega-like after glutaraldehyde fixation and cup-like after cryofixation. *Histochem Cell Biol* 133: 223-228, 2010.
154. Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J: Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 127: 1217-1232, 1994.
155. Schwab W, Galbiati F, Volonte D, Hempel U, Wenzel KW, Funk RH, Lisanti MP, Kasper M: Characterisation of caveolins from cartilage: expression of caveolin-1, -2 and -3 in chondrocytes and in alginate cell culture of the rat tibia. *Histochem Cell Biol* 112: 41-49, 1999.

156. Shakirova Y, Bonnevier J, Albinsson S, Adner M, Rippe B, Broman J, Arner A, Sward K: Increased Rho activation and PKC-mediated smooth muscle contractility in the absence of caveolin-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C1326-C1335, 2006.
157. Shaul PW, Anderson RG: Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* 275: L843-L851, 1998.
158. Shimosegawa T, Foda HD, Said SI: [Met]enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8-immunoreactive nerves in guinea-pig and rat lungs: distribution, origin, and co-existence with vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity. *Neuroscience* 36: 737-750, 1990.
159. Simionescu N, Siminoescu M, Palade GE: Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J Cell Biol* 64: 586-607, 1975.
160. Simons K, Toomre D: Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-39, 2000.
161. Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP: Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19: 7289-7304, 1999.
162. Smart EJ, Anderson RG: Alterations in membrane cholesterol that affect structure and function of caveolae. *Methods Enzymol* 353: 131-139, 2002.
163. Sommer B, Montano LM, Carbajal V, Flores-Soto E, Ortega A, Ramirez-Oseguera R, Irlles C, El-Yazbi AF, Cho WJ, Daniel EE: Extraction of membrane cholesterol disrupts caveolae and impairs serotonergic (5-HT<sub>2A</sub>) and histaminergic (H<sub>1</sub>) responses in bovine airway smooth muscle: role of Rho-kinase. *Can J Physiol Pharmacol* 87: 180-195, 2009.
164. Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP: Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 271: 15160-15165, 1996.
165. Sotgia F, Lee JK, Das K, Bedford M, Petrucci TC, Macioce P, Sargiacomo M, Bricarelli FD, Minetti C, Sudol M, Lisanti MP: Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem* 275: 38048-38058, 2000.
166. Stan RV: Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta* 1746: 334-348, 2005.
167. Starke K: Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. *Pharmakologie und Toxikologie*. Spektrum, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996.
168. Stengel PW, Yamada M, Wess J, Cohen ML: M(3)-receptor knockout mice: muscarinic receptor function in atria, stomach fundus, urinary bladder, and trachea. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R1443-R1449, 2002.

169. Stretton D: Non-adrenergic, non-cholinergic neural control of the airways. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 18: 675-684, 1991.
170. Struckmann N, Schwering S, Wiegand S, Gschnell A, Yamada M, Kummer W, Wess J, Haberberger RV: Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: studies on receptor-deficient mice. *Mol Pharmacol* 64: 1444-1451, 2003.
171. Struckmann N: Die Bedeutung von TRPC-Kanälen in der Muskarin-vermittelten Kontrolle peripherer Atemwege der Maus. Dissertation. Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2006.
172. Taggart MJ, Leavis P, Feron O, Morgan KG: Inhibition of PKC $\alpha$  and rhoA translocation in differentiated smooth muscle by a caveolin scaffolding domain peptide. *Exp Cell Res* 258: 72-81, 2000.
173. Taggart MJ: Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? *News Physiol Sci* 16: 61-65, 2001.
174. Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP: Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271: 2255-2261, 1996.
175. Thyberg J: Caveolae and cholesterol distribution in vascular smooth muscle cells of different phenotypes. *J Histochem Cytochem* 50: 185-195, 2002.
176. Uehara K, Miyoshi M: Localization of caveolin-3 in the sinus endothelial cells of the rat spleen. *Cell Tissue Res* 307: 329-336, 2002.
177. Valerius KP: Size-dependent morphology of the conductive bronchial tree in four species of myomorph rodents. *J Morphol* 230: 291-297, 1996.
178. Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC: Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J Biol Chem* 272: 28187-28190, 1997.
179. Verastegui C, Prada OA, Fernandez-Vivero J, Romero A, de Castro JM: Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in adult mouse lung. *Eur J Histochem* 41: 119-126, 1997.
180. Voldstedlund M, Vinten J, Trandum-Jensen J: cav-p60 expression in rat muscle tissues. Distribution of caveolar proteins. *Cell Tissue Res* 306: 265-276, 2001.
181. Volonte D, McTiernan CF, Drab M, Kasper M, Galbiati F: Caveolin-1 and caveolin-3 form heterooligomeric complexes in atrial cardiac myocytes that are required for doxorubicin-induced apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H392-H401, 2008.
182. Walch L, Norel X, Leconte B, Gascard JP, Brink C: Cholinergic control of human and animal pulmonary vascular tone. *Therapie* 54: 99-102, 1999.

183. Walch L, Brink C, Norel X: The muscarinic receptor subtypes in human blood vessels. *Therapie* 56: 223-226, 2001.
184. Weng W, Reynolds IJ, Jani JP, Blaskovich M, Sebti SM, Davies P, Pitt BR: Desensitization of 5HT<sub>2</sub> receptors by protein kinase C activation in distal pulmonary vascular smooth muscle cells in culture. *Microcirculation* 1: 129-135, 1994.
185. Wess J: Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 423-450, 2004.
186. Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K: The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 198-205, 1999.
187. Wessler IK, Kirkpatrick CJ: The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther* 14: 423-434, 2001.
188. Whicker SD, Compton MR, Seale JP, Black JL: Effect of sensitization and aerosol antigen challenge in guinea-pigs--studies of airway receptor function and characteristics. *Pulm Pharmacol* 3: 129-136, 1990.
189. Woodman SE, Park DS, Cohen AW, Cheung MW, Chandra M, Shirani J, Tang B, Jelicks LA, Kitsis RN, Christ GJ, Factor SM, Tanowitz HB, Lisanti MP: Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade. *J Biol Chem* 277: 38988-38997, 2002.
190. Woodman SE, Cheung MW, Tarr M, North AC, Schubert W, Lagaud G, Marks CB, Russell RG, Hassan GS, Factor SM, Christ GJ, Lisanti MP: Urogenital alterations in aged male caveolin-1 knockout mice. *J Urol* 171: 950-957, 2004a.
191. Woodman SE, Sotgia F, Galbiati F, Minetti C, Lisanti MP: Caveolinopathies: mutations in caveolin-3 cause four distinct autosomal dominant muscle diseases. *Neurology* 62: 538-543, 2004b.
192. Wyse BD, Prior IA, Qian H, Morrow IC, Nixon S, Muncke C, Kurzchalia TV, Thomas WG, Parton RG, Hancock JF: Caveolin interacts with the angiotensin II type 1 receptor during exocytic transport but not at the plasma membrane. *J Biol Chem* 278: 23738-23746, 2003.
193. Yamada M, Miyakawa T, Duttaroy A, Yamanaka A, Moriguchi T, Makita R, Ogawa M, Chou CJ, Xia B, Crawley JN, Felder CC, Deng CX, Wess J: Mice lacking the M<sub>3</sub> muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* 410: 207-212, 2001.
194. Yamano M, Ito H, Kamato T, Miyata K: Species difference in the 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor associated with the von Bezold-Jarisch reflex. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 330: 177-189, 1995.
195. Yang CM: Muscarinic receptor expression in the primary culture of tracheal smooth muscle cells. *J Recept Res* 10: 235-247, 1990.

196. Yang CM, Chou SP, Sung TC, Chien HJ: Regulation of functional muscarinic receptor expression in tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 261: C1123-C1129, 1991.
197. Zhang Y, Cardell LO, Adner M: IL-1beta induces murine airway 5-HT<sub>2A</sub> receptor hyperresponsiveness via a non-transcriptional MAPK-dependent mechanism. *Respir Res* 8: 29, 2007.
198. Zhao YY, Liu Y, Stan RV, Fan L, Gu Y, Dalton N, Chu PH, Peterson K, Ross J, Jr., Chien KR: Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11375-11380, 2002.

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."



## Danksagung

Ich möchte mich bei allen Menschen sehr herzlich bedanken, von denen ich Unterstützung und Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit erhalten habe.

Mein besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Wolfgang Kummer und Dr. Gabriela Krasteva für die Überlassung des Themas und die sehr gute persönliche und fachliche Unterstützung.

Meiner Betreuerin Dr. Gabriela Krasteva danke ich außerdem für die hervorragende Einarbeitung in das Arbeitsgebiet, die intensive Betreuung während der gesamten Zeit der Arbeit und auch für das freundschaftliche Verhältnis sehr herzlich.

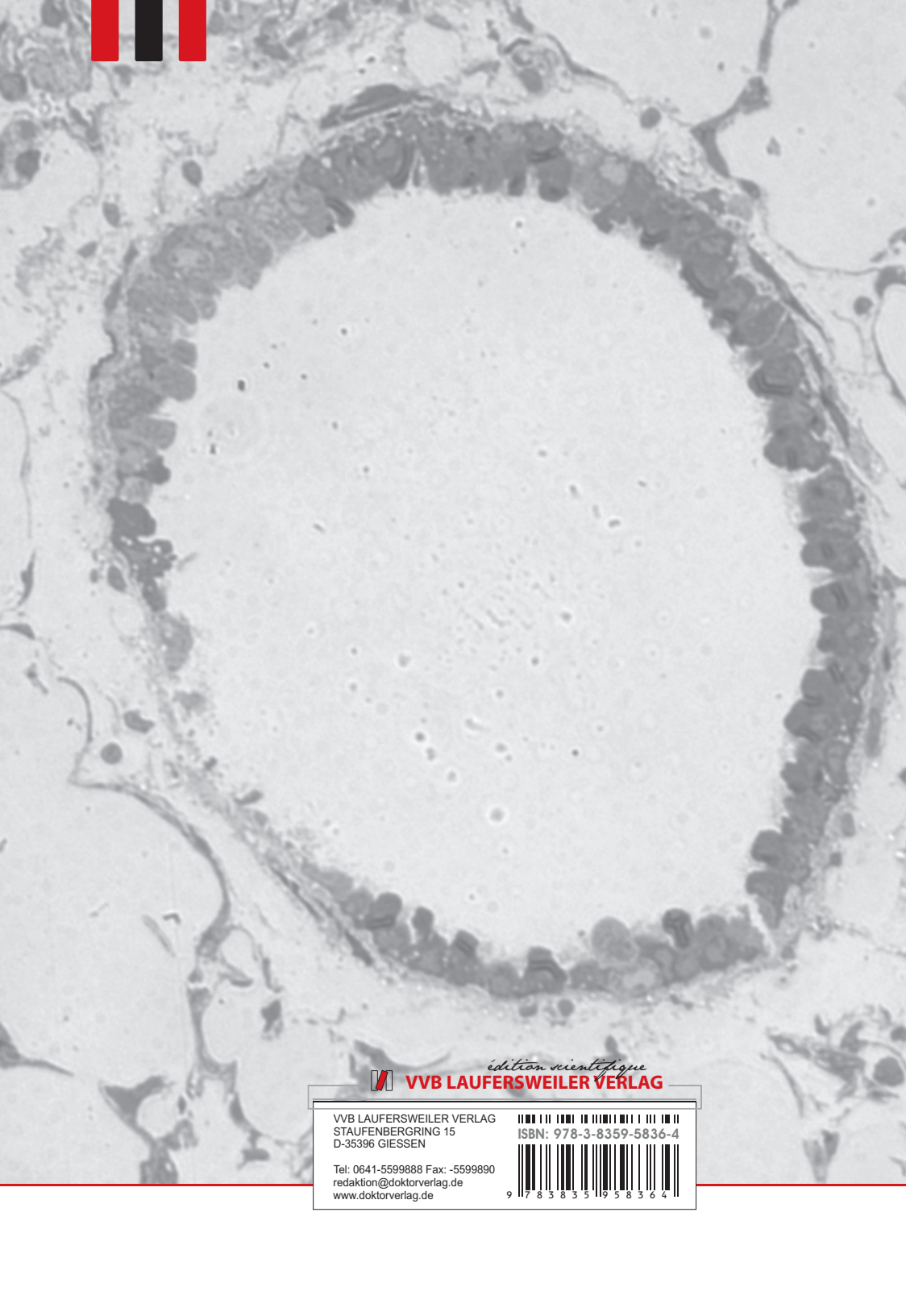
Prof. Dr. Martin Diener danke ich für die guten Ratschläge und die Bereitschaft, die Arbeit als externer Betreuer zu begleiten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Verantwortlichen und Organisatoren des Graduiertenkollegs *Molecular Biology and Medicine of the Lung (MBML)* für die exzellente zusätzliche wissenschaftliche Ausbildung.

Für die unermüdliche fachliche Unterstützung möchte ich mich außerdem bei allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kardiopulmonale Neurobiologie des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bedanken. Sie alle haben durch einen regen Austausch und mit guten Ratschlägen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und waren für die sehr angenehme, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre verantwortlich. Besonderer Dank gebührt hier Anna Goldenberg, Petra Faulhammer, Martin Bodenbenner und Tamara Papadakis für ihre stete Hilfe bei Problemen bei der Durchführung der Experimente und Karola Michael für die Unterstützung bei der Anfertigung von Grafiken und computertechnischen Problemen.

Auch meinen Freunden möchte ich danken, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, Großeltern und meiner Schwester von ganzem Herzen für die Liebe und seelische Unterstützung während dieser Arbeit.



*edition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5836-4



9 783835 958364