

Sphingosinkinase-1  
im Signaltransduktionsweg muskarinischer Rezeptoren  
in den peripheren Atemwegen der Maus

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

vorgelegt von  
Norbert Powaga  
aus Küstrin

Gießen 2013

Aus dem  
Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Leiter: Prof. Dr. W. Kummer

Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Gutachter: Prof. Dr. M. Weigand

Tag der Disputation: 31. Januar 2013

meinen Eltern in Dankbarkeit

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1	Einführung in das Thema und Formulierung des Untersuchungsschwerpunktes.....	8
1.2	Obere/unter Atemwege bzw. luftleitende/gasaustauschende Abschnitte.....	11
1.2.1	Morphologische und physiologische Grundlagen der Atmungsfunktion.....	11
1.2.2	Die Lappengliederung der Lunge.....	12
1.2.3	Der Bronchialbaum der Lunge.....	12
1.2.4	Unterschiede in der Anatomie der Lunge zwischen Mensch und Maus.....	14
1.3	Neuronale Kontrolle peripherer Atemwege.....	14
1.3.1	Parasympatische Innervation.....	15
1.3.2	Sympathische Innervation.....	16
1.3.3	Sensible Innervation.....	17
1.3.4	Nicht adrenerges, nicht cholinerges System.....	19
1.4	Acetylcholin und seine Synthese.....	19
1.4.1	Neuronales Acetylcholin.....	19
1.4.2	Nicht-neuronales Acetylcholin.....	20
1.5	Rezeptoren für Acetylcholin.....	21
1.5.1	Nikotinische Acetylcholinrezeptoren.....	21
1.5.2	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren.....	21
1.6	Acetylcholin in der Lunge.....	22
1.6.1	Quellen für Acetylcholin in der Lunge.....	22
1.6.2	Differenzierung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren in der Lunge.....	22
1.7	Signalwege muskarinische Acetylcholinrezeptoren in der Lunge.....	23
1.8	Funktionale Kopplung von G-Proteinen.....	24
1.8.1	Phospholipase C.....	24
1.8.2	Adenylatzyklase.....	24
1.8.3	Phospholipase A <sub>2</sub> .....	25
1.8.4	Sphingosin 1-Phosphat.....	26
1.8.5	Sphingosinkinase-1.....	27

<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>28</b>
2.1	Tiere.....	28
2.2	Pharmaka.....	28
2.2.1	Natrium-Nitroprussid .....	28
2.2.2	Penicillin/Streptomycin.....	28
2.2.3	Natrium-Heparin.....	29
2.2.4	Agarose.....	29
2.2.5	Muskarin.....	29
2.2.6	U46619.....	29
2.2.7	DL-Threo-Dihydrosphingosin.....	30
2.2.8	N,N-Dimethylsphingosin.....	30
2.2.9	Lanthanchlorid Heptahydrat.....	30
2.3	Lösungen.....	30
2.3.1	Aqua ad injectabilia.....	30
2.3.2	Spüllösung für Lungengefäße.....	31
2.3.3	Inkubationsmedium.....	31
2.3.4	Krebs-Ringer-Lösung.....	31
2.3.5	Hepes-Ringer-Lösung.....	31
2.4	Gebrauchsgegenstände und Geräte.....	32
2.4.1	Mikrotom.....	32
2.4.2	Inkubationskammer.....	32
2.5	Methoden.....	34
2.5.1	Vorbereitung der verwendeten Medien und Pharmaka.....	34
2.5.2	Präparation der Maus.....	34
2.5.3	Schneiden der Lunge.....	35
2.5.4	Inkubation der Lungenschnitte.....	36
2.5.5	Videomorphometrie.....	36
2.5.6	Bildauswertung an mikroskopisch untersuchten Lungenschnitten.....	38
2.5.7	Statistische Auswertung.....	39
2.5.8	Flussdiagramm des Versuchsablaufs.....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
3.1	Referenzmessungen mit Muskarin $10^{-6}$ M.....	41
3.1.1	Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli nach 4 h Inkubation.....	42
3.1.2	Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli	

	nach 12 h Inkubation.....	43
<b>3.1.3</b>	Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli nach 24 h Inkubation.....	45
<b>3.2</b>	Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe von Muskarin und DL-Threo-Dihydrosphingosin.....	46
<b>3.2.1</b>	Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe von Muskarin und N,N-Dimethylsphingosin.....	48
<b>3.3</b>	Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe des Thromboxanalogons U46619.....	49
<b>3.3.1</b>	Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe des Thromboxanalogons U46619 und DL-Threo-Dihydrosphingosin.....	51
<b>3.3.2</b>	Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe des Thromboxanalogons U46619 und N,N-Dimethylsphingosin.....	52
<b>3.4</b>	Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe von Muskarin und dem Kalziumkanalblocker Lanthanchlorid .....	54
<b>3.4.1</b>	Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe von DHS, Lanthanchlorid und Muskarin.....	55
<b>3.4.2</b>	Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe von DMS, Lanthanchlorid und Muskarin.....	57
<b>3.5</b>	Vergleich der luminalen Bronchialfläche nach Initialkonstriktion und letztem Wert vor Spülung nach zunächst alleiniger Gabe von U46619 sowie gemeinsam mit DMS, DHS und Lanthanchlorid.....	59
<b>3.6</b>	Vergleich der luminalen Bronchialfläche nach Initialkonstriktion und letztem Wert vor Spülung nach zunächst alleiniger Gabe von U46619 sowie gemeinsam mit DMS und DHS .....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>11</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>95</b>

<b>12</b>	<b>Eigene Publikationen zum Thema.....</b>	<b>96</b>
<b>13</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>97</b>
<b>14</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>98</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung in das Thema und Formulierung des Untersuchungsschwerpunktes

Obstruktive Lungenerkrankungen, wie das Asthma bronchiale sowie die chronisch-obstruktive Bronchitis (COPD), sind die häufigsten chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Menschen überhaupt. Asthma bronchiale ist definiert als akute passagere Atemnot durch reversible Obstruktion der unteren Atemwege, welche durch eine bronchiale Hyperreagibilität ausgelöst wird. Der Krankheitsbeginn liegt oft im Kindes- und Jugendalter. Die Erkrankungshäufigkeit nimmt wie die anderer allergischer Erkrankungen weiter zu. Im Gegensatz zu Asthma ist bei der COPD die Obstruktion der unteren Atemwege nur partiell reversibel. Nach Gabe von Bronchodilatoren zeigt sich bei Asthma im Vergleich zur COPD in der Lungenfunktionsanalyse eine vollständig reversible Bronchialobstruktion. Die Entstehung der COPD verläuft schleichend über viele Jahre mit zunächst Zeichen einer chronischen Bronchitis und beginnt oft erst im mittleren Lebensalter. In vielen Fällen liegt ein jahrelanger Nikotinkonsum vor. Die Obstruktion wird dabei durch entzündliche Schleimhautschwellung, glattmuskuläre Bronchokonstriktion sowie durch eine gestörte Schleimentwicklung (Dyskrie) ausgelöst.

Die Hyperreagibilität der glatten Bronchialmuskulatur wird zum einen durch immunologische Prozesse (Ermert et al. 2000) und zum anderen auf den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) zurück geführt (Wessler & Kirkpatrick 2001). Daher sind bei der klassischen COPD Anticholinergika neben Beta-2-Agonisten die Mittel der ersten Wahl (Barnes et al. 1995, Abad Santos et al. 2003). Dies weist auf die Wichtigkeit des cholinergen Systems bei diesem Krankheitsprozess hin. Bei der neuronalen Regulation der glattmuskulären Bronchokonstriktion unterscheidet man die zentralen Atemwege, Trachea und Stammbronchien, von den peripheren Atemwegen, den Bronchioli.

Die cholinerge Konstriktion in den zentralen Atemwegen verläuft biphasisch. Sie beginnt mit einer schnellen initialen Konstriktion, der eine tonische Phase folgt (Rodger 1985). Bei der initialen Konstriktion wird die für die glattmuskuläre Konstriktion erforderliche Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) sichergestellt. Hierbei wird über G-Proteine das



membranständige Enzym Phosphoinositid-Phospholipase C (PLC) stimuliert, welches das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. Folgend diffundiert  $\text{IP}_3$  von der Membran ins Zytoplasma und aktiviert über  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren auf dem endoplasmatischen Retikulum (ER) die Kalziumfreisetzung (Caulfeld 1992, Felder 1995, Berridge et al. 1993, Clapham et al. 2007, Mikoshiba et al. 1997, Kajita & Yamaguchi 1993).

In der tonischen Phase erfolgt das Einströmen von extrazellulärem Kalzium über kalziumpermeable Kanäle. Als Kalziumkanäle wurden durch Untersuchungen an gentechnisch modifizierten glatten Muskelzellen TRPC-Kanalproteine identifiziert (Montell 2001). Die Daten der zentralen Atemwege lassen sich allerdings nicht auf die Reaktionen in den peripheren Atemwegen übertragen. Die elektrische Stimulation des Vagusnerven bei Hunden und Katzen verursachte eine Konstriktion in den zentralen Atemwegen, aber keine Konstriktion der terminalen Bronchioli (Wessler & Kirkpatrick 2001). Dies zeigt, dass eine periphere Atemwegsverengung nicht durch cholinerge Neurone vermittelt wird.

Führend verantwortlich für den Schweregrad der obstruktiven Lungenerkrankungen sind die Bronchioli und deren Hyperreagibilität. Der Durchmesser der Bronchioli trägt entscheidend zum Atemwegwiderstand und somit zum Schweregrad der COPD bei (Martin 2002, Escolar et al. 2003). Das Wissen über den Einfluss von ACh im Bereich der peripheren Atemwege ist bis dato noch lückenhaft. ACh ist ein starker Bronchokonstriktor in der Lunge und interagiert hierbei mit Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (mAChR). Diese können selektiv mit Muskarin, dem Gift des Fliegenpilzes *Amarita muscarina*, stimuliert werden (Roffel et al. 1990, Halayko et al. 1999).

Anhand vitaler Schnittpräparate von Mäuselungen konnte unsere Gruppe nachweisen, dass mAChR für die cholinerge Konstriktion im Bereich der peripheren Atemwege verantwortlich sind (Struckmann et al. 2006).

Die mAChR-vermittelte Konstriktion peripherer Atemwege ist durch eine schnelle und starke Lumeneinengung, insbesondere der Bronchioli, gekennzeichnet. Das für die Konstriktion der glatten Atemwegsmuskulatur benötigte Kalzium wird initial aus intrazellulären Kalziumspeichern freigesetzt.

Zur weiteren Aufrechterhaltung der Konstriktion wird extrazelluläres Kalzium benötigt, das über spezielle Kalziumkanäle einströmt. Dafür sind in der Zellmembran der glatten Muskelzelle der Bronchioli verschiedene Typen von Kalziumkanälen vorhanden, welche jeweils einem unterschiedlichen Aktivierungsmechanismus unterliegen (Fasolato et al. 1994, Felder et al. 1994). Spannungsunabhängige Kalziumkanäle (VICCs), wie die Familie der TRPC-Kanalproteine, sind mögliche Mediatoren des Kalziumeinstroms in peripheren Atemwegen. TRPC Kanäle sind nicht nur auf transkriptioneller Ebene im Lungengewebe nachweisbar, sondern auch immunhistochemisch in Zellpopulationen peripherer Atemwege zu finden (Martin et al. 1996, Struckmann et al. 2006).

In den bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass das bioaktive Lipid Sphingosin 1-Phosphat (S1P) die intrazelluläre Kalziumfreisetzung beeinflusst (Beaven 1996, Ghosh 1990). S1P entsteht aus Sphingosin durch Übertragung eines Phosphatrests unter Verbrauch des Moleküls Adenosintriphosphat (ATP) (Spiegel et al. 2002). S1P ist in eine Vielzahl von Signalwegen integriert und besitzt zahlreiche biologische Wirkungen wie z. B. Zellproliferation, Zellmigration und Angiogenese (Igarashi 1997, Olivera et al. 1999, Pyne et al. 2000). Katalysator für die Bildung des S1P sind die Sphingosinkinase-1 und 2 (SPHK1, 2) (Stoffel et al. 1974), welche unter anderem durch mAChR-Aktivierung stimuliert werden können (Meyer zu Heringsdorf et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Rolle der SPHK1 in der broncholuminalen Konstriktion nach Stimulation am mAChR im Bereich der peripheren Atemwege der Maus untersucht. Als Modell dienten vitale Lungenschnitte der Maus, in welchen mit Hilfe der Videomorphometrie das Konstriktionsverhalten der Bronchioli untersucht wurde.

## **1.2 Obere/untere Atemwege bzw. luftleitende/gasaustauschende Abschnitte**

Die Atemwege können nach topographischen Gesichtspunkten eingeteilt werden: in obere Atemwege (Mund, Nasenhöhle, Rachen, Kehlkopf) sowie untere Atemwege (Luftröhre, Bronchien und Bronchioli). Eine weitere Einteilung gliedert die Atemwege nach funktionellen Gesichtspunkten in luftleitende Abschnitte (Mund, Nasenhöhle, Rachen, Kehlkopf, Luftröhre, Bronchien und Bronchiolen) und gasaustauschende/respiratorische Abschnitte (Bronchioli respiratorii, Alveoli).

Die luftleitenden Abschnitte des Atemtraktes dienen der Anfeuchtung, Anwärmung und Reinigung der Luft. Histologisch zeigt sich im Bereich der luftleitenden Abschnitte ein Epithel aus mehrreihig hochprismatischen Flimmerepithelzellen mit Becherzellen.

Im Bereich der gasaustauschenden Abschnitte, den Lungenbläschen, Alveoli, welche von Lungenkapillaren umgeben sind, erfolgt der Gasaustausch über Diffusion. Hierbei wird über die Atemluft den Lungenkapillaren O<sub>2</sub> zugeführt und parallel CO<sub>2</sub> abgeatmet (Benninghoff 2002).

### **1.2.1 Morphologische und physiologische Grundlagen der Atmungsfunktion**

Die für den Atemgastransport erforderliche Inspiration erfolgt durch Anspannung der Zwischenrippenmuskulatur, der Brust- und der Zwerchfellmuskulatur. Das der Lunge anliegende Rippenfell (Pleura visceralis) und das der Brustkorbinnenseite anliegende Brustfell (Pleura parietalis) gleiten hierbei luftdicht übereinander und entfalten über Adhäsionskräfte die Lunge. Die Ausatmung erfolgt in der Regel passiv durch elastische Fasern im Lungenparenchym (Retraktion) nach Entspannen der Brust- und Bauchfellmuskulatur. Dafür verantwortlich sind fibroelastische Fasern der Pleura visceralis, welche in das Organ eindringen und als inter- und intralobuläres sowie peribronchiales und perivaskuläres Bindegewebe das Interstitium der Lunge darstellen (Nickel 1987).

Bei Einatmung wird frische, sauerstoffreiche Luft über die oberen Atemwege zu den unteren Atemwegen geleitet. Die unteren Atemwege unterteilen sich in

einen proximalen, konduktiven (luftleitenden Bronchialbaum) und einen distalen mit Alveolen besetzten (respiratorischen) Abschnitt.

Das Blutgefäßsystem der Lunge gliedert sich in Vasa publica und Vasa privata. Die Vasa publica entspringen dem rechten Herzen und transportieren das Blut aus dem Körperkreislauf über den Lungenhauptstamm (Truncus pulmonalis) und die Lungenarterien (Aa. pulmonales). Seine Äste folgen der Verzweigung des Bronchialbaums und führen das CO<sub>2</sub>-reiche Blut dem Kapillarnetz der Lungenalveolen zu. Nach Oxygenierung im Bereich der Lungenbläschen erfolgt über die Lungenvenen (Vv. pulmonales) der Zufluss zur linken Vorkammer des Herzes. Die Aa. und Vv. pulmonales bilden mit ihren Kapillaren den kleinen Kreislauf. Die Vasa privata (Aa/Vv. bronchiales) dienen nur der Versorgung von beispielsweise glatter Muskulatur und Drüsen der Atemwege mit Sauerstoff und gehören dem großen Kreislauf an.

### **1.2.2 Die Lappengliederung der Lunge**

Die Lungen stellen paarige Organe dar und gliedern sich in Lappen, Segmente, Läppchen und Azini. Beide Lungen liegen in einer eigenen Pleurahöhle und sind jeweils von der Pleura visceralis umgeben.

Die linke Lunge gliedert sich in der Regel in zwei Lappen, den oberen (Lobus superior) und den unteren (Lobus inferior). Das Volumen der linken Lunge ist mit 1400 cm<sup>3</sup> aufgrund des nach links reichenden Herzens etwas kleiner als das der rechten Lunge. Die rechte Lunge gliedert sich in der Regel in drei Lappen, den Ober-, Mittel- und Unterlappen (Lobus superior, Lobus inferior und Lobus medius). Das Volumen ist hier mit 1500 cm<sup>3</sup> etwas größer.

### **1.2.3 Der Bronchialbaum der Lunge**

Der funktionelle Bau der Lunge wird von dem Miteinander des luftleitenden Röhrensystems der Bronchien und den begleitenden Gefäßen bestimmt. Der Bronchialbaum wird als eine Folge von Gabelungen (Dichotomie) beschrieben (Boyden 1975, Starck 1975, Phalen et al.1978, Horsfield 1991). Am Ende der Luftröhre (Trachea) teilt sich die Luftröhre an der Luftröhrengabelung (Bifurcatio tracheae) in ihre zwei kurzen Hauptbronchien (Bronchi principales). Nach Eintritt in die rechte bzw. linke Lunge teilen sich die Hauptbronchien in die

Lappenbronchien (Bronchi lobares). Diese unterteilen sich nun weiter in Segmentbronchien (Bronchi segmentales). Nach weiteren sechs bis zwölf Aufteilungen in den jeweiligen Lungenlappen in sogenannte mittlere und kleine Bronchi folgen die Bronchioli, denen erstmals die Knorpel Elemente fehlen und die mit ihren Aufzweigungen jeweils ein Lungenläppchen (Lobulus pulmonis) versorgen (Valerius 1996). Die Bronchioli teilen sich drei- bis viermal gleichmäßig (dichotom) und bilden mit ihren Ästen den Bronchioli terminales und somit das Ende des luftleitenden Bronchialbaumes.

Anschließend kommen die Bronchioli respiratorii, welche das erste Stück der Gewebe für den Gasaustausch darstellen. Diese teilen sich zwei- bis zehnfach und bilden so die Ductuli alveolares (Gänge), deren Wände dicht nebeneinander liegende Alveolen bzw. Eingänge (Atria alveolaria) in Alveolengruppen (Sacculi alveolares) aufweisen. Die Alveolen sind für den Gasaustausch die entscheidenden Abschnitte. Mikroskopisch stellen sie sechskantige Pyramidenstümpfe mit einem Durchmesser von 250-300 µm dar. Die menschliche Lunge weist ca. 480 Millionen Alveoli auf, welche eine Oberfläche von 120 m<sup>2</sup> ergeben (Ochs et al. 2004).

Die Innenauskleidung der Atemwege wird von einer speziellen Schleimhaut gebildet, deren histologischer Aufbau sich in den einzelnen Abschnitten der Atemwege verändert. Die Schleimhaut sitzt auf der Lamina propria (Faserhaut) auf und enthält Basalzellen, zilienträgenden Epithelzellen und verschiedene nicht-zilienträgende Epithelzellen. Die nicht-zilienträgenden Epithelzellen werden anhand ihrer Sekretgranula in muköse (Becher-), sero-muköse und seröse Zellen eingeteilt. Die Faserhaut weist eine kollagenfaserige Bindegewebsschicht mit elastischen Fasernetzen auf und beherbergt die Glandulae tracheales.

In der Luftröhre und den großen Bronchien ist zwischen Schleimhaut und Faserhaut eine Schicht glatter Muskelzellen eingefügt, die aus anfänglich zirkulär, später schraubenförmig verlaufenden Muskelfasern besteht und bei den Bronchioli respiratorii ausläuft. Im Bereich der Alveolen finden sich nur noch im Bereich der Alveolarsepten vereinzelt glatte Muskelfasern.

In der Luftröhre und den Bronchien sind in der Wand dieser Atemwege Knorpelspangen zwischen die glatten Muskelzellen eingelagert. Dies begrenzt

hier zum Einen die Wirkung der glatten Muskelzellen, hält aber zum Anderen die Atemwege offen.

#### **1.2.4 Unterschiede in der Anatomie der Lunge zwischen Mensch und Maus**

Bei Menschen besteht die rechte Lunge aus 3 Lappen (Lobus inferior, Lobus medius und Lobus superior) und die linke Lunge aus 2 Lungenlappen (Lobus inferior und Lobus superior).

Im Gegensatz zum Menschen ist bei der Maus der linke Lungenflügel nicht untergliedert. Der rechte Lungenflügel der Maus ist in einen Oberlappen, einen Mittellappen, einen infrakardialen Lappen und einen unteren Lappen unterteilt. Der infrakardiale Lappen liegt in einer Fortsetzung der rechten Pleurahöhle unter dem Herzen und ragt zu einem großen Teil auf die linke Seite des Brustkorbs (Thorax) hinüber (Valerius 1996).

### **1.3 Neuronale Kontrolle peripherer Atemwege**

Die neuronale Steuerung der peripheren Atemwege erfolgt durch ein komplexes Nervenfasergeflecht mit unterschiedlichem Ursprung. Aufgeteilt wird das die Atemwege versorgende Nervensystem zum einen in eine autonome, efferente Komponente mit einem sympathischen und parasympathischen Anteil. An der Hinterwand der Luftröhre bündeln sich die einzelnen Nervenfasern und treten über den Lungenhilus in die Lunge ein. Zum zentralen Nervensystem (ZNS) hinführende Nervenimpulse werden über sensible, afferente Nervenfasern geleitet.

Als Botenstoff (Transmitter) dient im Bereich der sympathischen postganglionären Nervenendigungen Noradrenalin (Burnstock 1992). Adrenalin als Überträgerstoff kommt nur bei niederen Vertebraten und Vögeln im Bereich des peripheren Nervensystem vor. Acetylcholin (ACh) dient als Botenstoff im Bereich der parasympathischen Nervenfasern des autonomen Nervensystems. Viele parasympathische Neurone enthalten neben ACh ebenso ein oder mehrere Neuropeptide (z. B. Substanz P und VIP), welche als Co-Transmitter zusammen mit ACh in den großen Vesikeln gespeichert werden. Es wurde

gezeigt, dass die Neuropeptide die Wirkung der klassischen Transmitter verstärken und besonders in der Aufrechterhaltung tonischer Effektantworten bei langanhaltender neuronaler Aktivierung wirksam werden (Muskeltonus von Blutgefäßen und Bronchien, Drüsensekretion sowie Aktivierung von Entzündungs- und Immunzellen) (Lundberg et al. 1988, Boichot et al. 1993, Iwamoto et al. 1993, Burnstock 1992, Morris et al. 1992). Im Bereich der Atemwege wird dieser Effekt der Neuropeptide als nicht-adrenerges, nicht cholinerges (NANC)-System zusammengefasst (Crimi & Mistretta 1989, Stretton et al. 1991).

### **1.3.1 Parasympatische Innervation**

Die Zellkörper der präganglionären parasympatischen Neurone liegen im Hirnstamm. Ihre Axone sind teils myelinisiert, teils unmyelinisiert und verlaufen hauptsächlich im N. vagus. Er ist der zehnte (X.) Hirnnerv mit einem weiten Innervationsgebiet (Brust- und Bauchraum). Nach Austritt aus der Schädelhöhle durch das Foramen jugulare gehen im Kopf- und Halsbereich verschiedene viszeromotorische Fasern ab. Nach Abgabe des N. laryngeus recurrens führt der N. vagus bei Eintritt in den Brustkorb nur noch parasympathische und viszerosensible Fasern. Durch die obere Thoraxapertur verläuft der N. vagus (rechts zwischen A. subclavia und V. brachiocephalica, links zwischen Aortenbogen und V. brachiocephalica) hinab ins Mediastinum. Im Bereich der Lungenwurzel verlassen die Rr. bronchiales, welche zuständig für die glatte Muskulatur und die Schleimdrüsen der Lungen und Bronchien sind, den Vagusstamm. Zusammen bilden sie mit Zweigen des sympathischen Ganglion cervicothoracium und Ästen der vorderen Brustganglien des Grenzstranges die dorsal und ventral von den Stammbronchien gelegenen Rr. bronchiales (Plexus pulmonalis). Im weiteren Verlauf erfolgt die Umschaltung auf die kurzen postganglionären Nervenfasern.

Der klassische postganglionäre parasympatische Überträgerstoff der Atemwegen ist ACh. ACh vermittelt seine Wirkung über zwei Klassen von Acetylcholinrezeptoren (AChR): nikotinsche (nach dem Alkaloid der Tabakpflanze) und muskarinsche (nach einem Alkaloid des Fliegenpilzes).

Der Nachweis von ACh als Transmitter im Bereich der peripheren Atemwege konnte wegen der schnellen Metabolisierung nur indirekt durch Nachweis der

Enzyme oder Transporter erbracht werden. An verschiedenen Säugerspezies wurde das ACh-abbauende Enzym Acetylcholinesterase (AChE) (Mann 1971), das ACh-synthetisierende Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) (Canning & Fischer 1997) und der vesikuläre ACh-Transporter (VACHT) (Arvidsson et al. 1997) nachgewiesen.

Versuche bei Katzen und Hunden zeigten nach Stimulation von Vagusnerven keine Konstriktion der terminalen Bronchioli und Alveoli (Wessler & Kirkpatrick 2001). Hingegen konnte dafür beim Menschen ein Netzwerk aus AChE-positiven Nervenfasern bis in die terminalen Bronchioli nachgewiesen werden (Partanen et al. 1982). Cholinerge Nervenfasern konnten in den Alveoli nicht nachgewiesen werden (Richardson 1977).

### **1.3.2 Sympathische Innervation**

Der sympathische Anteil des peripheren Nervensystems nimmt seinen Ursprung im Seitenhorn des Thorakal- und Lumbalmarks. Die sympathischen Neuronen werden größtenteils direkt neben der Wirbelsäule in den Ganglien des Truncus sympathicus (Grenzstrang) umgeschaltet. Diese begleiten strickleiterartig die Wirbelsäule auf der Ventralseite. Die Grenzstrangganglien kann man in die Halsganglien, Brustganglien und lumbosakrale bzw. Beckenganglien unterteilen. Von den Halsganglien (Ganglion cervicale superius, medius, inferius) werden der Kopf, der Hals und ein Teil der Arme versorgt. Die zwölf thorakalen Grenzstrangganglien stehen wie alle anderen sympathischen Ganglien miteinander in Verbindung und liegen in Höhe der Rippenköpfe vor den Interkostalgefäßen. Das Ganglion cervicale inferius, welches lateral von der Trachea liegt, bildet nach Verschmelzen mit dem Ganglion thoracicum I und meist II und III das Ganglion cervicothoracicum (Ganglion stellatum). Die postganglionären Fasern ziehen vom Ganglion cervicale superius, vom Ganglion stellatum und von den oberen thorakalen Grenzstrangganglien zur Luftröhre und zur Lunge.

Neben dem klassischen Transmitter bei den präganglionären Neuronen (Lindh et al. 1986) konnte auch NO gefunden werden (Blottner & Baumgarten 1992).

Als klassischer Transmitter im Bereich der postganglionären sympathischen Nervenfasern ist Noradrenalin (NA) bekannt. Daneben sind weitere Mediatoren beschrieben: z.B. das Neuropeptid Tyrosin (NPY), das zusammen mit NA in



sympathischen Nervenfasern im Bereich der Arterien, Arteriolen und der Bronchialmuskulatur der unteren Atemwege gefunden wurde (Lundberg et al. 1983, Uddman et al. 1984), sowie das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) (Bowden & Gibbins 1992).

### **1.3.3 Sensible Innervation**

Der größte Teil der sensiblen, afferenten Nervenfasern verläuft mit dem Nervus vagus und endet im Gehirn in den Kernen des Tractus solitarius. Die Zellkörper (Perikaryen) dieser Neurone liegen im Ganglion jugulare und im Ganglion nodosum (Kummer et al. 1992).

Außerdem gibt es eine afferente Versorgung der Atemwege aus den thorakalen Spinalganglien (Springall et al. 1987, Plato et al. 2005, Groth et al. 2006). Diese afferenten Nervenfasern verlaufen mit sympathischen, efferenten Nervenfasern zum Grenzstrang, durchqueren diesen ohne Verschaltung und münden ins Hinterhorn des Rückenmarks (Lundberg et al. 1988, Kummer et al. 1992).

Die sensiblen Fasern leiten die Informationen aus den Berührungs- und Dehnungs-Rezeptoren im Bereich der Luftröhre, Bronchen und Bronchioli weiter. Beim Menschen konnten sensible Nervenendigungen bis in das bronchiale Oberflächenepithel nachgewiesen werden, während bei der Maus dort keine Nervenendigungen angetroffen wurden (Pack et al. 1981, 1984). Weiterführend konnte in Studien gezeigt werden, dass Tachykinine (z. B. Substanz P), welche einen entzündungsfördernden Einfluss auf die Atemwege haben, ihre Ursprungsneuronen neben den bekannten sensiblen Vagusganglien auch in Spinalganglien haben (Kummer et al. 1992). Von den Ganglia nodosum und jugulare gelangen die afferenten Fasern mit dem N. vagus zum Nucleus tractus solitarii und zu weiteren Zellgruppen des Atemzentrums im Bereich der Medulla.

Nach anatomisch-physiologischen Kriterien lassen sich die sensorischen Fasern der Atemwege in Dehnungsrezeptoren, Irritanzenrezeptoren, Hustenrezeptoren und C-Fasern unterscheiden. Die Dehnungsrezeptoren messen die Wandspannung und dienen dem Schutz vor einer Überdehnung (Hering-Breuer-Reflex). Die Irritanzenrezeptoren liegen in der Schleimhaut und lösen über chemische und mechanische Reize eine Wirkung aus, z.B. Husten.

Weiterführend wurden spezielle Hustenrezeptoren bei Untersuchungen an Meerschweinchen nachgewiesen (Canning et al. 2005). Im Gegensatz zu den Dehnungsrezeptoren, den Irritanzienrezeptoren und den Hustenrezeptoren, haben die C-Fasern keine Myelinisierung, verfügen jedoch neben ihrer afferenten Informationsvermittlung über die Fähigkeit zur Freisetzung von entzündungsfördernden Neuropeptiden aus den peripheren Endigungen (Neuroeffektorfunktion). Zu den wichtigsten Mediatoren in der Lunge gehören NO und die Tachykinine, Substanz P (SP), Neurokinin A (NKA) sowie Calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Levine et al. 1985, Stretton 1991, Nadel 1990, Kummer et al. 1992). Immunhistochemisch wurden sowohl im Meerschweinchen als auch im Menschen Tachykinine nachgewiesen (Lundberg et al. 1984, Hua et al. 1985, Kummer et al. 1992). Wie Untersuchungen an sensibilisierten Meerschweinchen belegen, wirken SP und NKA am gleichen Rezeptor, mit jedoch unterschiedlicher Affinität zu Tachykinin-Rezeptor-Subtypen (Frossard et al. 1991). So verursacht SP im Rahmen einer neurogenen Entzündung Extravasation und Mukussektion (Kuo et al. 2003, Lei et al. 1992), während NKA eine Bronchokonstriktion vermittelt (Satoh et al. 1992). CGRP wird von denselben Neuronen wie SP und NKA produziert und ist an der Vasodilatation beteiligt (Martling et al. 1988).

Die Fortleitung der Signale von den Berührungs- und Dehnungsrezeptoren im Bereich der Trachea, den Bronchien und den Bronchioli erfolgt über eine afferente Faser. Als Neurotransmitter spielt Glutamat eine wichtige Rolle (Dalsgaard & Lundberg 1984). Des Weiteren unterscheidet man elektrophysiologisch langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren (slowly adapting receptors; SAR), die myelinisierte Axone haben und damit eine hohe Leitungsgeschwindigkeit aufweisen. Sie konnten vorwiegend in der glatten Muskulatur der Trachea und den Bronchien nachgewiesen werden. Die Endigungen der schnell adaptierenden Dehnungsrezeptoren (rapidly adapting receptors; RAR), welche auch eine Myelinisierung aufweisen, sind im respiratorischen Epithel und in der glatten Atemwegsmuskulatur anzutreffen (Coleridge & Coleridge 1984).

Sensible Nervenfasern wurden beim Menschen bis in das bronchiale Oberflächenepithel nachgewiesen (Lundberg et al 1984). Bei der Maus konnten

im Oberflächenepithel der Atemwege keine sensiblen Nervenfasern nachgewiesen werden (Pack et al. 1981). Solche sensiblen Nervenfasern können sowohl durch exogene (z. B. Capsaicin) als auch durch endogene Stimuli (z. B. Histamin, Bradykinin und Prostaglandine) aktiviert werden (Saria et al. 1988).

#### **1.3.4 Nicht-adrenerges, nicht-cholinerges-System**

Als nicht-adrenerges und nicht-cholinerges (NANC)-System fasst man die Wirkungen von einigen Neuropeptiden auf z.B. auf den Muskeltonus der Blutgefäße, Bronchien, Drüsensekretion und die Entzündungs- und Immunzellen zusammen. Hierbei unterscheidet man beim NANC zwei gegensätzlich wirkende Anteile, das exzitatorische (excitatory non-adrenergic system; eNANC) und das inhibitorische (inhibitory non-adrenergic non-cholinergic system; iNANC) System (Sonea et al. 1993, Barnes 1992). Über diese kann man den Muskeltonus der Blutgefäße und der Bronchien pharmakologisch beeinflussen. Weiterführend verändern sie die Drüsensekretion sowie den Regelkreis der Entzündungs- und Immunzellen (Lundberg et al. 1988, Boichot et al. 1993, Iwanato et al. 1993).

### **1.4 Acetylcholin und seine Synthese**

#### **1.4.1 Neuronales Acetylcholin**

Die chemische Struktur von ACh wurde erstmals von Dale aufgeklärt (Dale 1935), der Nachweis seiner neuronalen Freisetzung war vorher von Loewi erbracht worden (Loewi 1921).

ACh ist Transmitter der motorischen Neurone und außerdem ein Mediator im ZNS. Zudem wirkt es als Überträgersubstanz der präganglionären sympathischen sowie der prä- und postganglionären parasymphatischen Neurone. Durch das Enzym ChAT wird ACh im Zytoplasma aus Cholin und Acetyl-Coenzym A gebildet (Fonnum 1975). Es erfolgt eine Speicherung in Vesikeln innerhalb der Neurone durch VACHT (Parsons et al. 1993). Erreicht ein Aktionspotenzial die Endigung strömt über spannungsabhängige Kanäle Kalzium in die Nervenendigung und dies bewirkt eine Freisetzung des

gespeicherten ACh durch Verschmelzung der Vesikeln mit der präsynaptischen Membran und Freisetzung in den synaptischen Spalt.

Das in den synaptischen Spalt freigesetzte ACh wirkt über nAChR und mAChR im Bereich der prä- und postsynaptischen Membran. Die Inaktivierung erfolgt durch Acetyl- und Butrylcholinesterasen (AChE, BuChE), die ACh in Cholin und Acetyl aufspalten. Das bei der Spaltung entstandene Cholin wird über den hochaffinen Cholintransporter (ChT1) wieder in die präsynaptischen Nervenendigungen aufgenommen (Okuda et al. 2000).

#### **1.4.2 Nicht-neuronales Acetylcholin**

Die traditionelle Ansicht von ACh als klassischen Neurotransmitter im Nervensystem und an der motorischen Endplatte hat lange Zeit unser Verständnis des cholinergen Systems geprägt. Neue Erkenntnisse zeigen, dass auch nicht-neuronale Zellen ChAT enthalten (Haberberger et al. 1997, Klapproth et al. 1997) und in der Lage sind, ACh-Synthese zu betreiben (Wessler & Kirkpatrick 2001). Cholinerge Kommunikation und Regulation hat möglicherweise von Beginn der Evolution an in Einzellern, Mehrzellern, Bakterien und Pilzen stattgefunden (Wessler et al. 1999). ACh wird in vielen Zellen nachgewiesen und ist somit auch ein wichtiger Botenstoff in der Kommunikation zwischen neuronalen Zellen und nicht-neuronalen Zellen. Daher ist das Enzym ChAT kein spezifischer Marker für cholinerge Neurone (Wessler & Kirkpatrick 2001). ChAT konnte im Endothel der Pumonalfäße, in der Schleimhaut der Atemwege, in Immunzellen und in Embryonalzellen der Maus nachgewiesen werden (Haberberger et al. 1997, Paraoanu et al. 2007).

Die Physiologie der Freisetzung des ACh aus nicht-neuronalen Zellen ist bis heute nicht genau geklärt. Es wird angenommen, dass die Freisetzung durch organische Kationentransporter (OCTs) erfolgt, deren Anwesenheit bei Ratte, Maus und Mensch im Bronchialepithel nachgewiesen wurde (Lips et al. 2005, Kummer et al. 2006). Weiterhin werden auch sogenannte Mediatophore für die Freisetzung diskutiert (Birman et al. 1989). Neben Isoformen der AChE existiert in vielen Geweben im Körper die BuChE, die auch in der Lage ist ACh abzubauen.

## **1.5 Rezeptoren für Acetylcholin**

### **1.5.1 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren**

Die nAChR sind ligandengesteuerte Ionenkanäle. Sie kommen in der Zellmembran verschiedener Zellen vor. Bei den direkt ligandengesteuerten Kanälen binden sich Überträgerstoffmoleküle an das Rezeptormolekül, das daraufhin für Millisekunden seinen Ionenkanal öffnet. NACHR kommen an der neuromuskulären Endplatte und als Rezeptoren im PNS und ZNS vor. NACHR bestehen aus fünf alpha und/oder beta-Untereinheiten, welche sich um den zentralen Kanal gliedern und so eine Pore bilden (Numa et al. 1983, Popot et al. 1984). Je nach Anordnung der verschiedenen Isoformen der alpha und beta-Untereinheiten ergeben sich unterschiedliche Eigenschaften dieser Rezeptoren. Kommt es zu einer Bindung von ACh bzw. Nikotin, erfolgt innerhalb von Millisekunden eine Öffnung des Kanals und damit ein Einstrom von Natrium- und Kalziumionen und umgekehrt ein Ausstrom von Kaliumionen (Starke 1996).

### **1.5.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren**

Diese mAChR wurden bereits 1961 von Beckett beschrieben (Beckett et al. 1961). Unterschieden werden fünf Subtypen (mAChR1-5), deren Aminosäuresequenz zu 90 % übereinstimmt. Guaninnucleotid bindende Regulatorproteine (G-Proteine) binden an die mAChR. Unterschiede gibt es im Aufbau und der Verteilung im Körper (Caulfield 1993). Die G-Proteine stellen eine Brücke in der Signalweiterleitung zwischen Rezeptor und second messenger dar. Die Funktion der G-Proteine und die intrazellulären Signalwege werden folgend erläutert (1.7 und 1.8). Es werden Pertussis-Toxin insensitive ( $G_{q/11}$ -Proteine) und sensitive ( $G_{i/o}$ -Proteine) unterschieden. Die mAChR1, 3 und 5 koppeln an  $G_{q/11}$ -Proteinen, während mAChR2 und -4 ihre Wirkung über die  $G_{i/o}$ -Proteine vermitteln (Caulfield 1993, Felder 1995).

## **1.6 Acetylcholin in der Lunge**

### **1.6.1 Quellen für Acetylcholin in der Lunge**

Im Bereich der glatten Bronchialmuskulatur ist ACh der wichtigste neuronale Transmitter in parasympathischen Nervenfasern (Wessler & Kirkpatrick 2001). ChAT-Immunreaktivität wurde auch für glatte Muskelzellen der menschlichen Atemwege beschrieben, welche damit auch in der Lage sein könnten, selbst ACh-Synthese zu betreiben (Wessler & Kirkpatrick 2001).

Auch im Bronchialepithel des Menschen (Klapproth et al. 1997, Wessler et al. 1998), der Ratte (Klapproth et al. 1997, Pfeil et al. 2003) und des Meerschweinchens (Canning & Fischer 1997) wurden das Enzym ChAT und zusätzlich der hochaffine Cholintransporter sowie ACh nachgewiesen. Somit ist das Bronchialepithel eine zusätzliche Quelle von nicht-neuronalem ACh (Reinheimer et al. 1996, Klapproth et al. 1997, Pfeil et al. 2003). Ebenso konnte in pulmonalen Endothelzellen des Meerschweinchens ChAT gezeigt werden (Haberberger et al. 1997).

### **1.6.2 Differenzierung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren in der Lunge**

Mit Hilfe von selektiven, radioaktiv markierten Liganden für die muskarinischen Rezeptoren konnte die Lokalisierung und Verteilung im Körper ermittelt werden. In den Atemwegen von Mensch, Maus, Ratte und Schwein konnte mAChR1, mAChR2 und mAChR3 nachgewiesen werden (Fryer & el-Fakahany 1990, Mak et al. 1992, Garssen et al. 1993, Hislop et al. 1998). Als erstes konnte mAChR3 im gesamten Bronchialbaum, im Bereich der glatten Muskelzellen, bis hin in die kleinen Bronchioli nachgewiesen werden (Yu et al. 1992, Roffel et al. 1990, Halayko et al. 1999, Stengel et al. 2000, Stengel et al. 2002). Der mAChR1 beim Menschen findet sich auf respiratorischen Epithelzellen, den Endigungen sympathischer Nervenfasern und auf glatten Muskelzellen (Maclagen et al. 1989, Shapiro et al. 1990). Bei der Ratte wurde der mAChR1 in den peripheren Atemwegen (Fryer & el-Fakahany 1990) und der mAChR2 und der mAChR3 in den zentralen Atemwegen nachgewiesen (Fryer & el-Fakahany 1990). Der Nachweis von mAChR4 in der Lunge konnte mit Hilfe von Antikörpern bei Ratten gezeigt werden (Yasuda et al. 1993). Eine Detektion von mAChR4 und

mAChR5 in der menschlichen Lunge konnte nicht erbracht werden (Mak et al. 1992, Barnes et al. 1993).

### **1.7 Signalwege muskarinischer Acetylcholinrezeptoren in der Lunge**

Die mAChR sind an verschiedene G-Proteine gekoppelt. Ein G-Protein unterteilt sich in das an der Membraninnenseite liegende Heterotrimer aus einer alpha-, beta- und gamma-Untereinheit. An die alpha-Untereinheit ist Guanosindiphosphat (GDP) gebunden. Bindet sich ACh an den mAChR, wird das G-Protein aktiviert. Dies führt zu einem Austausch von GDP an der alpha-Untereinheit gegen Guanosin triphosphat (GTP). Konsekutiv zerfällt das Heterotrimer in eine alpha-Untereinheit und beta/gamma-Untereinheit. Die Inaktivierung erfolgt durch Hydrolyse des GTP zu GDP, wobei die alpha-Untereinheit als GTPase wirkt und alpha-GDP mit dem beta/gamma-Komplex reassoziert wird (Caulfield 1993).

Intrazellulär erfolgt nach Stimulation der G-Proteine die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden. Die Darstellung der intrazellulären Signalkaskaden folgt unter 1.8. Hierbei wird nach Stimulation am mAChR1, mAChR3 und mAChR5 über die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub>, -C, -D oder einer Tyrosin-Kinase eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels erreicht. Eine Hemmung der Adenylatzyklase über den mAChR2 und mAChR4 bewirkt ein Absinken des cAMP-Spiegels in der Zelle (Felder 1995, Yan et al. 1996).

Als wichtigster Rezeptor für die ACh-vermittelte Bronchokonstriktion kann der mAChR3 gesehen werden, der als Vermittler im Bereich des Bronchialbaumes beim Pferd bis hin in kleine Bronchioli nachgewiesen wurde (Yu et al. 1992). Am Beispiel der peripheren Atemwege der Maus konnte gezeigt werden, dass die Bronchokonstriktion hauptsächlich über den mAChR2- und mAChR3 vermittelt wird (Struckmann et al. 2003, Pfaff et al. 2005). Der mAChR2 konnte weiterführend nicht nur in den Atemwegen des Menschen, sondern in vielen anderen Spezies sowie wie in parasymphatischen Ganglien isoliert werden (Zaagsma et al. 1997, Fryer & Jacoby 1998, Barnes 2001). In Studien konnte an der glatten Muskulatur von Kaninchenlungen gezeigt werden, dass eine Stimulation am Beta-2-Adrenorezeptor mit Isoproterol zu einer Relaxation und

eine Blockade des mAChR2 zu einer Bronchokonstriktion führte (Fernandes et al. 1992).

Der zusätzlich auf den cholinergen Axonen vorkommende mAChR2 wirkt inhibierend auf die weitere Freisetzung von ACh. Damit wird in einer Art Autoregulation eine weitere Konstriktion verhindert (Maclagan & Barnes 1989). Untersuchungen an Trachealgewebe von gesunden und an COPD erkrankten Pferden zeigten, dass die ACh-Freisetzung unter Einwirkung des nicht selektiven muskarinischen Antagonisten Atropin erhöht war (Wang et al. 1992).

## **1.8 Funktionale Kopplung von G-Proteinen**

### **1.8.1 Phospholipase C**

In der Reaktionskette der intrazellulären Botenstoffe bildet die Phospholipase C (PLC) nach Aktivierung durch mAChR1, mAChR3 und mAChR5 einen wichtigen Katalysator bei der Bildung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinosindiphosphat (PIP<sub>2</sub>) (Lampert et al. 1992, Felder 1995).

Nach Bildung von IP<sub>3</sub> in der Membran und Diffusion ins Zytoplasma werden spezifische IP<sub>3</sub>-Rezeptoren auf dem endoplasmatischen Retikulum (ER) aktiviert. Dies vermittelt dort eine Kalziumfreisetzung. Eine Hemmung dieser Kaskade kann über die Proteinkinase C (PKC), DAG und frei verfügbares Kalzium erfolgen.

### **1.8.2 Adenylatzyklase**

Die an der Membraninnenseite liegende Adenylatzyklase (AC) katalysiert die Umwandlung vom intrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP).

Eine Stimulation von mAChR2 und mAChR4, z.B. durch Muskarin, führt über eine von G-Proteinen vermittelte Hemmung der AC (Buckley et al. 1990). Hingegen konnte ein Anstieg von cAMP nach Stimulation von mAChR3 bei menschlichen Neuroblasten (Baumgold & Fishmann 1988), der Glandula olfactoria der Ratte (Olianas & Onali 1992), sowie an Parotiszellen der Maus (Watson et al. 1990) und sympathischen Neuronen der Maus (Suidan et al. 1991) nachgewiesen werden. Es wurde ein Anstieg von cAMP im Bereich der



peripheren Lunge der Ratte nach Stimulation des mAChR3-Rezeptors nachgewiesen. Dieser Anstieg steht in Zusammenhang mit Arachidonsäure-Metaboliten und erfolgt nicht über eine direkte Aktivierung der AC nach mAChR3-Stimulation (Esqueda et al. 1996). Im Gegensatz dazu erfolgt in den zentralen Atemwegen eine direkte Hemmung der AC über den mAChR2 (Emala et al. 1995).

### **1.8.3 Phospholipase A<sub>2</sub>**

Die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) katalysiert die Hydrolyse der in der Zellmembran vorkommenden Phospholipide. Hierbei entstehen die Arachidonsäure und das korrespondierende Lysophospholipid. Die Arachidonsäure wird weiter in sogenannte Eicosanoide (Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene) umgewandelt. Die Lysophospholipide werden von der Membran wieder aufgenommen.

Eine Aktivierung der PLA<sub>2</sub> erfolgt über mAChR1, mAChR3 oder mAChR5 (Conklin et al. 1988, Felder et al. 1990, Liao et al. 1990). Eine Aktivierung über mAChR2 oder mAChR4 konnte nicht gezeigt werden (Conklin et al. 1988).

In weiteren Studien hat man dokumentieren können, dass die Aktivierung der PLA<sub>2</sub> durch z.B. Kalziumeinstrom, DAG und PKC erfolgen kann (Brooks et al. 1989, Felder et al. 1990). Weiterführend konnte eine gesteigerte Konstriktion an isolierten Trachealmuskelpräparaten der Ratte (Chand et al. 1988) und des Rindes (Takata et al. 1990) bei nur niedriger PLA<sub>2</sub> Aktivierung gezeigt werden. Die hierbei erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration wird auf die Synthese von Thromboxan A<sub>2</sub> zurückgeführt (Strek et al. 1992, Takata et al. 1990).

### 1.8.4 Sphingosin 1-Phosphat

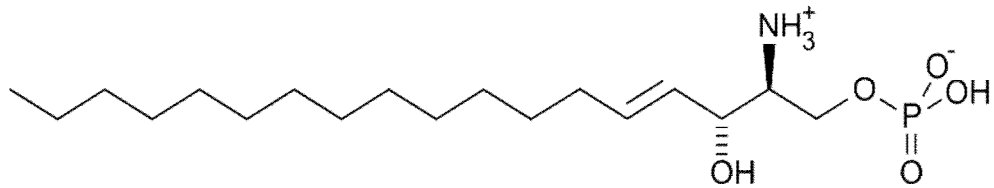


Abb. 1 Strukturformel Sphingosin 1-Phosphat

Sphingosin 1-Phosphat (S1P) ist ein Gewebehormon aus der Klasse der Lipidmediatoren. Es wird aus dem Sphingolipid Sphingomyelin gebildet, welches durch die Sphingomyelin-Phosphodiesterase unter Abspaltung eines Phosphocholinrests zu einem Ceramid (zu den Lipiden gehörende Untergruppe) wird (Barnholz et al. 1966, Chatterjee et al. 1989). Anschließend erfolgt durch die Ceramidase die Hydrolysierung zum Sphingosin (Yavin et al. 1969). Durch die SPHK1 wird unter Verbrauch eines Moleküls ATP ein Phosphatrest auf die Hydroxygruppe übertragen, wodurch S1P entsteht (Stoffel et al. 1974). Der Abbau kann zum Einem über die Abspaltung des Phosphates mittels S1P Phosphatasen erfolgen und andererseits durch Spaltung durch die S1P Lyase (Stoffel et al. 1974).

S1P weist als Signalmolekül vielfältige intra- und extrazelluläre Funktionen auf. Es ist unter anderem an der Zellproliferation, Zellmigration sowie Angiogenese beteiligt (Olivera et al. 1999, Pyne et al. 2000). Nachdem früher dem S1P überwiegend extrazelluläre Funktionen zugesprochen wurden, zeigten folgende Studien auch intrazelluläre Funktionen, beispielsweise in der Vermittlung der Kalziumfreisetzung (Young et al. 2001). Die Beteiligung an der intrazellulären Kalziumfreisetzung ist erstmalig an Rattenzellen demonstriert worden (Beaven et al. 1996). Es sind fünf spezifische S1P Rezeptoren bekannt (S1P/Edg-1, S1P/Edg-3, S1P/Edg-5, S1P/Edg-6, S1P/Edg-8) (Im et al. 2001). Die Rezeptoren sind zwischen Spezies hoch konserviert. Die Aminosäuresequenz des S1P/Edg-8 Rezeptors beim Menschen und der Maus stimmen zu 97 % überein (Im et al. 2001).

Extrazelluläres S1P moduliert ebenfalls die Kalziumspiegel von Zielzellen. Am Beispiel von glatten Muskelzellen der Lunge des Menschen konnte auch nach Vorbehandlung mit Thapsigargin, wodurch eine Entleerung der intrazellulären

Kalziumspeicher erfolgte, eine durch S1P vermittelte Kontraktion gezeigt werden (Rosenfeldt et al. 2003). Erst durch die Blockierung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle wurde die S1P-vermittelte Kontraktion geblockt (Rosenfeldt et al. 2003). Gleiche Ergebnisse wurden an glatten Muskelzellen im Bereich der peripheren Atemwege der Maus nach Stimulation mit Muskarin und Vorbehandlung mit Thapsigargin mit Hilfe der Videomorphometrie demonstriert (Struckmann 2006). Aufgrund der Effekte von S1P auf die glatte Muskulatur in der Lunge wurde die Hypothese aufgestellt, dass S1P als Mediator bei obstruktiven Lungenerkrankungen eine bedeutsame Rolle einnehmen könnte (Ammit et al. 2001). S1P scheint auch an pathologischen Prozessen beteiligt zu sein (Ammit et al. 2001, Rosenfeld et al. 2003). In der bronchoalveolären Lavage bei Menschen wurde 24 h nach einem akuten Asthmaanfall ein signifikant erhöhter S1P Spiegel gezeigt (Ammit et al. 2001).

#### **1.8.5 Sphingosinkinase-1**

Die Sphingosinkinase-1 (SPHK1) ist eine der beiden Enzymisoforamen, welche S1P synthetisieren (Stoffel et al. 1974). Die Aktivierung war lange unklar. Am Beispiel von HEK293T Zellen konnte gezeigt werden, dass der Aktivator der PKC Phorbol-12-myristat 13-acetat (PMA) die SPHK1 aktiviert (Johnson et al. 2002). Nach Aktivierung erfolgt eine Translokation der SPHK1 in die Zellmembran (Danneberg 2004, Johnson et al. 2002). Nachgewiesen werden konnte die SPHK1 im Bereich der Zellmembran (Johnson et al. 2002). Ein indirekter Nachweis der intrazellulär vermittelten Aktivierung der SPHK1 erfolgte durch Vorinkubation der Zellen mit den bekannten PKC-Inhibitoren Bisindoylmaleimide und Calphostin C. Hierdurch konnte ein signifikanter Abfall des intrazellulären S1P gemessen werden (Johnsson et al. 2002). Weiterführend konnte auch an HEK293T Zellen durch Hemmung der SPHK1 mit DL-Threo-Dihydrosphingosin (DHS) und N,N-Dimethylsphingosin (DMS) die durch mAChR2 und mAChR3 vermittelte Kalziumfreisetzung gehemmt werden (Meyer zu Heringsdorf et al. 1998). Einfluss von SPHK1 auf das broncholuminale Verhalten im Bereich der peripheren Atemwege konnte am Beispiel von asthmakranken Mäuselungen gezeigt werden. Nach Gabe von Muskarin und Inhibierung der SPHK1 durch DMS konnte ein deutlich abgeschwächtes Asthma bronchiale dokumentiert werden. Zum klinischen Bild

korrelierend zeigte die bronchoalveoläre Lavage signifikant erniedrigte Entzündungszellen (Lai et al. 2008). Gleiche Ergebnisse mit Inhibierung der Entzündungszellen wurden nach Inhalation von DMS bei asthmakranken Mäuselungen demonstriert (Nishiuma et al. 2008).

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tiere**

Die Untersuchungen wurden an ca. 80 männlichen und weiblichen FVB-Mäusen im Alter von 4 -12 Wochen mit einem Gewicht zwischen 20 und 35 g durchgeführt. Bezogen wurden die Tiere über die Firma Harlan Winkelmann GmbH in Borchon. Die Tiere waren in Makrolonkäfigen im Versuchstierstall des Instituts für Physiologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen unter Standardbedingungen untergebracht.

### **2.2 Pharmaka**

#### **2.2.1 Natrium-Nitroprussid**

Natrium-Nitroprussid: Schwarz-Pharma, Monheim, Deutschland

Die Ampulle mit 42,75 g Trockensubstanz, entsprechend 60 mg Natrium-Nitroprussid x 2H<sub>2</sub>O, wurde in 20 ml Wasser ad injectabilia gelöst und in einem dunklen Plastikröhrchen (Greiner-Röhrchen) bei 4 °C gelagert. Von dieser Lösung wurden jeweils 149 µl mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und direkt in der Inkubationszelle der Spüllösung für die Lungengefäße zugesetzt.

#### **2.2.2 Penicillin/Streptomycin**

Die Ampulle mit 100 ml der Mischung von Penicillin und Streptomycin (jeweils 10 000 Units/10mg/ml) der Firma PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich, wurde in 1 ml Portionen aliquotiert und anschließend tiefgefroren.

#### **2.2.3 Natrium-Heparin**

Die Durchstechflaschen mit 5 ml Liquemin 25.000 I.E./5 ml (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Weylen, Deutschland) wurden unter sterilen Bedingungen

aliquotiert und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Hiervon wurden 200 µl (1000 I.E.) für die Spüllösung der Lungengefäße hinzugesetzt.

#### **2.2.4 Agarose**

Als Agarose wurde Low Melt Preparative Grade Agarose (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verwendet. Unmittelbar vor der Verwendung wurden 160 mg in 10 ml Krebs-Ringer gelöst und durch mehrfaches Aufkochen eine Lösung hergestellt. Bis zu ihrem Gebrauch wurde diese Lösung bei 37 °C im Inkubator gelagert. Zum Füllen der Luftwege wurden etwa 2-3 ml dieses 1,6%-igen Agarosegels über die Trachea in die Luftwege der Maus gefüllt, wo es unter Kühlung aushärtete.

#### **2.2.5 Muskarin**

Als muskarinischer Rezeptoragonist wurde Muskarinchlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) verwendet und laut Angaben des Herstellers in Aqua ad injectabilia gelöst. Angefertigt wurden Aliquots zu je 100 µl in einer Konzentration von  $10^{-2}$  M und  $10^{-4}$  M, die bei -20 °C tiefgefroren wurden. Die Endkonzentration in der Inkubationskammer betrug stets  $10^{-6}$  M.

#### **2.2.6 U46619**

Das Thromboxan A<sub>2</sub>-Analogon U46619, Molekulargewicht 350,5 g/mol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), war bereits in Ethanol gelöst und auf eine Konzentration von  $10^{-3}$  M verdünnt. Davon wurden Aliquots zu je 40 oder 100 µl bei -20 °C tiefgefroren. Im Vorfeld der eigentlichen Versuchreihe wurden Verdünnungsreihen zur Ermittlung der Konzentration mit der stärksten Konstriktion der Bronchiolen in der Inkubationszelle getestet, wobei sich Endkonzentrationen von  $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  M ergaben. Im späteren Verlauf wurde U46619 als Kontrollsubstanz in einer Endkonzentration von  $10^{-5}$  M in der Zelle eingesetzt.

### **2.2.7 DL-Threo-Dihydrosphingosin**

Die Trockensubstanz des Sphingosinkinase-1 Inhibitors, DL-Threo-Dihydrosphingosin, Molekulargewicht 301,5 g/mol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), wurde in Methanol gelöst und auf  $10^{-2}$  M bzw.  $10^{-4}$  M verdünnt. Hiervon wurden Aliquots zu je 100  $\mu$ l bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Die eingesetzten Konzentrationen betragen in der Verdünnungsreihe  $10^{-4}$  M bis  $10^{-10}$  M, ansonsten wurden  $10^{-6}$  M verwendet.

### **2.2.8 N,N-Dimethylsphingosin**

Als zweiter Inhibitor der Sphingosinkinase wurde N,N-Dimethylsphingosin, Molekulargewicht 327,6 g/mol (Biomol Research Laboratories GmbH, Hamburg, Deutschland), als Trockensubstanz verwendet. Diese wurde in Methanol gelöst und auf  $10^{-2}$  M bzw.  $10^{-4}$  M verdünnt. Aliquots zu je 100  $\mu$ l wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Die Endkonzentrationen während der Versuche betragen in der Verdünnungsreihe  $10^{-4}$  M bis  $10^{-10}$  M, ansonsten  $10^{-6}$  M.

### **2.2.9 Lanthanchlorid Heptahydrat**

Lanthanchlorid Heptahydrat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurde in Wasser gelöst. Der Inhibitor von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen sowie von TRPC-Kanälen des Typs 1, 3, 6 und 7 und Aktivator von TRPC-Kanälen des Typs 4 und 5 wurde in Aliquots von 100  $\mu$ l mit einer Konzentration von  $10^{-4}$  M tiefgefroren. Er wurde in den Versuchen mit einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  M eingesetzt.

## **2.3 Lösungen**

### **2.3.1 Aqua ad injectabilia**

Als steriles Wasser diente Ampuwa für Injektionszwecke der Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland.

### **2.3.2 Spüllösung für Lungengefäße**

Als Spüllösung wurden in 20 ml Krebs-Ringer-Lösung 200 µl Natrium-Heparin (Liquemin) und 100 µl Penicillin/Streptomycin vermischt. Unmittelbar vor dem Spülen wurden noch 149 µl ( $75 \times 10^{-6}$  M) Nitroprussid-Natrium zugegeben.

### **2.3.3 Inkubationsmedium**

Zur Aufbewahrung der Schnitte und in der Inkubationszelle wurde steriles Earle's Minimal Essential Medium (MEM) der Firma PAA Laboratories eingesetzt, dem als pH-Indikator Phenolrot zugesetzt war.

### **2.3.4 Krebs-Ringer Lösung**

Für die Zubereitung von 1 Liter Krebs-Ringer-Lösung in einem Messzylinder wurden folgende Substanzen benötigt:

- Kaliumchlorid : 0,35 g,
- Natriumchlorid: 7,8 g,
- Natriumdihydrogenphosphat x 2H<sub>2</sub>O: 0,21 g,
- Natriumhydrogencarbonat: 1.37 g,
- Magnesiumsulfat x 7H<sub>2</sub>O: 0.15 g,
- D-Glucose: 1.4 g.

Die Substanzen wurden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst. Nach fünfminütiger Begasung mit Carbogen (95 Vol% Sauerstoff u. 5 % CO<sub>2</sub>) wurden 2,8 ml Kalziumchlorid-Lösung (1 M) zugesetzt. Anschließend wurde der pH auf 7,4 eingestellt und die Lösungen steril filtriert. Alle hier genannten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

### **2.3.5 Hepes-Ringer-Lösung**

Für die Zubereitung von 1 Liter Hepes-Ringer-Lösung in einem Messzylinder wurden folgende Substanzen verwendet:

- Kaliumchlorid: 0,418 g,
- Natriumchlorid: 7,97 g,
- Magnesiumchlorid x 2 H<sub>2</sub>O (1 M): 1 ml,

- Kalziumchlorid x 2 H<sub>2</sub>O (1 M): 2,2 ml,
- D-Glucose: 1,98 g,
- Hepes: 2,38 g.

Die Substanzen wurden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurden 4,6 ml NaOH (1 N) hinzugegeben und die Lösung auf einen pH von 7,4 eingestellt. Zum Schluss wurde die Lösung steril filtriert. Die hier angeführten Substanzen wurden von den Firmen Merck in Darmstadt (Deutschland) und Sigma Aldrich in Steinheim (Deutschland) bezogen.

## **2.4 Gebrauchsgegenstände und Geräte**

### **2.4.1 Mikrotom**

Das Mikrotom (Vibratom<sup>®</sup>, Vibrating Blade Tissue Slicer, VT 1000S, Leica, Bensheim, Deutschland) diente zur Herstellung von 200 µm dicken vitalen Gewebeschnitten. Dabei wurde das Gewebe auf eine Metallplatte aufgeklebt und durch Kork an der Rückseite gestützt, welches somit als Widerlager diente. Die Platte wurde in der im Vorfeld mit Hepes-Ringer aufgefüllten Wanne arretiert. Die Wanne war über ein Schlauchsystem an ein Kühlaggregat angeschlossen, welches das Medium auf 4 °C kühlte. Die Wanne stellt den statischen Teil des Vibratoms dar. Als Schneidewerkzeug diente eine halbe Rasierklinge, die in eine auf einem beweglichen Schlitten montierte Haltevorrichtung eingespannt wurde. Dieser stellte den mobilen Teil des Vibratoms dar. Der Schlitten bewegte sich in axialer Richtung auf das Gewebe zu, wobei das Schneidewerkzeug senkrecht dazu in horizontaler Ebene mit feinsten hochfrequenten Bewegungen vibrierte. Dabei bestand die Möglichkeit, die Vibrationsfrequenz, die Schnittdicke sowie den axialen Vorschub individuell einzustellen.

### **2.4.2 Die Inkubationskammer**

Die Untersuchung des Konstriktionverhaltens der Bronchiolen auf verschiedene Substanzen erfolgte in einer hierfür aus Plexiglas hergestellten Kammer (Firma Hugo Sachs Elektronik, March) mit zwei Inkubationszellen. Die Kammer war auf dem Objektisch eines Mikroskops (Leica, DMIL) montiert. Eine Digitalkamera (Firma Stemmer, Puchheim, Deutschland) übertrug die Bilder aus der



Versuchszelle auf den Bildschirm eines PC. Dort wurden die Bilder von einer speziellen Software, Optimas Version 6.5, Firma Stemmer, Puchheim, Deutschland, abgespeichert.

Die beiden Inkubationszellen befanden sich im Zentrum der Kammer und konnten durch ein Wasserbad temperiert werden. Zur Einstellung einer konstanten Temperatur wurde dieses ca. 15 Minuten vor Versuchsbeginn eingeschaltet. Damit wurden die Inkubationskammern sowie die Hapes-Ringer Lösung auf eine physiologische Temperatur auf 37°C erwärmt.

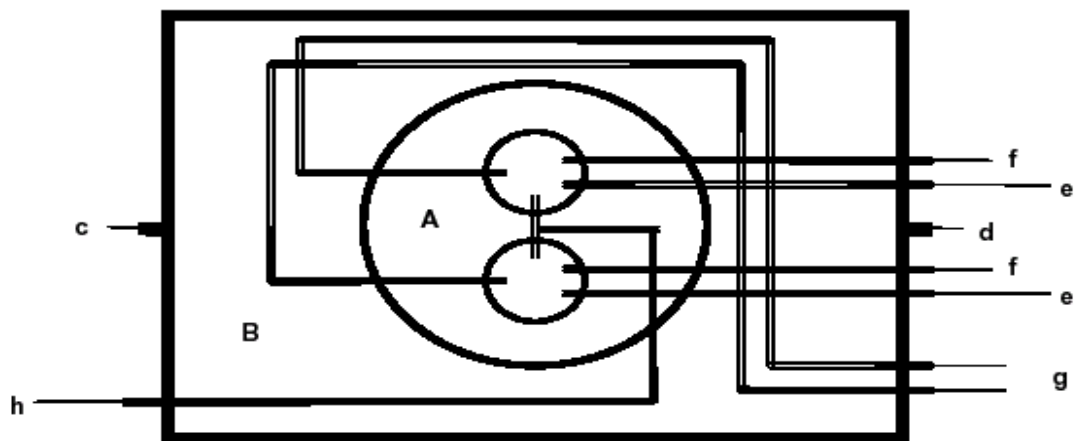


Abb. 2 Schema der Inkubationskammer

- A Innenraum der Kammer mit zwei Inkubationszellen
- B Wasserbad
- c Wassereinlauf
- d Wasserablauf
- e Zulauf
- f mit einer Spritze manuell zu bedienender Abfluss
- g Ablauf

Nur eine der beiden Inkubationskammern diente als Versuchszelle für die Lungenschnitte und nur diese war mit Medium gefüllt. Durch einen Überlauf wurde die Menge an Nährlösung in der Versuchszelle auf 2 ml konstant gehalten. In einem externen temperierten Vorratsgefäß wurde 1 l Hapes-Ringer-Lösung mit Normoxie-Gasgemisch (78 % Stickstoff, 21 % Sauerstoff, 1 % Edelgase, 0,035 % Kohlestoffdioxid) begast und durch ein Pumpsystem

(Gilson°, Miniplus 3, Abimed, Langenfeld, Deutschland) in die Inkubationskammer gepumpt und anschließend entsorgt. Der Lungenschnitt wurde mit Hilfe eines Metallbügels fixiert. Die Pumpe sorgte für einen kontinuierlichen Durchfluss des Mediums in der Kammer. Die Zugabe der zu testenden Substanzen erfolgte nach Abstellen der Pumpe durch direkte Gabe in das Medium der Inkubationszelle. Über den Ablauf wurde beim Spülvorgang über fünf Minuten das Medium aus der Zelle abgeleitet und verworfen, wobei die Versuchszelle von allen hinzugegebenen Substanzen befreit wurde.

## **2.5 Methoden**

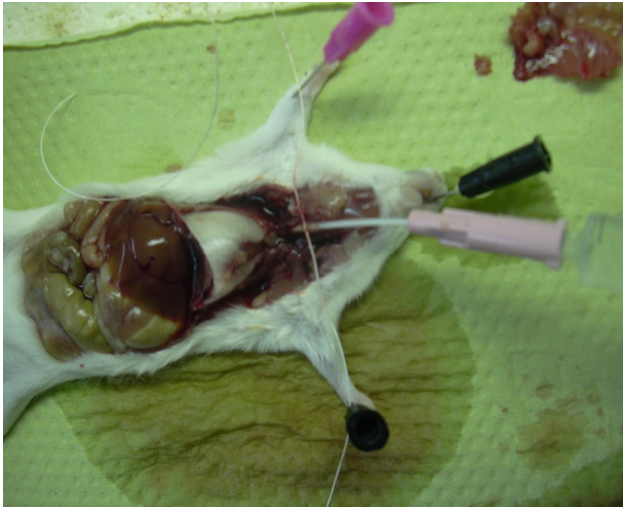
### **2.5.1 Vorbereitung der verwendeten Medien und Pharmaka**

Im Vorfeld der Präparationen wurden Medien und Pharmaka vorbereitet. Zum Befüllen der Atemwege wurden 160 mg Agarosepulver durch mehrfaches Aufkochen in Lösung gebracht. Für die Spüllösung wurden 20 ml Krebs-Ringer Lösung, 200 µl Liquemin sowie 100 µl Penicillin/Streptomycin benötigt. Dieser Ansatz diente als Spüllösung für die Lungengefäße. Vor dem direkten Einsatz wurden noch 149 µl Natrium-Nitroprussid der Lösung zugegeben. Für das Inkubationsmedium wurden 50 ml Krebs-Ringer Lösung mit 500 µl Penicillin/Streptomycin versetzt. Alle Lösungen wurden in Glasgefäßen zubereitet und im Inkubator bei einer physiologischen Temperatur von 37 °C aufbewahrt. Das Inkubationsmedium wurde mit einem Normoxie-Gasgemisch (s.o.) begast. Ein Gefäß wurde mit 40 ml Krebs-Ringer Lösung gefüllt und anschließend auf Eis gelagert. Es diente zum Aushärten der agarosegelhaltigen Lunge.

### **2.5.2 Präparation der Maus**

Nach Tötung der Maus durch Genickbruch mit einer Pinzette und Fixierung mit Kanülen in Rückenlage auf einer Styroporplatte wurde die Haut vom Nabel bis zum Unterkiefer und das Bauchfell bis zum Rippenbogen aufgeschnitten. Durch Punktion der Bauchaorta mit einer Scherenspitze erfolgte das Ausbluten. Das Zwerchfell wurde an der seitlichen Brustwand (Recessus costodiaphragmaticus) eingeschnitten, damit die Lunge kollabierte. Anschließend

erfolgte durch Präparation mit einer Schere an der Knochen-Knochen-Knorpel-Grenze und Durchtrennung beider Schlüsselbeine die Entfernung des Rippenschilds inklusive Brustbein. Nach Freilegen der Luftröhre und Inzision derselben möglichst weit cranial wurde die linke Herzkammer mit der Scherenspitze eröffnet, um einen Abfluss der Spüllösung aus den



Lungengefäßen zu gewährleisten: Die Spülung der Lungengefäße erfolgte mittels einer Pumpe mit 20 ml Krebs-Ringer-Lösung + 100 µl Penicillin/Streptomycin + 200 µl Liquemin + 149 µl Na-Nitroprussid. Durch Einführen einer Kanüle, die über Kunststoff-Schläuche mit einer Pumpe verbunden war, in die rechte

Abb. 3 Maus in Rückenlage mit eröffnetem Bauch und Brustraum. Sichtbar von cranial Herz, Lunge, Leber sowie der Darm. Trachea mit einer Kanüle zum Befüllen mit Agarose punktiert.

Herzkammer bis kurz vor die Lungenarterie, wurden die Lungengefäße ausgewaschen. Der Spülvorgang erfolgte so lange, bis sich die Lunge sichtbar weiß färbte. Danach wurde die Lunge durch eine Öffnung in der Luftröhre (Tracheotomie) über eine Kanüle der Größe 1,1 x 33 mm, (Vasocan, Braunüle, Fa. B. Braun Melsungen, Deutschland) mit 2-3 ml Agarose bis zu ihrer vollständigen Entfaltung gefüllt. Das Kanülen-Röhrchen wurde durch einen um die Luftröhre geschlungenen Ligaturfaden fixiert. Nach vollständiger Füllung der Lunge wurde die Kanüle entfernt und die Luftröhre durch Anziehen des Ligaturfadens verschlossen. Nach abschließender Herauspräparation des Lungen-Herz-Pakets wurde dieses zur Aushärtung der Agarose sofort in eiskalte Krebs-Ringer-Lösung überführt.

### 2.5.3 Schneiden der Lunge

Die gekühlte Wanne des Mikrotoms, Vibratom<sup>o</sup>, Vibrating Tissue Slicer, VT 1000S, Firma Leica, Bensheim, Deutschland, wurde mit knapp 200 ml Hebes-

Ringer-Lösung gefüllt. Eine halbierte Rasierklinge diente als Schneidemesser. Als Halterung für den Lungenlappen diente ein Korkestück, welches auf einem kreisrunden Objektträger aufgeklebt (UHU GmbH, Bühl, Deutschland) und in die Schneidevorrichtung eingespannt wurde.

Nach den Vorbereitungen wurde ein kompletter Lungenlappen aus dem auf 4 °C abgekühlten und dadurch ausgehärteten Lunge-Herz-Paket mit einer kleinen Schere herauspräpariert. Der Lungenlappen wurde so auf einen Objektträger geklebt, dass er mit seiner Zwerchfellseite dem Korken auflag. Zur Herstellung der Lungenschnitte wurden der rechte obere und der linke Lungenlappen verwendet. Der bestückte Objektträger wurde nun in die Wanne des Vibratoms eingelegt, so dass der Lungenlappen vollständig untertauchte. Nach Einstellen des Vibratoms auf eine Schnittdicke von 200–250 µm und des Programms für fortlaufende Schnitte auf eine gerätspezifische Vortriebgeschwindigkeit der Klinge von 5–6 sowie auf eine Vibrationsfrequenz dieser Klinge von 9-10 pro Sekunde wurden die Lungenlappen geschnitten. Die erhaltenen Schnitte wurden bis zur Beendigung des kompletten Schneidevorganges in der Wanne belassen. Danach wurden die Lungenschnitte in 50 ml einer auf 37 °C vorgewärmten und mit 500 µl Penicillin/Streptomycin versetzten Krebs-Ringer-Lösung überführt, die mit Normoxie-Gasgemisch begast wurde.

#### **2.5.4 Inkubation der Lungenschnitte**

Nach Abschluss des Schneidevorgangs wurden die Schnitte mit Hilfe einer Pinzette in ein Becherglas mit Inkubationsmedium überführt. Die Gewebeschnitte verblieben 2-4 Stunden in diesem begasten (Normoxie-Gasgemisch) Medium im 37 °C warmen Inkubationsschrank zur vollständigen Ausspülung der Agarose aus den Luftwegen. Das Ende dieses Vorgangs war am Absinken der Lungenschnitte auf den Boden des Gefäßes erkennbar.

#### **2.5.5 Videomorphometrie**

Für die Erfassung der Änderungen der Atemwegsweite wurde ein Mikroskop mit integrierter Digitalkamera und angeschlossener Auswertungs-Software, Optimas, Version 6.5, Firma Stemmer, Puchheim, verwendet. Über die Digitalkamera wurden die Ansichten der Gewebeschnitte auf den Computer

übertragen und dort von einem Programm (Optimas) ausgewertet. Für die Untersuchung wurde aus dem Inkubationsmedium ein Lungenschnitt entnommen und in die Versuchszelle eingelegt. Dabei lief die Pumpe mit 2-4 ml/min, wodurch der Schnitt kontinuierlich mit frischer HEPES-Ringer-Lösung umspült wurde und sich dadurch adaptieren konnte. Anschließend wurde der Schnitt unter dem Mikroskop durchmustert und ein Lungenareal mit einem geeigneten Bronchus/Bronchiolus (100-400 µm Durchmesser) sowie intaktem Gewebeverband eingestellt. Der Bronchiolus musste frei von Agarosegel, Blutzellen und Zelltrümmern sein. Weiterführend stellte bei der Beobachtung die Zilienbewegungen ein weiteres Kriterium zur Vitalitätsbeurteilung dar. Die Aktivität der Zilien blieb über vier Tage Inkubation erhalten. Die Schnitte für diese Versuchsreihe wurden bis maximal 24 Stunden nach Präparation verwendet.

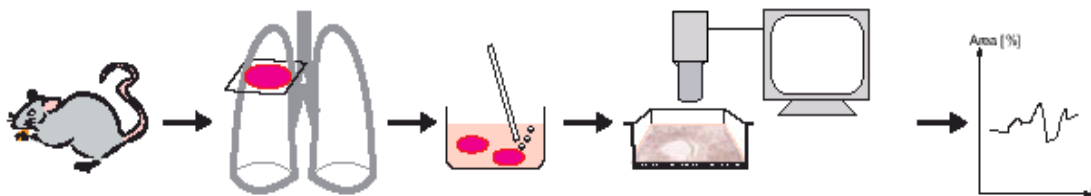


Abb. 4 Darstellung der einzelnen Schritte: Maus, Herstellung der Lungenschnitte, Inkubation, mikroskopische Auswertung und graphische Darstellung.

Zu Beginn der Messungen wurde eine Aufnahme des Bronchiolus als Referenzbild gemacht. Hieraus wurde der Ausgangswert für die späteren Untersuchungen erhalten. Im weiteren Verlauf wurde durch das Programm stets ein Bild pro Minute gemacht. Danach wurde die Pumpe ausgestellt und es erfolgte die Applikation der Kontrollsubstanz, z.B. Muskarin, in die Versuchszelle. Nach 15 min erfolgte eine 30-minütige Spülphase, in der das Pharmakon wieder aus der Versuchszelle ausgespült wurde. Im weiteren Verlauf wurden je nach Versuch zunächst die Hemmstoffe bzw. deren Trägermedium zunächst für 10 min eingesetzt. Anschließend erfolgte die gemeinsame Applikation des Hemmstoffs und des eingesetzten Pharmakons. Mit Hilfe des Rapid-Programms der Pumpe war es möglich, die Prüfsubstanzen innerhalb von 10 min auszuspülen. Am Monitor zeigte sich das Ende der Spülphase durch eine erneute Weitstellung des Bronchiolus.

## 2.5.6 Bildauswertung an videomikroskopisch untersuchten Lungenschnitten

Bei mikroskopischen Untersuchungen an Geweben ergibt sich als erstes das Problem der Auswahl des Bildausschnittes bzw. der Auswahl der gewünschten Gewebestruktur. Für die Untersuchungen sollte im Bildausschnitt ein Bronchiolus möglichst im Querschnitt vorliegen. Auch sollte die gesamte Gewebestruktur des Wandaufbaus intakt sein. Zusätzlich war bei 400-facher Vergrößerung die Zilienaktivität erkennbar und diente als Zeichen der Vitalität. Ein weiteres Auswahlkriterium stellte auch der Durchmesser der Bronchioli dar. Herangezogen für unsere Untersuchungen wurden nur Bronchioli mit einem Durchmesser zwischen 100-400  $\mu\text{m}$ .

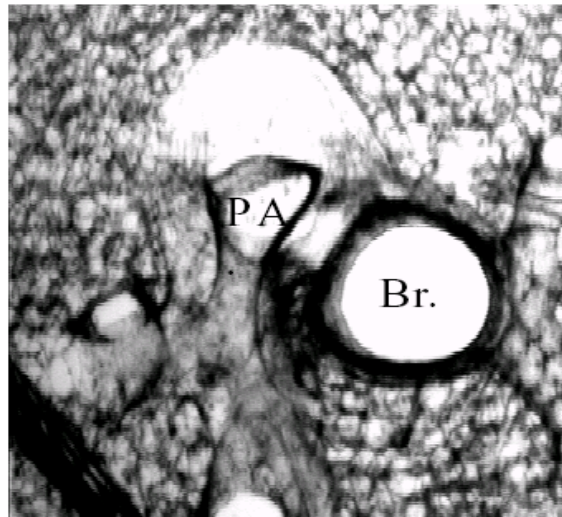


Abb. 5 Videomikroskopische Aufnahme eines 220  $\mu\text{m}$  dicken Lungenschnittes der Maus. Man sieht einen quer angeschnittenen Bronchiolus (Br.) sowie eine Pulmonalarterie (PA), die durch den Schneidevorgang teilweise aus ihrem Gewebezusammenhang gelöst wurde.

Außerdem sollten funktionelle glatte Muskulatur vorhanden sein. Durch Kontrollversuche mit der Zugabe von Muskarin in die Nährlösung und Erfassung der resultierenden Bronchokonstriktion wurde dies nachgewiesen. Die Reaktion auf Muskarin diente als Referenzwert.

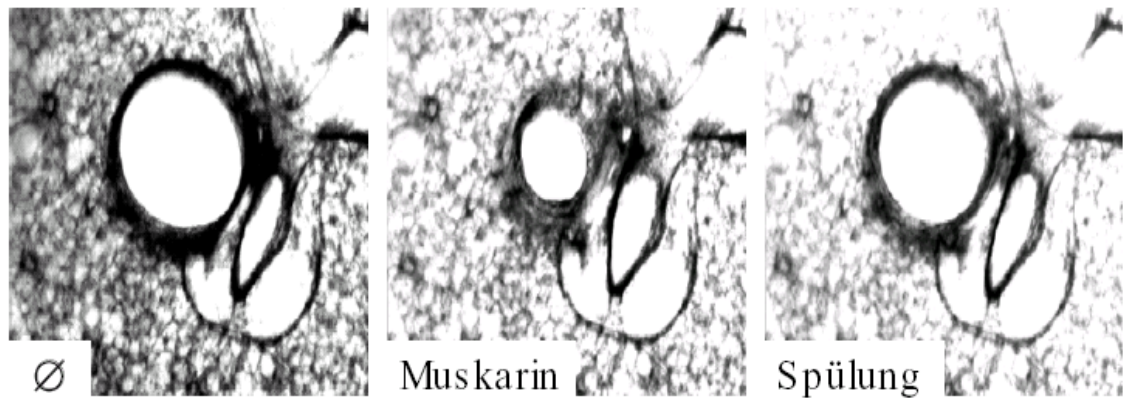


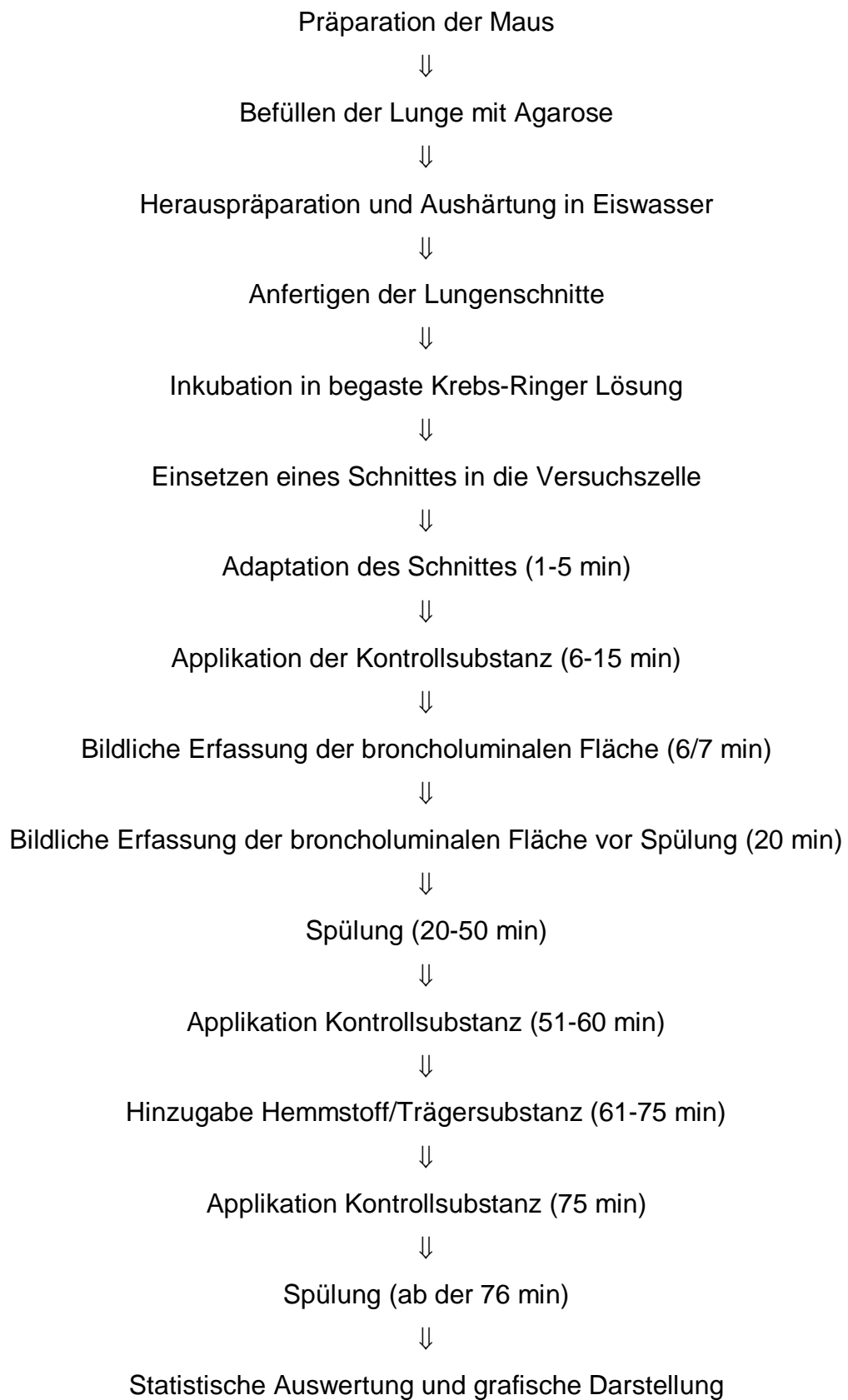
Abb. 6 Videomikroskopische Aufnahmen eines 220  $\mu\text{m}$  dicken Lungenschnittes der Maus. Links: peripherer Bronchiolus und eine benachbarte Pulmonalarteriole vor Applikation von Muskarin  $10^{-4}$  M. Mitte: Fläche des gleichen Bronchiolus nach Applikation von Muskarin  $10^{-4}$  M und fünf Minuten Einwirkzeit. Rechts: Relaxation des Bronchiolus nach 15-minütiger Spülung mit dem Medium.

Nach Abschluss eines Versuch wurde die Fläche des Bronchiolus auf jedem der minütlich gemachten Bilder durch die Software automatisch markiert und vermessen. Zur Kalibrierung wurde ein Eichmaßstab mit erfasst und es wurde auf die originalen Größenverhältnisse zurückgerechnet. Es wurden sowohl der Flächeninhalt als auch der Durchmesser des Bronchiolus erfasst. Das Ausgangsbild diente als 100 %-Wert.

### 2.5.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 9.0 der SPSS GmbH Software in München. Dies umfasste die Ermittlung der arithmetischen Mittelwerte, der Standardabweichungen und die Ermittlung des Fehlers der Mittelwerte. In einem nicht-parametrischem Test für unabhängige Stichproben nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney wurde die statistische Signifikanz der beobachteten Differenzen geprüft. Als Signifikanzniveau wurde dabei mit  $p \leq 0.05$  gearbeitet. Werte ( $p > 0.05$ ) wurden als nicht signifikant eingestuft und in folgenden Tabellen mit *ns* betitelt.

## 2.5.8 Flussdiagramm des Versuchsablaufs





### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Referenzmessungen mit Muskarin $10^{-6}$ M

Eine wichtige Grundlage für die Untersuchungen war der Nachweis der Stabilität des Prüfsystems. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe hatte sich die Muskarinkonzentration von  $10^{-6}$  M als die Konzentration mit dem maximalen Effekt erwiesen. Andere Arbeitsgruppen erzielten mit dem ACh-Analogen Metacholin vergleichbare Ergebnisse (Martin et al. 1996). In Vorversuchen konnte nachgewiesen werden, dass nach Applikation von Muskarin  $10^{-6}$  M, Spülung und erneuter Muskarinapplikation der Bronchiolus vergleichbar kontrahierte. In der Grafik (Abb. 7) wurde das broncholuminale Verhalten bei unterschiedlichen Diametern nach Applikation von Muskarin  $10^{-6}$  M dargestellt. Zu erkennen ist das reproduzierbare Verhalten der jeweiligen Bronchioli nach Applikation von Muskarin  $10^{-6}$  M in der 6. min, folgend Spülung und erneuter Gabe in der 61. min.

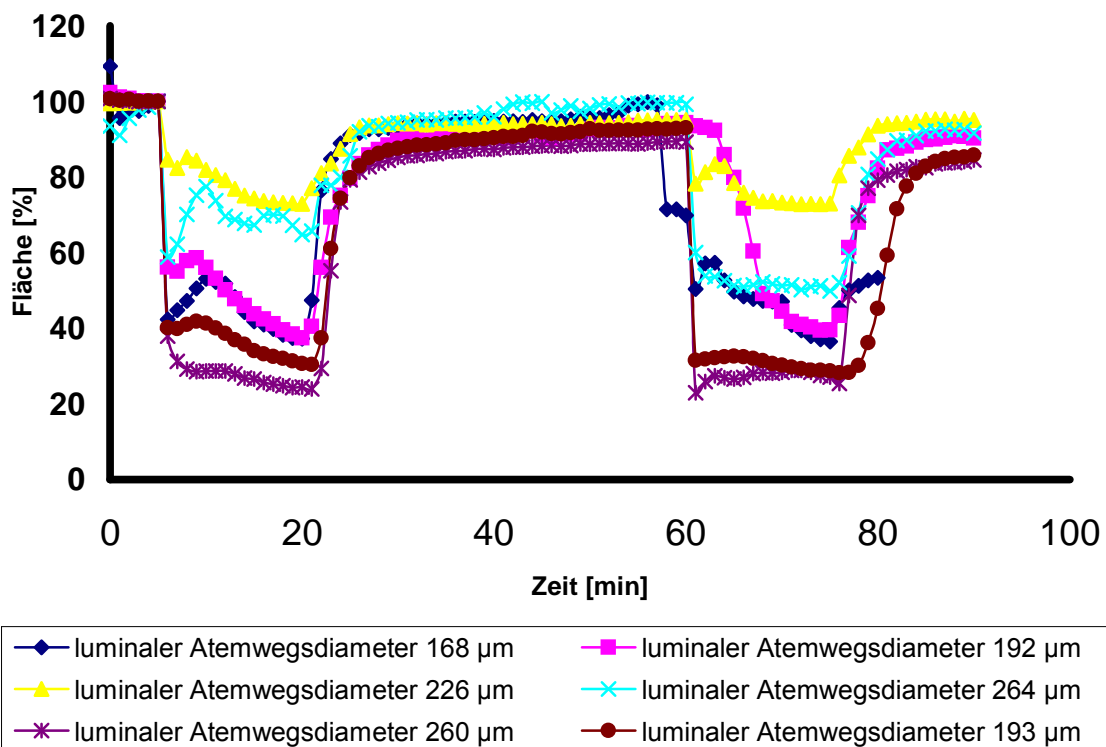


Abb. 7 Broncholuminale Flächenänderung auf Muskarin  $10^{-6}$  M nach 4 h Inkubationszeit

bei unterschiedlichen Atemwegsdiametern (n=6). Die erste Applikation erfolgte in der 6. min und folgend Spülung ab der 21. min. Zweite Applikation in der 61. min und Spülung ab der 76. min.

Nachfolgend wurde das Konstriktionsverhalten auf wiederholte Muskaringabe nach 4 h, 12 h und 24 h Inkubation ermittelt. Hierbei konnte ein relevanter Unterschied ausgeschlossen werden (vgl. Tab. 1, S. 43, Abb.8).

Inkubationszeit vor Muskaringabe (h)	Fläche der Bronchioli [ $\mu\text{m}^2$ ]	Initialkonstriktion nach Muskaringabe im Vergleich zur Ausgangsfläche in % +/- SEM (6/7 min)	luminale Fläche der Bronchioli vor Ausspülung des Muskarin im Vergleich zur Ausgangsfläche in % +/- SEM (20 min)	Anzahl der Versuche/ Mäuse
4	220	52 +/- 7	44 +/- 8	6/4
12	211	63 +/- 8	47 +/- 5	8/6
24	278	48 +/- 9	46 +/- 9	8/7

Tab. 1 Broncholuminales Verhalten auf Muskaringabe in Abhängigkeit von der Inkubationszeit vor Versuchsbeginn.

### 3.1.1 Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli nach 4 h Inkubation

Hier wurden in sechs Experimenten Lungenschnitte von insgesamt vier Mäusen genutzt. Der Durchmesser der untersuchten Bronchioli betrug  $220 \pm 15 \mu\text{m}$ . Die Veränderungen der luminalen Fläche des Bronchiolus wurden relativ zum Ausgangsdurchmesser (100 %) in Prozent erfasst.

Nach einer Adaptionszeit von 5 min erfolgte die erste Muskaringabe  $10^{-6} \text{ M}$ , nach der sich die luminale Fläche des Bronchiolus innerhalb der ersten Minute auf fast die Hälfte des Ausgangswertes reduzierte ( $52 \pm 7 \%$ , S.43, Abb. 8). In den folgenden Minuten (7. bis 8. min) erweiterte sich die luminale Fläche transient um ca. vier Prozent auf  $57 \pm 9 \%$  (Abb. 8). Anschließend zeigte der Bronchiolus eine langsame und kontinuierlich zunehmende Konstriktion. Zum Ende der ersten Applikation (20. min nach Versuchsbeginn) war die luminale Fläche des Bronchiolus auf  $44 \pm 8 \%$  des Ausgangswertes verringert (Abb. 8). Nach Spülung (Auswaschen des Muskarins) von der 21. bis zur 50. min erreichte die Fläche des Bronchiolus nahezu den Ausgangswert von  $93 \pm 3 \%$  (Abb. 8). Nun wurde Methanol, das Lösungsmittel für DHS und DMS, allein appliziert (51. bis 60. min, Abb. 9). Dies führte zu keiner Konstriktion des

Bronchiolus. Anschließend wurde in der 61. min Muskarin zusammen mit Methanol verabreicht. Dabei zeigte der Bronchiolus eine Konstriktion auf  $55 \pm 11$  % der Ausgangsfläche mit nachfolgender transientser Dilatation von  $2 \pm 11$  %. Im weiteren Verlauf der 15 Minuten langen Einwirkzeit setzte eine erneute und weiter fortschreitende Konstriktion ein und erreicht am Ende dieser Phase (75. min) den Minimalwert von  $42 \pm 7$  % (Abb. 8). Nach erneutem Auswaschen (76. bis 90. min) erreichte der Bronchiolus mit einer Dilatation auf 90 % nach 10 Minuten nahezu die Ausgangsfläche.

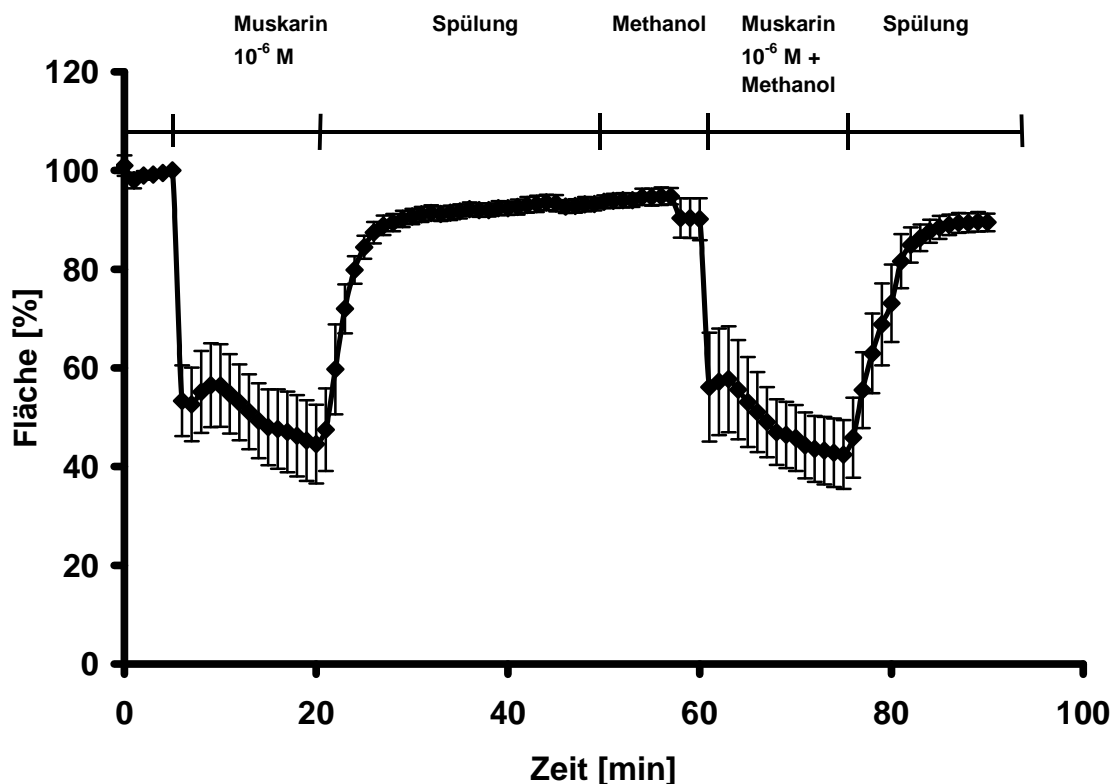


Abb. 8 Broncholuminale Flächenänderung auf Muskarin-gabe nach 4 h Inkubationszeit. Applikation von Muskarin  $10^{-6}$  M in der 6. min. Ausspülung von der 21. bis 50. min. Gabe von Methanol in der 51. min sowie zusammen mit Muskarin  $10^{-6}$  M in der 61. min. Ausspülung der Stoffe ab der 76. min. Zusammenfassung von 6 Experimenten.

### 3.1.2 Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli nach 12 h Inkubation

In dieser Versuchsreihe wurden in acht Experimenten Lungenschnitte von sechs Mäusen eingesetzt. Der Ausgangsdurchmesser der Bronchioli betrug  $211 \pm 2$   $\mu$ m. Nach einer Adaptionszeit von fünf Minuten erfolgte in der 6. min die

erste Muskarinabgabe. In den folgenden 15 Minuten der Einwirkzeit verengte sich die luminale Fläche des Bronchiolus auf  $63 \pm 8$  % des Ausgangswertes (S. 44, Abb. 9). Im weiteren Verlauf nahm die Konstriktion kontinuierlich zu und erreichte am Ende dieser Applikationsphase (20. min) eine Reduktion der luminalen Fläche des Bronchiolus auf  $47 \pm 5$  %. Nach erneutem Auswaschen über 30 Minuten (21. bis 50. min) erreichte die Fläche des Bronchiolus nahezu den Ausgangswert ( $93 \pm 8$  %, Abb. 9). Die Gabe des Lösungsmittels Methanol (51. bis 60. min) hatte keinen Effekt. Auf erneute Gabe von Muskarin kontrahierten die Bronchioli auf  $62 \pm 7$  % der Ausgangsfläche. In den folgenden 10 Minuten nahm die Konstriktion zunächst um 10 % zu, stagnierte und zeigte nach 75 Minuten eine luminale Fläche des Bronchiolus von  $53 \pm 7$  % (Abb. 9). Im Anschluss (76. bis 90. min) wurde erneut mit Medium gespült, wodurch der Bronchiolus mit  $90 \pm 9$  % nahezu den Ausgangsdurchmesser erreichte.

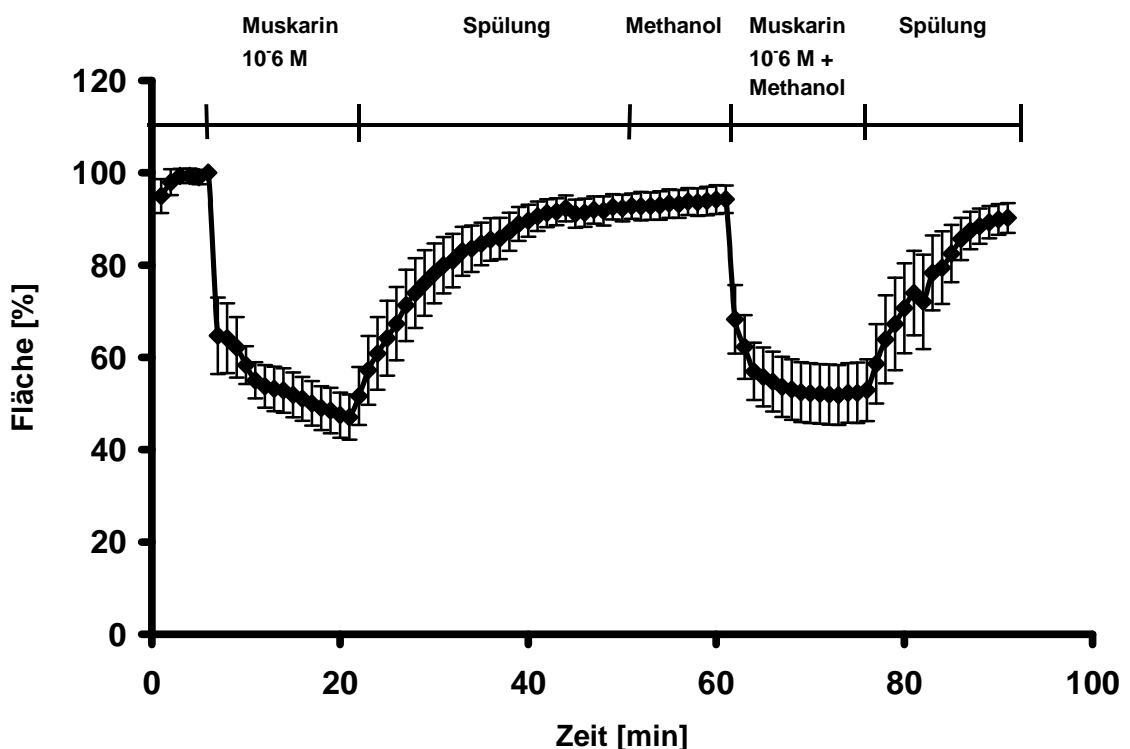


Abb. 9 Broncholuminale Flächenänderung auf Muskarinabgabe nach 12 h Inkubationszeit. Applikation von Muskarin  $10^{-6}$  M in der 6. min. Ausspülung von der 21. bis 50. min. Gabe von Methanol in der 51. min sowie zusammen mit Muskarin  $10^{-6}$  M in der 61. min. Ausspülung der Stoffe ab der 76. min. Zusammenfassung von 8 Experimenten.

### **3.1.3 Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli nach 24 h Inkubation**

Der Versuchsablauf entsprach dem der Experimente nach 4 h und 12 h Inkubation. In acht Versuchen wurden die Lungenpräparate von sieben Mäusen eingesetzt. Der Ausgangsdurchmesser der Bronchien betrug  $278 \pm 36 \mu\text{m}$ . Wie bisher erfolgte nach einer Adaptionszeit von fünf Minuten in der 6. min die erste Muskarinabgabe, mit der sich die luminale Fläche des Bronchiolus auf  $48 \pm 9 \%$  des Ausgangswertes reduzierte (S. 46, Abb. 10). Anschließend zeigte der Bronchiolus eine leichte Dilatation bis zur 13. min auf  $51 \pm 20 \%$  (Abb. 10), bevor er in eine langsame aber kontinuierlich zunehmende Konstriktion überging und nach 20 Minuten eine luminale Fläche von  $46 \pm 9 \%$  erreichte. Nach vollständiger Ausspülung des Muskarins (21. bis 50. min) erreichte die Fläche des Bronchiolus nahezu den Ausgangswert ( $92 \pm 3 \%$ , Abb. 10). Methanol hatte keinen Effekt. Auf Muskarin zusammen mit Methanol reduzierte sich die Fläche auf  $53 \pm 11 \%$  der Ausgangsfläche, gefolgt von einer transienten Dilatation und einer konstanten Reduktion auf  $57 \pm 11 \%$  des Ausgangswertes (Abb. 10). Nach vollständiger Ausspülung von Muskarin und Methanol (76. bis 90. min) erreichte der Bronchiolus mit einer Dilatation von  $93 \pm 4 \%$  nahezu den Ausgangswert.

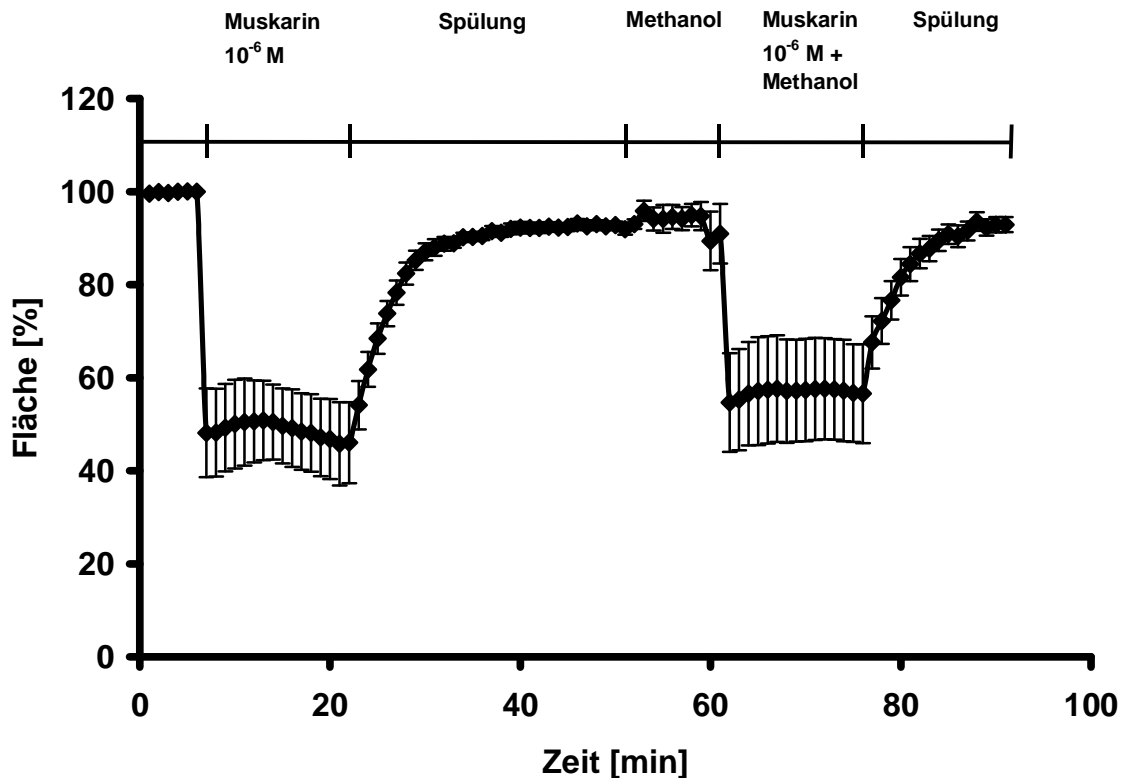


Abb. 10 Broncholuminale Flächenänderung auf Muskarinabgabe nach 24 h Inkubationszeit. Applikation von Muskarin  $10^{-6}$  M in der 6. min. Ausspülung von der 21. bis 50. min. Gabe von Methanol in der 51. min sowie zusammen mit Muskarin  $10^{-6}$  M in der 61. min. Ausspülung der Stoffe ab der 76. min. Zusammenfassung von 7 Experimenten.

### 3.2 Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe von Muskarin und DL-Threo-Dihydrosphingosin

Diese Versuchsreihe, in der Muskarin und DHS verabreicht wurden, bestand aus Untersuchungen an fünf Lungenschnitten von drei Mäusen. Der Durchmesser der Bronchien betrug  $205 \pm 26 \mu\text{m}$ . Nach einer Adaptionszeit von fünf Minuten erfolgte in der 6. min die erste Muskarinabgabe, mit der sich die luminalen Fläche des Bronchiolus auf fast die Hälfte des Ausgangswertes reduzierte ( $52 \pm 15 \%$ , S. 47, Abb. 11). In den folgenden Minuten (7. bis 12. min) der ersten Applikationsphase zeigte sich eine Dilatation von ca. 5%. Anschließend nahm im weiteren Verlauf die Konstriktion zu und reduzierte in der 20. min die luminalen Bronchialfläche auf  $41 \pm 12 \%$  (Abb. 11). Nach 30

Minuten Spülung mit Inkubationsmedium (21. bis 50. min) erreichte die Fläche des Bronchiolus nahezu den Ausgangswert ( $93 \pm 8\%$ , Abb. 11). Vor einer erneuten Applikation des Muskarins wurde nun DHS alleine appliziert (51. bis 60. min), was zu keiner erkennbaren Veränderung des broncholuminalen Durchmessers führte. In der 61. min wurde Muskarin zusammen mit DHS verabreicht. In den darauf folgenden Minuten zeigte sich ein Konstriktion, die in der 71. min mit  $63 \pm 9\%$  ihr Maximum erreichte, gefolgt von einer Dilatation auf  $66 \pm 8\%$ , bevor in der 76. min die Spülphase einsetzte, an deren Ende (76. bis 90. min) der Bronchiolus mit einer Dilatation von  $94 \pm 4\%$  nahezu den Ausgangswert erreichte.

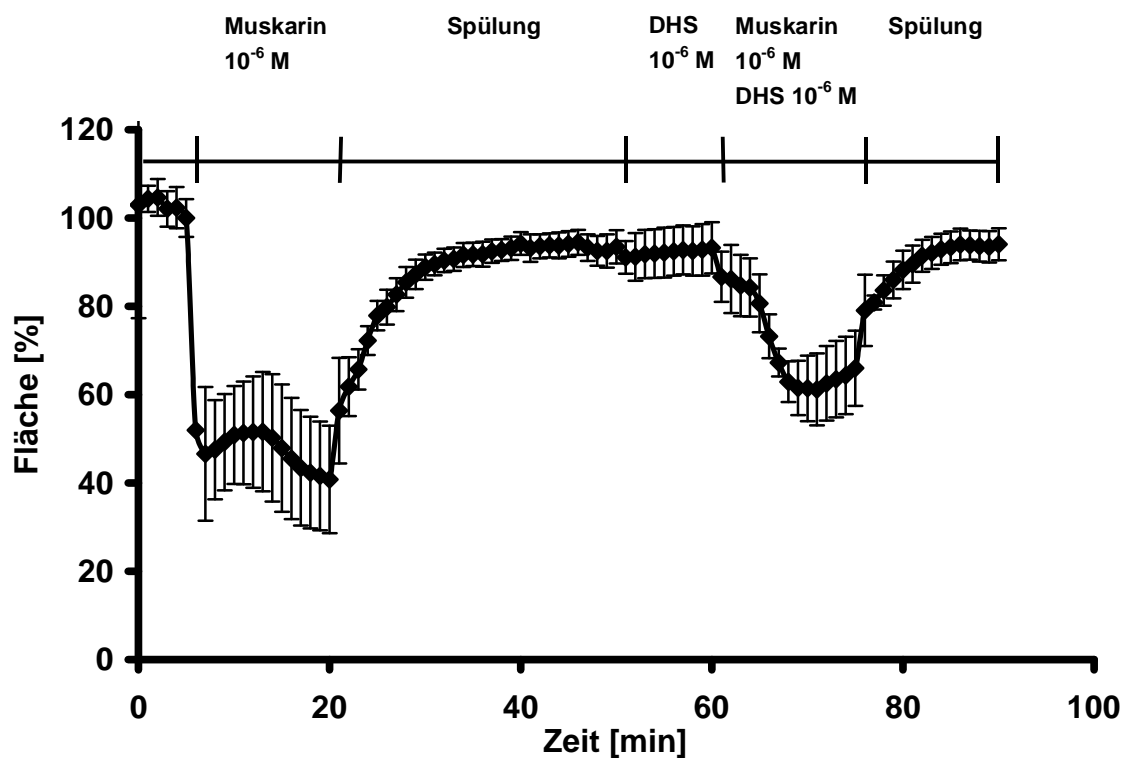


Abb. 11 Broncholuminale Flächenänderung auf Gabe von Muskarin  $10^{-6}$  M und DHS  $10^{-6}$  M nach 4 h Inkubationszeit. Applikation von Muskarin  $10^{-6}$  M in der 6. min. Spülung von der 21. bis 50. min. Gabe von DHS  $10^{-6}$  M in der 51. min sowie zusammen mit Muskarin  $10^{-6}$  M in der 61. min. Ausspülung der Stoffe ab der 76. min. Zusammenfassung von 5 Experimenten.

### **3.2.1 Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe von Muskarin und N,N-Dimethylsphingosin**

Diese Versuchsreihe, in der Muskarin und DMS verabreicht wurden, bestand aus Untersuchungen an sieben Lungenschnitten von drei Mäusen. Der Durchmesser der Bronchien betrug  $190 \pm 15 \mu\text{m}$ . Nach einer Adaptionszeit von fünf Minuten erfolgte in der 6. min die Gabe von Muskarin alleine, mit der sich die luminale Fläche des Bronchiolus innerhalb der 1. min nach Applikation um fast die Hälfte des Ausgangswertes ( $54 \pm 10 \%$ , S. 49, Abb.12) reduzierte. In den folgenden Minuten der ersten Einwirkzeit (6. bis 20. min) erfolgte eine gleichmäßige Zunahme der Konstriktion um weitere 24 % und erreichte in der 20. min eine Reduktion der luminalen Bronchialfläche ausgehend von der Ausgangsfläche auf  $30 \pm 7 \%$  (Abb.12). Nach vollständiger Ausspülung des Muskarins (21. bis 50. min) erreichte die Fläche des Bronchiolus nahezu den Ausgangswert ( $91 \pm 7 \%$ , Abb. 12). Vor einer erneuten Applikation des Muskarins wurde nun DMS alleine appliziert (51. bis 60. min), was zu keiner Änderung des Bronchiolusdurchmessers führte. In der 61. min wurde Muskarin zusammen mit DMS verabreicht. Initial vollzog sich eine Konstriktion auf  $65 \pm 6 \%$  der Ausgangsfläche (Abb. 12). In den nachfolgenden Minuten dieser Einwirkphase zeigte sich eine kontinuierlich weitere zunehmende Konstriktion um 17 % auf  $48 \pm 9 \%$  der Ausgangsfläche (75. min, Abb. 12). Nach vollständiger Ausspülung von Muskarin und DMS (76. bis 90. min) erreichte der Bronchiolus mit einer Dilatation von  $87 \pm 3 \%$  nahezu den Ausgangswert.



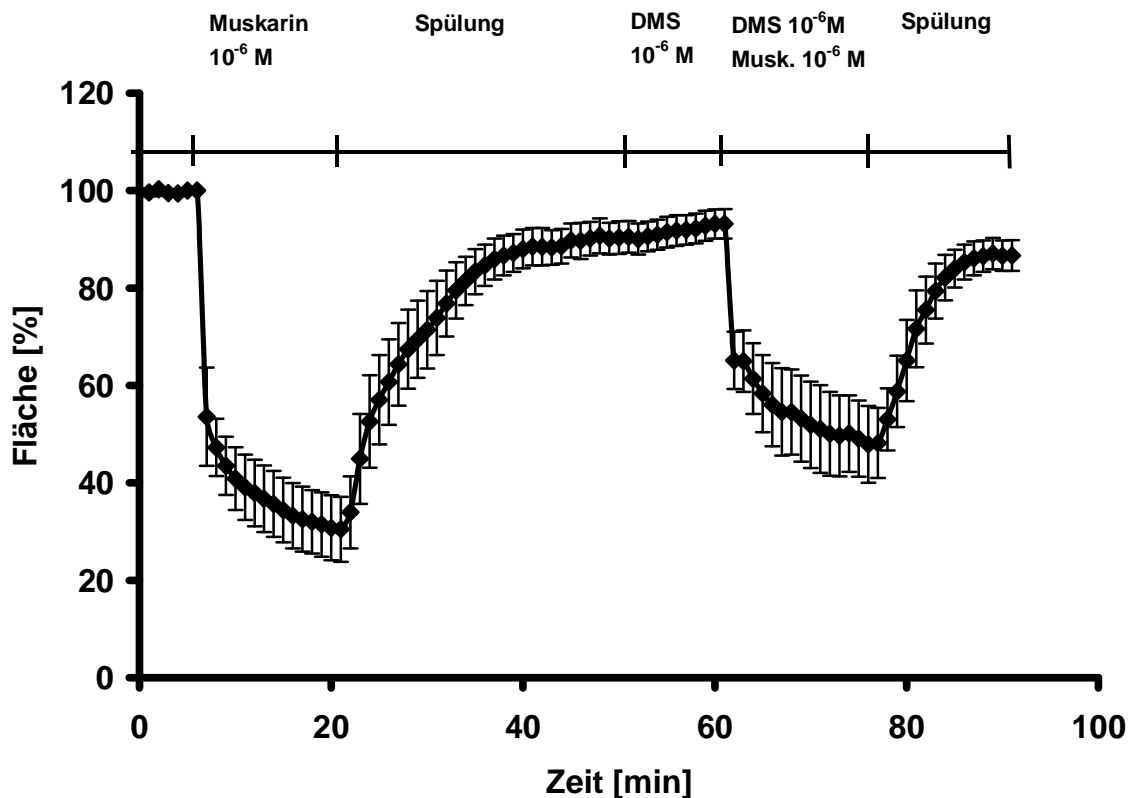


Abb. 12 Broncholuminale Flächenänderung auf Gabe von Muskarin  $10^{-6}$  M und DMS  $10^{-6}$  M nach 4 h Inkubationszeit. Applikation von Muskarin  $10^{-6}$  M in der 6. min. Spülung von der 21. bis 50. min. Gabe von DMS  $10^{-6}$  M in der 51. min sowie zusammen mit Muskarin  $10^{-6}$  M in der 61. min. Spülung der Stoffe ab der 76. min. Zusammenfassung von 7 Experimenten.

### 3.3 Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe des Thromboxananalogons U46619

Diese Versuchsreihe, in der das Thromboxananalogon U46619 verabreicht wurde, bestand aus Untersuchungen an sechs Lungenschnitten von drei Mäusen. Der Durchmesser der Bronchioli betrug  $242 \pm 9 \mu\text{m}$ . Nach einer Adaptionszeit von fünf Minuten erfolgte in der 6. min die erste Gabe von U46619, mit der sich die luminalen Fläche des Bronchiolus auf  $64 \pm 4 \%$  reduzierte (S. 50, Abb. 13). In den folgenden Minuten (7. bis 8. min) der ersten Einwirkzeit erfolgte zunächst eine kleine Dilatation von ca. 2 %. Im Weiteren reduzierte sich die luminalen Fläche erneut und erreichte in der 20. min eine Restfläche von  $58 \pm 4 \%$  bezogen auf die Ausgangsfläche (Abb. 13). Zu Beginn des Ausspülens von U46619 (21. bis 50. min) dilatierte der Bronchiolus zunächst um ca. 20 %, verengte sich erneut um 8 % auf  $69 \pm 4 \%$ , bevor er sich

im Anschluss langsam aber kontinuierlich auf  $87 \pm 3$  % dilatierte (50. min, Abb. 13). Vor einer erneuten Applikation von U46619 wurde nun das Lösungsmittel Methanol appliziert (51. bis 60. min). Dies hatte keinen signifikanten Effekt. Nachfolgend wurde U46619 erneut appliziert, wobei sich initial die luminal Fläche des Bronchiolus auf  $57 \pm 7$  % verengte (Abb. 13). In den ersten beiden Minuten dieser Einwirkphase (61. bis 75. min) zeigte sich zunächst wiederum eine minimale Dilatation von ca. 2 %. Im weiteren Verlauf verengte sich die luminal Fläche erneut und zeigte vor Einsetzen des Spülvorgangs in der 75. min ein Restlumen von  $52 \pm 5$  %. Nach erneutem Spülen erreichte der Bronchiolus  $77 \pm 3$  % der Ausgangsfläche.

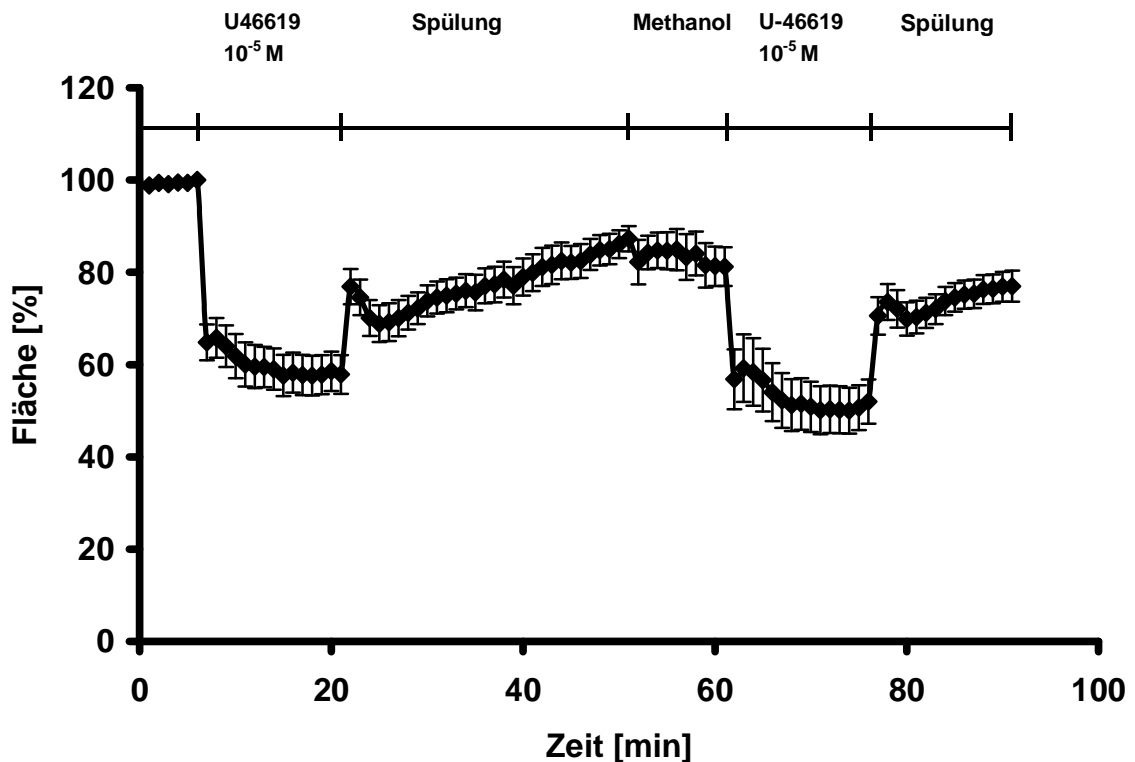


Abb. 13 Broncholuminale Flächenänderung nach Gabe von U46619  $10^{-5}$  M und 4 h Inkubationszeit. Applikation von U46619  $10^{-5}$  M in der 6. min. Spülung von der 21. bis 50. min. Gabe von Methanol in der 51. min sowie zusammen mit U-46619  $10^{-5}$  M in der 61. min. Spülung der Stoffe ab der 76. min. Zusammenfassung von 6 Experimenten.

### **3.3.1 Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe des Thromboxananalogs U46619 und DL-Threo-Dihydrosphingosin**

Diese Versuchsreihe, in der U46619 und DL-Threo-Dihydrosphingosin (DHS) verabreicht wurden, bestand aus sechs Versuchen mit den Lungenschnitten von drei Mäusen. Der Durchmesser der Bronchioli betrug  $245 \pm 19 \mu\text{m}$ . Nach einer Adaptionszeit von fünf Minuten erfolgte in der 6. min die erste Gabe von U46619, mit der sich die luminalen Fläche des Bronchiolus auf  $76 \pm 4 \%$  des Ausgangswertes reduzierte (S. 52, Abb. 14). In den folgenden Minuten (7. bis 8. min) der ersten Einwirkzeit erfolgte zunächst eine Dilatation von ca. 4 Prozent auf  $80 \pm 6 \%$  der Ausgangsfläche. Der weitere Verlauf zeigte eine erneute Zunahme der Konstriktion, die dann zum Ende hin stagnierte und eine luminalen Fläche von  $68 \pm 8 \%$  in der 20. min erreichte (Abb. 14). Mit dem Einsetzen der Spülphase dilatierte der Bronchiolus in der 1. min und erreichte eine luminalen Fläche von  $104 \pm 13 \%$  (21. min) bezogen auf die Ausgangsfläche. Im weiteren Verlauf (23. bis 28. min) verengte sich die luminalen Fläche erneut auf ca.  $79 \pm 6 \%$ , bevor sich der Bronchiolus im Anschluss kontinuierlich dilatierte und zum Ende des Spülvorgangs (50. min) eine luminalen Bronchialfläche von  $105 \pm 7 \%$  erreichte (Abb. 14). Vor einer erneuten Applikation von U46619 wurde DHS alleine in der 51. min appliziert. Dies führte zu einer Konstriktion auf  $95 \pm 7 \%$  der Ausgangsfläche (60. min). Bei der folgenden Applikation wurden U46619 und DHS gemeinsam verabreicht, wobei sich die luminalen Fläche zunächst auf  $72 \pm 7 \%$  (61. min) und nachfolgend weiter auf  $50 \pm 8 \%$  verengte (61. bis 75. min). Mit dem Einsetzen der Spülung in der 76. min zeigte sich eine Dilatation auf  $91 \pm 12 \%$  und nach 90 min  $98 \pm 8 \%$  der Ausgangsfläche (Abb. 14).

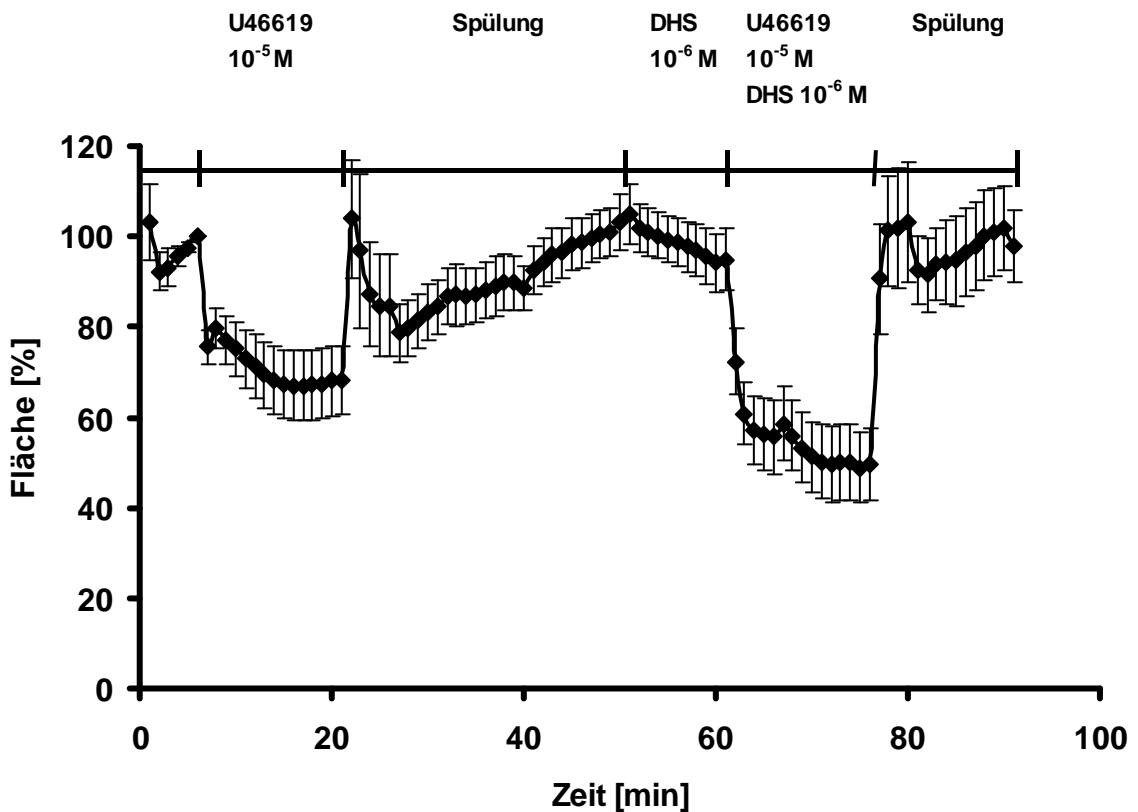


Abb. 14 Broncholuminale Flächenänderung nach Gabe von U46619  $10^{-5}$  M und DHS  $10^{-6}$  nach 4 h Inkubationszeit. Applikation von U46619  $10^{-5}$  M in der 6. min. Spülung von der 21. bis 50. min. Gabe von U46619  $10^{-5}$  M in der 51. min sowie zusammen mit DHS  $10^{-6}$  M in der 61. min. Spülung der Stoffe ab der 76. min. Zusammenfassung von 6 Experimenten.

### 3.3.2 Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe des Thromboxananalogons U46619 und N,N-Dimethylsphingosin

Diese Versuchsreihe, in der U46619 und DMS verabreicht wurden, bestand aus neun Versuchen mit den Lungenschnitten von drei Mäusen. Der Durchmesser der Bronchioli betrug  $197 \pm 13 \mu\text{m}$ . Nach einer Adaptionszeit von fünf Minuten erfolgte in der 6. min die erste Gabe von U46619, mit der sich die luminalen Fläche des Bronchiolus auf  $73 \pm 7 \%$  des Ausgangswertes reduzierte (S. 53, Abb. 15). In der folgenden Minuten der ersten Einwirkzeit (7. bis 8. min) erfolgte zunächst eine Dilatation von ca. 2 %, gefolgt von einer erneuten Konstriktion der luminalen Fläche auf  $71 \pm 6 \%$  in der 14. min. Anschließend dilatierte der Bronchiolus kontinuierlich und erreichte in der 20. min eine luminalen Fläche von  $81 \pm 3 \%$  (Abb. 15). In der Spülphase dilatierte der Bronchiolus auf  $97 \pm 4 \%$  in

der 50. min (Abb. 15). Vor einer erneuten Applikation von U46619 wurde nun DMS alleine appliziert (51. bis 60. min), was zu einer kontinuierlichen Konstriktion des Bronchiolus auf  $86 \pm 6 \%$  bis zur 60. min führte (Abb. 15). In der 61. min wurden U46619 und DMS gemeinsam appliziert. Dabei zeigte der Bronchiolus in den ersten vier Minuten eine Konstriktion auf  $67 \pm 8 \%$  der Ausgangsfläche. Im restlichen Verlauf dieser Applikationsphase zeigte der Bronchiolus nur eine geringe Zunahme der Konstriktion und erreichte vor Einsetzen der Spülphase in der 75. min eine lumenale Fläche von  $64 \pm 8 \%$  (Abb. 15). Am Anfang des Spülvorgangs (76. bis 90. min) zeigte der Bronchiolus in den ersten beiden Minuten zunächst eine sprunghafte Dilatation auf  $82 \pm 5 \%$  der Ausgangsfläche. Anschließend stagnierte für fünf Minuten das lumenale Bronchialverhalten, bevor ab der 85. min eine kontinuierliche weitere Dilatation einsetzte und  $86 \pm 7 \%$  erreichte (Abb. 15).

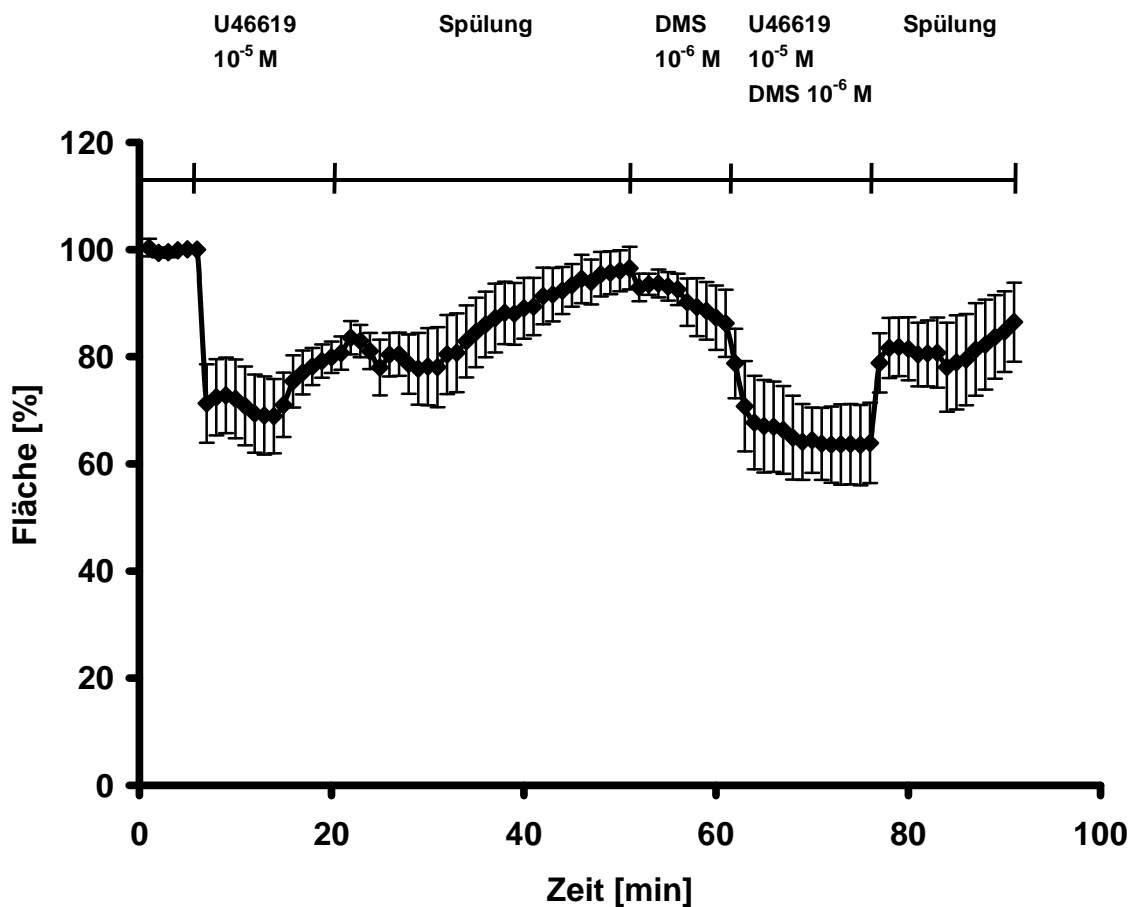


Abb. 15 Broncholuminale Flächenänderung nach Gabe von U46619  $10^{-5}$  M und DMS  $10^{-6}$  nach 4 h Inkubationszeit. Applikation von U46619  $10^{-5}$  M in der 6. min. Ausspülung von der 21. bis

50. min. Gabe von U46619 in der 51. min sowie zusammen mit DHS  $10^{-6}$  M in der 61. min. Ausspülung der Stoffe ab der 76. min. Zusammenfassung von neun Experimenten.

### **3.4 Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe von Muskarin und dem Kalziumkanalblocker Lanthanchlorid**

Diese Versuchsreihe, in der Muskarin und Lanthanchlorid verabreicht wurden, bestand aus zehn Versuchen mit den Lungenschnitten von drei Mäusen. Der Durchmesser der Bronchioli betrug  $162 \pm 10 \mu\text{m}$ . Nach einer Adaptionszeit von fünf Minuten folgte in der 6. min die erste Gabe von Muskarin, mit der sich die luminalen Fläche des Bronchiolus auf  $43 \pm 6 \%$  des Ausgangswertes reduzierte (S. 55, Abb. 16). In der 8. bis 15. min der ersten Applikationsphase erfolgte eine Dilatation um 11 % auf  $54 \pm 7$ . Im weiteren Verlauf stagnierte das konstriktive Verhalten der luminalen Bronchialfläche und zeigte vor Einsetzen des Spülvorgangs  $53 \pm 9 \%$  der Ausgangsfläche (Abb. 16). Mit Beginn der Spülphase (21. bis 50. min) setzte eine kontinuierliche Dilatation ein, die ab der 45. min bis zum Ende  $95 \pm 2 \%$  des Ausgangswertes betrug (Abb. 16). Vor einer erneuten Applikation von Muskarin wurde Lanthanchlorid alleine appliziert (51. bis 60. min), was keine luminalen Bronchialveränderung bewirkte. Anschließend erfolgte in der 61. bis 75. min die gemeinsame Applikation von Lanthanchlorid und Muskarin. Dabei zeigte sich in der ersten Minute nach Applikation eine Konstriktion von 30 % auf  $65 \pm 7 \%$  der Ausgangsfläche. Im weiteren Verlauf setzte eine Dilatation ein, die ab der 71. min  $89 \pm 3 \%$  betrug (Abb. 16). Mit dem Beginn der Spülphase (76. bis 90. min) setzte eine Dilatation ein, die am Ende  $92 \pm 2 \%$  der Ausgangsfläche erreichte.

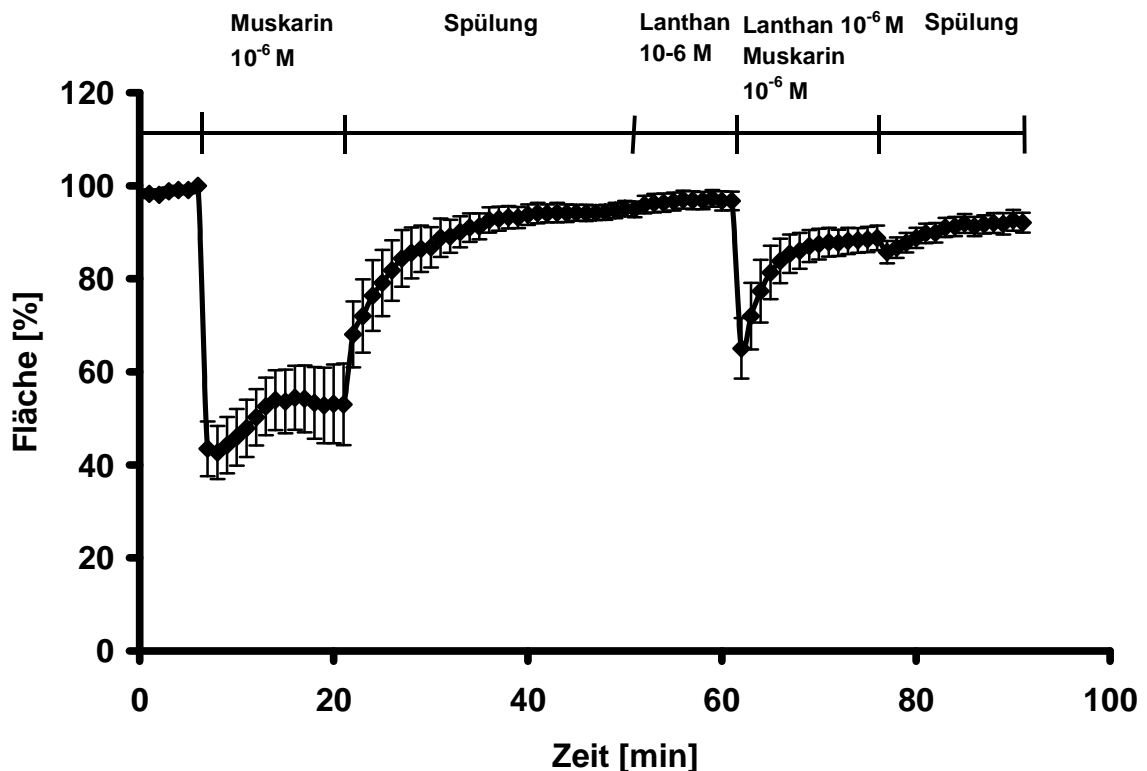


Abb. 16 Broncholuminale Flächenänderung nach Gabe von Muskarin  $10^{-5}$  M und Lanthan  $10^{-6}$  M nach 4 h Inkubationszeit. Applikation von Muskarin  $10^{-6}$  M in der 6. min. Spülung von der 21. bis 50. min. Gabe von Lanthan  $10^{-6}$  M in der 51. min sowie zusammen mit Muskarin  $10^{-6}$  M in der 61. min. Spülung der Stoffe ab der 76. min. Zusammenfassung von 10 Experimenten.

### 3.4.1 Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe von Muskarin, Lanthanchlorid und DHS

Diese Versuchsreihe, in der Muskarin, Lanthanchlorid und DHS verabreicht wurden, bestand aus sieben Versuchen mit den Lungenschnitten von drei Mäusen. Der Durchmesser der Bronchioli betrug  $219 \pm 14 \mu\text{m}$ . Nach einer Adaptionszeit von fünf Minuten erfolgte in der 6. min die erste Gabe von Muskarin, mit der sich die luminalen Fläche des Bronchiolus auf  $37 \pm 4 \%$  des Ausgangswertes reduzierte (S. 56, Abb. 17). In der 7. bis 13. min der ersten Applikationsphase erfolgte eine transiente Dilatation von 2 % auf  $39 \pm 3 \%$  der Ausgangsfläche. Im weiteren Verlauf setzte eine erneute Konstriktion ein und reduzierte vor Einsetzen der Spülphase die luminalen Fläche auf  $32 \pm 3 \%$  (Abb. 17). Mit Beginn der Spülphase (21. bis 50. min) zeigte der Bronchiolus in den

ersten Minuten (21. bis 30. min) eine Dilatation auf  $94 \pm 0 \%$  (50. min, Abb. 17) des Ausgangswertes. Anschließend wurden Lanthanchlorid und DHS gemeinsam appliziert (51. bis 60. min, Abb. 17), was keine luminale Bronchialveränderung bewirkte. In der anschließenden Applikationsphase (61. bis 75. min) erfolgte die gemeinsame Gabe von Muskarin, DHS und Lanthanchlorid. Dabei zeigte sich in der ersten min nach Verabreichung eine Konstriktion von 8 % auf  $86 \pm 1 \%$  der Ausgangsfläche. Im weiteren Verlauf veränderte sich die luminale Fläche kaum. Vielmehr dilatierten die Bronchioli um durchschnittlich 5 %. Zum Ende dieser Versuchsphase wurde eine luminale Bronchialfläche von  $90 \pm 1 \%$  erreicht. In der Spülphase (76. bis 90. min) zeigte der Bronchiolus keine weitere Änderung.

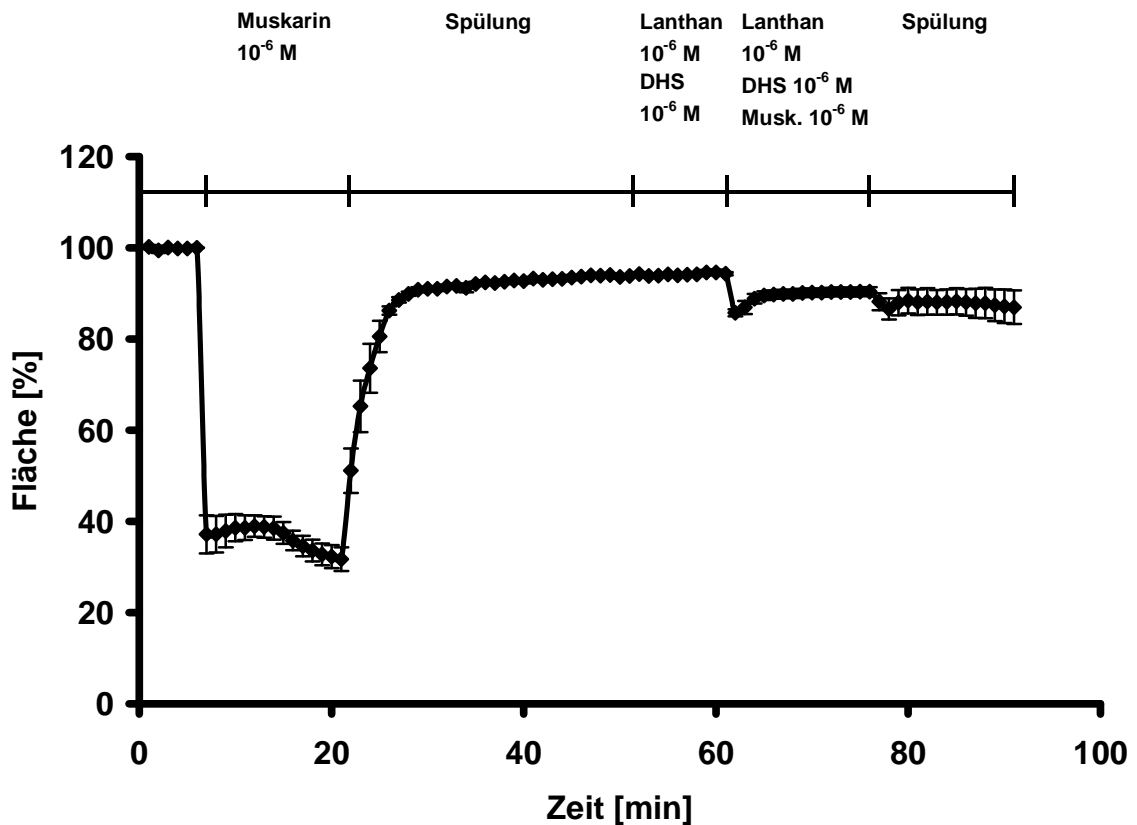


Abb. 17 Broncholuminale Flächenänderung nach Gabe von Muskarin  $10^{-6}$  M, DL-Threo-Dihydrosphingosin  $10^{-6}$  M (DHS) und Lanthan  $10^{-6}$  M und nach 4 h Inkubationszeit. Applikation von Muskarin  $10^{-6}$  M in der 6. min. Spülung von der 21. bis 50. min. Gabe von Lanthan  $10^{-6}$  M und DHS  $10^{-6}$  M in der 51. min sowie zusammen mit Muskarin  $10^{-6}$  M in der 61. min. Spülung der Stoffe ab der 76. min. Zusammenfassung von 7 Experimenten.



### **3.4.2 Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli auf Gabe von DMS, Lanthanchlorid und Muskarin**

Diese Versuchsreihe, in der Muskarin, Lanthanchlorid und DMS verabreicht wurden, bestand aus acht Versuchen mit den Lungenschnitten von drei Mäusen. Der Durchmesser der Bronchioli betrug  $231 \pm 22 \mu\text{m}$ . Nach einer Adaptionszeit von fünf Minuten erfolgte in der 6. min die erste Gabe von Muskarin, mit der sich die luminale Fläche des Bronchiolus auf  $44 \pm 6 \%$  des Ausgangswertes reduzierte (S. 58, Abb. 18). Im weiteren Verlauf dieser Einwirkphase zeigte der Bronchiolus von der 7. bis 13. min eine Dilatation von 8 % auf  $50 \pm 4 \%$ . Anschließend verengten sich die Bronchioli erneut und erreichten vor Einsetzen der Spülphase  $40 \pm 6 \%$  der Ausgangsfläche. Mit Beginn der Spülphase (21. bis 50. min) zeigte der Bronchiolus in den ersten Minuten (21. bis 32. min) eine Dilatation von ca. 51 % auf  $91 \pm 2 \%$  (Abb. 18). Im weiteren Verlauf veränderte sich die Fläche kaum ( $93 \pm 1 \%$  des Ausgangswertes). Anschließend wurden Lanthan und DMS gemeinsam appliziert (51. bis 60. min), was keine luminale Bronchialveränderung bewirkte. In der anschließenden Applikationsphase (61. bis 75. min) erfolgte die gemeinsame Gabe von Muskarin, Lanthan, und DMS. Dabei zeigte die luminale Bronchialfläche keine Änderung auf Muskarin. Auch in der anschließenden Spülphase blieb die Fläche unverändert. Letztlich wurde eine Fläche von  $95 \pm 1 \%$  des Ausgangswertes erreicht (Abb. 18).

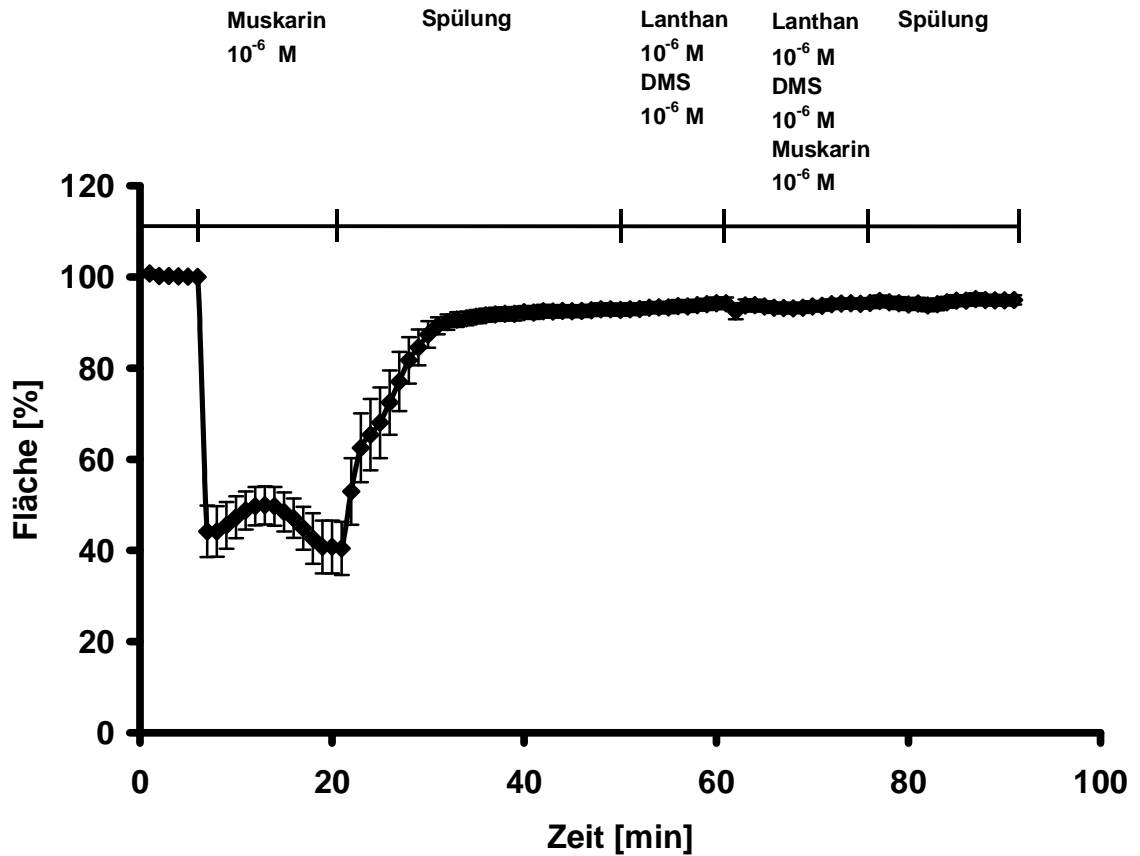


Abb. 18 Broncholuminale Flächenänderung nach Gabe von Muskarin  $10^{-6}$  M und Lanthan  $10^{-6}$  M und N,N-Dimethylsphingosin  $10^{-6}$  M (DMS) nach 4 h Inkubationszeit. Applikation von Muskarin  $10^{-6}$  M in der 6. min. Spülung von der 21. bis 50. min. Gabe von Lanthan  $10^{-6}$  M und DMS  $10^{-6}$  M in der 51. min sowie zusammen mit Muskarin  $10^{-6}$  M in der 61. min. Spülung der Stoffe ab der 76. min. Zusammenfassung von 8 Experimenten.

### 3.5 Vergleich der luminalen Bronchialflächen nach Initialkonstriktion und letztem Wert vor Spülung nach zunächst alleiniger Gabe von Muskarin $10^{-6}$ M sowie gemeinsam mit DMS $10^{-6}$ M, DHS $10^{-6}$ M und Lanthanchlorid $10^{-6}$ M

In der folgenden Tabelle ist der statistische Vergleich der broncholuminalen Fläche nach alleiniger Muskarin-Gabe (Initialkonstriktion, 6/7 min sowie letztem Wert vor Spülung, 20 min) und der Gabe von Muskarin gemeinsam mit DHS, DMS und Lanthanchlorid (Initialkonstriktion 61 min sowie letztem Wert vor Spülung, 76 min) mit dem Kruskal-Wallis und Mann-Whitney Test dargestellt.

Die Inhibierung der Initialkonstriktion durch DHS/DMS im Vergleich zur alleinigen Muskarin-Gabe stellt sich signifikant dar (vgl. Tab. 2, Wert 1 u. 3). Nicht signifikant kleiner ist die Fläche vor Einsetzen der Spülung nach gemeinsamer Gabe von DHS/DMS (vgl. Wert 2 u. 4). Die Gabe von Lanthanchlorid mit Muskarin zeigt im Vergleich zur alleinigen Gabe von Muskarin eine signifikante Inhibierung der Initialkonstriktion sowie der Fläche vor Einsetzen der Spülung (vgl. Tab. 2, Wert 1 u. 3, Wert 2 u. 4). Die gemeinsame Gabe von Muskarin mit Lanthanchlorid und DHS/DMS verglichen mit der alleinigen Gabe von Muskarin zeigt ebenfalls im Vergleich der Werte 1 u. 3 sowie 2 u. 4. eine signifikante Inhibierung.

Im direkten Flächenvergleich der broncholuminalen Fläche nach Gabe von Muskarin/DHS zu Muskarin/DMS (75. min) zeigte sich eine Tendenz zur stärkeren Inhibierung des Muskarineffektes durch DHS, die jedoch statistisch sich als nicht signifikant darstellte ( $p=0.11$ ).

alleinige Applikation	Fläche der max. Initialkonstriktion in % +/- SEM (6/7 min) Wert 1	Fläche vor Spülung in % +/- SEM (20 min) Wert 2	gemeinsame Applikation	Fläche der max. Initialkonstriktion in % +/- SEM (61 min) Wert 3	Fläche vor Spülung in % +/- SEM (76 min) Wert 4	Vergleich der Werte 1 u. 3	Vergleich der Werte 2 u. 4
Muskarin $10^{-6}$ M	52 ± 7	44 ± 8	Muskarin $10^{-6}$ M	55 ± 1	42 ± 7	ns	ns
Muskarin $10^{-6}$ M	45 ± 1	40 ± 1	Muskarin $10^{-6}$ M und DHS $10^{-6}$ M	86 ± 7	66 ± 8	$p \leq 0.01$	ns
Muskarin $10^{-6}$ M	45 ± 7	30 ± 7	Muskarin $10^{-6}$ M und DMS $10^{-6}$ M	63 ± 6	48 ± 8	$p \leq 0.05$	ns
Muskarin $10^{-6}$ M	42 ± 6	53 ± 8	Muskarin $10^{-6}$ M und Lanthanchlorid $10^{-6}$ M	65 ± 6	88 ± 3	$p \leq 0.01$	$p \leq 0.01$
Muskarin $10^{-6}$ M	37 ± 4	32 ± 3	Muskarin $10^{-6}$ M, DHS $10^{-6}$ M und Lanthanchlorid $10^{-6}$ M	85 ± 1	90 ± 1	$p=0.001$	$p=0.001$

Muskarin 10 <sup>-6</sup> M	44 ± 6	41 ± 6	Muskarin 10 <sup>-6</sup> M, DMS 10 <sup>-6</sup> M und Lanthanchlorid 10 <sup>-6</sup> M	93 ± 2	94 ± 1	p≤0.001	p≤0.001
--------------------------------	--------	--------	---	--------	--------	---------	---------

Tab. 2 Vergleich der luminalen Bronchialfläche nach Initialkonstriktion und letztem Wert vor Spülung nach alleiniger Muskarinabgabe und folgend gemeinsam mit den Sphingosinkinaseinhibitoren DMS und DHS sowie dem Kalziumkanalblocker Lanthanchlorid; nicht signifikant = ns (p>0.05), signifikant = p≤0.05 (Test für unabhängige Stichproben nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney).

### 3.6 Vergleich der luminalen Bronchialfläche nach Initialkonstriktion und letztem Wert vor Spülung nach zunächst alleiniger Gabe von U46619 sowie gemeinsam mit DMS und DHS

Die folgende Tabelle zeigt den statistischen Vergleich der broncholuminalen Fläche nach alleiniger Gabe von U46619 (Initialkonstriktion, 6/7 min sowie letztem Wert vor Spülung, 20 min) und der Gabe von U46619 gemeinsam mit DHS oder DMS (Initialkonstriktion, 61 min sowie letztem Wert vor Spülung, 76 min) mit dem Kruskal-Wallis und Mann-Whitney Test.

DHS oder DMS inhibieren nicht signifikant die Initialkonstriktion durch U46619 (vgl. Tab. 3, Wert 1 u. 3). Die Fläche vor Einsetzen der Spülung zeigt nach gemeinsamer Gabe von U46619 mit DHS im Vergleich zur alleinigen Gabe von U46619 keinen signifikanten Unterschied (vgl. Wert 2 u. 4). Hierzu abweichend stellt sich die Fläche nach Gabe von U46619 mit DMS signifikant kleiner dar (vgl. Tab. 3, Wert 2 u. 4).

alleinige Applikation	Fläche der max. Initialkonstriktion in % +/- SEM (6/7 min) Wert 1	Fläche vor Spülung in % +/- SEM (20 min) Wert 2	gemeinsame Applikation	Fläche der max. Initialkonstriktion in % +/-SEM (61 min) Wert 3	Fläche vor Spülung in % +/- SEM (76 min) Wert 4	Vergleich der Werte 1 u. 3	Vergleich der Werte 2 u. 4
U46619 10 <sup>-6</sup> M	64 ± 4	44 ± 8	U46619 10 <sup>-6</sup> M	57 ± 7	52 ± 5	ns	ns
U46619 10 <sup>-6</sup> M	75 ± 4	68 ± 8	U46619 und DHS 10 <sup>-6</sup> M	60 ± 7	49 ± 8	ns	ns
U46619 10 <sup>-6</sup> M	72 ± 7	81 ± 3	U46619 und DMS 10 <sup>-6</sup> M	70 ± 9	64 ± 8	ns	P=0.05

Tab. 3 Vergleich der luminalen Bronchialfläche nach Initialkonstriktion und letztem Wert vor Spülung nach alleiniger Thromboxan A<sub>2</sub>-Analogongabe U46619 und folgend gemeinsam mit den Sphingosinkinaseinhibitoren DMS und DHS; nicht signifikant = ns (p>0.05), signifikant = p≤0.05 (Test für unabhängige Stichproben nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney).

## 4 Diskussion

Ein Charakteristikum chronischer Erkrankungen der Atemwege wie dem Asthma bronchiale und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) ist ein Anstieg des Atemwegswiderstands. Als Ursache wird eine Dysregulation der glatten Muskulatur in den Bronchien und Bronchioli diskutiert. Hier wird Acetylcholin (ACh), welches non-neuronal oder von parasymphatischen Nervenfasern freigesetzt wird, als wesentlicher Faktor angesehen. Eine gesteigerte Aktivität cholinergischer Nervenfasern und die Hyperreaktivität vom mAChR sollen in der Reaktionskette eine entscheidende Rolle spielen (Zaagsman et al. 1997, Fryer & Jacoby 1998, Barnes 2001). Studien an Rattenlungen demonstrierten, dass die Erhöhung des Atemwegswiderstandes hauptsächlich von den peripheren Atemwegen beeinflusst wird (Martin 2002, Escolar et al. 2003). In weiteren Untersuchungen konnte mit Hilfe von radioaktiv markierten Liganden für muskarinische Rezeptoren (mAChR1-5) deren unterschiedliche Verteilung in der Lunge detektiert werden (Fryer & el-Fakahany 1990, Mak et al. 1992, Garssen et al. 1993, Hislop et al. 1998). Diese und andere Arbeiten zeigten Unterschiede zwischen den großen und kleinen Atemwegen im histologischen Aufbau, in der Innervation und in der Verteilung der mAChR (Pack et al. 1981, Junqueira 1986, Fryer & el-Fakahany 1990, Wessler et al. 1998, Wessler & Kirkpatrick 2001). Weiterführend konnten funktionelle Unterschiede in der Reaktion auf bronchoreaktive Substanzen demonstriert werden. So wurde in den kleineren Bronchioli der Ratte eine zehnfach stärkere Reaktion auf das bronchokonstriktorische Thromboxananalogon U46619 im Vergleich zu den großen Bronchien nachgewiesen (Martin et al. 2000). Dies scheint ein allgemeineres Prinzip zu sein, da in weiteren Versuchen der unterschiedliche konstriktorische Effekt auf verschiedene Atemwegskaliber auch an anderen Spezies und mit anderen Substanzen wie Methacholin beobachtet wurde (Shioya et al. 1987, Mitchell & Sparrow 1994, Gray & Mitchell 1999). Diese Studien demonstrieren in kleinen Atemwegen nicht nur eine erhöhte Sensitivität auf Konstriktoren, sondern auch eine schnellere Reaktion der Bronchioli im Vergleich zu den Bronchien und Trachea. Dies kann durch den unterschiedlichen Wandaufbau erklärt werden.

Der hauptsächlich verantwortliche Rezeptor für die ACh vermittelte broncholuminale Konstriktion im Bereich der peripheren Atemwege ist der mAChR3 (Struckmann et al. 2006, Yu et al. 1992, Roffel et al. 1990, Halayko et al. 1999, Stengel et al. 2000, Stengel et al. 2002).

Die broncholuminale Reaktion auf Konstriktoren lässt sich am lebenden Tier und damit in der intakten Lunge nicht direkt erfassen und sinnvoll verfolgen. Daher wurde für die vorliegende Arbeit der größtmögliche intakte Gewebeverband gewählt, der sich *ex vivo* für mehrere Stunden vital erhalten lässt. Bereits in früheren Studien konnte an Lungenschnitten von Mäusen das broncholuminale Verhalten untersucht werden (Krumdieck et al. 1980, Dandurand et al. 1993, Martin et al. 1996, Held et al. 1999, Struckmann 2006). In der vorliegenden Studie erfolgte, im Gegensatz zu früheren Versuchen, eine Begasung der Nährlösung, in welcher die Lungenschnitte inkubiert waren. Hierdurch konnte in den Lungenschnitten die Agarose schneller ausgewaschen, eine gleichmäßige und anhaltende Vitalität der Lungenschnitte gezeigt und mit den Versuchen früher begonnen werden. Da das Verhalten der Lungenschnitte nach 4 h, 12 h und 24 h Inkubation vergleichbar war, wurden die Experimente mit Lungenschnitten nach vier Stunden Inkubation durchgeführt (vgl. S. 42, Tab. 1).

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, welche Rolle die Sphingosinkinase-1 in der Signalkaskade muskarinischer Acetylcholinrezeptoren im Bereich der peripheren Atemwege der Maus hat. Die Aktivierung von mAChR führt zur intrazellulären Generierung von Sphingosin (Meyer zu Heringsdorf et al. 1998), das durch Sphingosinkinase-1 zu dem aktiven Biolipid Sphingosin 1-Phosphat phosphoryliert wird. Sphingosin 1-Phosphat ist ein bekanntes Signalmolekül mit vielfältigen intra- und extrazellulären Funktionen (Olivera et al. 1994 und 1999, Pyne et al. 2000). Die Experimente sollen die Hypothese prüfen, dass S1P ein wichtiger Mediator der Kalziumfreisetzung aus dem ER im Bereich der peripheren Atemwege der Maus ist. Dass S1P einen alternativen Weg in der Kalziumfreisetzung darstellt, konnte bereits in vielen Studien belegt werden (Beaven 1996, Ghosh 1990 und 1994). Eine effektive Hemmung der S1P-Synthese durch DHS und DMS ist in

vielen Studien erbracht worden (Meyer zu Heringsdorf 1998). An Säugerzellen (HEK293T Zellen) und menschlichen Blutplättchen konnte eine signifikante Hemmung der SPHK1 durch DHS und DMS gezeigt werden (Tolan et al. 1996, Meyer zu Heringsdorf et al. 1998, Yatomi 1996). Im Weiteren wurde nach Stimulierung an muskarinischer Rezeptoren mit Methacholin eine signifikante Inhibierung der Kalziumfreisetzung durch DHS an menschlichen SH-SY5Y Zellen beobachtet (Young et al. 2000).

In der ersten Versuchsreihe mit alleiniger Muskaringabe  $10^{-6}$  M konnte gezeigt werden, dass Stimulation muskarinischer Rezeptoren die broncholuminale Fläche um bis zu 60 % verringerte (vgl. S. 43, Abb. 8). Die Reaktion auf selektive Stimulation muskarinischer Rezeptoren war in allen Experimenten reproduzierbar (Abb. 8). Nach Stimulation muskarinischer Rezeptoren zeigte sich nach der initialen Konstriktion zu Beginn eine schwache Dilatation um 4 % bzw. 2 %, die als Grund eine Entleerung/Eerschöpfung intrazellulären Speicher haben könnte. Die dann erneut einsetzende Verengung konnte dann durch extrazelluläres Kalzium erfolgen. Durch Spülung mit Auswaschung des Muskarins nach der Applikationsphase erfolgte eine Dilatation des Bronchiolus.

In der zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluss der Sphingosinkinase-1 auf die Muskarinrezeptor-vermittelte Konstriktion peripherer Atemwege und indirekt die intrazelluläre Kalziummobilisierung durch Hemmung der SPHK1 untersucht. Hierfür wurden vitale Atemwege mit funktionellen mAChR und starker Initialkonstriktion ausgewählt. Die Gabe von DHS alleine hatte keinen Effekt, was eine konstitutive Aktivierung der SPHK1 in Atemwegen unabhängig von mAChR Stimulation unwahrscheinlich macht. Die gemeinsame Applikation von Muskarin und DHS führte zu einer signifikant reduzierten initialen Konstriktion ( $p=0.008$ ) (vgl. S. 47, Abb. 11, S. 59, Tab. 2). Hemmung der S1P Synthese würde somit die Muskarinrezeptor-vermittelte Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem intrazellulären Speicher hemmen. Die nachfolgende, zweite Konstriktion würde damit hauptsächlich vom Einstrom von extrazellulärem Kalzium abhängen, welches in den folgenden Versuchsreihen durch den Inhibitor von Kalzium-Kanälen, Lanthanchlorid, gezeigt werden konnte (vgl. S. 55, Abb. 16).

Die einsetzende Dilatation ab der 77. min könnte ein Hinweis darauf sein, dass S1P auch den extrazellulären Kalziumeinstrom mit beeinflusst und durch DHS gehemmt wird (vgl. S.47, Abb. 11). In Studien an glatten Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass S1P das TRPC1- und das TRPC2-Kanalprotein aktiviert und damit den glatten Muskeltonus beeinflusst (Xu et al. 2006). Weiterführend könnte DHS auf spannungsunabhängige Kalziumkanäle, TRPC-Kanalproteine, Einfluss nehmen und diese inhibieren. An peripheren Atemwegen von Mäusen konnte erstmalig extrazellulärer Kalziumeinstrom über TRPC1- und 2-Kanalproteine nachgewiesen werden (Struckmann 2006).

In Anwesenheit eines weiteren SPHK Inhibitors, DMS, reduzierte sich die broncholuminale Fläche auf Gabe von Muskarin auf 64 % der Ausgangsfläche. Beide Inhibitoren zeigten vergleichbare Effekte. Da SPHK1 spezifisch durch DHS, beide SPHK-Isoformen aber durch DMS inhibiert werden, weisen die vergleichbaren Daten auf die Dominanz der SPHK1-Isoform in der Rezeptorvermittelten S1P Synthese hin. Im Vergleich der beiden broncholuminalen Flächen konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden (vgl. S. 59, Tab. 2). Im direkten Flächenvergleich der broncholuminalen Fläche nach Gabe von Muskarin/DHS und Muskarin/DMS zeigte sich eine Tendenz zu einer stärkeren Inhibierung des Muskarineffekts durch DHS, die jedoch nicht statistisch signifikant war. In der Inhibierung der SPHK1 an HEK293T Zellen konnte eine Überlegenheit von DMS gegenüber DHS gezeigt werden (Meyer zu Heringsdorf 1998). In dieser Studie konnte demonstriert werden, dass die Hemmung der Kalziumfreisetzung abhängig von der Konzentration des Inhibitors der SPHK1 war. Bei der in unseren Studien eingesetzten Konzentration von  $10^{-6}$  M zeigte sich bei beiden Inhibitoren am Beispiel der broncholuminalen Flächenänderung ein vergleichbarer Effekt wie in den Untersuchungen an Nierenzellen (Meyer zu Heringsdorf et al. 1998).

Eine Erklärung für die Überlegenheit der Inhibierung der SPHK1 durch DMS an HEK293T Zellen konnte aus diesen Experimenten nicht abgeleitet werden.

Damit konnte in der vorliegenden Arbeit eine relevante Hemmung der mAChR-vermittelten Effekte durch Inhibierung der SPHK1 an einem organnahen Modell gezeigt werden.



In der folgenden Versuchsreihe sollte der Einfluss von U46619, einem stabilen Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>)-Analogon, auf das broncholuminale Verhalten nach Stimulation am muskarinischen Rezeptor und Inhibierung der SPHK1 mit DHS und DMS untersucht werden. Thromboxan A<sub>2</sub> ist ein potenter Vasokonstriktor und wird von Thrombozyten und Entzündungszellen freigesetzt. In Studien an Menschen konnte U46619 nach Inhalation als potenter Bronchokonstriktor nachgewiesen werden (Jones et al. 1992). In der asthmatischen Kaninchenlunge zeigte sich nach Inhalation von U46619 eine relevante Freisetzung von ACh und damit verbundene Bronchokonstriktion (Sarocea et al. 1995).

Welchen Einfluss U46619 auf die SPHK1 im Bereich der peripheren Atemwege hat und inwieweit es sich durch DHS und DMS beeinflussen lässt, war bisher nicht klar. Unsere Studie zeigte, dass sich nach alleiniger Applikation von U46619 die Initialkonstriktion der broncholuminalen Fläche (vergleichbar mit der auf Muskarin 10<sup>-6</sup> M) auf 64 % der Ausgangsfläche verringerte (vgl. S. 50, Abb. 13). Als Erklärung wird nach Stimulation durch U46619 am TXA<sub>2</sub>-Rezeptor eine Proteinkinase C vermittelte Kalziumfreisetzung aus dem ER und folgend eine Aktivierung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle (VOCCs) in der Zellmembran gesehen (Berridge 1995, Catterall 2000). An glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie der Ratte konnte nach Stimulation mit U46619 ein erhöhter Muskeltonus gemessen werden, der durch Nifedipin, einem spannungsabhängigen Kalziumkanalblocker, gesenkt werden konnte. Die Inhibierung der Rho-Kinase 1, einem Enzym, welches in der Signalkaskade der kalziumunabhängigen Kontraktion glatter Muskelzellen eingebunden ist, zeigte keinen Einfluss auf den Muskeltonus (Cogolludo et al. 2003). Weiterführend konnte durch eine Hemmung des Thromboxan-Rezeptors mit dem Antagonisten SQ-29548 der Kalziumeinstrom gehemmt werden (Wilson et al. 2005).

Konsekutiv sollte der Frage nachgegangen werden, ob die U46619 abhängige Aktivierung des TXA<sub>2</sub> Rezeptors die Aktivierung von Sphingosinkinasen für die Konstriktion nutzt. Im Gegensatz zu Muskarinrezeptorstimulation hatte die gemeinsame Gabe von DHS oder DMS keinen Einfluss auf die U46619 vermittelte initiale Konstriktion (vgl. S. 60, Tab. 3). Auffällig zeigte sich nach

Einsetzen der Spülphase (im Gegensatz zur Stimulation muskarinischer Rezeptoren) die sprunghafte Dilatation auf 77 % der Ausgangsfläche (S. 53, Abb. 15). Dies könnte durch eine unterschiedliche Affinität von U46619 am  $\text{TXA}_2$  Rezeptor im Vergleich zur Bindung von Muskarin am mAChR erklärt werden. Da bei der gemeinsamen Gabe des Thromboxanagonisten und der SPHK1 Inhibitoren (DHS und DMS) keine Abschwächung in der Intialkonstriktion beobachtet wurde, scheint die Aktivierung relativ spezifisch für den muskarinischen Rezeptorsignalweg zu sein. Hier sind weitere Untersuchungen zum genaueren Verständnis erforderlich.

Einen Einfluss der SPHK1 Aktivierung auf Stimulation muskarinischer Rezeptoren und wahrscheinlicher Konstriktion bronchiolärer glatter Muskelzellen konnte nachgewiesen werden. Inwieweit die SPHK1 nach Stimulation mit Muskarin den Einstrom von extrazellulärem Kalzium beeinflusst, wurde nun im Folgenden untersucht.

Betrachtete man die Bronchokonstriktion nach alleiniger Muskarinapplikation, so zeigte sich eine kontinuierliche Konstriktion. Das für die initiale Konstriktion benötigte Kalzium stammt aus dem ER (Berridge 1993, Clapham 2007). Nach Entleerung der intrazellulären Speicher erfolgt zur Aufrechterhaltung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum über Ionenkanäle (Felder 1990). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom dient auch zum Wiederauffüllen der Kalziumspeicher, um bei anhaltender Stimulation eine Konstriktion aufrecht erhalten zu können (Fasolato et al. 1994, Parekh & Penner 1997). Welcher Typ von Kalziumkanal nach Stimulation am mAChR für die Konstriktion der Muskelzellen in peripheren Atemwegen verantwortlich ist, ist bis dato noch nicht komplett geklärt. Da dieser Teil der Konstriktion in Anwesenheit des Antagonisten Verapamil bestand, konnte die Beteiligung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen ausgeschlossen werden (Struckmann 2006). Ein anderer Kandidat sind TRPC-Kanalproteine, die nicht nur auf transkriptioneller Ebene im Lungengewebe, sondern auch immunhistochemisch in Zellpopulationen peripherer Atemwege detektiert werden können (Struckmann 2006). Ein intrazellulärer Kalziumeinstrom über TRPC-Kanalproteine nach Stimulation am mAChR, welche eine Gruppe bei den

spannungsunabhängigen Kalziumkanälen darstellen, wurde an transfizierten Zellen gezeigt (Montell 2001).

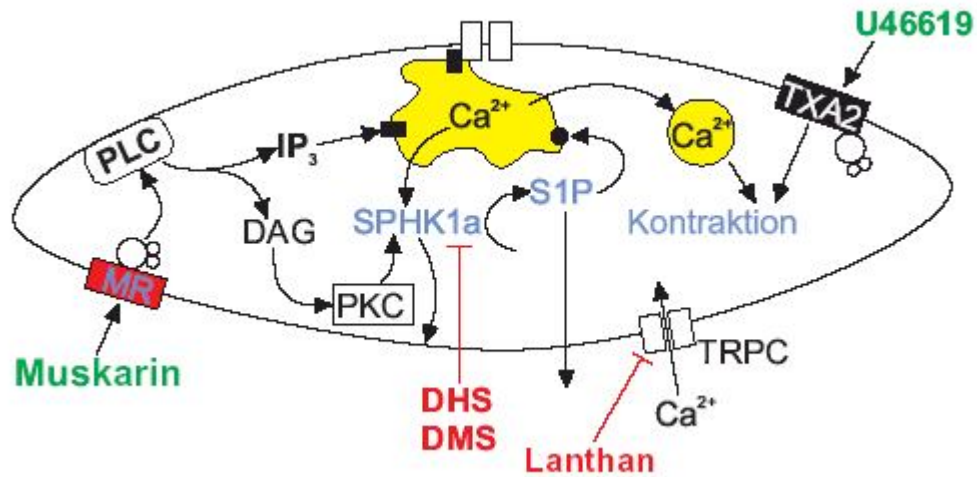


Abb. 19. Schematische Darstellung einer glatten Atemwegszelle. Dargestellt ist der Einfluss der Sphingosinkinase (SPHK1a) auf die intrazelluläre Kalziummobilisierung nach Stimulation am Muskarinrezeptor (MR). Inhibierende Wirkung von DHS/DMS auf SPHK1a. Extrazellulärer Kalziumeinstrom über TRPC-Kanäle und ihre Inhibition durch Lanthan. U46619 vermittelte eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung über den TXA<sub>2</sub>-Rezeptor.

Nach erfolgter Initialkonstriktion zeigte sich nach Hemmung der S1P Synthese durch DMS und DHS eine Abnahme der broncholuminalen Konstriktion. Am Beispiel von Lanthan, einem Inhibitor von spannungsabhängigen Kalziumkanälen und der TRPC-Kanäle 1, 3, 6 und 7 und Agonisten der TRPC 4 & 5 -Kanäle (Nathan et al. 1988, Qiu et al. 2010), sollte in der folgenden Versuchsreihe untersucht werden, ob ein Einfluss auf die Initialkonstriktion nach Stimulation an muskarinischen Rezeptoren besteht.

Verglich man die broncholuminale Initialkonstriktion nach Gabe von Muskarin mit der gemeinsamen Applikation mit Muskarin und Lanthan, so konnte eine signifikant abgeschwächte Initialkonstriktion gezeigt werden (vgl. S. 55, Abb. 16 und S. 59, Tab. 2 (Wert 1 und 3)). Über welchen intrazellulären Signalweg Lanthan Einfluss auf die Initialkonstriktion nimmt, muss in weiteren Studien geprüft werden.

Folgend konnte eine Dilatation nach der Initialkonstriktion auf 89 % der Ausgangsfläche vor Beginn der Spülung gezeigt werden. Die Hypothese ist,

dass nach Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher das extrazelluläre Kalzium fehlt. Dies zeigt die inhibitorische Eigenschaft von Lanthan im Bereich des extrazellulären Kalziumeinstroms durch z. B. TRPC Kanäle oder andere kalziumabhängige Kanäle.

Um zu klären, ob Lanthan einen verstärkenden inhibierenden Effekt auf die intrazelluläre Kalziumfreisetzung hat und damit die Sphingosinkinaseinhibitoren (DHS/DMS) unterstützt, wurde durch gemeinsame Gabe von Muskarin mit Lanthan und DHS/DMS untersucht. Im Vergleich der Initialkonstriktion nach Muskarin und DHS/DMS-Gabe sowie der gemeinsamen Gabe mit Lanthan konnte eine signifikante Inhibierung mit nahezu Aufhebung der broncholuminalen Konstriktion dokumentiert werden (vgl. S. 56, Abb. 17, S. 59-60, Tab. 2, S. 67, Abb. 19). Durch welchen intrazellulären Signaltransduktionsweg Lanthan die intrazelluläre Kalziummobilisierung inhibiert und ob eine Interaktion mit der SPHK1 besteht, lässt sich aus den hier erhobenen Daten nicht direkt ableiten.

In Anwesenheit von DHS und Lanthan war die mAChR-abhängige Konstriktion nahezu komplett gehemmt, was auf eine Aktivierung von SPHK1 und nachfolgende  $Ca^{2+}$  Freisetzung für die initiale Konstriktion hinweist, während der Einstrom von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  für die der initialen Konstriktion folgenden und andauernden Verengung der peripheren Atemwege verantwortlich zu sein scheint.

Dies bewies, dass die in Vorversuchen dokumentierte Dilatation nach Initialkonstriktion, nach Gabe von Muskarin und den Inhibitoren der SPHK1 durch den Kalziumeinstrom von extrazellulär sichergestellt wurde.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf einen relevanten Einfluss der SPHK1 im Signaltransduktionsweg muskarinischer Rezeptoren in den peripheren Atemwegen der Maus hin. Vor dem Hintergrund der bedeutenden Rolle, die muskarinische Acetylcholinrezeptoren bei Lungenerkrankungen spielen, können die hier gefundenen Ergebnisse in der Zukunft Einfluss auf die medikamentöse Therapie erlangen.

## 5 Zusammenfassung

In peripheren Atemwegen erfolgt eine Konstriktion als Antwort auf eine Freisetzung von Acetylcholin (ACh) aus den parasympathischen Nervenfasern. Stimulation muskarinischer Rezeptoren (mAChR) führt in den bronchialen glatten Muskelzellen zu einem intrazellulären Anstieg von Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Die Reaktion auf ACh ist bei Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale erhöht. Ein Modulator des intrazellulären Kalziumspiegels ist Sphingosin 1-Phosphat (S1P), welches durch die Sphingosinkinase-1 und 2 (SPHK1 u. 2) gebildet wird. Es ist bekannt als wichtiger Botenstoff bei vielen biologischen Reaktionsketten, z.B. Überleben von Zellen und Neubildung von Gefäßen.

Unsere Hypothese war, dass S1P in der intrazellulären Signalkaskade nach Stimulation mAChR in den peripheren Atemwegen eingebunden ist.

Mit Hilfe der Videomorphometrie erfolgte an vitalen Lungenschnitten von Mäusen unter einem invertierten Mikroskop die digitale Aufzeichnung der Bronchioli, wobei die Veränderung der luminalen Fläche von Bronchioli in Reaktion auf die pharmakologische Intervention ermittelt wurde.

Nach Stimulation mAChR mit Muskarin konnte eine Konstriktion der broncholuminalen Fläche um 50 % bis 60 % dokumentiert werden. Die Inhibierung der SPHK1 mittels DL-Threo-Dihydrosphingosin (DHS) und N,N-Dimethylsphingosin (DMS) führte zu einer signifikant abgeschwächten durch mAChR vermittelten Bronchokonstriktion, wobei der bronchokonstriktorische Effekt von U46619 (Thromboxan-Analogon) durch DHS/DMS nicht beeinflusst wurde.

Bei gemeinsamer Applikation von Muskarin und Lanthan (Inhibitor von spannungsabhängigen Kalziumkanälen und TRPC-Kanälen) war die Initialkonstriktion und die anhaltende Kontraktion signifikant abgeschwächt im Vergleich zu alleiniger Muskarinapplikation. Die Applikation von Lanthan und DHS/DMS blockierte die broncholuminale Konstriktion auf Muskarinabgabe vollständig.

Die Experimente demonstrieren zum ersten Mal die Aktivierung von Sphingosinkinasen in der Signalkaskade der muskarinischen Bronchokonstriktion in den peripheren Atemwegen der Maus. Vor dem Hintergrund der bedeutenden Rolle, die mAChR bei Lungenerkrankungen

spielen, könnten die hier gefundenen Ergebnisse in der Zukunft Einfluss auf die medikamentöse Therapie erlangen.

## 6 Summary

Peripheral airways constrict in response to acetylcholine (ACh) released from parasympathetic nerve fibres leading to the increase in intracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in response to the activation of muscarinic acetylcholine receptors (mAChR). During airway diseases such as asthma, peripheral airways are hyperactive and show an increased response to mAChR stimulation.

Many studies have shown sphingosine-1 phosphate (S1P) as an important mediator for intracellular calcium. S1P is well known as an important extracellular mediator of a magnitude of biological pathways, e.g. cell survival and angiogenesis. The sphingosine kinases (SPHK1 and 2) catalyse the formation of S1P.

We tested the hypothesis that the generation of S1P is integrated in the mAChR signalling of peripheral airways.

Videomorphometric analysis was performed using precision cut lung slices to study broncho-luminal behaviour on those vital lung slices. Under an inverted microscope digital pictures of the bronchioli were taken to determine changes in the area of the airway lumen in response to pharmacological stimulation.

Stimulation of mAChR with muscarine led to a constriction of peripheral airways of 50 % to 60 %. Blockade of SPHK1 activity through the Inhibitors of sphingosine kinase DL-threo-Dihydrosphingosine (DHS) and N,N-Dimethylsphingosine (DMS) led to a significant reduction of mAChR mediated airway constriction whereas the bronchoconstrictory effect of the thromboxan analogon U46619 was not influenced by SPHK1 inhibition. The DHS/DMS mediated inhibition reduced mainly the initial phase of constriction. This strongly suggests the subsequent activation of SPHKs in response to specific stimulation of mAChR.

Application of muscarine in combination with the voltage gated calcium channel and TRP channel blocker lanthanum chloride abolished the prolonged constriction in response to mAChR stimulation. Application of DHS/DMS together with lanthanum chloride abolished the mAChR mediated constriction of peripheral airways.

The experiments demonstrate for the first time the specific coupling of muscarinic ACh receptors to the stimulation of sphingosine kinases in murine

peripheral airways. Given the important role of muscarinic cholinergic mechanisms in pulmonary disease, these findings should be of considerable therapeutic relevance.



## 7 Literaturverzeichnis

**Abad Santos, F., Novalbos, J., Gallego Sandin, S., Galvez Mugica, M. A.,** 2003. Regulation of bronchial tone in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): role of muscarinic receptors. *An Med Interna.* 20(4):201-5.

**Adrian, R. H.,** 1956. The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle. *J Physiol.* 133(3):631-58.

**Ammit, A. J., Hastie, A. T., Edsall, L. C., Hoffmann, R. K., Amrani, Y., Kane, S. A., Peters, S. P., Penn, R. B., Spiegel, S., Panettieri, R. A. Jr.,** 2001. Sphingosine 1-phosphate modulates human airway smooth muscle cell function that promote inflammation and airway remodeling in asthma. *FASEB J.* 15(7):1212-4.

**Arvidsson, U., Riedl, R., Elde, R., Meister, B.,** 1997. Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol.* 378(4):454-67.

**Barnes, P. J., James, Baraniuk, J. N., Belvisi, M. G.,** 1990. Neuropeptides in the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis.* 144: 1187-98.

**Barnes, P. J.,** 1992. Neural mechanism in asthma. *Br Med Bull.* 48(1):149-168.

**Barnes, P. J.,** 1993. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci.* 52(5-6):521-27.

**Barnes, P. J., Belvisi, M. G., Maak, J. C., Haddad, E. B., O'Conner, B.,** 1995. Tiotropium bromide (Ba679 BR), a novel long-acting muscarinic antagonist for the treatment of obstructive airway disease. *Life Sci.* 56 (11-12):853-9.

**Barnes, P. J.,** 2001. New treatments of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pharmacol.* 1(3):217-22.

**Barnholz, Y., Roitman, A., Gatt, S.,** 1966. Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. II. Hydrolysis of sphingomyelin by an enzyme from rat brain. *J Biol Chem.* 241:3731-37.

**Baumgold, J., Fishman, P. H.,** 1988. Muscarinic receptor-mediated increase in cAMP levels in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 154(3):1137-43.

**Beaven, M. A.,** 1996. Calcium signalling: sphingosine kinase versus phospholipase C?. *Curr Biol.* 6(7):798-801.

**Beckett A. H., Harper, N. J., Clitherow, J. W., Lesser, E.,** 1961. Muscarinic receptors. *Nature.* 189:671-73.

**Beckmann, J. S.,** 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(4):1620-24.

**Benninghoff, A. Drenckhahn D.,** 2002. *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*, 16. Auflage, Band 1.

**Berridge, M. J.,** 1993. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361, 315-25.

**Berridge, M. J.,** 1995. Capacitative calcium entry. *Biochem J.* 312, 1-11.

**Blottner, D., Baumgarten, H. G.,** 1992. Nitric oxide synthesis (NOS)-containing sympathoadrenal cholinergic neurons of the rat IML-cell column: evidence from histochemistry, immunohistochemistry, and retrograde labeling. *J Comp Neurol.* 316(1):45-55.

**Boichot, E. Lagente, V., Paupert Braquet, M., Frossard, N.,** 1993. Inhaled substance P induces activation of alveolar macrophages and increases airway responses in the guinea-pig. *Neuropeptides.* 25(5):307-13.

**Bowden, J. J., Gibbins, I. L.,** 1992. Vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y coexist in non-noradrenergic sympathetic neurons to guinea pig trachea. *J Auton Nerv Syst.* 38(1):1-19.

**Boyden, E. A.,** 1975. Development of the human lung. *Prac of Pediatrics* 4.

**Buckley, N. J., Hulme, E. C., Birdsall, N. J.,** 1990. Use of clonal cell lines in the analysis of neurotransmitter receptor mechanisms and function. *Biochim Biophys Acta.* 1055: 43-53.

**Burnstock, G., Hoyle, C. H. V.,** 1992. *Autonomic Neuroeffector Mechanisms.* Harwood-Academic Publishers.

**Brooks, R. C., McCarthy, K. D., Lapetina, E. G., Morell, P.,** 1989. Receptor-stimulated phospholipase A2 activation is coupled to influx of external calcium and not to mobilization of intracellular calcium in C62B glioma cells. *J Biol Chem.* 264:20147-53.

**Canning, B. J., Udem, B. J.,** 1994. Parasympathetic innervation of airway smooth muscle. In: REABURN D., GEIMBYCZ M.A. (eds.): *Airway smooth muscle: structure, innervation and neurotransmission.* Birkhäuser Verlag, Berlin, S. 43-78.

**Canning, B. J., Fischer, A.,** 1997. Localization of cholinergic nerves in lower airways of guinea pigs using antisera to choline acetyltransferase. *AJP-Lung Physiol.* 272:L731-38.

**Canning, B. J., Mazzone, B., Nanako, M.,** 2005. Synergistic interactions between airway afferent nerve subtypes regulating the cough reflex in guinea pigs. *J Physiol.* 569(2): 559-73.

**Catterall, W.,** 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:521-55.

**Caulfield, M. P.**, 1993. Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther.* 58:319-79.

**Caulfield, M. P., Birdsall, N. J. M.**, 1998. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 50 (2):279-90.

**Chand, N., Diamantis, W., Mahoney, T. P., Sofia, R. D.**, 1988. Phospholipase A<sub>2</sub> induced airway hyperreactivity to cooling and acetylcholine in rat trachea: pharmacological modulation. *Br J Pharmacol.* 94:1057-62.

**Chatterjee, S., Gosh, N.**, 1989. Neutral sphingomyelinase from human urine. Purification and preparation of monospecific antibodies. *J Biol Chem.* 264:12554-61.

**Clapham, D. E.**, 2007. Calcium signalling. *Cell.* 1047-58.

**Cogolludo, A., Moreno, L., Bosca, L., Tamargo, J.**, 2003. Thromboxane A<sub>2</sub>-Induced inhibition of Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channels and Pulmonary Vasoconstriction. *Circ Res.* 93:656-63.

**Coleridge, J. C., Coleridge, H. M.**, 1984. Afferent vagal C fibre innervation of the lung and airways and its functional significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 99:1-110.

**Conklin, B. R., Brann, M. R., Buckley, N. J., Ma, A. L., Bonner, T. I.**, 1988. Stimulation of arachidonic acid release and inhibition of mitogenesis by cloned genes for muscarinic receptor subtypes stably expressed in A9 L cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:8698-702.

**Crimi, N., Mistretta, A.**, 1989. Non-adrenergic non cholinergic nervous control of airways. *Eur Respir J Suppl.* 6:508-11.

**Dale, H.**, 1935. Pharmacology and nerve-endings. *Proc R Soc Med.* 28:319-32.

**Dalsgaard, C. J., Lundberg, J. M.,** 1984. Evidence for a spinal afferent innervation of the guinea-pig lower respiratory tract as studied by the horseradish peroxidase technique. *Neurosci Lett.* 45:117-22.

**Dandurand, R. J., Wang, C. G., Phillips, N. C., Eidelman, D. H.,** 1993. Responsiveness of individual airway to methacholine in adult rat lung explants. *J Appl Physiol.* 75:364-72.

**Danneberg, K.,** 2004. Funktionelle Rolle und subzelluläre Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen 1 und 2 in HEK-293- und PC12-Zellen. Dissertation, Duisburg-Essen, Signatur des Buches ZZX641953.

**Emala, C. W., Aryana, A., Levine, M. A., Yasuda, R. P.,** 1995. Expression of muscarinic receptor subtypes and M2-muscarinic inhibition of adenylyl cyclase in lung. *Am J Physiol.* 268:L101-07.

**Ermert, L., Ermert, M., Duncker, H. R., Grimminger, G., Seeger, W.,** 2000. In situ localization and regulation of thromboxane A<sub>2</sub> synthase in normal and LPS-primed lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 278(4):L744-53.

**Escolar, J. D., Escolar, M. A., Guzman, J., Roques, M.,** 2003. Morphological hysteresis of the small airways. *Histol Histopathol.* 18:19-26.

**Esqueda, E. E., Gerstin, E. H., Griffin, M. T., Ehlert, F. J.,** 1996. Stimulation of cyclic AMP accumulation and phosphoinositide hydrolysis by M<sub>3</sub> muscarinic receptors in the peripheral lung. *Biochem Pharmacol.* 52:643-58.

**Fasolato, C., Innocenti, B., Pozzan, T.,** 1994. Receptor-activated Ca<sup>2+</sup> influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol Sci.* 15(3):77-83.

**Felder, C. C., Dieter, P., Kinsella, K., Tamura, K., Kanterman, R. Y., Axelrod, J.,** 1990. A transfected m<sub>5</sub> muscarinic acetylcholine receptor

stimulates phospholipase A<sub>2</sub> by inducing both calcium influx and activation of protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther.* 255:1140-47.

**Felder, C. C.**, 1995. Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* 9:619-25.

**Fernandes, L. B., Fryer, A. D., Hirshman, C. A.**, 1992. M<sub>2</sub> muscarinic receptors inhibit isoproterenol-induced relaxation of canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 262:119-26.

**Fonnum, F.**, 1975. A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J Neurochem.* 24(2):407-9.

**Frossard, N., Advenier, C.**, 1991. Tachykinin receptors and the airways. *Life Sci.* 49:1941-53.

**Fryer, A. D., El-Fakahany E. E.**, 1990. Identification of three muscarine receptor subtypes in rat lung using binding studies with selective antagonists. *Life Sci.* 47:611-18.

**Fryer, A. D., Jacoby, D. B.**, 1998. Muscarine receptors and control of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med.* 158:154-60.

**Garssen, J., Van Loveren, H., Gierveld, C. M., Van Der Vliet, H., Nijkamp, F. P.**, 1993. Functional characterization of muscarinic receptors in murine airways. *Br J Pharmacol.* 109:53-60.

**Ghosh, T. K., Bian, J., Gill, D. L.**, 1990. Intracellular calcium release mediated by sphingosine derivatives generated in cells. *Science.* 248:1653-56.

**Ghosh, T. K., Bian, J., Gill, D. L.**, 1994. Sphingosine-1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of store calcium. *J Biol Chem.* 269:22628-35.

**Gray, P. R., Mitchell, H. W.,** 1996. Effect of diameter on force generation and responsiveness of bronchial segments and rings. *Eur Respir J.* 9:500-5.

**Groth, M. Helbig, T., Grau, V., Kummer, W., Haberberger, R. V.,** 2006. Spinal afferent neurons projecting to the rat lung and pleura express acid sensitive channels. *Respir Res.* 7(1):96.

**Haberberger, R. V, Schemann, M., Scann, H., Kummer, W.,** 1997. Innervation pattern of guinea pig pulmonary vasculature depends on vascular diameter. *J Appl Physiol.* 82:426-34.

**Halayko, A. J. Camoretti-Mercado, B., Wylam, M. E., Hershenson, M. B., Solway, J.,** 1999. Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes. *Am J Physiol.* 276:197-206.

**Held, H. D., Martin, C., Uhlig, S.,** 1999. Characterization of airway and vascular responses in murine lungs. *Br J Pharmacol.* 126:1191-99.

**Hislop, A. A., Mak, J. C. W., Reader, J. A., Barnes, P. J., Hawroth, S. G.,** 1998. Muscarinic receptor subtypes in the porcine lung during postnatal development. *Eur J Pharmacol.* 359:211-21.

**Horsfield, K.,** 1991. Pulmonary airways and blood vessels considered as confluent trees. *The Lung: Scientific Foundations Vol 1.* 721-27.

**Hua, X. Y., Theodorsson-Norheim, E., Brodin, E., Lundberg, J. M., Hökfeld, T.,** 1985. Multiple tachykinins (neurokinin A, neuropeptide K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. *Regul Pept.* 13(1):1-19.

**Igarashi, Y.** 1997. Functional role of sphingosine, sphingosine 1-phosphate, and methylsphingosines: in regard to membrane sphingolipid signalling pathways. *J Biochem.* 122(6):1080-87.

**Im, D. S., Clemens, J., Macdonald, T. L., Lynch, K. R.,** 2001. Characterization of the human and mouse sphingosine 1-phosphate receptor, S1P5 (Edg-8): structure-activity relationship of sphingosine1-phosphate receptors. *Biochemistry*. 40(46):14053-60.

**Iwamoto, I. N., Nakagawa, N., Yamazaki, H., Kimura, A., Tomioka, H., Yoshida, S.,** 1993. Mechanism for substance P-induced of human neutrophils and eosinophils. *Regul Pept*. 46(1-2):228-30.

**Junqueira, L. C. C., Schiebler, J., Peiper, U., Schneider, F.,** 1986. *Histologie*. Osford University Press, Berlin, Heidelberg, New York, Toronto.

**Johnson, K. R., Becker, K. P., Facchinetti, M. M., Hannun, Y. A., Obeid, L. M.,** 2002. PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *J Biol Chem*. 277(38):35257-62.

**Jones, G. L., Saroea, H. G., Watson, R. M., O`Byrne, P. M.,** 1992. Effect of an inhaled thromboxane mimetic (U46619) on airway function in human subjects. *Am Rev Respir Dis*. 145(6):1270-4.

**Jones, S. V.,** 1992. m4 muscarinic receptor subtypes activates an inwardly rectifying potassium conductance in AtT20 cells. *Neurosci Lett*. 147:125-30.

**Kajita, J., Yamaguchi, H.,** 1993. Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am J Physiol*. 264:496-503.

**Klapproth, H. Rheinheimer, T., Metzen, J., Münch, M., Bittinger, F., Kirpatrick, C. J., Höhle, K. D., Schemann, M., Racke, K., Wessler, I.,** 1997. Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 355:515-23.



**Krumdieck, C. L., dos Santos, J. E., Ho, K. J.,** 1980. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Biochem Biophys Res Commun.* 104:118-23.

**Kummer, W., Fischer, A., Kurkowski, R., Heym, C.,** 1992. The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience.* 49:715-37.

**Kummer, W., Wiegand, S., Akinici, S., Wessler, I., Schinkel, A. H., Wess, J., Koepsell, H., Haberberger, R. V., Lips, K.,** 2006. Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. *Respiratory Research.* 7:65.

**Kuo, H. P., Rohde, J. A., Touyama, K., Barnes, P. J., Rogers, D. F.,** 2003. Capsaicin and sensory neuropeptide stimulation of goblet cell secretion in guinea-pig trachea. *J Physiol.* 431:629-41.

**Lampert, D. G., Woicikiewicz, R. J., Safrany, S. T., Whitham, E. M., Nahorski, S. R.,** 1992. Musacrinic receptors, phosphoinositide metabolism and intracellular calcium in neuronal cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 16:253-70.

**Lai, W. Q., Goh, H. H., Bao, Z., Wong, W. S., Melendez, A. J., Leung, B. P.,** 2008. The role of sphingosine kinase in a murine model of allergic asthma. *J Immunol.* 180(6):4323-9.

**Lei, Y. H., Barnes, P. J., Rogers, D. F.,** 1992. Inhibition of neurogenic plasma exudation in guinea-pig airways by CP-96,345, a new non-peptide NK1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 105:261-62.

**Levine, J. D., Collier, D. H., Basbaum, A. I., Moskowitz, M. A., Helms, C. A.,** 1985. Hypothesis: the nervous system may contribute to the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 12:406-11.

**Liao, C. F., Schilling, W. P., Birnbaumer, M., Birnbaumer, L.,** 1990. Cellular responses to stimulation of the M5 muscarinic acetylcholine receptor as seen in murine L cells. *J Biol Chem.* 265:11273-84.

**Lindh, B., Staines, W., Hökfelt, T., Terenius, L., Salvaterra, P. M.,** 1986. Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea-pig autonomic ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:5316-20.

**Lips, K. S., Volk, C., Schmitt, B. M., Arndt, P., Miska, D., Ermert, L., Kummer, W., Koepsell, H.,** 2005. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 33(1):79-88.

**Loewi, O.,** 1921. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere.* 189:239-42.

**Lundberg, J. M., Terenius, L., Hökfelt, T., Goldstein, M.,** 1983. High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. *Neurosci Lett.* 42:167-72.

**Lundberg, J. M., Hökfelt, T., Martling, C. R., Saria, A., Cuello, C.,** 1984. Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res.* 235:251-61.

**Lundberg, J. M., Hemsén, A., Rudhill, A., Härfstrand, A., Larsson, O., Sollevi, A., Saria, A., Hökfelt, T., Fuxe, K., Fredholm, B. B.,** 1988. Neuropeptide Y- and alpha-adrenergic receptors in pig spleen: localization, binding characteristics, cyclic AMP effects and functional responses in control and denervated animals. *Neuroscience.* 24:659-72.

**Maclagan, J., Barnes P. J.,** 1989. Muscarinic pharmacology of the airways. *Trends Pharmacol Sci.* 88-92.

**Maclagan, J., Fryer, A. D., Faulkner, D.,** 1989. Identification of M1 muscarinic receptors in pulmonary sympathetic nerves in the guinea-pig by use of pirenzepine. *Br J Pharmacol.* 97:499-505.

**Mann, S. P.,** 1971. The innervation of mammalian bronchial smooth muscle: the localization of catecholamines and cholinesterases. *Histochem J.* 3:319-31.

**Mak, J. C., Baraniuk, J. N., Barnes, P. J.,** 1992. Localization of muscarinic receptor subtype mRNAs in human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 7:344-48.

**Martin, C., Uhlig, S., Ullrich, V.,** 1996. Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *Eur Respir J.* 9:2479-87.

**Martin, C., Ullrich, V., Uhlig, S.,** 2000. Effects of the thromboxane receptor agonist U46619 and endothelin-1 on large and small airways. *Eur Respir J.* 16:316-23.

**Martin, R. J.,** 2002. Therapeutic significance of distal airway inflammation in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 109:447-60.

**Martling, C. R., Saria, A., Fischer, J. A., Hökfelt, T., Lundberg, J. M.,** 1988. Calcitonin gene-related peptide and the lung: neuronal coexistence with substances P, release by capsaicin and vasodilatory effect. *Regul Pept.* 20:125-39.

**Meyer zu Heringsdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K. T., Neumann, E., Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K., van Koppen, K. H.,** 1998. Sphingosine kinase-mediated Ca<sup>2+</sup> signalling by G-protein-coupled receptors. *The EMBO J Vol 17.* 2830-2837.

**Mitchell, H. W., Sparrow, M. P.,** 1994. Increased responsiveness to cholinergic stimulation of small compared to large diameter cartilaginous bronchi. *Eur Respir J.* 7:298-305.

**Mikoshiba, K.**, 1997. The InsP<sub>3</sub> receptor and intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling. *Curr Opin Neurobiol.* 7(3):339-45.

**Montell, C.**, 2001. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* Issue 90, p. re1.

**Morris, J. I., Gibbins, J. L.**, 1992. Co-transmission and neuromodulation. In: Burnstock G, Hoyle CHV (eds) *Autonomic neuroeffector mechanism.* Harwood Academic Chur, pp 2121-45.

**Nadel, J. A.**, 1990. Neutral endopeptidase modulation of neurogenic inflammation in airways. *Eur Respir J.* 12:645-51.

**Nathan, R. D., Kanai, K., Clark, R. B., Giles, W.**, 1988. Selective block of calcium current by lanthanum in single bullfrog atrial cells. *JGP.* 91(4):549-72.

**Nishiuma, T., Nishimura, Y., Okada, T., Kuramoto, E., Kotani, Y., Jahangeer, S., Nakamura, S.**, 2008. Inhalation of sphingosine kinase inhibitor attenuates airway inflammation in asthmatic mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294(6):1085-93.

**Numa, S., Noda, M., Takahashi, T., Tanabe, M., Toyosato, Y., Furutani, S.**, 1983. Molecular structure of the nicotinic acetylcholine receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 48:57-69.

**Ochs, M., Nyengaard, J., R., Jung, A., Knudsen, L., Voigt, M., Wahlers, T., Richter, J., Gundersen, H. J. G.**, 2004. The number of alveoli in the human lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 169(1):120-4.

**Okuda, T., Haga, T., Kanai, Y., Endou, H., Ishihara, T., Katsura, I.**, 2000. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci.* 3(2):120-25.

**Olianas, M., Onali, P.,** 1992. Properties of muscarinic-stimulated adenylate cyclase activity in rat olfactory bulb. *J Neurochem.* 58(5):1723-29.

**Olivera, A., Zhang, H., Carlson, R. O., Mattie, M. E., Schmidt, R. R., Spiegel, S.,** 1994. Stereospecificity of sphingosine-induced intracellular calcium mobilization and cellular proliferation. *J Biol Chem.* 269(27):17924-30.

**Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S., Spiegel, S.,** 1999. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine 1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol.* 147:225-37.

**Pack, R. J., Al-Ugaily, L. H., Morris, G.,** 1981. The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. *J Anat.* 132:71-84.

**Pack, R. J., Ugaly, L. H.,** 1981. The cells of tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. *J Anat.* 132:71-84.

**Pack, R. J., Richardson, P. S.,** 1984. The aminergic innervation of the human bronchus: a light and electron microscopic study. *J Anat.* 138:493-502.

**Parekh, A. B., Penner, R.,** 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* 77:901-30.

**Paraoanu, L. E., Steinert, G., Koehler, A., Wessler, I., Layer, P. G.,** 2007. Expression and possible functions of the cholinergic system in a murine embryonic stem cell line. *Life Sci.* 80:2375–79.

**Parsons, S. M., Prior, C., Marshall, I. G.,** 1993. Acetylcholine transport, storage, and release. *Int Rev Neurobiol.* 35:279-90.

**Partanen, M., Laitinen, A., Hervonen, A., Toivanen, M., Laitinen, L. A.,** 1982. Catecholamine- and acetylcholinesterase-containing nerves in human lower respiratory tract. *Histochemistry*. 76:175-88.

**Pfaff, M., Powaga, N., Akinici, S., Schütz, W., Banno Y., Wiegand, S., Kummer, W., Wess, J., Haberberger, R. V.,** 2005. Activation of SPHK/S1P signalling pathway is coupled to muscarinic receptor-dependent regulation of peripheral airways. *Respir Res*. 6:48.

**Pfeil, U., Haberberger, R. V., Lips, K. S., Eberling, L., Grau, V., Kummer, W.,** 2003. Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia. *Life Sci*. 72:2087-90.

**Phalen, R. F., Yeh, H. C., Schum, G. M., Raabe, O. G.,** 1978. Application of an idealized model to morphometry of the mammalian tracheobronchial tree. *Anat Rec*. 190:167-76.

**Plato, M., Kummer, W., Haberberger, R. V.,** 2005. Structural and neurochemical comparison of vagal and spinal afferent neurons projecting to the rat lung. *Neurosci Lett*. 13;395(3):215-19.

**Popot, J. L., Changeux, J. P.,** 1984. Nicotinic receptor of acetylcholine: structure of an oligomeric integral membrane protein. *Physiol Rev*. 64:1162-39.

**Pyne, S., Pyne, N. J.,** 2000. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J*. 349:385-402.

**Qiu, J., Fang, Y., Bosch, M. A., Ronnekleiv, O. K., Kelly, M. J.,** 2010. Guinea pig kisspeptin neurons are depolarized by leptin via activation of TRPC channels. *Endocrinology*. 152(4):1503-14.

**Reinheimer, T., Bernedo, P., Klapproth, H., Oelert, H., Zeiske, B., Racke, K., Wessler, I.,** 1996. Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and

human: species differences in role of airway mucosa. *Am J Physiol.* 270:722-28.

**Richardson, J. B.**, 1977. The neural control of human tracheobronchial smooth muscle. *Asthma*, vol. 2. Academic Press Inc., New York.

**Rodger, I. W.**, 1985. Excitation-contraction coupling and uncoupling in airway smooth muscle. *Br J Clin Pharmacol.* 20:255-66.

**Roffel, A. F., Elzinga, C. R., Zaagsma, J.**, 1990. Musacrinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulm Pharmacol* 3:27-51.

**Rosenfeldt, H. M., Amrani, Y., Watterson, K. R., Murthy, K. S., Panettieri, R. A., Spiegel, S.**, 2003. Sphingosine-1-phosphate stimulates contraction of human airway smooth muscle cells. *FASEB J.* 279(13):1789-99.

**Saria, A., Martling, C. R., Yan, Z., Theodorson-Nordheim, E., Gamse, R., Lundberg, J. M.**, 1988. Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, histamine, dimethylphenyl piperazinium, and vagal nerve stimulation. *Am Rev Respir Dis.* 137:1330-5.

**Saroea, H. G., Inman, M. D., O'Byrne, P. M.**, 1995. U46619-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects is mediated by acetylcholine release. *Am J Respir Crit Care Med.* 151:321-24.

**Satoh, H., Lou, Y. P., Lee, L. Y., Lundberg, J. M.**, 1992. Inhibitory effects of capsazepine and the NK2 antagonist SR 48968 on bronchoconstriction evoked by sensory nerve stimulation in guinea-pigs. *Acta Physiol Scand.* 146:535-36.

**Shapiro, M. S., Loose, M. D., Hamilton, S. E., Nathanson, N. M., Gomeza, J., Wess, J., Hille, B.**, 1999. Assignment of muscarinic receptor subtypes mediating G-protein modulation of Ca(2+) channels by using knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:10899-904.

**Shioya, T., Solway, J., Munoz, N. M., Mack, M., Leff, A. R.,** 1987. Distribution of airway contractile responses within the major diameter bronchi during exogenous bronchoconstriction. *Am Rev Respir Dis.* 135:1105-11.

**Sonea, I. M., Bowker, R. M., Broadstone, R. V., Robinson, N. E.,** 1993. Adrenergic and peptidergic innervation in trachealis muscle in the horse: a preliminary report. *Res Vet Sci.* 54:335-39.

**Sonea, I. M., Bowker, R. M., Robinson, N. E., Holland, R. E.,** 1994. Distribution of SP- and CGRP-like immunoreactive nerve fibers in lower tract of neonatal foals: evidence for loss during development. *Anat Embryol.* 190:469-77.

**Spiegel, S., Milstein, S.,** 2002. Sphingosine 1-phosphate, a key signalling molecule. *J Biol Chem.* 277:25851-54.

**Spina, D.,** 1998. Modulation of sensory nerve function in airway. *Pulm Pharmacol Ther.* 11:319-30.

**Springall, D. R., Cadieux, A., Oliveira, H., Royston, D., Polak, J. M.,** 1987. Retrograde tracing shows that CGRP-immunoreactive nerves of rat trachea and lung originate from vagal and dorsal root ganglia. *J Auton Nerv Syst.* 20:155-66.

**Starke, K.,** 1996. *Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage ed.* Spektrum, Heidelberg, Berlin, Oxford.

**Stengel, P. W., Gomeza, J., Wess, J., Cohen, M. L.,** 2000. M(2) and M(4) receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 292:877-85.

**Stengel, P. W., Yamada, M., Wess, J., Cohen, M. L.,** 2002. M(2)-receptor knockout mice: muscarinic receptor function in atria, stomach fundus, urinary bladder, and trachea. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 282:1443-49.



**Starck, D.**, 1975. Embryologie. Thieme, Stuttgart.

**Stoffel, W., Bauer, E., Stahl, J.**, 1974. The metabolism of sphingosine bases in *Tetrahymena pyriformes*. Sphingoine kinase and sphingosin-1-phosphate lyase. *Physiol Chem.* 355 61-74.

**Stretton, D.**, 1991. Non-adrenergic. Non-cholinergic neural control of the airways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 18:675-84.

**Struckmann, N., Schwering, S., Wiegand, S., Gschnell, A., Yamada, M., Wess, J., Haberberger, R. V.**, 2003. Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: studies on receptor-deficient mice. *Mol Pharmacol.* 64(6):1444-51.

**Struckmann, N.**, 2006. Die Bedeutung von TRPC-Kanälen in der muskarinvermittelten Kontrolle peripherer Atemwege der Maus. Justus Liebig-Universität Gießen, Institut für Anatomie und Zellbiologie.

**Suidan, H. S., Murrel, R. D., Tolkowsky, A. M.**, 1991. Carbachol and bradykinin elevate cyclic AMP and rapidly deplete ATP in cultured rat sympathetic neurons. *Cell Regul.* 2:113-25.

**Takata, Y., Nishimura, Y., Maeda, H., Yokoyama, M.**, 1999. Phospholipase A2 augments contraction and intracellular calcium mobilization through thromboxane A2 in bovine trachea smooth muscle. *Eur Respir J.* 14:396-404.

**Tolan, D., Conway, A. M., Steele, L., Pyne, N. J.**, 1996. The identification of DL-threo dihydrosphingosine and sphingosine as novel inhibitors of extracellular signal-regulated kinase signalling in airway smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 119(2):185-6.

**Uddman, R., Sundler, F., Emson, P.**, 1984. Occurrence and distribution of neuropeptide-Y-immunoreactive nerves in the respiratory tract and middle ear. *Cell Tissue Res.* 237:321-7.

**Valerius, K. P.**, 1996. Size-dependent morphology of the conductive bronchial tree in four species of myomorph rodents. *J Morphol.* 230:291-97.

**Wang, Z., Yu, M. F., Robison, N. E.**, 1995. Prejunctional muscarinic autoreceptors on horse airway cholinergic nerves. *Life Sci.* 56:2255-62.

**Watson, E. L., Singh, J. C., McPhee, C., Beavo, J.**, 1990. Regulation of cAMP metabolism in mouse parotid gland by cGMP and calcium. *Mol Pharmacol.* 38:547-53.

**Wess, J.** 1996. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol.* 10:69-99.

**Wessler, I., Kirkpatrick, C. J., Racke, K.**, 1998. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: Expression and function in humans. *Pharmacol Ther.* 77:59-79.

**Wessler, I., Kirkpatrick, C. J., Racke, K.**, 1999. The cholinergic „pitfall“: acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 26:198-205.

**Wessler, I., Kirkpatrick, C. J.**, 2001. The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther.* 14:423-43.

**Wilson, D. P., Susnjar, M., Kiss, E., Sutherland, C., Walsh, M. P.**, 2005. Thromboxane A<sub>2</sub>-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup> sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem J.* 389(3):763-74.

**Yan, Z., Surmeier, D. J.**, 1996. Muscarinic (m<sub>2</sub>/m<sub>4</sub>) receptors reduce N- and P-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci.* 16(8):2592-604.

**Yavin, E., Gatt, S.,** 1969. Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. 8. Further purification and properties of rat brain ceramidase. *Biochemistry* 8:1692-98.

**Yasuda, R. P., Ciesla, W., Flores, L. R., Wall, S. J., Li, M., Satkus, S. A., Weistein, J. S., Spangnola, B. V., Wolfe, B. B.,** 1993. Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol.* 43(2):149-57.

**Yatomi, Y., Ruan, F., Megidish, T., Toyokuni, T., Hakomori, S., Igarashi, Y.,** 1996. N,N-dimethylsphingosine inhibition of sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate activity in human platelets. *Biochem.* 35:626-33.

**Young, K. W., Channing, D. R., Nahorski, S. R.,** 2000. Effect of dimethylsphingosine on muscarinic M(3) receptor signalling in SH-SY5Y cells. *Eur J Pharmacol.* 402:55-59.

**Young, K. W., Nahorski, S. R.,** 2001. Intracellular sphingosine1-phosphate production: a novel pathway for calcium release. *Semin Cell Dev Biol.* 12:19-25.

**Yu, M., Robinson, N. E., Wang, Z., Derkson, F. J.,** 1992. Muscarinic receptor subtypes in equine tracheal smooth muscle. *Vet Res Commun.* 16:301-10.

**Xu, S. Z., Muraki, K., Zeng, F., Sukumar, P., Shan, S., Dedman, A. M., Flemming, P. K., McHugh, D., Nayler, J., Cheong, A., Bateson, A. N., Munsch, C. M., Porter, K. E., Beech, D. J.,** 2006. A sphingosine-1-phosphate-activated calcium channel controlling vascular smooth muscle cell motility. *Circ Res.* 98:1381-89.

**Zaagsma, J., Roffel, A. F., Meurs, H.,** 1997. Muscarine control of airways function. *Life Sci.* 60:1061-8.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

A., Aa.	Arteria, Arteriae
AChR	Acetylcholinrezeptor
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CHAT	Cholinacetyltransferase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
ChAT	Cholinacetyltransferase
COPD	chronisch obstruktive Bronchitis
DAG	Diaminoglycerol
DMS	DL-Threo-Dihydrosphingosin
DHS	N,N,-Dimethylsphingosin
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
eNANC	excitatory non-adrenergic non-cholinergic system
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	(lat.): und andere
Fa.	Firma
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
G-Protein	Guaninnucleotid-bindende Regulatorproteine
GTP	Guanosintriphosphat
INANC	inhibitory non-adrenergic non-cholinergic system
IP3	Inositoltriphosphat
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
M <sub>1-5</sub> R	muskarinischer Rezeptor 1-5
M	Molar
N.	Nervus
NA	Noradrenalin
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NANC	nicht-adrenerg, nicht-cholinerg
NKA	Neurokinin A
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Tyrosin
OCT	organische Kationentransporter
PIP2	Phosphatidylinositolbiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinosindiphosphat
PMA	Aktivator der Proteinkinase C
RAR	schnell adaptierende Dehnungsrezeptoren
ROCC	receptor-operated calcium channel (Rezeptor-abhängiger Kalziumkanal)
SAR	langsam adaptierende Dehnungsrezeptoren

SOCC	store-operated calcium channel (speicherabhängiger Kalziumkanal)
S1P	Sphingosin 1-Phosphat
SP	Substanz P
SPHK1	Sphingosinkinase-1
TRP	transient receptor potential (transientes Rezeptorpotential)
VAChT	vesikulärer Acetylcholintransporter
V., Vv	Vene, Venen
VICC	voltage-insensitive calcium channel (spannungsunabhängiger Kalziumkanal)
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
VOCC	voltage-operated calcium channel (spannungsabhängiger Kalziumkanal)
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 9 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Strukturformel Sphingosin 1-Phosphat.....	26
<b>Abbildung 2:</b>	Schema der Inkubationskammer.....	33
<b>Abbildung 3:</b>	Maus in Rückenlage mit eröffnetem Bauch und Brustkorb.....	35
<b>Abbildung 4:</b>	Darstellung der einzelnen Schritte: Maus, Herstellung der Lungenschnitte, Inkubation, mikroskopische Auswertung und graphische Darstellung.....	37
<b>Abbildung 5:</b>	Videomikroskopische Aufnahme eines 220 µm dicken Lungenschnittes der Maus.....	38
<b>Abbildung 6:</b>	Videomikroskopische Aufnahme eines 220 µm dicken Lungenschnittes der Maus nach Muskaringabe.....	39
<b>Abbildung 7:</b>	Broncholuminale Flächenänderung auf Muskaringabe nach 4 Inkubation unterschiedlichen Atemwegsdiametern.....	41
<b>Abbildung 8:</b>	Broncholuminales Verhalten auf Muskaringabe nach 4 h Inkubationszeit.....	43
<b>Abbildung 9:</b>	Broncholuminales Verhalten auf Muskaringabe nach 12 h Inkubationszeit.....	44
<b>Abbildung 10:</b>	Broncholuminales Verhalten auf Muskaringabe nach 12 h Inkubationszeit.....	46
<b>Abbildung 11:</b>	Broncholuminales Verhalten auf Gabe von Muskarin und DHS.....	47
<b>Abbildung 12:</b>	Broncholuminales Verhalten auf Gabe von Muskarin und DMS .....	49
<b>Abbildung 13:</b>	Broncholuminales Verhalten auf Gabe von U46619.....	50
<b>Abbildung 14:</b>	Broncholuminales Verhalten auf Gabe von U46619/DHS.....	52
<b>Abbildung 15:</b>	Broncholuminales Verhalten auf Gabe von Muskarin/DMS.....	53
<b>Abbildung 16:</b>	Broncholuminales Verhalten auf Gabe von Muskarin/Lanthan.....	55
<b>Abbildung 17:</b>	Broncholuminales Verhalten auf Gabe von Muskarin/Lanthan/DHS.....	56
<b>Abbildung 18:</b>	Broncholuminales Verhalten auf Gabe von Muskarin/Lanthan/DMS.....	58
<b>Abbildung 19:</b>	Schematische Darstellung einer glatten Atemwegszelle.....	67

## 10 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Broncholuminales Verhalten nach Muskaringabe in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	42
<b>Tabelle 2:</b>	Vergleich der luminalen Bronchialflächen.....	59-60
<b>Tabelle 3:</b>	Vergleich der luminalen Bronchialflächen.....	60

## 11 Erklärung

“Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Promotionsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt oder indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich für einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Norbert Powaga

## 11 Eigene Publikation zum Thema

### Originalarbeit

Pfaff, M., **Powaga, N.**, Akinici, S., Schütz, W., Banno, Y., Wiegand, S., Kummer, W., Wess, J., Haberberger, R. V., 2005. Activation of the SPHK/S1P signalling pathway is coupled to muscarinic receptor-dependent regulation of peripheral airways. *Respir Res* 6(1):48.

### Abstracts

**Powaga, N.**, Schütz, W., Struckmann, N., Kummer, W., Haberberger, R. V., 2003. Products of the sphingosine kinase-I are involved in the muscarinic receptor signalling in peripheral airways of the mouse. *Ann Anat (Suppl)* 185:306.

Schütz, W., **Powaga, N.**, Struckmann, N., Banno, Y., Kummer, W., Haberberger, R. V., 2003. Products of sphingosine kinase-I are involved in the muscarinic receptor signalling in the peripheral airways of the mouse. *Autonom Neurosci: Basic Clin* 106:44.

**Powaga, N.**, Schütz, W., Wiegand, S., Kummer, W., Haberberger, R. V., 2004. Activation of sphingosine kinase 1 is involved in the muscarinic receptor dependent regulation of peripheral airways. *Ann Anat (Suppl)* 186:65.



**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**

## 14 Danksagung

Für das Überlassen des Themas möchte ich mich zunächst bei A/Prof. Dr. Haberberger bedanken und für die damit verbundenen Mittel und Möglichkeiten am Institut für Anatomie und Zellbiologie.

Weiterführend gilt ein besonderer Dank Prof. Dr. Kummer für die abschließende Betreuung der Dissertation nach dem beruflichen Wechsel von A/Prof. Dr. Haberberger nach Adelaide/Australien, an das Center for Neuroscience, Flinders University.

Für die nette und geduldige Einarbeitung in das Thema, Erklärung der Versuchgeräte und Versuchabläufe sowie die Begleitung der ersten Experimente gebührt ein besondere Dank Dr. Nicole Struckmann.

Bei der Durchführung der Versuche danke ich allen Mitarbeitern der Labore für Anatomie und Zellbiologie der JLU Giessen für ihre unendliche Geduld, die vielen Ratschläge sowie die nette Atmosphäre. Für die Unterstützung bei den Experimenten möchte ich mich besonders bei Silke Wiegand, Petra Hartmann, Anna Goldberger und Petra Faulhammer bedanken.

Ein lieber Dank geht auch an Karola Michael für die Hilfe bei der grafischen Darstellung und Patricia Berger, Sekretariat Prof. Dr. Kummer.

Für ihren unermüdlichen Einsatz beim Korrekturlesen ergeht ein großer Dank an Dr. Judith Melchers genannt Meyer und an Dr. Wolfram Hofmann.

Meinen Eltern gilt ein besonderer Dank für die finanzielle und seelische Unterstützung während des Studiums und die damit verbundene eigene Einschränkung.

Zum Schluss möchte ich mich vor allem bei meiner Frau Ines Powaga bedanken, die mich in guten und in schlechten Zeiten stets motiviert hat. Für ihre Geduld und ihren Zuspruch danke ich ihr vom ganzen Herzen.