

**Molekulare Komponenten  
des cholinergen Systems  
in mikrodisseziertem Trachealepithel  
der Ratte**

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

vorgelegt von  
Eberling, Lars  
aus Berlin

Gießen 2005

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

Direktor: Prof. Dr. W. Kummer

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer

Gutachter: PD Dr. L. Fink

Tag der Disputation: 20. Juni 2005

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

Gießen, den 20. Juni 2005

Lars Eberling





## Inhalt

---

2.2 Reverse Transkription (RT) .....	32
2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	32
2.4 Immunfluoreszenz .....	36
<b>3 Ergebnisse</b>	
3.1 RT-PCR Produkte nach laserunterstützter Mikrodissektion .....	38
3.1.1 VAcHT .....	38
3.1.2 CHT1 .....	41
3.1.3 ChAT .....	44
3.2 VAcHT Immunfluoreszenz .....	47
<b>4 Diskussion</b>	
4.1 Laserunterstützte Mikrodissektion .....	50
4.2 CHT1 .....	50
4.3 ChAT .....	55
4.4 VAcHT .....	60
4.5 Funktionelle Bedeutung nicht-neuronaler, cholinergischer Komponenten .....	64
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	66
<b>Abstract</b> .....	68
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	70
<b>7 Lebenslauf/Danksagungen</b> .....	84

### **1 Einleitung**

#### **1.1 Das cholinerge System**

##### **1.1.1 Historische Entwicklung**

Acetylcholin (ACh) stellt evolutionsgeschichtlich ein extrem altes Molekül dar. Es wird angenommen, dass es seit ungefähr 3 Milliarden Jahren existiert und in biologischen Systemen eine weite Verbreitung hat (WESSLER ET AL. 1999). So kann es u.a. in Pflanzen, Pilzen und Algen, aber auch in vielen menschlichen Zellen nachgewiesen werden (GRANDO ET AL. 1997A, KLAPPROTH ET AL. 1997, WESSLER ET AL. 1998, 1999, HABERBERGER ET AL. 2002, SONG ET AL. 2003). Die Proteine des cholinergen Systems dienen zur Synthese und Wahrnehmung des Botenstoffes ACh. Erste Elemente dieses Systems wurden bereits um 1900 beschrieben. So konnten Dale und Lewis ACh in Pflanzen nachweisen (EWINS 1914). Langley erkannte als erster postsynaptische Bindungsstellen für die Pflanzengifte Muskarin und Nikotin. Doch erst 1921 konnte durch Otto Loewi experimentell der Nachweis geführt werden, dass Nervenendigungen des N. vagus eine Substanz „Parasympathin“ abgeben. Wenige Jahre später wurde dieser Stoff als ACh identifiziert (LOEWI 1921A/B, 1926). In den folgenden Jahren legte man das Augenmerk vor allem auf ACh als Neurotransmitter. Es zeigte sich jedoch, dass ACh auch in einer Vielzahl nicht-neuronaler Gewebe nachweisbar ist. So wiesen Experimente ACh in einzelligen Organismen, Pflanzen

(BEYER ET AL. 1936, COMLINE 1946, HARTMANN ET AL. 1978) und der menschlichen Plazenta, einem nicht cholinerg innerviertem Organ, nach (COMLIN 1946, SASTRY 1997). Aufgrund dieser experimentellen Funde deklarierte Whittaker 1963, „... da Acetylcholin in der Natur so weit verbreitet ist, sollte man auch eine nicht-neuronale Funktion annehmen ...“ (WHITTAKER 1963). Weitere Untersuchungen in den folgenden Jahren bekräftigten diese These. So gelang es Sastry et al. 1979 erstmals, die Expression von Bestandteilen des nicht-neuronalen cholinergen Systems in Säuger- und Nichtsäugerzellen nachzuweisen (SASTRY ET AL. 1979). Seitdem konnte in zahlreichen weiteren Experimenten dargelegt werden, dass einzelne Bestandteile des cholinergen Systems auch in nicht-neuronalen Zellen vorkommen (WESSLER ET AL. 2001A).

### **1.1.2 ACh: Von der Synthese bis zur Freisetzung**

Wie Nachmansohn und Machado bereits 1943 herausfanden, wird ACh durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Acetyl-CoenzymA (AcetylCoA) und Cholin synthetisiert (NACHMANSOHN ET AL. 1943). Neben ChAT ist auch die ubiquitär, z.B. in Herz- und Skelettmuskulatur, vorkommende Carnitinacetyltransferase zur ACh Synthese befähigt (WHITE ET AL. 1973, TUCEK ET AL. 1982). AcetylCoA ist ein Abbauprodukt des Fettsäurezyklus in den Mitochondrien, welches in das Zytosol abgegeben wird. Das Cholin muss zuvor über ein Transportsystem in das Zytosol der Zelle aufgenommen werden. Hierzu ist prinzipiell jede Zelle

befähigt (ADAMIC 1972, DUCIS 1988). Unterschiede werden in der Affinität der Transportsysteme zu Cholin gemacht. So differenziert man hochaffine Cholintransporter gegenüber niedrigaffinen Cholintransportern. Beide Transportsysteme sind abhängig vom Natriumgradienten. Es zeigt sich jedoch eine weitaus stärkere Abhängigkeit des hochaffinen Cholintransporters vom Natriumgradienten als es beim niedrigaffinen Cholintransporters der Fall ist (DUCIS 1988). Ein weiteres Charakteristikum des hochaffinen Transporters ist die spezifische Hemmbarkeit durch Hemicholinium-3 (DUCIS 1988). Das verantwortliche Protein für eine hochaffine Cholinaufnahme wurde erstmals durch Okuda et al. 2000 kloniert (OKUDA ET AL. 2000A/B). Dieser der ACh Synthese vorangehende Vorgang ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der ACh Produktion (OKUDA ET AL. 2000A). Mit Hilfe der ChAT erfolgt nun die ACh Synthese. Anschließend wird ACh in neuronalen Zellen über den vesikulären Acetylcholin Transporter (VACHT) in Vesikel verpackt (MATSURA ET AL. 1997). Für nicht-neuronale Zellen hingegen konnte bis jetzt kein Beweis für eine Speicherung in Vesikeln geführt werden. Man geht aber davon aus, dass auch in solchen Zellen die Speicherung in Vesikeln oder aber in Zellorganellen bzw. Zellkompartimenten mit Hilfe des VACHT stattfindet (WESSLER ET AL. 2001C). Die Freisetzung des gespeicherten ACh aus Neuronen findet über eine Erhöhung der intrazellulären Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) Konzentration statt. Eine ebensolche Erhöhung ist auch für die ACh Freisetzung aus T-Lymphozyten erforderlich (FUJI ET AL. 2001). Neben der These, dass die ACh Freisetzung über reine Exozytose stattfindet (JAHN ET AL. 1994), konnten Bloc et al.

zeigen, dass ein spezifisches Protein, Mediatophor, mit für die Freisetzung verantwortlich ist (FALK-VAIRANT ET AL. 1996, BLOC ET AL. 1999). An menschlicher Plazenta zeigte sich, dass ein spezifischer organischer Kationentransporter (OCT) die Freisetzung von ACh in entscheidendem Maße beeinflusst (WESSLER ET AL. 2001B). Drei Isoformen dieser OCTs, OCT1-3 sind bekannt. Für die ACh Freisetzung an der Plazenta werden die beiden Isoformen OCT1 und OCT3 benötigt (WESSLER ET AL. 2001B). Durch Quinin konnte eine reversible Hemmung der OCT und somit eine reduzierte Freisetzung von ACh erreicht werden (WESSLER ET AL. 2001B).

Das freigesetzte ACh kann nun mit muskarinischen und/oder nikotinischen Rezeptoren auf den Zielzellen interagieren. Diese Rezeptoren sind auf neuronalen und nicht-neuronalen Zellen weit verbreitet, z.B. Plazenta, Endothel- und zirkulierenden weißen Blutzellen (WESSLER ET AL. 2001c). Durch die Acetylcholin Esterase (AChE) und die Butyrylcholin Esterase (BuChE) wird das im Interzellulärspalt befindliche ACh wieder in seine Bestandteile Cholin und Acetat gespalten. Die Hydrolyse beschränkt die Wirkung von ACh auf ein bestimmtes Areal, wodurch eine hormonartige Ausbreitung von ACh verhindert wird (Wessler et al. 2001c).

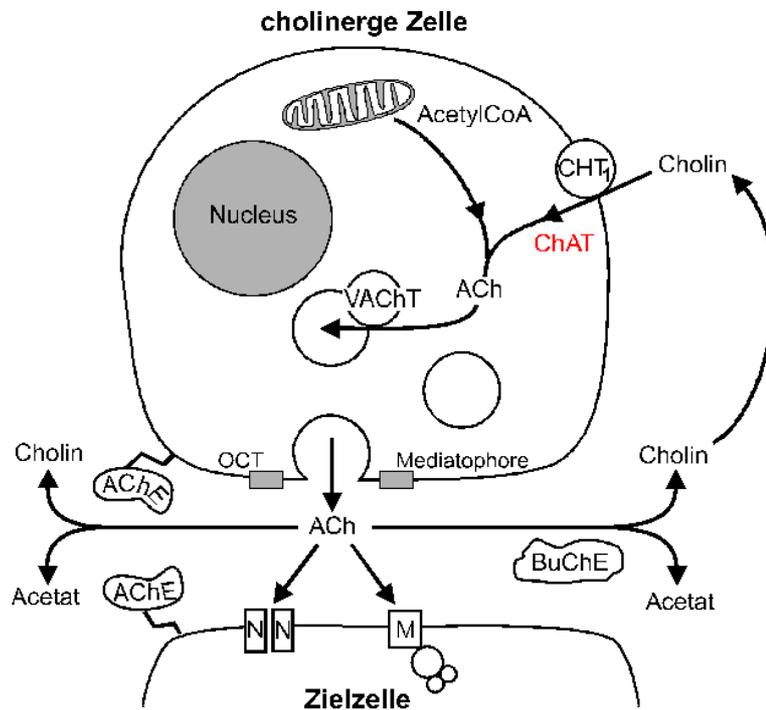


Abbildung 1: Cholinerge Zelle mit ACh Syntheseyklus. Aufnahme von Cholin durch CHT1 in das Zytosol, Synthese von ACh aus AcetylCoA und Cholin mittels ChAT, anschließend vesikuläre Speicherung von ACh mit Hilfe von VACHT. Freisetzung des vesikulär gespeicherten ACh durch OCT und/oder Mediatophor in interzellulären Spalt, hier Interaktion mit nikotinischen und/oder muskarinischen Rezeptoren auf Zielzelle. Abschließende Inaktivierung von ACh durch Spaltung mittels AChE oder BuChE in Acetat und Cholin, mit Wiederaufnahme von Cholin durch CHT1.

### 1.1.3 Bestandteile des cholinergen Systems

#### 1.1.3.1 Cholintransporter 1 (CHT1)

Cholin ist ein essenzieller Bestandteil in der ACh Synthese. Zu diesem Zweck muss es in das Zytosol der Zelle aufgenommen werden. Hierzu sind prinzipiell alle Zellen in der Lage (ADAMIC 1972, DUCIS 1988). Da

Cholin jedoch nicht befähigt ist, die Zellmembran zu passieren, benötigt es spezifische Transporter. In Neuronen erfolgt die Cholinaufnahme über den hochaffinen CHT1. Dieser ist stark vom Natriumgradienten abhängig und spezifisch durch Hemicholinium-3 hemmbar (SWANN ET AL. 1988, OKUDA ET AL. 2000A/B). Im Jahr 2000 gelang Okuda et al. die Klonierung des CHT1 Proteins für Mensch und Ratte (OKUDA ET AL. 2000A/B). Es setzt sich aus 12 Transmembrandomänen zusammen und besteht aus 580 Aminosäuren (OKUDA ET AL. 2000A). Das humane Gen wurde auf Chromosom II mit der Position IIq11-12 lokalisiert (OKUDA ET AL. 2000B). Neben diesem hochaffinen Cholintransporter existiert ein weiterer, niedrigaffiner Cholintransporter. Dieser ist weniger stark vom Natriumgradienten abhängig. Zellen mit niedrigaffinem Cholintransporter zeigen eine geringere Cholinaufnahme. Okuda et al. propagierten 2000 aufgrund positiver Funde mittels Northern Blot und In-Situ Hybridisation an neuronalen, aber negativer Resultate an nicht-neuronalem Gewebe, dass CHT1 spezifisch für neuronale Zellen sei (OKUDA ET AL. 2000A/B). Mittlerweile konnte jedoch auch für nicht-neuronales Gewebe die Existenz von CHT1 gezeigt werden, so z.B. in Keratinozyten der Haut (HABERBERGER ET AL. 2002).

### **1.1.3.2 Cholinacetyltransferase (ChAT)**

ChAT ist an der Synthese von ACh aus AcetylCoA und Cholin beteiligt (NACHMANSOHN ET AL. 1943). Daneben existiert in Herz- und Skelettmuskelzellen mit der Carnitinacetyltransferase ein weiteres ACh syn-

thetisierendes Protein (WHITE ET AL. 1973, TUCEK ET AL. 1982). ChAT zeigt eine hohe Spezifität für Cholin, wohingegen es verschiedene Acylgruppen akzeptiert. So konnte an cerebralem Gewebe der Ratte die gleiche Affinität von ChAT für AcetylCoA, PropionylCoA und ButyrylCoA gezeigt werden (ROSSIER 1977). Dies lässt vermuten, dass ChAT neben der ACh Synthese auch an der Propionyl- sowie Butyrylcholinsynthese beteiligt ist (ROSSIER 1977). Für den Menschen konnte das ChAT Gen auf Chromosom 10, Region 10q11, gefunden werden (WESSLER ET AL. 1998). Das ChAT Gen der Ratte besteht aus 3 nicht kodierenden (R, N und M), sowie 14 kodierenden Exons. Durch alternatives Splicing können bei Ratte und Mensch verschieden viele mRNA Isoformen gebildet werden. So existieren beim Menschen 4, bei Ratte 5 und der Maus 7 mRNA Isoformen (KENGAKU ET AL. 1993, WU ET AL. 1994, MISAWA ET AL. 1997). Aus den mRNAs werden beim Menschen Proteine mit 69 kDa und 82 kDa translatiert, bei Ratte und Maus lediglich eines mit 68 kDa. Neben diesen konnten in Atemwegszellen ChAT ähnliche Proteine mit Molekulargewichten von 41 kDa und 54 kDa gezeigt werden (KLAPPROTH ET AL. 1997). Des weiteren zeigten sich im zentralen und peripheren Nervensystem unterschiedliche ChAT mRNA Isoformen. Im Rückenmark und Gehirn existiert eine 4 kb große sogenannte ChAT of common type (cChAT). Im peripheren Gewebe existiert eine Spleißvariante der pChAT, die sogenannte ChAT of peripheral type (pChAT) (TOKOYAMA ET AL. 2000).

### **1.1.3.3 Vesikulärer Acetylcholin Transporter (VAChT)**

Mit Hilfe des VAChT wird das neuronal synthetisierte ACh im Wasserstoff (H<sup>+</sup>) Antiport in Vesikel transportiert. Er besteht aus 12 membranspannenden Domänen und ist durch Vesamicol hemmbar (ERICKSON ET AL. 1994). Für nicht-neuronale Zellen ist bisher kein Nachweis erbracht worden, ob eine vesikuläre oder andersartige ACh Speicherung existiert. Außergewöhnlich ist die Lage des VAChT Gens. Hatte man bisher immer angenommen, dass Introns nur nicht-kodierende Sequenzen enthalten, fand sich in diesem Fall, dass das Gen für VAChT auf dem 1. Intron zwischen den ersten beiden nicht kodierenden Exons für ChAT liegt. Es liegen also 2 Komponenten des cholinergen Systems in unmittelbarer genomischer Nachbarschaft. Diese Tatsache hat der Sequenz den Namen „cholinerges Genlokus“ gegeben (Abb. 2, Seite 15). In neuronalen Zellen nimmt man eine Co-Regulation der beiden Gene an (WU ET AL. 1994, BEJANIN ET AL. 1994, BERRARD ET AL. 1995). Für nicht-neuronale Zellen konnte eine solche Co-Regulation bisher nicht gezeigt werden. Es gibt jedoch erste Hinweise auf ein Vorkommen von nicht-neuronalem VAChT, so z.B. in Granulozyten des Dünndarms der Ratte, sowie in Endothelzellen von Pulmonalarterien bei Ratte und Mensch (SCHÄFER ET AL. 1998, HABERBERGER ET AL. 2000).

## Einleitung

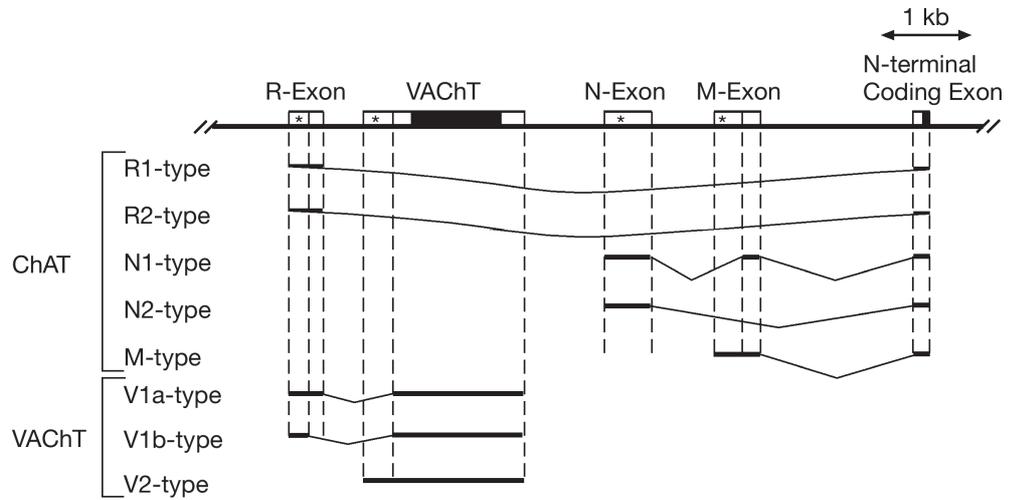


Abbildung 2: Misawa et al. (1995), *Neuroreport* 6: 965-968; Schematische Darstellung des cholinergen Genlokus bei der Ratte (obere Linie), sowie der verschiedenen ChAT und VAcHt mRNA Formen (unterer Bildabschnitt). Schwarz gefüllte Boxen stellen kodierende, weiß gefüllte nicht kodierende VAcHt und ChAT Gensequenzen dar. R, N und M sind 3 nicht kodierende Exons des ChAT Gens. Vertikal von Exons ausgehende gestrichelte Linien zeigen die Spleißvarianten der mRNA Formen für VAcHt und ChAT. Sternchen in oberster Linie markieren Startpunkte für die Transkription des ChAT und VAcHt Gens.

## 1.2 Bisherige Nachweise nicht-neuronaler Komponenten des cholinergen Systems

Komponente des cholinergen Systems	Spezies	Organ/Gewebe	Methodik des Nachweises	Autor und Jahr
ChAT	Mensch	Haut, Haarfollikel	Immunfluoreszenz	JOHANSSON ET AL. 1993
	Mensch	Keratinocyten	Immunfluoreszenz	GRANDO ET AL. 1993
	Schwein	Kultivierte Endothelzellen zerebraler Mikrogefäße	Immunfluoreszenz	IKEDA ET AL. 1994
	Mensch	Lunge	Immunfluoreszenz	KIRKPATRICK ET AL. 1997
	Mensch	Leukämische T-Zelllinie	RT-PCR, Immunfluoreszenz	KAWASHIMA ET AL. 1998
	Mensch, Schwein, Meerschweinchen	Pulmonalarterien	Immunfluoreszenz	HABERBERGER ET AL. 2000
	Schwein	Endothelzellen Pulmonalarterien	RT-PCR	HABERBERGER ET AL. 2000
	Mensch	Endothelzellen von Gefäßen der Haut	Immunfluoreszenz	KIRKPATRICK ET AL. 2001
	Mensch	kultivierte umbilikale Endothelzellen und Angiosar-kom Zelllinie	Immunfluoreszenz	KIRKPATRICK ET AL. 2003
VACHT	Ratte	Schweißdrüse der Haut	Immunfluoreszenz	GUIDRY ET AL. 1998
	Mensch, Schwein	Endothelzellen Truncus pulmonalis	RT-PCR	HABERBERGER ET AL. 2000
	Ratte	Pulmonalarterien	RT-PCR	HABERBERGER ET AL. 2000
	Mensch	Endothelzellen von Gefäßen der Haut	Immunfluoreszenz	KIRKPATRICK ET AL. 2001
CHT1	Mensch, Ratte	Haut, menschliche Keratinocyten Zelllinie HaCaT	RT-PCR, Immunfluoreszenz	HABERBERGER ET AL. 2002
	Ratte, Mensch	Arterielle Gefäßwandzellen	RT-PCR, Immunfluoreszenz, Western Blot	LIPS ET AL. 2003

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht bisheriger nicht-neuronaler Komponenten des cholinergen Systems

### 1.3 Laserunterstützte Mikrodisektion

Die laserunterstützte Mikrodisektion ist ein Verfahren, welches es erlaubt, Untersuchungen an gezielt isolierten Zellen aus histologischen Präparaten durchzuführen. Der Hauptvorteil dieses Verfahrens liegt neben der Isolierung einzelner Zellen oder Zellverbänden in der hohen Präzision bei geringer Kontaminationsgefahr und leichter Durchführbarkeit (BECKER ET AL. 1997). Anfangs fand die laserunterstützte Mikrodisektion lediglich eine Anwendung in der routinemäßigen DNA-Analytik bei Tumorleiden, Infektionen und genetischen Erkrankungen (BECKER ET AL. 1997). Kummer et al. konnten 1998 erstmals zeigen, dass diese Methode, ergänzt durch eine RT-PCR, auch der mRNA Analyse dienen kann (KUMMER ET AL. 1998). In den folgenden Jahren bekräftigten eine ganze Reihe von Untersuchungen diese Beobachtung (FINK ET AL. 1998, 1999, 2000). So ist es mit Hilfe der laserunterstützten Mikrodisektion möglich, eine qualitative Aussage darüber zu tätigen, ob eine mRNA Expression in dem zu untersuchenden Gewebe existiert oder nicht. Weitergehende Untersuchungen von Fink et al. zeigten darüber hinaus, dass neben der qualitativen auch die quantitative Untersuchung von mRNA Expressionen möglich ist (FINK ET AL. 1998). So erlaubt die Kombination aus laserunterstützter Mikrodisektion und Real-time quantitativer PCR, erstmals eine Zelltyp-spezifische relative RNA Quantifizierung aus komplexem Gewebe (FINK ET AL. 1998).

Bis zur Einführung der laserunterstützten Mikrodissektion waren mRNA Untersuchungen nur an Gewebehomogenaten oder Gewebefragmenten möglich. Diese hatten zum Nachteil, dass die Gewebegewinnung meist relativ unspezifisch erfolgte, wodurch Mischexpressionen verschiedener Zelltypen unvermeidlich waren. Zudem bestand bei einer solchen Form der Gewebegewinnung eine hohe Gefahr der Kontamination der Proben.

Als Ausgangsgewebe können neben formalinfixierten auch schockgefrorene Präparate verwendet werden (KUMMER ET AL. 1998, SCHÜTZE UND LAHR 1998). Bei sachgerechter Lagerung kann das Gewebe über einen längeren Zeitraum gelagert werden, wodurch sich die Anzahl der Versuchstiere drastisch reduzieren lässt. Zur Erhöhung der Spezifität bei der Zellidentifikation kann man das verwendete Gewebe vor der Mikrodissektion einer Immunfluoreszenz unterziehen (FINK ET AL. 2000). Zwar hat die Vorbehandlung durch die Immunfluoreszenz einen negativen Einfluss auf den nachfolgenden RNA Nachweis, trotzdem lassen sich positive Ergebnisse erzielen (FINK ET AL. 2000). Eine Schonung der verwendeten Gewebe lässt sich durch den Verzicht einer RNA Extraktion sowie eines DNase Verdaus erreichen (KUMMER ET AL. 1998). Die RNA Extraktion wird aufgrund der speziellen Technik des Auftauens der gewonnen Proben überflüssig. Hierbei wird die Tertiärstruktur der mRNA zerstört und die anschließende RT erhält eine bessere Angriffsmöglichkeit. Der DNase Verdau kann durch die Verwendung Intron überspannender Primer umgangen werden (KUMMER

ET AL. 1998, FINK ET AL. 1998). Kann dies nicht gewährleistet werden, müssen spezifische Kontrollproben durchgeführt werden, die eine eventuelle Kontamination der Probe mit DNA anzeigen.

Bisher wurde die laserunterstützte Mikrodisektion vor allem zur Isolierung relativ großer und damit leicht zu isolierender Zellen angewendet. So ließen sich z.B. Neurone aus dem Herzen der Ratte oder aber Alveolarmakrophagen aus der Lunge sehr gut einzeln isolieren (FINK ET AL. 1998, KUMMER ET AL. 1998). Dagegen gibt es bisher kaum Untersuchungen darüber, ob die laserunterstützte Mikrodisektion auch zur Isolierung einzelner Zellen aus dichtstehenden Gewebverbänden, wie z.B. dem Trachealepithel, zu verwenden ist. Die Anzahl von zu isolierenden Zellen für einen mRNA Nachweis hängt von der Expression der zu untersuchenden mRNA im jeweiligen Gewebe ab. So reichen z.B. für den Nachweis von ChAT mRNA aus Neuronen des Herzens ein bis zehn Neuronenanschnitte aus (KUMMER ET AL. 1998). Nimmt man dagegen Gewebe mit geringerer mRNA Expression, kann die Anzahl der zu untersuchenden Zellen erhöht werden, ohne das Ergebnis zu verfälschen.

## **1.4 Komponenten des nicht-neuronalen cholinergen Systems im Trachealepithel und deren Funktion**

### **1.4.1 Mukoziliäre Clearance, Wasser- und Ionentransport**

Die Oberfläche der Atemwege ist von einem feinen Flüssigkeitsfilm bedeckt, welcher durch einen koordinierten Zilienschlag, vor allem in den großen Atemwegen, nach oral transportiert wird. Diesen Vorgang bezeichnet man als mukoziliäre Reinigung. Für eine effektive Reinigung sind neben einem synchronisierten Zilienschlag eine Interaktion zwischen Nachbarzellen, Sekretion von Wasser, Ionen und Schleim sowie eine Regulation der Zell-Zell-Kontakte erforderlich (WANNER ET AL. 1996). Diese Bestandteile beeinflussen sich gegenseitig. Verringern sich z.B. die Zell-Zellabstände, kann es zu erhöhtem Zilienschlag und reflektorischer Mukusabgabe mit der Freisetzung von glykosylierten Proteinen kommen (WANNER ET AL. 1996). Diese Proteine reagieren dann mit den Oberflächenstrukturen der Zellen und verhindern so, dass sich Bakterien o.ä. an diese binden können (WANNER ET AL. 1996). ACh kann direkt in die Mukussekrektion eingreifen. So zeigten isolierte submuköse Drüsen vom Schwein nach ACh Applikation eine erhöhte Glukokonjugatsekretion (DWYER ET AL. 1992). Des weiteren ist ACh über die Beeinflussung von  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -Kanälen an der Flüssigkeitssekretion beteiligt. Untersuchungen am Trachealepithel des Schafes zeigten bei ACh Applikation eine Stimulation apikaler  $\text{Cl}^-$  Kanäle (ACEVEDO 1994). Durch diese Stimulation wird eine Kaskade in der Zelle ausgelöst, die

eine Hyperpolarisation und damit eine Flüssigkeitssekretion zur Folge hat. Beide Mechanismen, Mukus- und Flüssigkeitsabgabe, dienen der Abwehr und schützen so vor dem Eindringen von Mikroorganismen (WANNER ET AL. 1996).

ACh ist direkt an der Regulation des Zilienschlags beteiligt (WESSLER ET AL. 2001D). Erste Hinweise stammen bereits aus dem Jahre 1953 (BÜLBRING ET AL. 1953). An Kiemenplatten der Seemuschel *Mytilus edulis*, die keine Neurone enthält, aber dennoch ACh produziert, wurde nach ACh und Physostigmin Applikation eine verstärkte Zilientätigkeit beobachtet (BÜLBRING ET AL. 1953). In Biopsien aus humanem Bronchusgewebe konnte diese Beobachtung bestätigt werden (WONG ET AL. 1988A, B). Nach Applikation von Agonisten und Antagonisten muskarinischer Rezeptoren zeigte sich eine Stimulation bzw. eine Inhibition der Zilientätigkeit (WONG ET AL. 1988A/B). Auffällig ist, dass sich der Zilienschlag bei Säugern durch Atropin reduzieren lässt, jedoch eine Basalaktivität bestehen bleibt (SASTRY ET AL. 1979, WANNER ET AL. 1996). Es scheint ein Grundmechanismus zu existieren, der durch besondere Einflüsse gesteigert werden kann. Eine wichtige Voraussetzung für die effektive mukoziliäre Reinigung ist der koordinierte Zilienschlag. Wanner et al. zeigten, dass spezielle Zell-Zell-Kontakte, gap junctions und extrazelluläre parakrine Faktoren für die Koordination des Zilienschlags sowie die Verbindung Zilienschlag-Mukusbildung verantwortlich sein müssen (WANNER ET AL. 1996).

### 1.4.2 Zellproliferation

Nicht-neuronales ACh hat einen Einfluss auf die Mitose von Epithelien des Menschen. Klapproth et al. zeigten an isolierten und anschließend kultivierten Bronchialepithelzellen, dass appliziertes ACh einen stimulierenden Effekt auf das Wachstum der Zellen hat (KLAPPROTH ET AL. 1997). Durch die Applikation der muskarinischen und nikotinischen Rezeptor-Antagonisten Atropin und D-Tubocurarin konnte das Wachstum gestoppt werden (KLAPPROTH ET AL. 1997). Diese Beobachtungen lassen die Überlegung zu, dass nicht-neuronales ACh an der Regulation der natürlichen Zellerneuerung des Bronchialepithels beteiligt ist (WESSLER ET AL. 2001c). Auch in anderen Oberflächenzellen, wie z.B. dem Kornealepithel, zeigte sich, dass nicht-neuronales ACh über auto-/parakrine Mechanismen an der Regulation der Mitose beteiligt ist (CAVANAGH ET AL. 1989). Grando et al. belegten von 1993–1999 in einer ganzen Reihe von Untersuchungen, dass ACh über nikotinische und muskarinische Rezeptoren einen Einfluss auf das Wachstum von menschlichen Keratinozyten der Epidermis hat (GRANDO ET AL. 1993, 1996, 1997A/B, 1999). ACh ist auch an der Differenzierung der Keratinozyten sowie an der Wundheilung der Haut beteiligt (WESSLER ET AL. 2001c). Haberberger et al. konnten 2002 mittels RT-PCR und Immunhistochemie die Existenz von CHT1 sowohl für humane als auch für Haut der Ratte nachweisen (HABERBERGER ET AL. 2002). In der Immunfluoreszenz an kultivierten Zellen zeigte sich eine vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten abhängige Zunahme der

CHT1-Immunreaktivität (HABERBERGER ET AL. 2002). Der Verdacht liegt nahe, dass ACh und CHT1 gemeinsam in die Signalwege der Differenzierung von Keratinozyten integriert sind.

Unter physiologischen Bedingungen proliferieren beim Menschen innerhalb von 24 h weniger als 1% der Bronchialepithelzellen (WANNER ET AL. 1997). Ändern sich die Bedingungen, z.B. bei chronischen Atemwegserkrankungen, steigt die Zahl der an der Proliferation befindlichen Zellen auf bis zu 17% an (WANNER ET AL. 1997). Nimmt man eine unter pathologischen Bedingungen gesteigerte ACh Freisetzung an, so zeigen diese und die Ergebnisse von Grando et al. 1993, 1996, 1997a/b, 1999, dass nicht-neuronales ACh am Wachstum von Epithelzellen des Menschen beteiligt ist. Eine solch gesteigerte ACh Sekretion findet sich in kleinzelligen Bronchialtumoren (SCLC). Song et al. konnten zeigen, dass SCLC-Zellen ACh synthetisieren und abgeben können (SONG ET AL. 2003). So freigesetztes ACh stimuliert autokrin das Wachstum der SCLC-Zellen (SONG ET AL. 2003). Frühere Hinweise, dass ACh am Tumorwachstum beteiligt ist, erbrachten Schuller et al. bereits 1990 an Lungentumoren von Hamstern (SCHULLER ET AL. 1990). Nach Applikation von ACh und Nikotin konnte eine Wachstumsstimulation der Tumorzellen hervorgerufen werden (SCHULLER ET AL. 1990).

### 1.4.3 Zell-Zell-Kontakte und Zytoskelett

Nicht-neuronalen ACh ist in die Kontrolle des Zytoskeletts sowie durch Beeinflussung der Zell-Zell-Kontakte an der Interaktion der Zellen untereinander beteiligt. Zu den Elementen des Zellskeletts gehören Mikrotubuli, Filamente verschiedener Kaliberstärken sowie Lamine. Die Bestandteile besitzen eine statische und eine dynamischen Funktion. Sie sind an der Formbewahrung- bzw. Änderung, der Bewegung der Zelle, sowie an intrazellulären Transportabläufen beteiligt. Auf diesen Wegen können Proteine, Rezeptoren und Organellen transportiert werden. Zur dynamischen Funktion des Zellskeletts gehört auch die Beteiligung an der Proliferation sowie der Apoptose, dem programmierten Zelltod (WESSLER ET AL. 2001C). Mikrotubuli und andere Bestandteile weisen eine negative Oberflächenladung auf. Da ACh durch seine positive Ladung ein Kation ist, könnte durch diese Ladungsunterschiede eine direkte Interaktion zwischen ACh und Zellskelettbestandteilen bestehen (WESSLER ET AL. 2001C).

Nicht-neuronalen ACh ist an der Funktion des Zellskeletts beteiligt. Hemmte man nikotinische ACh Rezeptoren in Zellkulturen humaner Atemwegsepithelzellen durch die Antagonisten Tubocurarin, Mecamylamin oder  $\alpha$ -Bungarotoxin, so wurde neben einer Zellverkleinerung eine Größenzunahme des Interzellularspaltes beobachtet (KLAPPROTH ET AL. 1994, MAUS ET AL. 1998). Durch das Einwirken auf die Zell-Zell-Kontakte wird die qualitative Schutzfunktion der Oberflächenepithelien

beeinträchtigt. Darüber hinaus zeigten Wessler et al., dass appliziertes Atropin auf humanen Hautschnitten eine Verschlechterung der desmosomalen Zell-Zell-Kontakte sowie eine generelle Verbreiterung des Extrazellulärraumes zur Folge hatte (WESSLER ET AL. 1999). Damit nimmt ACh Einfluss auf die Barrierenfunktion der Haut und des Atemwegsepithels.

### **1.5 Fragestellungen der Arbeit**

Die bisherigen Untersuchungen über nicht-neuronale Komponenten des cholinergen Systems wiesen bisher nur einzelne Bestandteile in verschiedenen Geweben nach. Ein Nachweis, dass alle drei Komponenten gleichzeitig im selben Gewebe existieren, wurde bisher nicht erbracht. Daraus ergeben sich, exemplarisch für das Trachealepithel der Ratte, folgende Fragestellung:

1. Lassen sich auf molekularer Ebene die mRNAs von CHT1, VAcHT und ChAT im Trachealepithel der Ratte nachweisen?
2. Kann darüber hinaus VAcHT Protein mittels Immunfluoreszenz im Trachealepithel gezeigt werden?
3. Ist es mit Hilfe der laserunterstützten Mikrodissektion möglich, Trachealepithel der Ratte für eine anschließende mRNA Analyse zu gewinnen?
4. Kann eine differenzierte Isolierung der einzelnen Trachealepithelzellen mittels der laserunterstützten Mikrodissektion erfolgen?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Laserunterstützte Mikrodissektion**

#### **2.2.2 Gewebegewinnung**

Zur Gewinnung der Tracheen wurden adulte Wistar Ratten (n=25) verschiedenen Geschlechts verwendet. Diese wurden mittels Chloroform (Trichlormethan, Roth, Karlsruhe, Deutschland) anästhesiert und durch Durchtrennung der Aorta abdominalis getötet. Anschließend konnte die Trachea von der Bifurcatio tracheae bis zum Cartilago cricoidea freipräpariert und entnommen werden. Zur Schonung des Gewebes dauerte die Präparation nicht länger als 10 min. Nach Entnahme erfolgte das Schockgefrieren der Trachea in, durch flüssigen Stickstoff (N<sub>2</sub>) auf – 50° Celsius gekühltem Isopentan (KUMMER ET AL. 1998). Abschließend wurde die gefrorene Trachea mittels Tissue Tek® (Sakura, Zoeterwonde, Holland) auf einen Filterpapierträger aufgefroren (Riedel de-Haen, Seelze, Deutschland) und bis zur weiteren Prozessierung in flüssigem N<sub>2</sub>, beziehungsweise bei – 80°C gelagert (FINK ET AL. 1998, KUMMER ET AL. 1998).

### 2.1.2 Schnitthanfertigung und Färbung

Die schockgefrorenen Tracheen konnten nun am Kryostaten (Leica CM 1900, Bensheim) in einer Stärke von 8 µm Dicke geschnitten und mit einem Deckglas (Langenbrück, Emmerding, Deutschland) aufgenommen werden. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden diese zuvor über Nacht in Aceton (reinst, Riedel de-Haen, Seelze, Deutschland) eingelegt, anschließend für eine 1/2 Stunde in Wasserstoffperoxyd (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und bis zum endgültigen Gebrauch in 100% Ethanol (Riedel de-Haen, Seelze, Deutschland) gelagert. Zwischen jedem Schritt erfolgte eine Spülung mit sterilem Wasser (H<sub>2</sub>O).

Die auf das Deckglas aufgetragenen Schnitte wurden nun 1,5 min in einer Hämalaunlösung nach Mayer (1 g Hämatoxilin in 1 l destilliertem H<sub>2</sub>O gelöst, 0,2 g NaJo<sub>3</sub>, 50 g KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>12H<sub>2</sub>O, 1 g kristalline Zitronensäure (alle Substanzen Fluka, Neu-Ulm, Deutschland), 50 g Chloralhydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)) gefärbt und zum Wasserentzug in einer aufsteigenden Alkohollreihe (70%, 95%, 100% Ethanol) gebläut. Abschließend konnten sie in 100% Ethanol gelagert werden, wobei ein Zeitrahmen von 4 h bis zur endgültigen Verwendung nicht überschritten wurde (KUMMER ET AL. 1998).

### 2.1.3 Probengewinnung

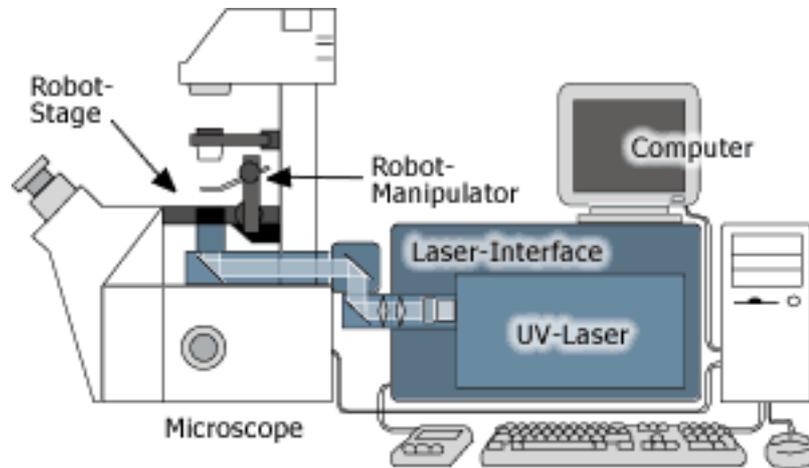


Abbildung 3: Aus Homepage von P.A.L.M., Berried, Germany. Übersichtsdarstellung des UV-Laser-Mikrodissektionssystems. Mikroskop mit über Computer steuerbarer Robot-Stage, Robot-Manipulator und UV-Lasereinheit.

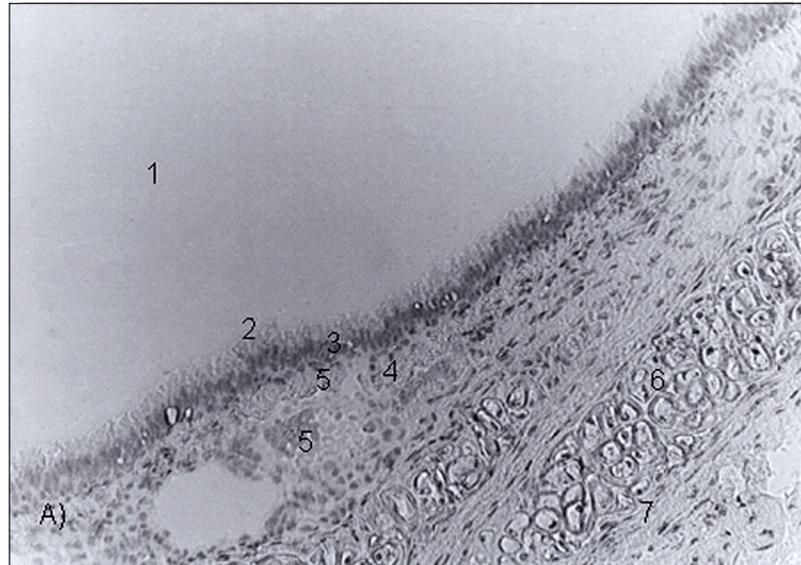
Mit Hilfe eines speziellen UV-Laser-Mikrodissektionssystems konnte nun aus dem gefärbten Gewebe ein Verband von ca. 50 Tracheal-epithelzellen isoliert werden. Nach Entnahme der Deckgläser aus dem Ethanol wurde bis zur endgültigen Gewebegewinnung eine Zeit bis zu 45 min nicht überschritten (KUMMER ET AL. 1998).

Das System besteht aus einem Stickstoff-Laser (337 nm Wellenlänge, max. 20 Pulse pro Sekunde, 3 ns Pulsdauer), dessen Strahl in den Strahlengang eines inversen Mikroskops (Zeiss Convert 135; Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) integriert werden kann (Abb. 3). Energieintensität sowie Fokussierung des Laserstrahls können beeinflusst werden und variieren die Schnittdicke des Lasers (SCHÜTZE UND LAHR

1998). Der Mikroskopisch kann ebenso wie ein Mikromanipulator per Computer-Maus bewegt werden (SCHÜTZE UND LAHR 1998). Mit Hilfe des Laserstrahls können nun unter optischer Kontrolle die gewünschten Zellverbände aus dem Trachealepithel geschnitten werden (Abb. 4A-D). Zur Vermeidung eventueller Kontamination der Probe durch genomische DNA aus dem Zellkern beschränkte sich die Mikrodissektion auf den zellkernfreien, apikalen Teil des Trachealepithels. Nach dem Schneidevorgang wurde der Objektträger mittels einer Pipette mit 100% Ethanol befeuchtet. Anschließend erfolgte die Befestigung einer 30G-Kanüle am Mikromanipulator. Mit Hilfe der 30G-Kanüle konnte nun unter optischer Kontrolle das zuvor freigeschnittene Gewebe zu einem Konglomerat zusammengeschoben werden (Abb.4A-D). Beim Verdunsten des Ethanols adhärierte das Gewebekonglomerat an der Spitze der Kanüle und konnte so aufgenommen werden (Abb.4A-D). Abschließend wurde die Nadel mit der gewonnenen Probe in ein Reaktionsgefäß mit 10 µl spezieller Pufferlösung (52 mM Tris-Puffer, 78 mM KCl, 3,1 mM MgCl<sub>2</sub>) überführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen und zur Materialschonung wurde das Reaktionsgefäß zunächst 5 min auf Eis gekühlt und anschließend bis zur nachfolgenden Reversen Transkription in flüssigem N<sub>2</sub> aufbewahrt (KUMMER ET AL. 1998, FINK ET AL. 1998).

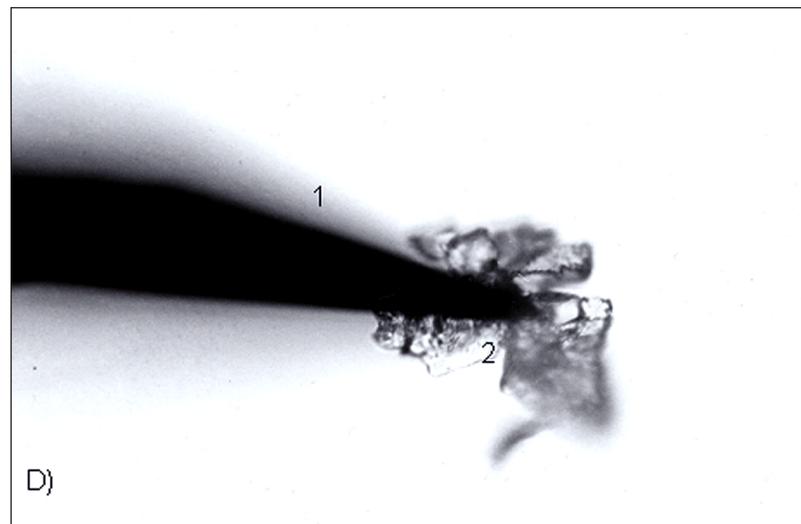
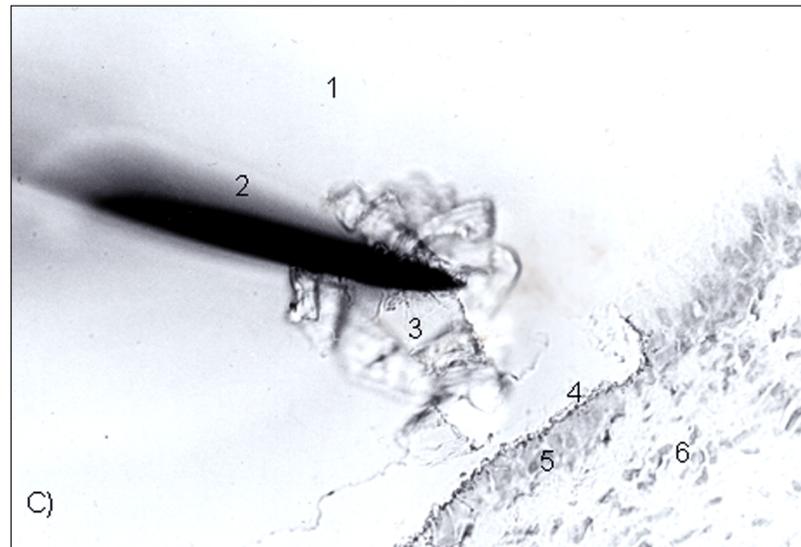
## Material und Methoden

Abbildung 4 A-D: Durchführung laserunterstützter Mikrodissektion am Trachealepithel der Ratte.



A: Mikroskopische Übersicht vor Schneidevorgang. 1 Tracheallumen; 2 apikaler, zellkernfreier Trachealepithelanteil; 3 basale Zellkernreihe; 4 Lamina propria mucosae; 5 angeschnittenes Gefäß mit Erythrozyten; 6 Cartilago tracheales; 7 Perichondrium und Tunica adventitia.

B: Übersicht nach Schneidevorgang mit Platzierung einer 30G-Kanüle. 1 Tracheallumen; 2 30G-Kanüle; 3 Schnittspur des Lasers; 4 isoliertes, apikales, zellkernfreies Epithel von ca. 50 Zellanschnitten; 5 basale Zellkernreihe; 6 Lamina propria mucosae.



*C: Aufnahme der Probe zum Zeitpunkt der Alkoholverdunstung. 1 Tracheallumen; 2 30G-Kanüle; 3 an 30G-Kanüle adhärenes, zuvor isoliertes Epithel; 4 Schnittspur des Lasers; 5 basale Zellkernreihe; 6 Lamina propria mucosae.*  
*D: Gewinnung der an 30G-Kanüle adhärenen Probe. 1 30G-Kanüle; 2 an 30G-Kanüle adhärenes, zuvor isoliertes Epithel.*

## 2.2 Reverse Transkription (RT)

Vor der Weiterverarbeitung wurden die Reaktionsgefäße mit der gewonnenen Probe aus dem flüssigen N<sub>2</sub> entnommen und schonend aufgetaut. Anschließend erfolgte bei 95°C eine 7 min dauernde Denaturierung der Gewebeprobe, mit abschließend 5 min dauernder Lagerung auf Eis. Dieser der eigentlichen RT vorangestellte Schritt dient zur Zerstörung der Tertiärstruktur der mRNA und bietet der RT eine bessere Angriffsmöglichkeit. Nach Zugabe des RT Mastermix (2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µl 10 x PCR Puffer II, 1 µl dNTP (2,5 mM), 1 µl Random Hexamer Primer (50 µM), 0,5 µl RNase Inhibitor (20 U/µl) sowie 1 µl MuLV RT (50 U/µl); alle Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) wurden die Proben 10 min bei 20°C, 60 min bei 42°C inkubiert und abschließend die Reaktion durch eine 5 min dauernde Erwärmung bei 95°C gestoppt (FINK ET AL. 1998). Als Kontrolle auf eventuelle Kontaminationen des Lysispuffers mit DNA wurde ein Reaktionsgefäß ohne mikrodissoziiertes Gewebe einer RT und anschließender Polymerase Kettenreaktion (PCR) unterzogen.

## 2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die durch die Primer detektierten, spezifischen Sequenzen der cDNA wurden mittels einer PCR amplifiziert. Der PCR Ansatz enthielt neben den 17,5 µl cDNA, 21,2 µl Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen,

## Material und Methoden

---

Deutschland), 4 µl MgCl<sub>2</sub> Lösung (25 mM), 4 µl 10 x PCR Puffer II, 1 µl dNTP (2,5 mM), je 1 µl Primer „forward und reverse“ sowie 0,4 µl Amplitaq Gold (5 U/µl). Mit Ausnahme der Primer stammten alle Substanzen von PE Applied Biosystems. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 dargestellt.

Amplikon	Primer	mRNA Region	Register-Nr./ Hersteller
<b>VACHT</b>	For.: 5'CGG TTC ATC AAG CAA CAC ATC 3' Rev.: 5'GCC ACA TCG TTC ACT CTC TTG 3'	2176-2325 (149 bp)	RNU 09838, MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)
<b>CHT1</b>	For.: 5'GCA AAC ATG GAA CTT GCT GA 3' Rev.: 5'CAA GAC CAA GGA GGA AGC AG 3'	1283-1433 (150 bp)	AB 030947, MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)
<b>ChAT</b>	For.: 5'CAA CCA TCT TCT GGC ACT GA 3' Rev.: 5'AAT GGC TAT GGA GCC TGC TA 3'	1735-1917 (183 bp)	nicht vorhanden, MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)

*Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der verwendeten Primer. Angegeben sind das Amplikon, Basenabfolge der Primer, spezifische mRNA-Region mit Anzahl der Basenpaare (bp), Registriernummer sowie die Hersteller.*

An eine 5 min dauernde Denaturierung bei 94°C schlossen sich 50 Zyklen mit 45 s bei 94°C, 45 s bei 58°C Annealing Temperatur der Primer, sowie 45 s bei 72°C an. Beendet wurde die Reaktion 7 min lang bei 72°C. Zur Funktionskontrolle der PCR wurden Kontrollproben durchgeführt (Abb. 5). Diese bestanden aus einer Positiv- und einer Negativ-Kontrolle. In der Positiv-Kontrolle befand sich anstelle einer aufbereiteten, mikrodissoziierten Probe 1 µl cDNA aus Rattenhirn. Die Negativ-Kontrolle enthielt lediglich 1 µl destilliertes H<sub>2</sub>O als Zusatz.

Als Kontrolle auf eventuelle DNA Verunreinigungen in den mikrodissoziierten Proben wurde pro Primer jeweils ein Gefäß mit mikrodissoziiertem Material ohne RT einer PCR unterzogen. Des Weiteren wurde eine Pufferlösungs-Kontrolle durchgeführt. Diese enthielt Pufferlösung, mit welcher eine RT-PCR durchgeführt wurde.

Die PCR Produkte sowie die notwendigen Kontrollproben wurden auf ein 2% Agarosegel (Genagarose, Genaxis, Saint-Claud Cedex, Frankreich) in TAE Puffer (242 g Tris Base (USB, Cleveland, USA), 57,1 ml 100% Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland), 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 (Merck, Darmstadt, Deutschland)) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Zur Auswertung der Banden wurde dem Gel der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt, welcher in die DNA interkalierte und durch UV Bestrahlung sichtbar gemacht und analysiert werden konnte. Zur Größenbestimmung des Amplikons diente ein Größenmarker (Invitrogen, Groningen, Holland). Die durchgeführte PCR Positivkontrolle (cDNA Rattenhirn) hatte die selbe Basenpaargröße wie die durchgeführten Proben.

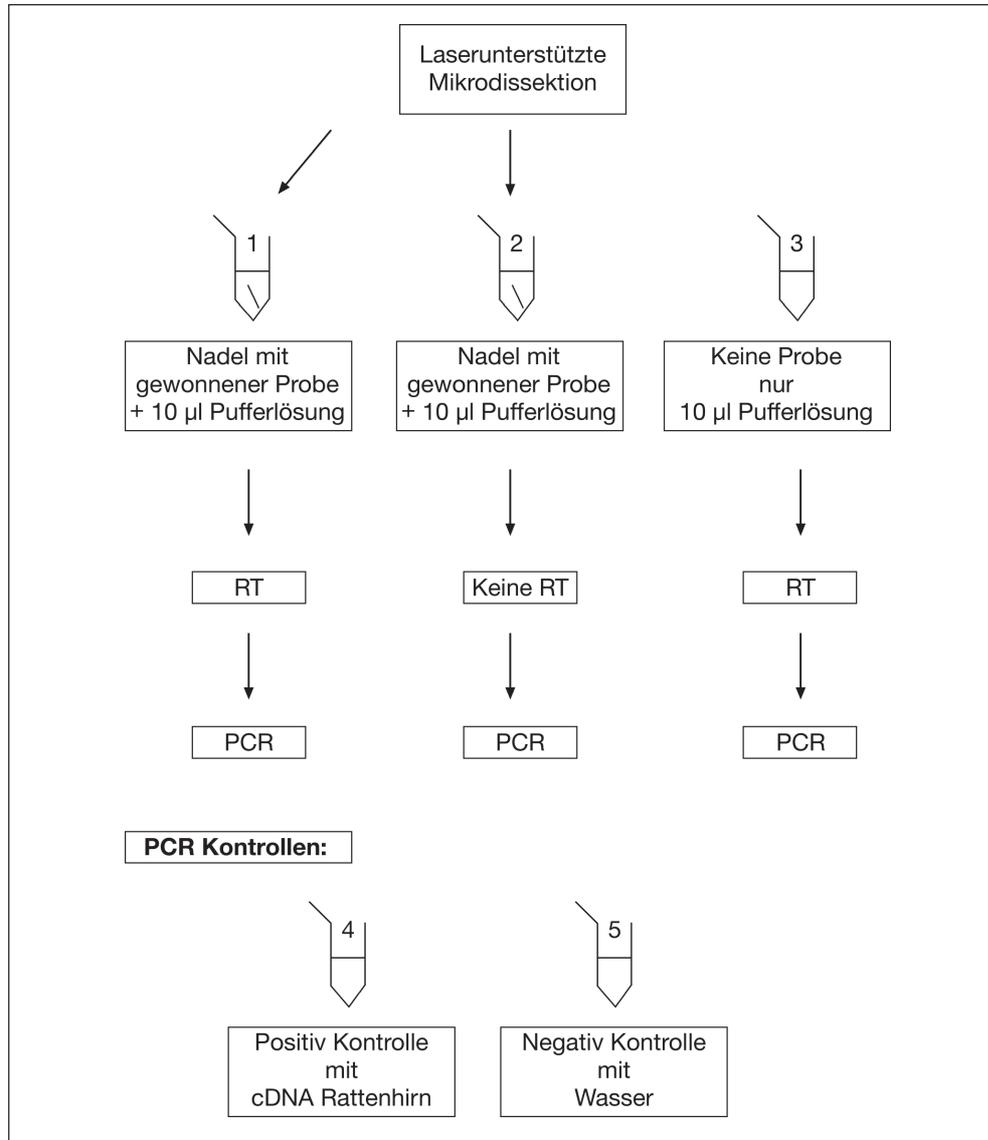


Abbildung 5: Übersicht eines Versuchsdurchlaufes mit verschiedenen Kontrollproben.  
1: Probe mit gewonnenem Trachealepithel. Reaktionsgefäß enthält Nadel mit gewonnener Probe sowie 10 µl Pufferlösung, anschließend erfolgt eine RT-PCR.  
2: Kontrolle auf genomische DNA. Reaktionsgefäß enthält Nadel mit gewonnener Probe sowie 10 µl Pufferlösung, es erfolgte keine RT, aber eine PCR.  
3: Puffer-Kontrolle. Reaktionsgefäß enthält keine Probe, aber 10 µl Pufferlösung, es erfolgt eine RT-PCR.  
4: PCR Positiv-Kontrolle mit 1 µl Rattenhirn cDNA.  
5: PCR Negativ-Kontrolle mit 1 µl destilliertem H<sub>2</sub>O.

### 2.4 Immunfluoreszenz

Als Gewebe für die Immunfluoreszenz wurden dieselben Tracheen wie für die laserunterstützte Mikrodissektion verwendet. Bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  wurden diese in einer Dicke von  $12\ \mu\text{m}$  quer geschnitten, auf Objektträger (Super Frost® Plus, Menzel Gläser, Deutschland) aufgebracht, 10 min in Aceton fixiert und danach 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte zur Blockung unspezifischer Proteinbindungsstellen (HAURI ET AL. 1986) mit Blockmedium überschichtet und für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Blockmedium diente ein Gemisch aus phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), 10% normalem Schweineserum, 0,1% Rinderserumalbumin und 0,5% Tween 20 (HABERBERGER ET AL. 2000A). Nach Entfernen des Blockmediums wurde das Primärantiserum gegen VACHT (polyklonales Antiserum aus der Ziege; Biotrend, Köln, Deutschland) in einer Endkonzentration von 1:800 in PBS/NaCl (PBS mit doppelter Salzkonzentration zur Verringerung der Hintergrundreaktion (GRUBE ET AL. 1980)) gelöst, auf die Schnitte aufgetragen, bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert und anschließend 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das biotinkonjugierte Sekundärserum aus dem Esel gegen Immunglobulin der Ziege (Amersham, Freiburg, Deutschland) in einer Endkonzentration von 1:400 in PBS/NaCl verdünnt, aufgetragen, 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und 6 x 5 min mit PBS gewaschen. Abschließend wurde

Fluoresceinisothiocyanat- (FITC) gekoppeltes Streptavidin (Amersham, Freiburg, Deutschland) in einer Endkonzentration von 1:50 in PBS/NaCl verdünnt aufgetragen und 1 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte ein 6 x 5 min langes Waschen mit PBS, Eindeckeln in karbonatgepuffertem Glycerol (pH 8,6), die fluoreszenzmikroskopische Analyse und die Anfertigung von Fotografien. Als Negativ-Kontrolle der Immunfluoreszenz erfolgte eine Präabsorptions-Kontrolle. Hierzu wurde dem Primärinterum gegen VACHT vor dem Auftragen auf die Schnitte das für das Antiserum spezifische Antigen (Ag) (Amersham, Freiburg, Deutschland) zugesetzt. Dieses Ag ging mit dem gegen VACHT gerichteten Primärinterum eine spezifische Bindung ein. Die Lösung mit dem so gebildeten Komplex wurde nun auf die Schnitte aufgebracht. Hier konnte das gebundene Primärinterum keine weiteren Bindungen eingehen. In der Präabsorptions-Kontrolle war somit keine Signalintensität zu erwarten.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 RT-PCR Produkte nach laserunterstützter Mikrodissektion

##### 3.1.1 VACHT

Untersucht wurde apikales, zellkernfreies Trachealepithel der Ratte. Dieses wurde mit Hilfe laserunterstützter Mikrodissektion aus Gewebeschnitten von zuvor schockgefrorenen Tracheen gewonnen. Es zeigte sich in 11 von 26 durchgeführten Proben ein PCR Produkt (Abb. 6A) mit einer Größe von 149 Basenpaaren (bp) (Abb. 7). Da die verwendeten Primer nicht Intron überspannend waren, wurden zum Ausschluss auf Kontamination mit genomischer DNA Kontrollen durchgeführt. Diese beinhalteten mikrodisseziertes Trachealepithel, anstelle eines RT Mastermix wurde jedoch eine äquivalente Menge H<sub>2</sub>O zugeführt. An die RT schloss sich eine PCR an, in welcher sich bei insgesamt 16 durchgeführten Kontrollen 2 positive Proben zeigten (Abb. 6B). Als PCR Funktionskontrollen dienten je eine Positiv- und Negativ-Kontrolle. Die Positiv-Kontrolle enthielt 1 µl cDNA Rattenhirn. Die Größen der beiden Produkte von Positiv-Kontrolle und Amplikon stimmten überein. In der durchgeführten Negativ-Kontrolle befand sich neben dem PCR Ansatz 1 µl destilliertes H<sub>2</sub>O, so dass kein Produkt zu erwarten war. Des weiteren wurde eine Pufferlösungs-Kontrolle durchgeführt. Diese enthielt Pufferlösung, mit welcher eine RT-PCR durchgeführt wurde. Auch hier war, wie gefordert, kein Produkt amplifiziert.

## Ergebnisse

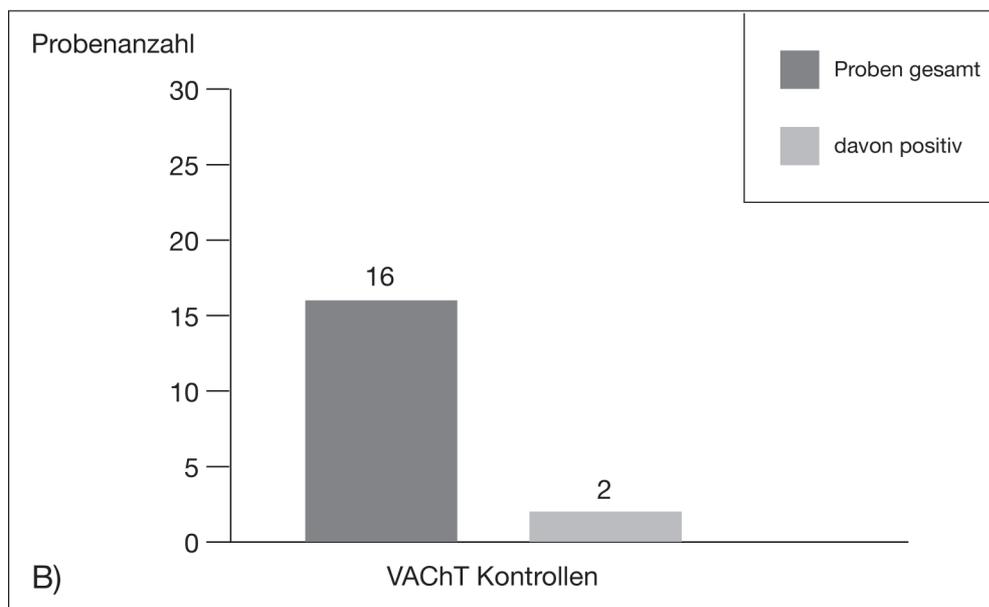
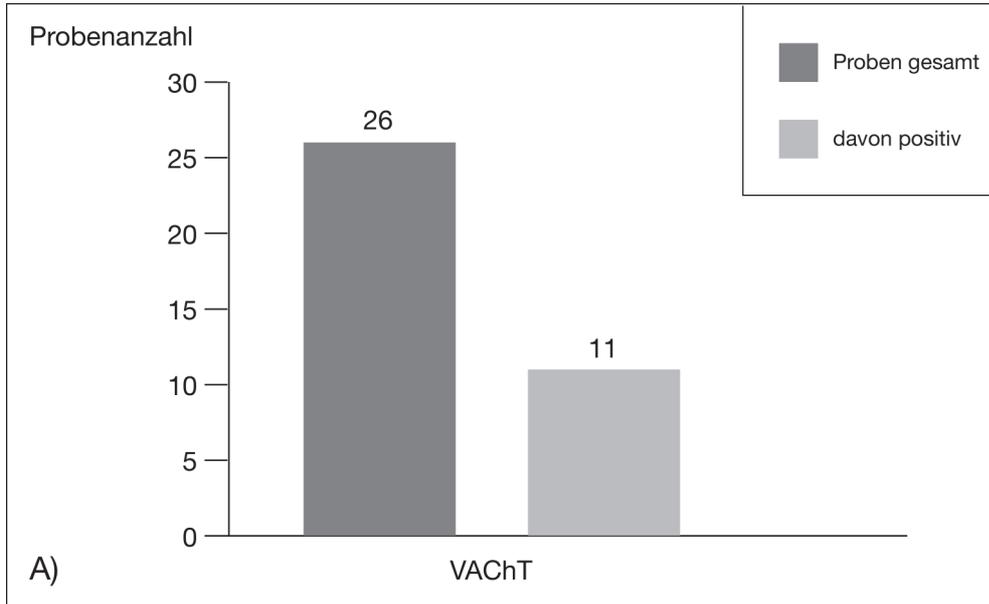


Abbildung 6 A) und B): Diagramm der Anzahl durchgeführter RT-PCR Proben, sowie Ergebnisse für mRNA Nachweis von VACHT in mikrodisseziertem Trachealepithel.

A) VACHT RT-PCR Produkt Nachweis

B) Kontrollen auf Verunreinigung durch genomische cDNA in Abwesenheit des RT-Schrittes

## Ergebnisse

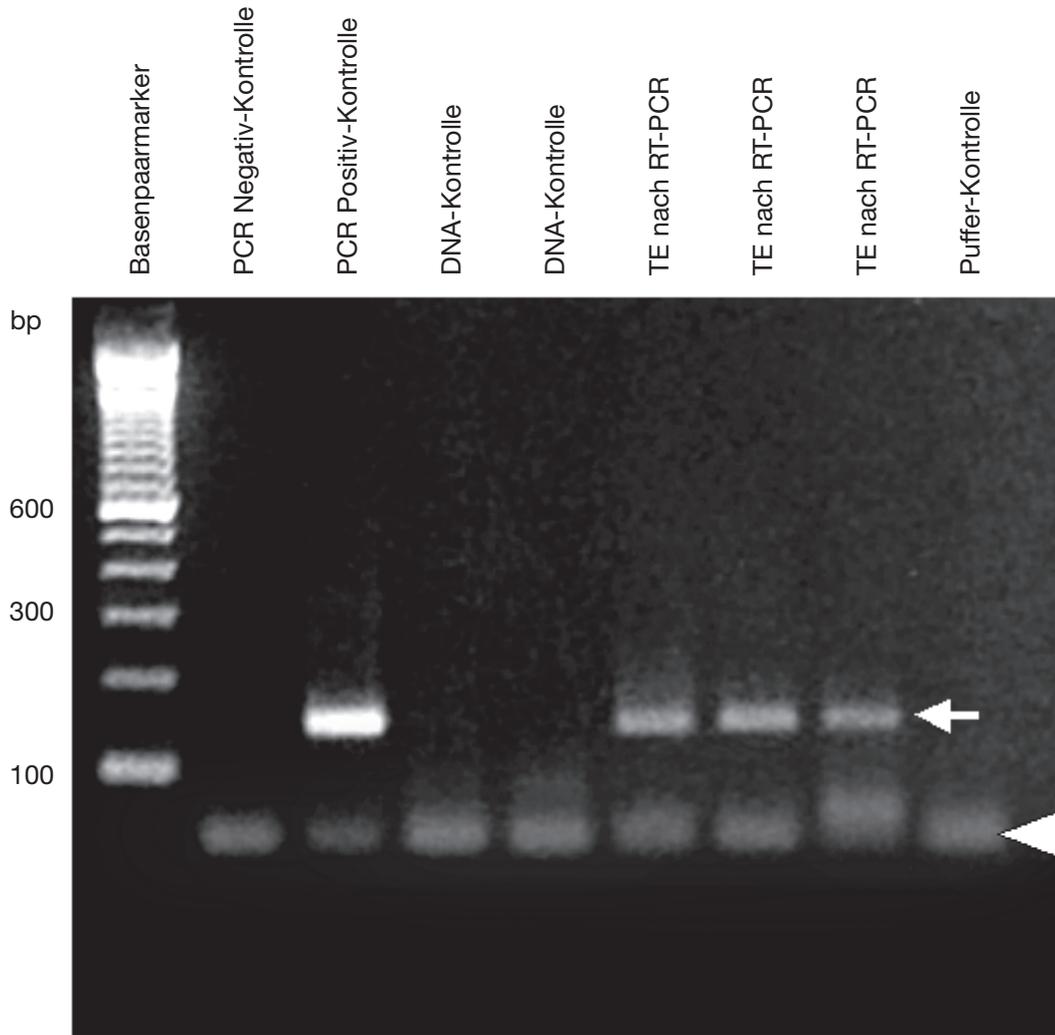


Abbildung 7: RT-PCR, VACHT, elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel.

Pfeil: Es zeigen sich in 3 Proben mikrodisszezierten Trachealepithels positive Signale. Basenpaarmarker; PCR Negativ-Kontrolle: H<sub>2</sub>O; PCR Positiv-Kontrolle: Rattenhirn; DNA-Kontrollen: Kontrollen auf Verunreinigung durch genomische DNA; TE nach RT-PCR: Mikrodissoziiertes Trachealepithel nach RT-PCR; Pufferkontrolle; Pfeilkopf: ‚Primerwolken‘

### 3.1.2 CHT1

Es wurde apikales, zellkernfreies Trachealepithel der Ratte untersucht, welches zuvor mit Hilfe laserunterstützter Mikrodissektion aus Gewebeschnitten schockgefrorener Trachea gewonnen wurde. In insgesamt 16 von 28 Proben zeigte sich ein PCR Produkt (Abb. 8A) mit einer Basenpaargröße von 150 (Abb. 9). Da auch hier die verwendeten Primer nicht Intron überspannend waren, wurden zum Ausschluss auf Kontamination mit genomischer DNA Kontrollen durchgeführt. Diese beinhalteten mikrodisseziertes Trachealepithel, anstelle eines RT Mastermix wurde jedoch eine äquivalente Menge H<sub>2</sub>O zugeführt. An die RT schloss sich eine PCR an, in welcher sich bei insgesamt 16 durchgeführten Kontrollen 1 positive Probe zeigte (Abb. 8B). Als PCR Funktionskontrollen dienten je eine Positiv- und Negativ-Kontrolle. Die Positiv-Kontrolle enthielt 1 µl cDNA Rattenhirn. Die Größen der beiden Produkte von Positiv-Kontrolle und Amplikon stimmten überein. In der durchgeführten Negativ-Kontrolle befand sich neben dem PCR Ansatz 1 µl destilliertes H<sub>2</sub>O, so dass kein Produkt zu erwarten war. Des weiteren wurde eine Pufferlösungs-Kontrolle durchgeführt. Diese enthielt Pufferlösung mit welcher eine RT-PCR durchgeführt wurde, auch hier war kein Produkt zu erwarten und wurde entsprechend nicht erhalten.

## Ergebnisse

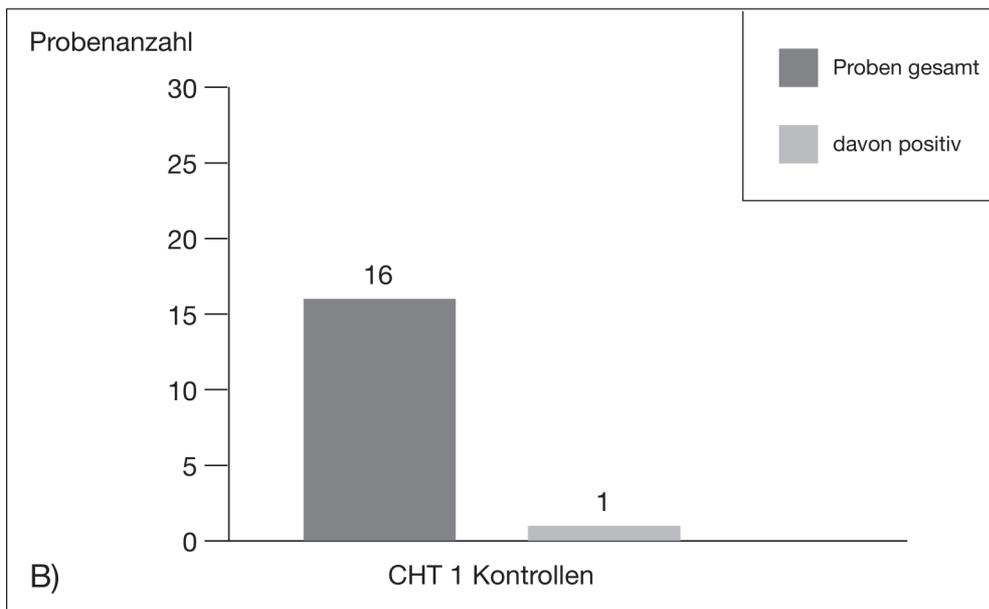
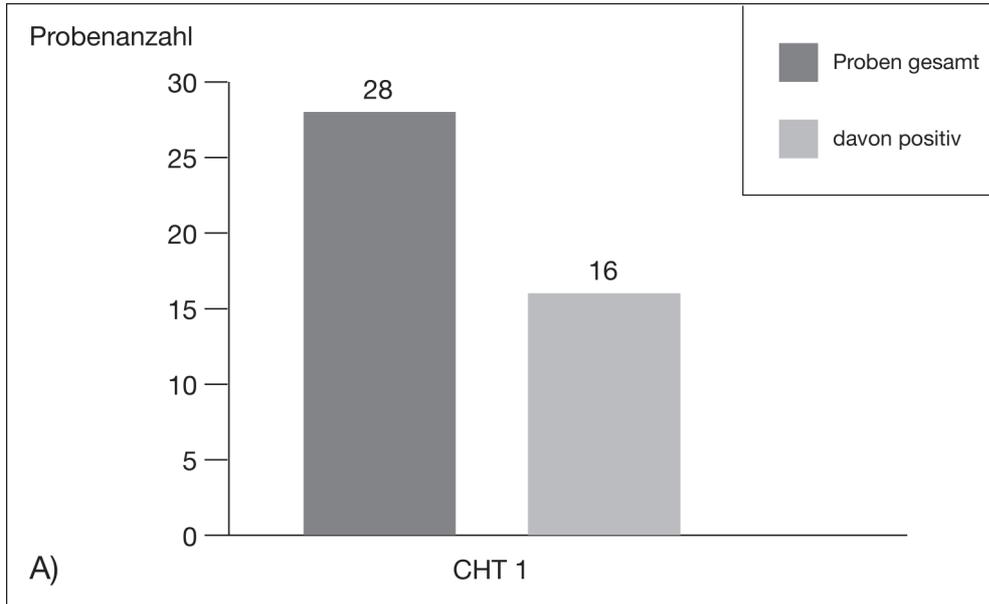


Abbildung 8 A) und B): Diagramm der Anzahl durchgeführter RT-PCR Proben, sowie Ergebnisse für CHT1 mRNA Nachweis in mikrodisseziertem Trachealepithel.

A) CHT1 RT-PCR Produkt Nachweis

B) Kontrollen auf Verunreinigung durch genomische DNA in Abwesenheit des RT-Schrittes

## Ergebnisse

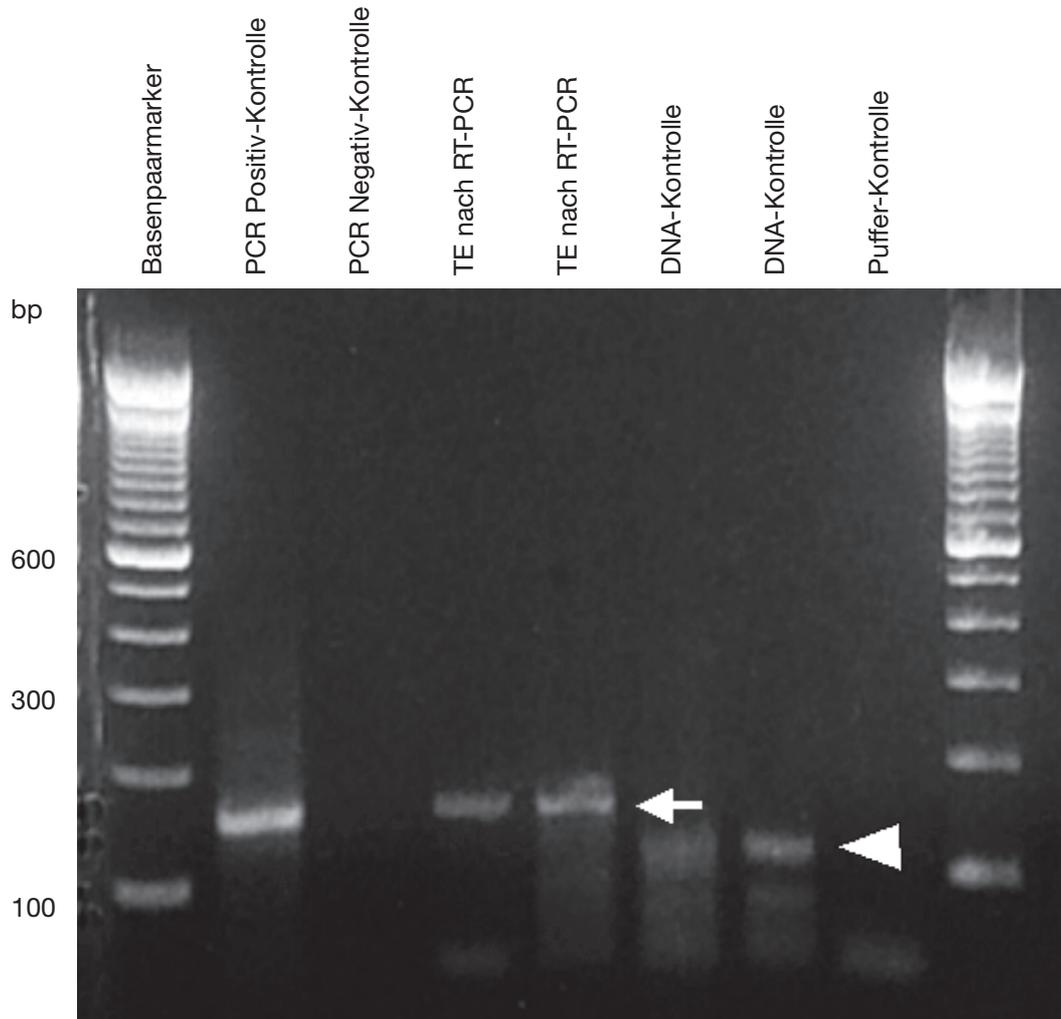


Abbildung 9: RT-PCR, CHT1, elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel.

Pfeil: Es zeigen sich in 2 Proben mikrodissezierten Trachealepithels positive Signale. Basenpaarmarker; PCR Positiv-Kontrolle: Rattenhirn; PCR Negativ-Kontrolle: H<sub>2</sub>O; TE nach RT-PCR: Mikrodissoziiertes Trachealepithel nach RT-PCR; DNA-Kontrolle: Kontrollen auf Verunreinigung durch genomische DNA; Pufferkontrolle; Pfeilkopf: ‚unspezifische PCR-Produkte‘

### 3.1.3 ChAT

Untersucht wurde apikales, zellkernfreies Trachealepithel der Ratte. Dieses wurde mit Hilfe laserunterstützter Mikrodissektion aus Gewebeschnitten von zuvor schockgefrorener Trachea gewonnen. Es zeigte sich in insgesamt 5 von 30 Proben ein PCR Produkt (Abb. 10) bei der erwarteten Größe von 183 bp (Abb. 11). Da der verwendete ChAT Primer Intron überspannend war, waren keine Kontrollen auf Kontamination mit genomischer DNA notwendig. Als PCR Funktionskontrollen dienten wiederum je eine Positiv- und Negativ-Kontrolle. Die Positiv-Kontrolle enthielt 1 µl cDNA Rattenhirn. Die Größen der beiden Produkte von Positiv-Kontrolle und Amplikon stimmten ebenfalls überein. In der durchgeführten Negativ-Kontrolle befand sich neben dem PCR Ansatz 1 µl destilliertes H<sub>2</sub>O, so dass kein Produkt zu erwarten war. Des weiteren wurde eine Pufferlösungs-Kontrolle durchgeführt. Diese enthielt Pufferlösung, mit welcher eine RT-PCR durchgeführt wurde, auch hier war kein Produkt zu erwarten. In beiden Kontrollen zeigte sich kein RT-PCR Produkt.

## Ergebnisse

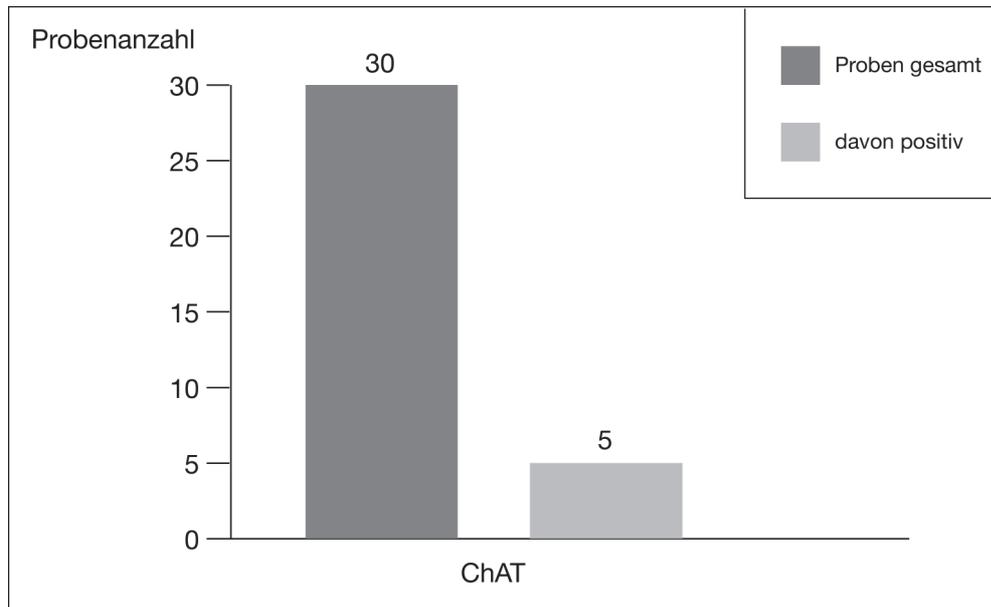


Abbildung 10: Diagramm der Anzahl durchgeführter RT-PCR Proben, sowie Ergebnisse für ChAT mRNA Nachweis in mikrodissiziertem Trachealepithel.

## Ergebnisse

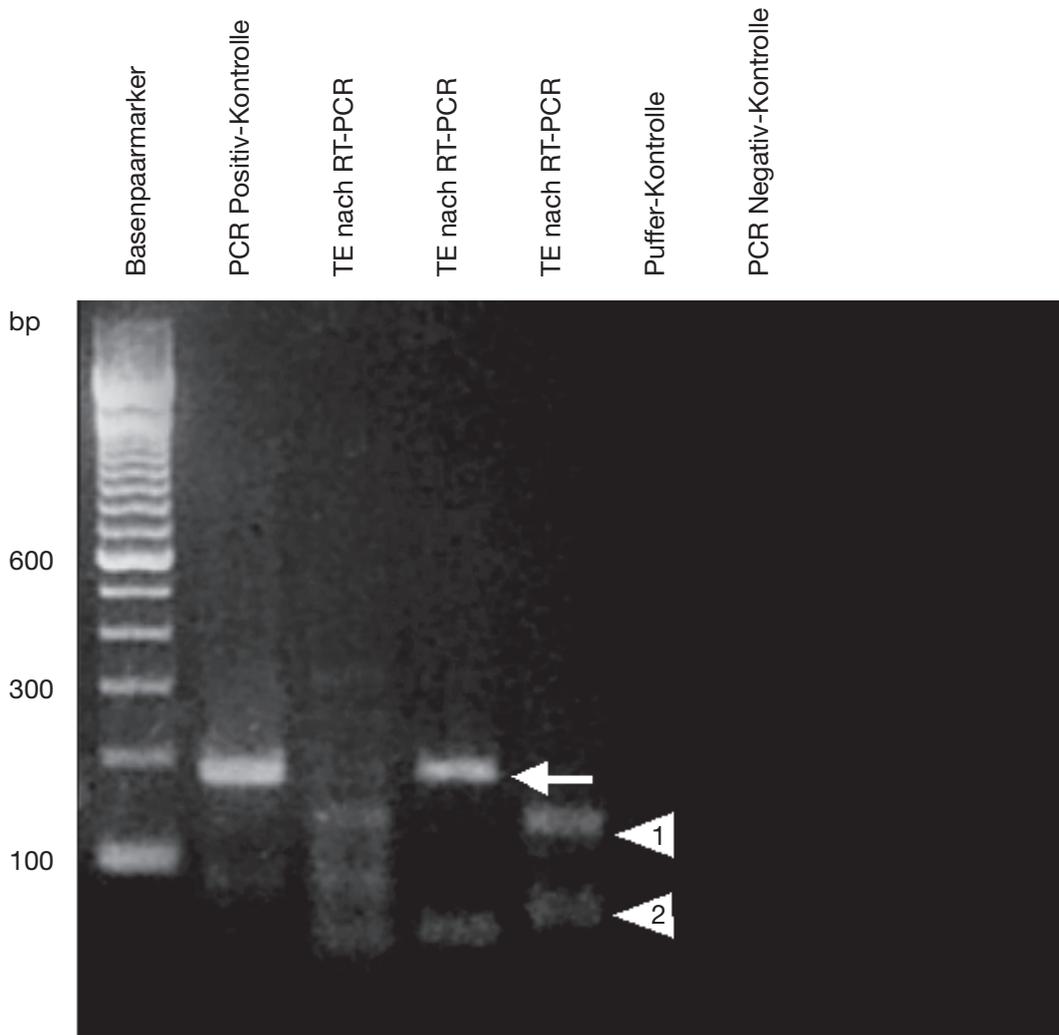


Abbildung 11: RT-PCR Produkte, ChAT, elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel.

Pfeil: Es zeigt sich in 1 Probe mikrodisszezierten Trachealepithels ein positives Signal. Basenpaarmarker; PCR Positiv-Kontrolle: Rattenhirn; TE nach RT-PCR: Mikrodissoziiertes Trachealepithel nach RT-PCR; Pufferkontrolle; PCR Negativ-Kontrolle: H<sub>2</sub>O; Pfeilkopf 1: ‚unspezifische PCR-Produkte‘, Pfeilkopf 2: ‚Primerwolken‘

### **3.2 VAcHT Immunfluoreszenz**

Mittels Immunfluoreszenz konnte VAcHT in sekretorischen Zellen des Trachealepithels der Ratte nachgewiesen werden (Abb. 12A). Das Fluoreszenzmuster zeigte granuläre Immunreaktivitäten, vor allem apikal des Zellkerns. Neben den sekretorischen Zellen zeigte kein weiterer Zelltyp des Trachealepithels VAcHT-Immunreaktivität. Als Positiv-Kontrolle zeigten sich positive Signale in cholinergen Axonen des Trachealmuskels und in Axonen um Trachealdrüsen. Darüber hinaus zeigten sich im angrenzenden Ösophagus positive Signale im Bereich der motorischen Endplatten und der präterminalen Axone (Abb. 13), welche bekannterweise VAcHT enthalten. Als Negativ-Kontrolle diente die Präabsorption (Abb. 12B). In der Präabsorption wurde dem Primärantiserum gegen VAcHT vor dem Auftragen auf die Schnitte das zur Immunisierung eingesetzte Peptid zugegeben. Derart präabsorbiertes Serum markierte in Gewebeschnitten weder Nervenfasern, noch die sekretorischen Zellen des Epithels.

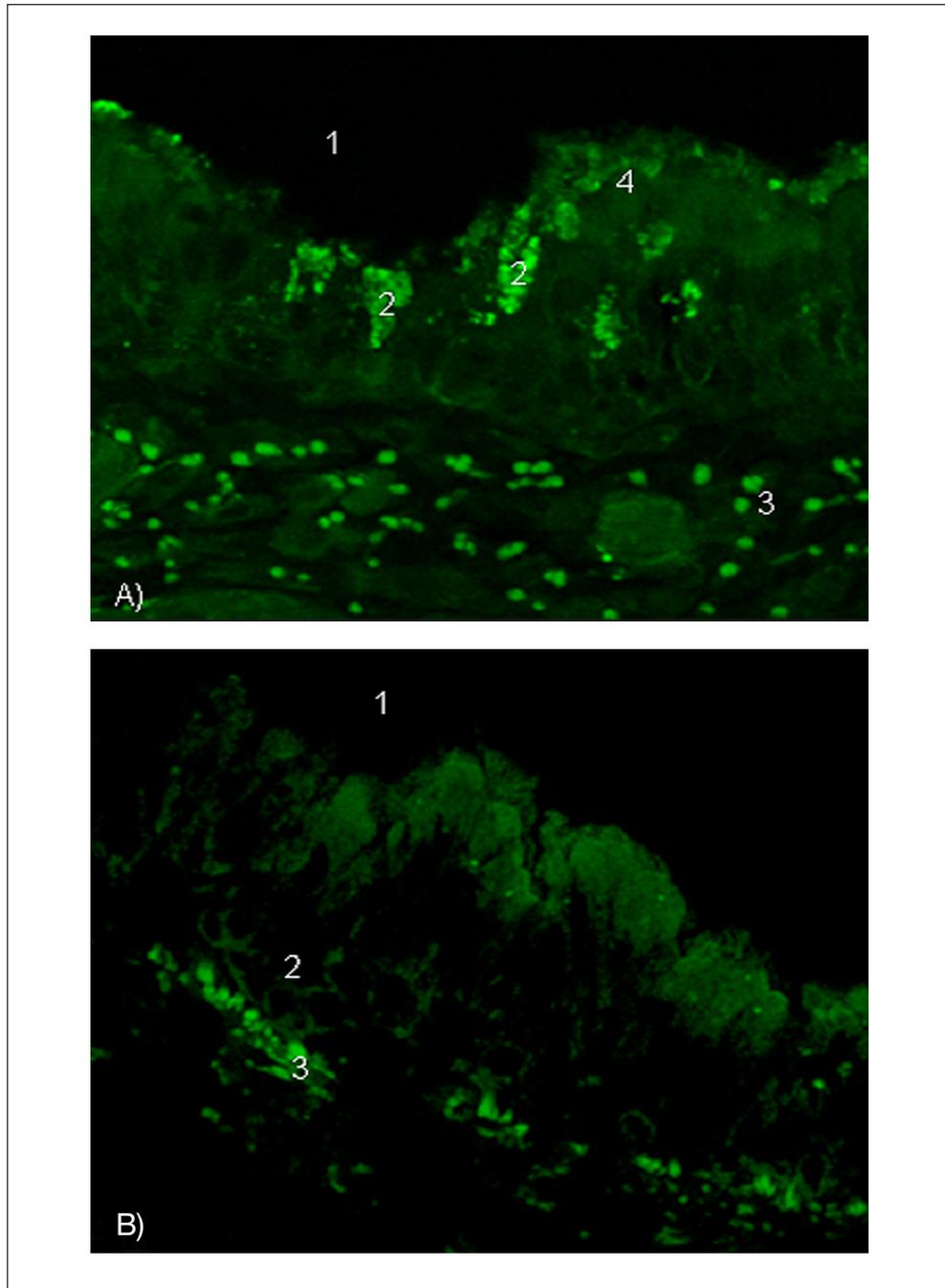
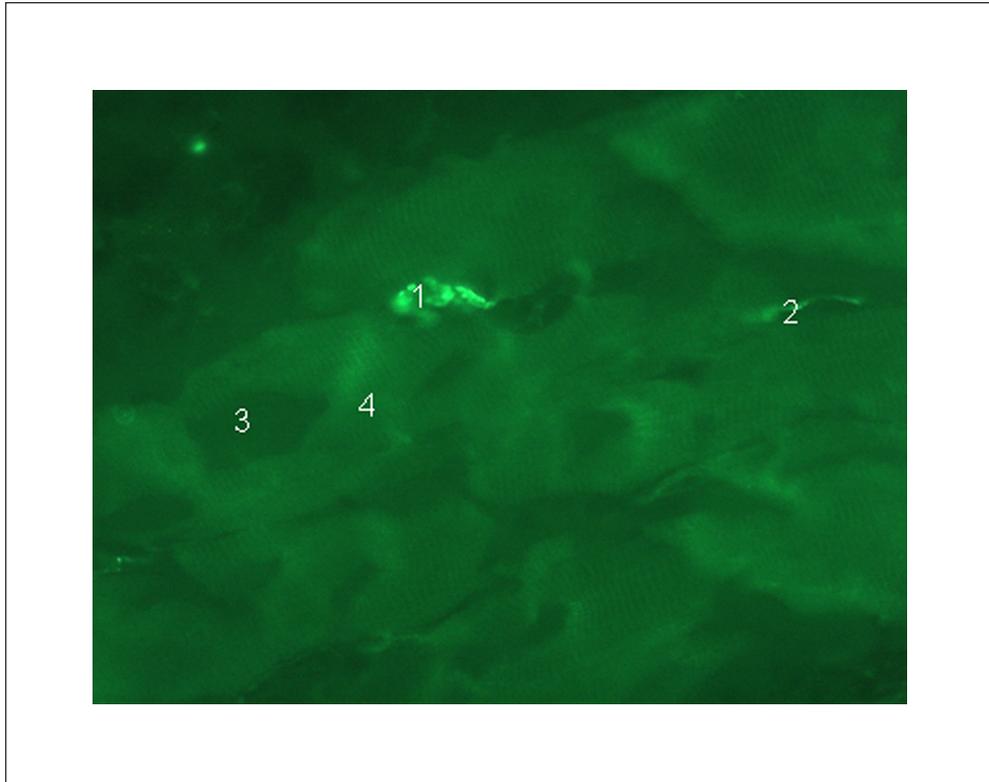


Abbildung 12 A-B: VACHT Immunfluoreszenz im Trachealepithel der Ratte.  
A: VACHT immunreaktive Zellen. 1: Tracheallumen; 2: Positive sekretorische Zellen; 3: Autofluoreszierende elastische Fasern; 4: Zilientragende Zellen.  
B: Präabsorption. 1: Tracheallumen; 2: Basalzellen; 3: Autofluoreszierende elastische Fasern.

## Ergebnisse

---



*Abbildung 13: Positiv-Kontrolle VACHT Immunfluoreszenz, Ösophagus, Ratte.*

*1: Positive motorische Endplatte;*

*2: Positives präterminales Axon;*

*3: Zellkernanschnitt;*

*4: Quergestreifte Muskulatur;*

## **4 Diskussion**

### **4.1 Laserunterstützte Mikrodisektion**

In vielen biomedizinischen Forschungsgebieten rücken zellspezifische Fragestellungen immer weiter in den Mittelpunkt des Interesses. Mit Hilfe der laserunterstützten Mikrodisektion ist ein Verfahren entwickelt worden, das die Untersuchung einzelner, gezielt isolierter Zellen aus histologischen Gewebepräparaten erlaubt. Der Hauptvorteil gegenüber anderen Methoden liegt neben der Isolierung spezifischer Zellen in der hohen Präzision bei geringer Kontaminationsgefahr und leichter Durchführbarkeit (BECKER ET AL. 1997). Dieses Verfahren fand bisher v.a. in der DNA-Analytik, z.B. zur routinemäßigen Untersuchung von DNA Veränderungen bei Tumorleiden, Infektionen und genetischen Erkrankungen auf Zellebene seine Anwendung (BECKER ET AL. 1997). Kummer et al. konnten 1998 erstmals zeigen, dass mittels der laserunterstützten Mikrodisektion auch die mRNA Analyse mit anschließender RT-PCR möglich ist (KUMMER ET AL. 1998, FINK ET AL. 1998, 1999, 2000). Bis zur Einführung dieser Methode waren mRNA Untersuchungen nur an Gewebehomogenaten oder Gewebefragmenten durchführbar. In Kombination mit der Methode der Immunfluoreszenz können definierte Zellen identifiziert und die Präzision der Isolierung spezifischer Zellen noch erhöht werden. Dabei hat die Vorbehandlung durch eine Immunfluoreszenz zwar negative Einflüsse auf den nachfolgenden RNA Nachweis, trotzdem lassen sich positive Ergebnisse erzielen (FINK ET AL.

2000). Als Ausgangsgewebe können neben formalinfixierten auch schockgefrorene Präparate verwendet werden (KUMMER ET AL. 1998, SCHÜTZE UND LAHR 1998, FINK ET AL. 1998, 1999, 2000). Bei sachgerechter Lagerung kann man das Gewebe über einen längeren Zeitraum verwenden, wodurch sich die Anzahl der Versuchstiere drastisch reduzieren lässt. Eine Schonung der Gewebe kann durch Verzicht auf RNA Extraktion und DNase Verdau erreicht werden (KUMMER ET AL. 1998, FINK ET AL. 1998). Die RNA Extraktion wird durch die spezielle Behandlung der Gewebe beim Auftauen überflüssig. Die besten Resultate zeigten sich nach schonendem Auftauen der in flüssigem N<sub>2</sub> gelagerten Proben mit anschließendem Erhitzen auf 95°C. Dieser der RT vorausgehende Schritt bewirkt eine Zerstörung der Tertiärstruktur der mRNA. Die sich anschließende RT hat so eine bessere Angriffsmöglichkeit. Der DNase Verdau kann durch die Verwendung Intron überspannender Primer umgangen werden (KUMMER ET AL. 1998, FINK UND BOHLE 1999). Kann dies nicht gewährleistet werden, müssen, wie beim Nachweis der mRNA von VACHT und CHT1 in dieser Arbeit, spezielle Kontrollproben durchgeführt werden. Diese bestanden aus einer Positiv- und Negativ-Kontrolle der PCR, einer Kontrolle auf Kontamination der Pufferlösung, sowie einer Kontrolle zur Überprüfung auf eine mögliche Verunreinigung des mikrodissierten Materials mit genomischer cDNA. Die PCR Positiv-Kontrolle diente zum Nachweis der Funktion der verwendeten Enzyme in der PCR. Anstelle der in der RT erzeugten cDNA wurde dem PCR Ansatz cDNA, welche zuvor aus Rattenhirn gewonnen wurde, zugesetzt. Die PCR Negativ-Kontrolle diente zum Ausschluss einer

Verunreinigung des PCR Ansatzes. Hier wurde dem Ansatz anstelle von in der RT erzeugten cDNA eine äquivalente Menge destillierten H<sub>2</sub>O zugeführt. Die Pufferlösungs-Kontrolle dient zum Nachweis von Verunreinigungen der Pufferlösung. Zu diesem Zweck wurde bei jedem Versuchsdurchlauf ein Reaktionsgefäß mit Pufferlösung einer RT-PCR unterzogen. Zum Ausschluss einer Verunreinigung der Probe mit genomischer cDNA wurde an einer gewonnenen Probe der Schritt der RT ausgelassen und direkt eine PCR durchgeführt. Unter optimalen Bedingungen sollte sich, außer in der PCR Positiv-Kontrolle, in keiner Kontrolle ein Signal zeigen. Mit Hilfe dieser Kontrollen war der Beweis möglich, dass es sich bei den durch RT-PCR nachgewiesenen Produkten ausschließlich um cDNA der zu untersuchenden mRNA Sequenzen handelte. Mögliche Kontaminationsquellen bestanden vor allem in der Verunreinigung der Proben mit genomischer DNA aus Zellkernanschnitten und durch Lymphozyten. Diese enthalten bekannterweise Komponenten des cholinergen Systems (KAWASHIMA ET AL. 1998, FUJI ET AL. 1996) und können in den basalen Schichten liegen (PABST ET AL. 1995). Durch die Methode der laserunterstützten Mikrodisektion war es möglich, nur den apikalen, zellkernfreien Anteil des Trachealepithels zu gewinnen. Somit konnte sowohl eine Verunreinigung der Probe mit genomischer DNA, als auch mit Lymphozyten verhindert werden. Erfolgte jedoch trotzdem eine Kontamination durch genomische cDNA, zeigten die durchgeführten Kontrollproben diese an.

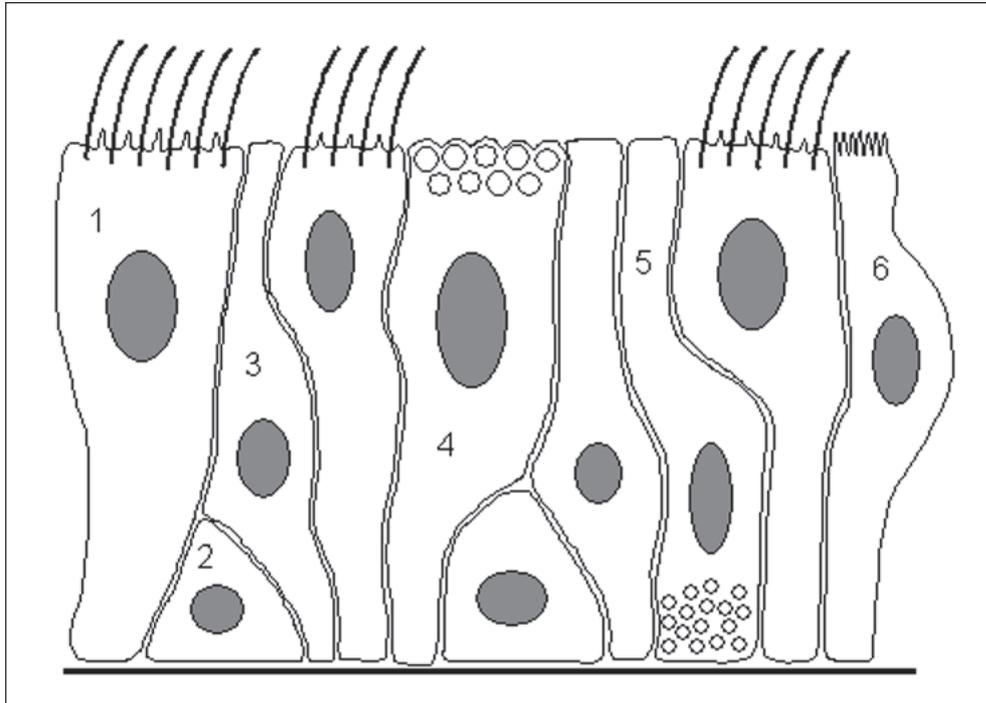


Abbildung 14: Übersicht der Zelltypen des Trachealepithels. 1 Kinozilientragende Zelle; 2 Basalzelle; 3 Intermediäre Zelle; 4 Becherzelle (sekretorische Zelle); 5 Endokrine Zelle; 6 Bürstenzelle.

Eine Schwierigkeit der Untersuchungen zeigte sich im Trachealepithel selbst. Dieses besteht bekannterweise aus 6 verschiedenen Zelltypen (Abb. 14). Aufgrund der Schnittdicke der Gewebeproben von 8  $\mu\text{m}$  stehen diese nicht nur horizontal, sondern auch in der Tiefe dicht nebeneinander. Eine Differenzierung der einzelnen Zelltypen ist mikroskopisch möglich. Durch technische Gegebenheiten des Lasers ist eine differenzierte Mikrodissektion so dicht hintereinander stehender Zellen jedoch nicht möglich. So konnte lediglich ein Gewebeverband von apikalem, zellkernfreien Trachealepithel gewonnen werden. Es

zeigte sich jedoch in Immunfluoreszenz Untersuchungen dieser Arbeit, dass nicht alle Zellen gleichermaßen Komponenten des cholinergen Systems enthalten. So konnte für VAcHT dargestellt werden, dass lediglich sekretorische Zellen ein positives Signal zeigen. Ob jedoch auch nur sekretorische Zellen VAcHT mRNA enthalten oder aber auch andere Zellen ein mRNA Vorkommen für VAcHT besitzen, kann mit Hilfe der laserunterstützten Mikrodisektion nicht eindeutig geklärt werden. Es wäre zwar denkbar, die Mikrodisektion mit einer Immunfluoreszenz für spezifische Zelltypen zu kombinieren. Anschließend ist es aber nicht möglich, so dicht hintereinander stehende Zellen zu isolieren. Die Methode der laserunterstützten Mikrodisektion trifft hier auf ihre Grenzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination aus laserunterstützter Mikrodisektion und RT-PCR das Mittel der Wahl zum Nachweis der mRNA-Expression einzelner Zellen bzw. Zellverbänden darstellt. Beim Trachealepithel trifft die Methode jedoch auf ihre Grenzen. Hier ist lediglich feststellbar, dass ein Zellverband von ca. 50 Anschnitten apikaler, zellkernfreier Epithelzellen mRNA für CHT1, ChAT und VAcHT enthält. Eine Differenzierung mittels der laserunterstützten Mikrodisektion, ob alle oder aber nur bestimmte Zellen mRNA von Komponenten des cholinergen Systems enthalten, ist nicht sicher möglich.

## 4.2 CHT1

Cholin wird über den hochaffinen CHT1 in die Zelle aufgenommen. Dieses ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der ACh Synthese (OKUDA ET AL. 2000A/B, APPARSUNDARAM ET AL. 2000). Neben diesem existiert ein weiterer, niedrigaffiner Cholintransport, den prinzipiell jede Zelle durchführen kann. Unterschiede zwischen den Transportern liegen neben der verschiedenen ausgeprägten Affinität zu Cholin in unterschiedlicher Abhängigkeit vom  $\text{Na}^+$ -Gradienten, sowie in der spezifischen Hemmbarkeit des hochaffinen CHT1 durch Hemicholinium-3 (DUCIS 1988, KUHAR 1978). Der hochaffine Cholintransport ist seit längerem bekannt, das verantwortliche Protein konnte jedoch erst im Jahre 2000 durch Okuda et al. kloniert werden (OKUDA ET AL. 2000A/B). Anfangs vermutete man nach Western Blot Untersuchungen und In Situ Hybridisierung eine Spezifität des CHT1 für cholinerge Neurone (OKUDA ET AL. 2000A). Weitere Untersuchungen konnten CHT1 jedoch auch in nicht-neuronalem Gewebe nachweisen. So zeigten Haberberger et al. 2002 CHT1 mRNA in der menschlichen Haut sowie in der menschlichen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (HABERBERGER ET AL. 2002). Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit kann mit dem Trachealepithel der Ratte ein weiteres, nicht-neuronales CHT1 exprimierendes Gewebe gezeigt werden.

Zum Zeitpunkt der durchgeführten Experimente existierte für den Proteinnachweis noch kein CHT1 spezifisches Antiserum. Dieses

wurde in einer parallel verlaufenden Untersuchung in der Arbeitsgruppe durch Lips et al. 2002 hergestellt und positiv an Motoneuronen der Ratte getestet (LIPS ET AL. 2002). Das Antiserum detektierte CHT1 auch im Trachealepithel der Ratte, hier zeigte sich eine Bevorzugung der apikalen Epithelabschnitte (PFEIL ET AL. 2002, 2003B). Eine genauere Lokalisation des CHT1 Proteins in der apikalen Membran zilien-tragender Zellen konnte durch Elektronenmikroskopie gezeigt werden (PFEIL ET AL. 2003B). Der Nachweis des CHT1 Proteins bestätigte die mRNA Expressionsbefunde dieser Arbeit.

Auf funktioneller Ebene ließ sich bisher nicht eindeutig klären, ob das im Trachealepithel generierte ACh in das Tracheallumen oder aber abluminal in den Interzellularrspalt entlassen wird. Da sich in der Elektronenmikroskopie wie auch in der Immunfluoreszenz eine deutliche Lokalisation von CHT1 in der apikalen Membran zilientragender Zellen zeigte, liegt der Verdacht nahe, dass es hier zu einer erhöhten Aufnahme von Cholin in die Zelle kommt. Cholin ist ein Abbauprodukt von ACh. Demnach ist anzunehmen, das ACh von zilientragenden Zelle nach luminal abgegeben wird. Hier kann ACh zur parakrinen Kommunikation zwischen Nachbarzellen dienen. Nach der Spaltung des ACh in seine Bestandteile Cholin und Acetat wird Cholin über den CHT1 in das Trachealepithel aufgenommen. Eine neue Untersuchung von Moffatt et al. konnte dagegen zeigen, dass eine nicht-neuronale Freisetzung von ACh aus dem Trachealepithel der Maus nach abluminal, in den Interzellularrspalt erfolgt (MOFFATT ET AL. 2004). Hier ist

ACh an der durch Serotonin induzierten Kontraktion der glatten Muskulatur beteiligt (MOFFATT ET AL. 2004). Der epitheliale Ursprung des durch Serotonin freigesetzten ACh zeigt sich daran, dass nach Entfernung des Epithels, die Kontraktion der glatten Muskulatur nach Serotoninapplikation deutlich geringer ausfiel (MOFFATT ET AL. 2004). Diese Beobachtung zeigt, dass nicht-neuronales, epithelial synthetisiertes ACh nach abluminal abgegeben wird und dort maßgeblich an der Kontraktion glatter Muskulatur der Trachea der Maus beteiligt ist (MOFFATT ET AL. 2004).

Lips et al. konnten CHT1 mittels RT-PCR, Western Blot und Immunfluoreszenz in arteriellen Gefäßen der Ratte sowie beim Menschen nachweisen (LIPS ET AL. 2003). Es zeigte sich ein Vorkommen in Endothelzellen, glatter Muskulatur sowie in Fibroblasten (LIPS ET AL. 2003). Neben der Existenz von CHT1 mRNA und Protein wurde die hochaffine Cholinaufnahme mittels autoradiografischer Mikro-Imaging Technik an thorakalen Aortenabschnitten der Ratte gezeigt (LIPS ET AL. 2003). In den Untersuchungen zeigten sich zwei wesentliche Befunde. Zum einen fanden sich in neuronalem und nicht-neuronalem Gewebe unterschiedlich große CHT1 Proteine (LIPS ET AL. 2003). Im Hippocampus konnte neben einem Protein von 50 kD ein weiteres mit 78 kD nachgewiesen werden (LIPS ET AL. 2003). In nicht-neuronalem Gewebe fand sich dagegen lediglich ein Protein von 50 kD (LIPS ET AL. 2003). Zum anderen zeigte sich in der autoradiografischen Mikro-Imager Technik eine unterschiedliche Cholinaufnahme zwischen Endothelzellen und

neuronalen Zellen (LIPS ET AL. 2003). Diese wurde auch in früheren Untersuchungen an Endothelzellen von Gefäßen verschiedener Gewebe gezeigt (ESTRADA ET AL. 1990, GALEA ET AL. 1992, ALLEN ET AL. 2001). Wodurch diese unterschiedliche Kinetik bedingt wird, ist bisher noch ungeklärt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die mRNA für den hochaffinen CHT1 mittels RT-PCR im Trachealepithel der Ratte nachweisen lässt. In Immunfluoreszenz und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigt sich eine bevorzugte Lokalisation in der apikalen Membran zilienträger Zellen. Hier erfolgt eine vermehrte Cholinaufnahme, so dass eine vorherige ACh Abgabe ins Tracheallumen als wahrscheinlich anzunehmen ist. Untersuchungen von Lips et al. (2003) zeigten unterschiedlich großen CHT1 Proteine in neuronalem und nicht-neuronalem Gewebe. Darüber hinaus zeigte sich eine unterschiedliche Kinetik der Cholinaufnahme zwischen Endothel- und neuronalen Zellen (ESTRADA ET AL. 1990, GALEA ET AL. 1992, ALLEN ET AL. 2001, LIPS ET AL. 2003). Wodurch diese unterschiedliche Kinetik bedingt ist, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geklärt werden.

### **4.3 ChAT**

Die ChAT ist ein Enzym, welches in einer ganzen Reihe nicht-neuronaler Gewebe nachgewiesen werden konnte, z.B. in Pulmonalarterien, Endothelzellen von Hautgefäßen und Endothelzellen aus Kapillaren der

Hirnrinde (GONZALEZ ET AL. 1987, REINHEIMER ET AL. 1998, HABERBERGER ET AL. 2000B). Es dient zur Synthese von ACh aus Cholin und AcetylCoA. Neben ChAT ist auch die, z.B. in Herz- und Skelettmuskulatur, vorkommende Carnitinacetyltransferase zur ACh Synthese befähigt (WHITE ET AL. 1973, TUCEK ET AL. 1982). ChAT übernimmt jedoch den weitaus größeren Anteil an der ACh Synthese. Neuere Untersuchungen zeigten, dass sich ChAT im zentralen und peripheren Nervensystem hinsichtlich mRNA und Proteinstruktur unterscheidet. Man spricht deshalb von einer cChAT (common form) und einer pChAT (peripheral form), die eine Spleißvariante der ChAT darstellt (TOOYAMA ET AL. 2000). Mit Hilfe von RT-PCR, laserunterstützter Mikrodisektion, Expressionsstudien dieser Arbeit und In Situ Hybridisierung gelang erstmals für das Trachealepithel der Ratte der Nachweis, dass hier eine zu zentralen cholinergen Neuronen sequenzidentische ChAT Form vorliegt (PFEIL ET AL. 2001). So ist die molekulare Identität der trachealen ChAT mRNA der Ratte als cChAT nachgewiesen (PFEIL ET AL. 2001).

Es ist bekannt, dass ChAT auch in nicht-neuronalem Gewebe existiert. So konnte ein ChAT Protein mittels Immunfluoreszenz und Western Blot in menschlichen Oberflächenepithelien, wie z.B. in Bronchus, Dick- und Dünndarm sowie Haut gezeigt werden (KLAPPROTH ET AL. 1997). Des weiteren konnten ChAT Enzymaktivität sowie die Existenz von ACh mittels „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC) dargestellt werden (KLAPPROTH ET AL. 1997). Es zeigte sich, dass in den verschiedenen Geweben unterschiedlich hohe ChAT und ACh Konzen-

trationen vorliegen, die einen Zusammenhang aufwiesen (KLAPPROTH ET AL. 1997). So besitzen Zellen mit hoher ChAT Konzentration auch eine höhere Konzentrationen an ACh, wohingegen Zellen mit geringerer ChAT Konzentration niedrigere ACh Konzentrationen zeigten (KLAPPROTH ET AL. 1997). Aus diesen Untersuchungen ergibt sich, dass ChAT in Oberflächenepithelien nicht nur existent, sondern auch aktiv an der ACh Synthese dieser Zellen beteiligt ist (KLAPPROTH ET AL. 1997).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Trachealepithel der Ratte eine zu zentralen cholinergen Neuronen sequenzidentische ChAT Form vorliegt (PFEIL ET AL. 2001). Neben dem Protein konnten des weiteren für verschiedene Gewebe unterschiedlich hohe ChAT Konzentrationen gezeigt werden. Diese steht in direktem Zusammenhang mit der unterschiedlich hohen ACh Konzentration der Gewebe (KLAPPROTH ET AL. 1997).

#### **4.4 VACHT**

Mit Hilfe des VACHT erfolgt in neuronalen Zellen die vesikuläre Speicherung von ACh. Für nicht-neuronale Zellen konnte eine vesikuläre Speicherung bisher nicht nachgewiesen werden. Erste Untersuchungen von Kirkpatrick et al. zeigten mittels Elektronenmikroskopie an Endothelzellen eine Assoziation des VACHT zu intrazellulären Vesikeln (KIRKPATRICK ET AL. 2001).

Eine Besonderheit für VACHT liegt in seiner Gen-Lage. Die gesamte für VACHT kodierende Sequenz befindet sich zwischen den ersten beiden nicht-kodierenden Exons (R,N) des ChAT-Gens (ERICKSON ET AL. 1994, BEJANIN ET AL. 1994). Diese verschachtelte Gen-Lage gab dem Komplex den Namen „cholinerges Genlokus“ (ERICKSON ET AL. 1994). In Neuronen erfolgt eine kooperative Expression beider Gene. Diese konnte für nicht-neuronales Gewebe bisher nicht gezeigt werden (ERICKSON ET AL. 1994, BERRARD ET AL. 1995, MISAWA ET AL. 1995).

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf dem Nachweis der mRNA und des Proteins für VACHT im Trachealepithel der Ratte. Der Nachweis erfolgte mittels RT-PCR nach laserunterstützter Mikrodissektion, eine Methode, die es erstmals erlaubt, einzelne Bestandteile des „cholinergen Genlokus“ In Situ zu analysieren (KUMMER ET AL. 1998). Mittels dieser Methode konnte der Nachweis erbracht werden, dass sich eine mRNA Form für VACHT im apikalen, zellkernfreien Anteil des Trachealepithels der Ratte befindet. Neben dem Nachweis auf transkriptioneller Ebene erfolgte darüber hinaus mittels Immunfluoreszenz der Proteinnachweis für VACHT im Trachealepithel der Ratte. Hier zeigte sich, dass nur sekretorische Zellen VACHT positiv waren. Die anderen Populationen der 6 verschiedenen Zelltypen zeigten dagegen kein Vorkommen von VACHT Protein.

Mittels der laserunterstützten Mikrodissektion konnte aufgrund technischer Gegebenheiten nicht zwischen den verschiedenen

Zelltypen unterschieden werden. Es ließ sich nur feststellen, dass sich im apikalen, zellkernfreien Trachealepithel mRNA für VACHT detektieren lässt. Ob nun alle Zellen gleichermaßen ein mRNA Vorkommen von VACHT haben und nur sekretorische Zellen auch tatsächlich VACHT Protein synthetisieren oder aber nur sekretorische Zellen mRNA für VACHT besitzen, lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht klären. Dagegen ist eindeutig, dass sich VACHT Protein in sekretorischen Zellen befindet und somit eine vesikuläre ACh Speicherung theoretisch möglich ist. Ob diese vesikuläre Speicherung tatsächlich vollzogen wird, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Zu überlegen wäre, ob Trachealepithelzellen, die kein VACHT Protein enthalten, wie z.B. zilienträgende Zellen, Basalzellen u.a., ACh frei im Zytosol oder aber mittels Ersatzmechanismen speichern können.

In weitergehenden immunhistochemischen Untersuchungen konnten Lips et al. zeigen, dass die Zellen des Trachealepithels, die kein VACHT Protein in der Immunfluoreszenz zeigten, an der apikalen Membran positiv für OCT1 und OCT2 Protein waren, OCT3 war basolateral lokalisiert (LIPS ET AL. 2004). Dagegen zeigten sekretorische Trachealepithelzellen, die VACHT Protein enthalten, kein Vorkommen von OCT Protein (LIPS ET AL. 2004). Wessler et al. konnten für die Plazenta zeigen, dass die OCT Isoformen 1 und 3 für die Freisetzung von nicht-neuronal synthetisiertem ACh verantwortlich sind (WESSLER ET AL. 2001B). Die Vermutung liegt nahe, dass am Trachealepithel der Ratte auch in Zellen, die kein VACHT Protein enthalten, ACh über OCT freigesetzt

werden kann. In solchen OCT-positiven Zellen kann ACh entweder frei im Zytoplasma oder aber in bisher nicht bekannten Speicherformen vorliegen. Die Freisetzung des ACh durch OCT ist abhängig vom Konzentrationsgradienten und vom Membranpotential, eine vermehrte Freisetzung wäre beispielsweise durch Depolarisation zu erwarten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Trachealepithel der Ratte mRNA für VAcHT existiert. Darüber hinaus konnte mittels Immunfluoreszenz VAcHT Protein in sekretorischen Becherzellen nachgewiesen werden. Andere Zellen des Trachealepithels zeigten dagegen keine VAcHT-Immunreaktivität. Neuerliche Untersuchungen zeigten mittels Immunfluoreszenz in der apikalen Membran von Trachealepithelzellen, die kein VAcHT Protein enthalten, OCT Protein (LIPS ET AL. 2004). OCT ist an der Plazenta für die Freisetzung von nicht-neuronalem ACh verantwortlich (WESSLER ET AL. 2001B). Es ist somit gut vorstellbar, dass Trachealepithelzellen, die OCT enthalten, ACh entweder frei im Zytoplasma oder aber in bisher nicht bekannter Speicherform enthalten und über OCT ins Tracheallumen abgeben.

#### **4.5 Funktionelle Bedeutung nicht-neuronaler cholinerges Komponenten**

Am Trachealepithel reguliert ACh eine Vielzahl von Funktionen. Es steigert die Schlagfrequenz der Zilien (WESSLER ET AL. 2001D), stimuliert den Wasser und apikalen Cl<sup>-</sup>-Transport (ACEVEDO 1994), stimuliert die Muzinsekretion (DWYER ET AL. 1992), GM-CSF Freisetzung (KLAPPROTH ET AL. 1998), die epitheliale Proliferation (KLAPPROTH ET AL. 1997) und ist wahrscheinlich an der Kontrolle von Zell-Zell-Kontakten beteiligt (vgl. WANNER ET AL. 1996).

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit sowie weiterer Untersuchungen der Arbeitsgruppe (PFEIL ET AL. 2003A/B) wurde bisher eine luminalen Sekretion des epithelial synthetisierten ACh angenommen. Pfeil et al. konnten mittels Elektronenmikroskopie sowie Immunfluoreszenz zeigen, dass dieser hochaffine, für die Wiederaufnahme von Cholin verantwortliche Transporter CHT1 in der luminalen Membran der zilien-tragenden Zellen gelegen ist (PFEIL ET AL. 2003A). In der vorliegenden Arbeit gelang mittels Immunfluoreszenz der Nachweis, dass sich das VAcHT-Protein in den Vesikeln der sekretorischen Zellen befindet, deren Sekretion erfolgt nach luminal. Die bekannten epithelialen Wirkungen des ACh können über dieses nach luminal sezernierte ACh vermittelt werden, eine apikale Lokalisation von cholinergen Rezeptoren vorausgesetzt. Darüber hinaus ist an eine cholinerge Regulation intraluminal befindlicher Zellen, wie z.B. Makrophagen, zu denken. Für Peritonealmakrophagen ist eine über nikotinische alpha-7 Rezep-

toren vermittelte anti-inflammatorische cholinerge Wirkung bekannt (BOROVIKOVA ET AL. 2000, WANG ET AL. 2003) und auch die Aktivierung von Alveolarmakrophagen wird durch Nikotin gedämpft (MATSUNAGA ET AL. 2001). Neben dieser luminalen Sekretion konnte kürzlich eine basal gerichtete Abgabe von ACh gezeigt werden. Bei der Maus führt exogene Applikation von Serotonin zu einer Bronchokonstriktion, die zu einem größeren Anteil nicht direkt, sondern durch ACh-Freisetzung aus dem Epithel erfolgt (MOFFATT ET AL. 2004). Da weder CHT1 in der basolateralen Membran noch VAcHT in basal sezernierten Vesikel nachweisbar ist, unterscheidet sich die basale ACh-Freisetzung in ihren molekularen Komponenten von der luminalen. In immunhistochemischen Untersuchungen von Lips et al. konnte gezeigt werden, dass diejenigen Zelltypen des Trachealepithels, die kein VAcHT Protein in der Immunfluoreszenz zeigten, an der apikalen Membran positiv für OCT1 und 2 und basolateral für OCT3 Protein waren (LIPS ET AL. 2004). An der Plazenta gelang für OCT3 der Nachweis, dass dieser an der Freisetzung von ACh beteiligt ist (WESSLER ET AL. 2001B). Somit ist OCT3 ein Kandidat für die basolaterale ACh-Freisetzung im respiratorischen Epithel.

### 5 Zusammenfassung

Nachmansohn und Machado zeigten 1943, dass neuronales ACh durch die ChAT aus AcetylCoA und Cholin synthetisiert wird (NACHMAN-SOHN ET AL. 1943). Cholin wird über den hochaffinen CHT1 in die Zelle aufgenommen. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der ACh Synthese (OKUDA ET AL. 2000A/B, APPARSUNDARAM ET AL. 2000). Der hochaffine Cholintransport ist seit längerem bekannt, das verantwortliche Protein konnte erst im Jahre 2000 durch Okuda et al. kloniert werden (OKUDA ET AL. 2000A/B). ACh existiert nachgewiesenermaßen in nicht-neuronalen Geweben. Einzelne, nicht-neuronale Komponenten des cholinergen Systems konnten bisher in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe, wie z.B. in Haut/Haarfollikeln, Pulmonalarterien und Keratinozyten, mittels verschiedenster Methoden nachgewiesen werden (JOHANSSON ET AL. 1993, GRANDO ET AL. 1993, HABERBERGER ET AL. 2000). Die bisherigen Untersuchungen über nicht-neuronale Komponenten des cholinergen Systems wiesen bisher nur einzelne Bestandteile in verschiedenen Geweben nach. Ein Nachweis, dass CHT1, ChAT und VAChT gleichzeitig im selben nicht-neuronalen Gewebe existieren, wurde bisher nicht erbracht. Daraus ergeben sich, exemplarisch für das Trachealepithel der Ratte, folgende Fragestellungen:

1. Lassen sich auf molekularer Ebene die mRNAs von CHT1, VAChT und ChAT im Trachealepithel der Ratte nachweisen?
2. Kann darüber hinaus VAChT Protein mittels Immunfluoreszenz im Trachealepithel gezeigt werden?
3. Ist es mit Hilfe der laserunterstützten Mikrodissektion möglich, Trachealepithel der Ratte für eine anschließende mRNA Analyse zu gewinnen?
4. Kann eine differenzierte Isolierung der einzelnen Trachealepithelzellen mittels der laserunterstützten Mikrodissektion erfolgen?

Mittels der laserunterstützten Mikrodissektion ist es aufgrund technischer Gegebenheiten des Lasers sowie der Vorbereitung der Trachealschnitte zur Mikrodissektion nicht möglich, einzelne der 6 verschiedenen Zelltypen des Trachealepithels gezielt zu isolieren. Es konnte jedoch für den Gesamtverband mRNA für CHT1, ChAT und VAcHT nachgewiesen werden. Darüber hinaus gelang es durch Immunfluoreszenzuntersuchungen am selben Gewebe, das VAcHT Protein in den Vesikeln sekretorischer Zellen im apikalen Zellanteil nachzuweisen. Demzufolge speichern im Epithel nur sekretorische Zellen ACh vesikulär und setzen es dann exozytotisch frei. In anderen Zelltypen des Trachealepithels scheint eine andere Speicher- bzw. Freisetzungsform vorzuliegen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit sowie weiterer Untersuchungen der Arbeitsgruppe (PFEIL ET AL. 2003A/B) ist eine luminal Sekretion des epithelial synthetisierten ACh anzunehmen. Hier kann ACh zum einen an der Steuerung epithelialer Funktionen, wie z.B. Steigerung der Schlagfrequenz von Zilien oder Stimulation der Muzinfreisetzung, beteiligt sein (DWYER ET AL. 1992, WESSLER ET AL. 2001D). Darüber hinaus ist an eine cholinerge Regulation intraluminal befindlicher Zellen, wie z.B. Makrophagen, zu denken. Neben dieser luminalen Sekretion konnte kürzlich eine basal gerichtete Abgabe von ACh gezeigt werden. Moffatt et al. zeigten eine durch Serotonin vermittelte Bronchokonstriktion, welche maßgeblich durch ACh-Freisetzung aus dem Epithel induziert wurde (MOFFATT ET AL. 2004). Für die basolaterale ACh-Freisetzung im respiratorischen Epithel ist am ehesten OCT3 verantwortlich, da weder CHT1 in der basolateralen Membran noch VAcHT in basal sezernierten Vesikel nachweisbar ist (LIPS ET AL. 2004). Zusammenfassend weist das Trachealepithel an der luminalen Seite die von Neuronen bekannten molekularen Komponenten des cholinergen Systems auf, während eine basolaterale Freisetzung über andere Wege erfolgt.

## 5 Abstract

In 1943 Nachmansohn and Machado demonstrated that neuronal acetylcholine (ACh) is synthesized by the enzyme choline acetyltransferase (ChAT) from acetylCoA and choline (NACHMANSOHN ET AL. 1943). The rate-limiting step in ACh synthesis is choline uptake into the cell via the membrane-bound high-affinity choline transporter, CHT1 (OKUDA ET AL. 2000A, B, APPARSUNDARAM ET AL. 2000). While the kinetics of this transport have been known for long time, the transporter itself has been cloned rather recently by Okuda et al. (OKUDA ET AL. 2000A, B). ACh is not restricted to the nervous system but exists also in non-neuronal tissues. Individual components of the cholinergic system have been identified by several methods in a variety of cells and tissues, e.g. keratinocytes, skin, hair follicles, and pulmonary arteries (JOHANSSON ET AL. 1993, GRANDO ET AL. 1993, HABERBERGER ET AL. 2000). These studies have focussed only upon individual components of the cholinergic system while a simultaneous demonstration of CHT1, ChAT and VAcHT within the same tissue is so far lacking. Thus, the following questions have been raised and investigated in the rat tracheal epithelium, serving as a model system:

1. Does the rat tracheal epithelium express mRNAs coding for CHT1, ChAT and VAcHT?
2. Can VAcHT protein be detected in tracheal epithelial cells by immunofluorescence?
3. Is laser-assisted cell picking a suitable method to collect tracheal epithelium for RT-PCR analysis?
4. Does laser-assisted cell picking allow to isolated individual epithelial cell types from the tracheal epithelium?

Due to technical limits of the laser system as well as due to the methodological requirements for preparation of tissue sections it

## Abstract

---

turned out to be impossible to isolate either of the 6 different epithelial cell types individually. In conjunction, however, rat tracheal epithelium could be collected by laser-assisted cell picking and expression of CHT1, ChAT and VACHT was detectable in these samples by RT-PCR. VACHT protein was localized in secretory vesicles of secretory epithelial cells by means of immunofluorescence. Hence, vesicular storage and exocytotic release of ACh in the epithelium appears to be restricted to secretory cells while other epithelial cells store and release ACh via different mechanisms. These data, together with further findings obtained by our laboratory (PFEIL ET AL. 2003), suggest a luminal release of ACh in the rat trachea. Here, ACh participates in the regulation of epithelial functions such as increase in ciliary beat frequency and stimulation of mucous secretion (DWYER ET AL. 1992, WESSLER ET AL. 2001D). In addition, a cholinergic influence on intraluminal cells, e.g. macrophages, has to be considered. Besides this luminal secretion, a basally directed release has recently been shown. Moffatt et al. demonstrated that serotonin-induced constriction of the mouse trachea is, to a large extent, mediated by ACh released from the epithelium (MOFFAT ET AL. 2004). This release is most likely mediated by OCT3 (LIPS ET AL. 2004) since neither basally located VACHT positive vesicles nor CHT1 in the basolateral membrane could be detected in the present study. In conclusion, tracheal epithelial cells exhibit at their luminal side molecular components of the neuronal cholinergic system whereas basolateral release of ACh is mediated differently.

## 6 Literaturverzeichnis

- ACEVEDO M (1994) Effect of acetylcholine on ion transport in sheep tracheal epithelium. *Pflügers Arch*, 427: 543-546
- ADAMIC S (1972) Effects of quaternary ammonium compounds on choline entry into the rat diaphragm muscle fibre. *Biochem Pharmacol*, 21: 2925-29
- ALLEN DD, SMITH QR (2001) Characterization of the blood-brain barrier choline trans-porter using the in situ rat brain perfusion technique. *J Neurochem*, 76: 1032-1041
- APPARSUNDARAM S, FERGUSON SM, GEORGE AL, BLAKELY RD (2000) Molecular cloning of a human, hemicholinium-3-sensitive choline transporter. *Biochem Biophys Res Commun*, 276: 862-867
- BARNES PJ, CHUNG KF, PAGE CP (1998) Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev*, 50: 515-596
- BECKER I, BECKER KF, ROHRL MH, HOFER H (1997) Laser-assisted preparation of single cells from stained histological slides for gene analysis. *Histochem Cell Biol*, 108: 447-451
- BEJANIN S, CERVINI R, MALLET J, BERRARD S (1994) A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. *J Biol Chem*, 269: 21944-21947

- BERRARD S, VAROQUI H, CERVINI R, ISRAEL M, MELLET J, DIEBLER MF (1995) Coregulation of two embedded gene products, cholineacetyltransferase and the vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem*, 65: 939-942
- BEYER G, WENSE UT (1936) Über den Nachweis von Hormonen in einzelligen Tieren. Cholin und Acetylcholin im Paramecium. *Pflügers Arch Gesamte Physiol Mensch Tier*, 237: 417-422
- BLOC A, BUGNARD E, DUNANT Y, FALK-VAIRANT J, ISRAEL M, LOCTIN F, ROULET E (1999) Acetylcholine synthesis and quantal release reconstituted by transfection of mediatophore and choline acetyltransferase cDNAs. *Eur J Neurosci*, 11: 1523- 1534
- BOROVIKOVA LV, IVANOVA S, ZHANG M, YANG H, BOTCHKINA GI, WATKINS LR, WANG H, ABUMRAD N, EATON JW, TRACEY KJ (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405: 458-462
- BÜLBRING E, BURN JH, SHELLEY HJ (1953) Acetylcholine and ciliary movement in the gill plate of *Mytilus edulis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 141: 445-466
- CAVANAGH HD, COLLEY AM (1989) The molecular basis of neurotrophic keratitis. *Acta Ophthalmol Suppl*, 192: 115-134
- COMLINE RS (1946) Synthesis of acetylcholine by non-nervous tissue. *J Physiol*, 105: 6-7

- DARVESH S, MACDONALD SE, LOSIER AM, MARTIN E, HOPKINS DA, ARMOUR JA (1998) Cholinesterase in cardiac ganglia and the modulation of canine intrinsic cardiac neuronal activity. *J Auton Nerv Syst*, 71: 75-84
- DOLECAL V, TUCEK S (1983) The synthesis and release of acetylcholine in normal and denervated rat diaphragms during intubation in vitro. *J Physiol*, 334: 461-474
- DUCIS I (1988) The high-affinity choline uptake system. VP Whittaker (ed): *Handbook of Experimental Pharmacology, Vol 86, Springer Verlag Berlin*, 409-437
- DWYER TM, SZE BENI A, DIVEKI K, FARLEY JM (1992) Transient cholinergic glycoconjugate secretion from swine tracheal submucosal gland cells. *Am J Physiol*, 262: L418-426
- ERICKSON JD, VAROQUI H, SCHÄFER MK, MODI W, DIEBLER MF, WEIHE E, RAND J, EIDEN L, BONNER T, USDIN TB (1994) Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a cholinergic gene locus. *J Biol Chem*, 269: 21929-21932
- ESTRADA C, BREADY J, BERLINER J, CANCELLA PA (1990) Choline uptake by cerebral capillary endothelial cells in culture. *J Neurochem*, 54: 1467-1473
- EWINS AJ (1914) Acetylcholine, a new active principle of ergot. *Biochem J*, 8: 44-49

- FALK-VAIRANT J, CORREGES P, EDER-COLLI L, SALEM N, ROULET E, BLOC A, MEUNIER F, LESBATS B, LOCTIN F, SYNGUELAKIS M, ISRAEL M, DUNANT Y (1996) Quantal acetylcholine release induced by mediatophore transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 5203-07
- FINK L, SEEGER W, ERMERT L, HANZE J, STAHL U, GRIMMIGER F, KUMMER W, BOHLE RM (1998) Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med*, 4: 1329-33
- FINK L UND BOHLE RM (1999) mRNA-Analyse nach Laser-assistiertem Zell-Picking aus komplexen Geweben. *Biospekt*, 414-417
- FINK L, KINFE T, STEIN MM, ERMERT L, HÄNZE J, KUMMER W, SEEGER W, BOHLE RM (2000) Immunostaining and laser-assisted cell picking for mRNA analysis. *Lab Invest*, 80: 327-333
- FUJI T, KAWASHIMA K (2001) An independent non-neuronal cholinergic system in lymphocytes. *Jpn J Pharmacol*, 85: 11-5
- FUJI T, TSUCHIYA T, YAMADA S, FUJIMOTO K, SUZUKI T, KASAHARA T, KAWASHIMA K (1996) Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. *J Neurosci Res*, 44: 66-72
- GALEA E, ESTRADA C (1992) Ouabain-sensitive choline transport system in capillaries isolated from bovine brain. *J Neurochem*, 59: 936-941
- GONZALEZ JL, SANTOS-BENITO FF (1987) Synthesis of acetylcholine by endothelial cells isolated from rat brain cortex capillaries. *Brain Res*, 412: 148-150

- GUIDRY G, LANDIS SC (1998) Target-dependent development of the vesicular acetylcholine transporter in rodent sweat gland innervation. *Dev Biol*, 199: 175-184
- GRANDO SA (1997A) Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2: 41-48
- GRANDO SA, HORTON RM (1997B) The keratinocyte cholinergic system: acetylcholine as an epidermal cytotransmitter. *Curr Opin Dermatol*, 4: 262-268
- GRANDO SA, HORTON RM, MAURO TM, KIST DA, LEE TX, DAHL MV (1996) Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *J Invest Dermatol*, 107: 412-418
- GRANDO SA, KIST DA, QI M, DAHL MV (1993) Human keratinocytes synthesize, secrete and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol*, 101: 32-36
- GRUBE D (1980) Immunoreactivities of gastrin (G-) cells. II. Non specific binding of immunoglobulins to G-cells by ionic interactions. *Histochemistry*, 66: 149-167
- HABERBERGER R V, PFEIL U, LIPS K S, KUMMER W (2002) Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin. *J Invest Dermatol*, 119: 943-948

- HABERBERGER RV, BODENBENNER M (2000A) Immunohistochemical localization of muscarinic receptors (M2) in the rat skin. *Cell Tissue Res*, 300: 389-396
- HABERBERGER RV, BODENBENNER M, KUMMER W (2000B) Expression of cholinergic gene locus in pulmonary arterial endothelial cells. *Histochem Cell Biol*, 113: 379-387
- HARTMANN E, KILBINGER H (1978) Occurrence of light-dependent acetylcholine concentrations in higher plants. *Experientia*, 30: 1397-1398
- HAURI HP, BUCHER K (1986) Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution. *Anal Biochem*, 159: 386-389
- IKEDA C, MORITA I, MORI A, FUJIMOTO K, SUZUKI T, KAWASHIMA K, MURATA S (1994) Phorbol ester stimulates acetylcholine synthesis in cultured endothelial cells isolated from porcine cerebral microvessels. *Brain Res*, 655:147-152
- JAHN R, SÜDHOF TC (1994) Synaptic vesicles and exocytosis. *Annu Rev Neurosci*, 17: 219-246
- JOHANSSON O, WANG L (1993) Choline acetyltransferase-like immunofluorescence in epidermis of human skin. *Neurobiology (Bp)*, 1: 201-206
- KAWASHIMA K, FUJI T (2000) Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther*, 86: 29-48

- KAWASHIMA K, FUJI T, WATANABE Y, MISAWA H (1998) Acetylcholine synthesis and muscarinic receptors subtype mRNA expression in T-lymphocytes. *Life Sci*, 62: 1701-1705
- KENGAKU M, MISAWA H, DEGUCHI T (1993) Multiple mRNA species of choline acetyltransferase from rat spinal cord. *Brain Res Mol Brain Res*, 18: 71-76
- KIRKPATRICK CJ, BITTINGER F, NOZADZE K, WESSLER I (2003) Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells. *Life Sci*, 72: 2111-2116
- KIRKPATRICK CJ, BITTINGER F, UNGER RE, KRIEGSMANN J, KILBINGER H, WESSLER I (2001) The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. *Jpn J Pharmacol*, 85: 24-28
- KLAPPROTH H, REINHEIMER T, METZEN J, MÜNCH M, BITTINGER F, KIRKPATRICK CJ, HÖHLE KD, SCHEMAN M, RACKEE K, WESSLER I (1997) Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 355: 515-523
- KLAPPROTH H, RACKEE K, WESSLER I (1994) Modulation of the airway smooth muscle tone by mediators released from cultured epithelial cells of rat trachea. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol (Suppl)*, 349: R72

- KUHAR MJ, MURRIN LC (1978) Sodium-dependent, high affinity choline uptake. *J Neurochem*, 30: 15-21
- KUMMER W, FINK L, DVORAKOVA M, HABERBERGER RV, BOHLE RM (1998) Rat cardiac neurons express the non-coding R-exon (exon1) of the cholinergic gene locus. *Neuroreport*, 9: 2209-2212
- LIND GJ, CAVANAGH HD (1993) Nuclear muscarinic acetylcholine receptors in corneal cells from rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34: 2943-2952
- LIPS KS, PFEIL U, REINERS K, RIMASCH C, KUCHELMEISTER K, BRAUN-DULLAEUS RC, HABERBERGER RV, SCHMIDT R, KUMMER W (2003) Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in rat and human arteries. *J Histochem Cytochem*, 51: 1645-1654
- LIPS KS, PFEIL U, HABERBERGER RV, KUMMER W (2002) Localisation of the high-affinity choline transporter-1 in the rat skeletal motor unit. *Cell Tissue Res*, 307: 275-280
- LOEWI O, NAVRATIL E (1926) Über humorale Übertragbarkeit der Herz-  
nervenwirkung. X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoff.  
*Pflügers Arch*, 214: 678-688
- LOEWI O (1921A) Über humorale Übertragbarkeit der Herznerven-  
wirkung. *Pflügers Arch*, 189: 239-242
- LOEWI O (1921B) Über humorale Übertragbarkeit der Herznerven-  
wirkung. X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoff.  
*Pflügers Arch*, 214: 678-688

- MATSUNAGA K, KLEIN TW, FRIEDMANN H, YAMAMOTO (2001) Involvement of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Suppression of Antimicrobial Activity and Cytokine Responses of Alveolar Macrophages to *Legionella pneumophila* Infection by Nicotine. *The American Association of Immunologists* 6518-6524
- MATSURA J, ICHIKAWA T, MISAWA H (1997) Changes of expression levels of choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter mRNAs after transection of the hypoglossal nerve in adult rats. *Neurosci Lett*, 236: 95-98
- MAUS ADJ, PEREIRA EFR, KARACHUNSKI PI, HORTON RM, NAVANEETHAM D, MACKLIN K, CORTES WS, ALBUQUERQUE EX, CONTI-FINE BM (1998) Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, 54: 779-788
- MILEDI R, MOLENAAR PC, POLAK RL, TAS JWM, VAN DER LAAKEN T (1982) Neuronal and non-neuronal acetylcholine in the rat diaphragm. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 214: 153-168
- MISAWA H, MATSUURA J, ODA Y, TAKAHASHI L, DEGUCHI T (1997) Human choline acetyltransferase mRNAs with different 5'-region produce a 69-kDa major translation product. *Brain Res Mol Brain Res*, 44: 323-333
- MISAWA H, TAKAHASHI R, DEGUCHI T (1995) Coordinate expression of vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in sympathetic superior cervical neurones. *Neuroreport*, 6: 965-68

- MOFFATT JD, COCKS TM, PAGE CP (2004) Role of the epithelium and acetylcholine in mediating the contraction to 5-hydroxytryptamine in the mouse isolated trachea. *Br J Pharmacol*, 141: 1159-1166
- NACHMANSOHN D, MACHADO AL (1943) The formation of acetylcholine. A new enzyme choline acetylase. *J Neurophysiol*, 6: 397-403
- OKUDA T, HAGA T (2000A) Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett*, 484: 92-97
- OKUDA T, HAGA T, KANAI Y, ENDOU H, ISHIHARA T, KATSURA I (2000B) Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci*, 3: 120-125
- PABST R, TSCHERNIG T (1995) Lymphocytes in the lung: an often neglected cell. Numbers, characterization and compartmentalization. *Anat Embryol (Berl)*, 192: 293-9
- PFEIL U, HABERBERGER RV, LIPS K, EBERLING L, GRAU V, KUMMER W (2003A) Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia. *Life Sci*, 72: 2087-2090
- PFEIL U, LIPS KS, EBERLING L, GRAU V, HABERBERGER RV, KUMMER W (2003B) Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 28: 473-477
- PFEIL U, EBERLING L, LIPS KS, HABERBERGER RV, KUMMER W (2002) Expression of the cholinergic gene locus and the high-affinity choline transporter in the rat tracheal epithelium. *XI<sup>th</sup> International Sym-*

*posium on cholinergic mechanismus function and dysfunction, St. Moritz 5.-9.05.2002*

PFEIL U, EBERLING L, LIPS KS, HABERBERGER RV, KUMMER W (2001) Expression des cholinergen Genlokus im Trachealepithel der Ratte. *Ann Anat (Suppl)*, 184

REINHEIMER T, VOGEL P, RACKEE K, BITTINGER F, KIRKPATRICK CJ, SALOGA J, KNOP J, WESSLER I (1998A) Non-neuronal acetylcholine is increased in chronic inflammation like atopic dermatitis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol (Suppl)*, 358: R87

REINHEIMER T, MÜNCH M, BITTINGER F, RACKEE K, KIRKPATRICK CJ, WESSLER I (1998) Glucocorticoids mediate reduction of epithelial acetylcholine content in the airways of rats and humans. *Eur J Pharmacol*, 349: 277-284

REINHEIMER T, BERNEDO P, KLAPPROTH H, OELERT H, ZEISKE B, RACKEE K, WESSLER I (1995) Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig and human: species differences in role of airway mucosa. *Amer J Physiol*, 250: L722-728

ROSSIER (1977) Acetyl-coenzyme A and coenzyme A analogues. Their effects on rat brain choline acetyltransferase. *Biochem J*, 165: 321-326

SASTRY BVR, SADAVONGVIVAD C (1979) Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacol Rev*, 30: 65-132

- SCHÄFER MK, EIDEN LE, WEIHE E (1998) Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. II. The peripheral nervous system. *Neuroscience*, 84: 361-376
- SCHÜTZE K, LAHR G (1998) Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol*, 16: 737-742
- SCHULLER HM, WITSCHI HP, NYLEN E, JOSHI PA, CORREA E, BECKER KL (1990) Pathobiology of lung tumors induced in hamsters by 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and the modulating effect of hyperoxia. *Cancer Res*, 50: 1960-1965
- SONG P, SEKHON HS, JIA Y, KELLER JA, BLUSZTAJN JK, MARK GP (2003) Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res*, 63: 214-221
- SWANN AC, HEWITT LO (1988) Hemicholinium-3 binding: correlation with high-affinity choline uptake during changes in cholinergic activity. *Neuropharmacology*, 27: 611-15
- TOOYAMA I, KIMURA H (2000) A protein encoded by an alternative splice variant of choline acetyltransferase mRNA is localized preferentially in peripheral nerve cells and fibres. *J Chem Neuroanat*, 17: 217-226
- TUCEK S (1982) The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol*, 322: 53-69

- WANG H, YU M, OCHANI M, AMELLA CA, TANOVIC M, SUSARLA S, LI JH, WANG H, YANG H, ULLOA L, ALABDED Y, CZURA CJ, TRACEY KJ (2003) Nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421: 384-388
- WANNER A, SALATHEE M, O,RIORDAN TG (1996) Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med*, 154: 1868-1902
- WESSLER I, KILBINGER H, BITTINGER F, KIRKPATRICK CJ (2001A) The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Jpn J Pharmacol*, 85: 2-10
- WESSLER I, ROTH E, DEUTSCH C, BROCKERHOFF P, BITTINGER F, KIRKPATRICK CJ, KILBINGER H (2001B) Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol*, 134: 951-956
- WESSLER I, KIRKPATRICK CJ (2001C) Role of non-neuronal and neuronal acetylcholine in the airways. *Muscarinic Receptors in Airways Diseases*, edited by Zaagsma J, Meurs H, Roffel F, Birkhäuser Verlag Basel/Schweiz, 25-50
- WESSLER I, KIRKPATRICK CJ (2001D) The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther*, 14: 423-434
- WESSLER I, KIRKPATRICK CJ, RACKEE K (1999) The cholinergic pitfall: acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26: 198-205

## Literaturverzeichnis

---

- WESSLER I, KIRKPATRICK CJ, RACKEE K (1998) Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther*, 77: 59-79
- WHITE HL, WU JC (1973) Choline and carnitine acetyltransferase of heart. *Biochemistry*, 12: 841-846
- WHITTAKER VP (1963) Identification of acetylcholine and related esters of biological origin. *Eichler O, Fahra A, Koelle GB (eds): Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd 15, Springer Verlag Berlin, 1-39*
- WONG LB, MILLER IF, YEATES DB (1988A) Stimulation of ciliary beat frequency by autonomic agonists: in vivo. *J Appl Physiol*, 65: 971-981
- WONG LB, MILLER IF, YEATES DB (1988B) Regulation of ciliary beat frequency by autonomic mechanisms in vitro. *J Appl Physiol*, 65: 1895-1901
- WU D, HERSH LB (1994) Choline acetyltransferase: celebrating its fiftieth year. *J Neurochem*, 62: 1653-1663

## 7 Lebenslauf

Lars Eberling

geboren am 26. 02. 1975

in Berlin Steglitz

- 1987-1994 Paul-Natorp Gymnasium Berlin Friedenau, Abschluss  
Abitur, Note 2,2
- 1994-1995 Technische Universität Berlin, 2 Semester Stadt- und  
Regionalplanung
- 1995-1996 Zivildienst im Klinikum Benjamin Franklin der FU Berlin  
Abteilung für Neurochirurgie
- April 1997 Justus-Liebig Universität Giessen, Studium der Human-  
medizin
- März 1999 Physikum
- März 2000 1. Staatsexamen
- März 2003 2. Staatsexamen, Note 2,6
- April 2003 Wechsel zum Praktischen Jahr an die Freie Universität  
Berlin
- Mai 2004 3. Staatsexamen, Note 1  
Gesamtabschlussnote: 2,3

### **Berufliche Tätigkeiten**

- 1999-2003 Kerkhoff Klinik Bad Nauheim, studentische Aushilfskraft  
Herzchirurgische Intensivstation im Bereich Pflege
- SoSe 2000 Studentische Hilfskraft, Kurs der Makroskopischen  
Neuroanatomie
- WS 2000/01 Studentische Hilfskraft, Kurs der Makroskopischen Ana-  
tomie
- Juli 2004 AIP/Arzt in Weiterbildung, neurologischen Klinik des  
Theodor-Wenzel-Werkes Berlin, CA Dr. med. Bögner

### **Auslandsaufenthalt**

- 02.-04. 2002 Hospital for Sick Children, Abteilung Infectious Diseases,  
Toronto, Canada

### **Danksagung**

Nun ist es also geschafft. Möglich war das ganze nur aufgrund der sagenhaften Betreuung nicht nur während der Durchführung der Versuchsreihen, sondern auch während der Schreibphase. Hier gilt mein größter Dank Wolfgang Kummer und Rainer Haberberger, welche mit unschlagbarer Ruhe für jedes Problem offen waren und immer hilfreiche Verbesserungsvorschläge parat hatten. Ohne die zuversichtlichen Worte von Rainer während der Versuche hätte ich sicherlich nicht nur einmal die Flinte ins Korn geworfen. Daneben danke ich Silke Wiegand, die es mir überhaupt erst ermöglichte mit Pipette, Zell-Picker und PCR umzugehen. Ohne Deine fast immer vorhandene gute Stimmung wäre die Arbeit sicherlich nur halb so angenehm gewesen. Danke auch an Ludger Fink der mir zu jeder Zeit, wenn es mal wieder nicht recht mit dem Zell-picken funktionierte, mit Rat und Tat zur Seite stand. Großer Dank gebührt Uwe Pfeil und Kathrin Lips für die Mitaufnahme meiner Befunde in die jeweiligen Veröffentlichungen. Und natürlich geht mein Dank auch an Björn Stinn mit dem ich Tage und Nächte am Zell-Picker verbracht habe und anschließend jedes noch so kleine Etappenziel gefeiert habe. Es hätte aber sicherlich nur halb soviel Spaß gemacht wenn da nicht auch so sagenhafte Veranstaltungen wie das alljährliche Fußballspiel, die Sport Dies, das Sportabzeichen mit anschließendem Grillen, sagenumwogene Zell-Pick-Nächte sowie die Basketballturniere stattgefunden hätten. In diesem Sinne natürlich auch Dank an das ganze Labor-Team der Anatomie (Peter, Martin, Tamara, Anna, Susti und all den anderen).

## Lebenslauf und Danksagungen

---

Herzlichen Dank für die Hilfe beim Layout und all dem PC-Kampf an Gerhard Dörries.

Ein riesiger Dank geht an meine Eltern Manni und Gisela und meinen Bruder Julian, die mich in jeder Lebenslage unterstützt und an mich geglaubt haben. Natürlich auch an meine Großmutter Ilse Gutzmer, Herrmann und Christa Böttcher und Marianne Franzwa für all die aufmunternden Worte die ihr für mich hattet.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Freundin Sandra bedanken, während der gesamten Zeit immer aufmunternd und zuversichtlich gewesen zu sein, dass die Arbeit zu einem guten Ende kommen wird.

